

**Katalyse und Regulation der E1-Komponente
des humanen Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes
auf molekularer Ebene**

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

Franziska Seifert
(geborene Demuth)

geboren am 28.12.1981 in Halle/Saale

Gutachter:

1. Prof. Dr. K. Tittmann
2. Prof. Dr. G. Sprenger
3. Prof. Dr. R. Ulbrich-Hofmann

Halle (Saale), 07.04.2010

“So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig,
man muss sie für fertig erklären,
wenn man nach Zeit und Umständen
das Möglichste getan hat.”

Johann Wolfgang von Goethe
Italienische Reise 1787

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
1. Einführung	10
1.1. Der Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex – Ein Multienzymsystem	10
1.1.1. Gesamtreaktion, Komponenten und Stöchiometrie	10
1.1.2. Regulation des PDH-Komplexes auf verschiedenen Ebenen	18
1.1.3. Medizinische Relevanz des humanen PDH-Komplexes	25
1.2. Zielstellung der Arbeit	27
2. Material und Methoden	28
2.1. Material	28
2.1.1. Chemikalien	28
2.1.2. Geräte und Verbrauchsmaterialien	29
2.1.3. Material für die molekularbiologischen Arbeiten	30
2.1.4. Stämme	31
2.2. Methoden	31
2.2.1. Molekularbiologische Arbeiten zur Generierung der <i>hsPDH-E2LII</i>	31
2.2.2. Expression und Reinigung der <i>hsPDH-E2LII</i>	35
2.2.3. Expression und Reinigung der <i>hsPDH-E1</i>	36
2.2.4. Konzentrationsbestimmung der untersuchten Proteine mittels UV/Vis-Spektroskopie	37
2.2.5. Thermodynamische und kinetische Methoden	39
2.2.5.1. Analytische Ultrazentrifugation	39
2.2.5.2. Isothermale Titrationskalorimetrie	41
2.2.5.3. CD-Spektroskopie	41
• Sekundärstruktur der <i>hsPDH-E2LII</i>	42
• Bestimmung des K_{app} -Werts für die Bindung von Methylacetylphosphonat	42
• Untersuchung der IP- und AP-Bande des ThDP gebunden an <i>hsPDH-E1</i>	43
2.2.5.4. UV/Vis-Spektroskopie	44
• DCPIP-Test	44
• Kontinuierlicher Aktivitätstest für die reduktive Acetylierung	45
• Aufnahme von Differenzspektren zur Visualisierung des Absorptionssignals der 1',4'-iminofom des PLThDP	46
• <i>stopped-flow</i> -Technik	47
○ Reaktion der <i>hsPDH-E1</i> mit Pyruvat	47
○ Reaktion der <i>hsPDH-E1</i> mit Methylacetylphosphonat	48
○ Reduktive Acetylierung der <i>hsPDH-E2LII</i>	48

2.2.5.5. $^1\text{H-NMR}$	49
• H/D-Austausch	50
• $^1\text{H-NMR-Intermediatanalyse}$	51
2.2.5.6. Massenspektrometrie	51
2.2.6. Strukturelle Methoden	52
2.2.6.1. Röntgenkleinwinkelstreuung	52
2.2.6.2. Kristallisation	53
2.2.6.3. Röntgenstrukturanalyse	53
3. Ergebnisse und Diskussion	54
3.1. <i>hsPDH-E1</i> – Einleitung	54
• C2-Ionisierung	55
• Substratbindung, Decarboxylierung und reduktive Acetylierung	57
• Halbseitenreaktivität	62
3.1.1. Biochemische Charakterisierung der <i>hsPDH-E1</i>	65
3.1.1.1. Expression und Reinigung der <i>hsPDH-E1</i>	65
3.1.1.2. Das Oligomergleichgewicht der <i>hsPDH-E1</i>	66
• Analytische Ultrazentrifugation	66
• Röntgenkleinwinkelstreuung	68
3.1.1.3. Mechanistische Charakterisierung der Halbseitenreaktivität der <i>hsPDH-E1</i> mittels $^1\text{H-NMR}$	70
• H/D-Austausch	70
• $^1\text{H-NMR-Intermediatanalyse}$	75
3.1.1.4. CD-spektroskopische Charakterisierung der IP- und AP-Bande des ThDP in der <i>hsPDH-E1</i> unter Verwendung von Substrat- und Cofaktoranaloga	79
3.1.1.5. Kinetische Untersuchung der Reaktion der <i>hsPDH-E1</i> mit Pyruvat	83
3.1.1.6. Thermodynamische und kinetische Untersuchungen der Reaktion der <i>hsPDH-E1</i> mit Methylacetylphosphonat	86
3.1.2. Mechanistische Untersuchungen der Wechselwirkung und der Acetylierungsreaktion zwischen <i>hsPDH-E1</i> und <i>hsPDH-E2LII</i>	90
3.1.2.1. Expression, Reinigung und Charakterisierung der <i>hsPDH-E2LII</i>	90
3.1.2.2. Protein-Protein-Wechselwirkung	95
• Isothermale Titrationskalorimetrie	95
• Röntgenkleinwinkelstreuung	97
3.1.2.3. Einfluss der <i>hsPDH-E2LII</i> auf die Bindung von Methylacetylphosphonat	102

3.1.2.4. Geschwindigkeit der reduktiven Acetylierung von <i>hsPDH-E2LII</i> durch <i>hsPDH-E1</i> in Abhängigkeit von der Enzym-, Substrat- und Cofaktorkonzentration	103
• Kontinuierlicher Test (UV/Vis-Absorptionsspektroskopie)	108
○ <i>stopped-flow</i>	108
○ Konventionelle UV/Vis-Spektroskopie	111
○ <i>stopped-flow</i> -Experiment mit Photodioden- <i>array</i>	117
• Diskontinuierlicher Test (Massenspektrometrie)	118
3.1.2.5. Untersuchung der Reaktion unter <i>steady-state</i> - und Gleichgewichtsbedingungen mittels $^1\text{H-NMR}$	120
3.1.2.6. Untersuchung der reduktiven Acetylierungsreaktion unter niedrigen KCl-Bedingungen	123
3.1.3. Zusammenfassende Diskussion des Kapitels 3.1.	127
3.2. Untersuchung der Regulation der <i>hsPDH-E1</i> durch Phosphorylierung mit Hilfe von Pseudophosphorylierungs-Varianten – Einleitung	136
3.2.1. Pseudophosphorylierungs-Varianten S264E und S264Q	137
3.2.1.1. ThDP-Bindung	139
3.2.1.2. C2-Ionisierung	141
3.2.1.3. Substratbindung und Decarboxylierung	142
• $^1\text{H-NMR}$ -Intermediatanalyse	142
• Thermodynamische und kinetische Untersuchungen mit dem Substratanalogon Methylacetylphosphonat	144
○ CD-Spektroskopie	145
○ Absorptionsspektroskopie	146
○ <i>stopped-flow</i>	147
3.2.1.4. Untersuchung der reduktiven Acetylierung der Lipoyldomäne <i>hsPDH-E2LII</i>	149
• Kontinuierlicher Test (UV/Vis-Absorptionsspektroskopie)	149
• Diskontinuierlicher Test (Massenspektrometrie)	151
3.2.1.5. Röntgenkristallstruktur der <i>hsPDH-E1</i> -Variante S264E und zusammenfassende Diskussion des Regulationsmechanismus der <i>hsPDH-E1</i> durch Phosphorylierung an Position 264	151
3.2.2. Pseudophosphorylierungs-Varianten S271E und S203E	157
3.2.2.1. ThDP-Bindung	157
3.2.2.2. C2-Ionisierung	159
3.2.2.3. Substratbindung und Decarboxylierung	160
• $^1\text{H-NMR}$ -Intermediatanalyse	160

• Thermodynamische und kinetische Untersuchungen mit dem Substratanalogon Methylacetylphosphonat	161
○ CD-Spektroskopie	161
○ <i>stopped-flow</i>	162
3.2.2.4. Untersuchung der reduktiven Acetylierung der Lipoyldomäne <i>hsPDH-E2LII</i>	163
• Kontinuierlicher Test (UV/Vis-Absorptionsspektroskopie)	163
• Diskontinuierlicher Test (Massenspektrometrie)	164
3.2.2.5. Zusammenfassende Diskussion des Regulationsmechanismus der <i>hsPDH-E1</i> durch Phosphorylierung an den Positionen 271 und 203	165
4. Ausblick	167
5. Literaturverzeichnis	168
6. Anhang	183

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AcThDP	2-Acetyl-thiamindiphosphat
Abs.	Absorption
Amp	Ampicillin
AP	Aminopyrimidin-Form des ThDP
A _{spez}	spezifische Aktivität
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
a.u.	<i>arbitrary units</i>
BCKDC	Verzweigtketten- α -Ketosäure-Dehydrogenase-Komplex
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
CA	Chloramphenicol
CD	Circulardichroismus
CoA	Coenzym A
DCPIP	2,6-Dichlorphenolindophenol (oxidiert)
DTE	1,4-Dithioerythritol
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
ϵ	Extinktionskoeffizient
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E3BP	E3-Bindeprotein
<i>ec</i> PDHc	Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex aus <i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI	<i>electrospray ionization</i>
eq	Gleichgewicht
FAD	Flavinadeninindinukleotid, oxidiert
FADH ₂	Flavinadeninindinukleotid, reduziert
FPLC	<i>fast performance liquid chromatography</i>
Gl.	Gleichung
HEThDP	2-(1-Hydroxyethyl)-thiamindiphosphat
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
<i>hs</i> PDHc	humaner Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex
<i>hs</i> PDH-E1	E1-Komponente des <i>hs</i> PDHc
<i>hs</i> PDH-E2LII	Lipoyldomäne 2 der E2-Komponente des <i>hs</i> PDHc
IP	Iminopyrimidin-Form des ThDP
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
ITC	isothermale Titrationskalorimetrie
kDa	Kilodalton
Kan	Kanamycin

Kap.	Kapitel
KPP	Kaliumphosphatpuffer
λ	Wellenlänge
LB	<i>lysogeny-broth</i> -Medium
LS	Liponsäure
LThDP	2-Laktyl-thiamindiphosphat
MALDI-MS	Matrix-assistierte Laserdesorption/Ionisation - Massenspektrometrie
MAP	Methylacetylphosphonat
NAD	Nikotinsäureamidadenindinukleotid, oxidiert
n.b.	nicht bestimmt
Ni-NTA	Nickel-nitrilotriacetat
NMR	kernmagnetische Resonanz (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
\ominus	Elliptizität
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PDB	Proteinstruktur-Datenbank (<i>protein data base</i>)
PDK	Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase
PDP	Pyruvat-Dehydrogenase-Phosphatase
PLThDP	2-Phosphonolaktyl-thiamindiphosphat
ppm	<i>parts per million</i>
RT	Raumtemperatur
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rotations per minute</i>)
S203E	<i>hsPDH</i> -E1 Variante mit Serin-Glutamat-Austausch an Position 203
S264E	<i>hsPDH</i> -E1 Variante mit Serin-Glutamat-Austausch an Position 264
S271E	<i>hsPDH</i> -E1 Variante mit Serin-Glutamat-Austausch an Position 271
S264Q	<i>hsPDH</i> -E1 Variante mit Serin-Glutamin-Austausch an Position 264
SDS	Natriumlaurylsulfat (<i>sodium dodecylsulfat</i>)
SUMO	<i>small ubiquitin-like modifier</i>
T	Temperatur
t	Zeit
Tab.	Tabelle
TAE Puffer	Tris-Acetat-EDTA Puffer
TCA	Trichloressigsäure
ThDP	Thiamindiphosphat
TOF	Flugzeitanalysator (<i>time-of-flight</i>)
TTDP	Thiaminthiazolondiphosphat
UE	Untereinheit
UV	ultraviolett (<i>ultraviolet</i>)
VIS	sichtbar (<i>visible</i>)

Anmerkungen

Englische Fachausdrücke, die keine adäquate deutsche Übersetzung zulassen, sind in dieser Arbeit kursiv geschrieben. Diese werden unter Umständen auch dann benutzt, wenn ein deutsches Äquivalent existiert.

Dezimalstellen sind im laufenden Text sowie in den Abbildungen und Tabellen durch einen Punkt getrennt.

Für biochemische Fachausdrücke werden die international üblichen Abkürzungen verwendet.

Der Begriff Expression beschreibt im Allgemeinen die Transkription und Translation eines Gens. Der Terminus Proteinexpression wird im Text dieser Arbeit für die Produktion von Proteinen in der Zelle verwendet.

Das Intermediat HET_hDP liegt nach der Reaktion der *hs*PDH-E1 mit Pyruvat als Carbanion/Enamin vor. Durch die Behandlung mit TCA während der NMR-Experimente wird es in seine protonierte Form überführt. Die Bezeichnung HET_hDP wird im Text sowie in den Abbildungen und Tabellen unabhängig vom Protonierungszustand der Intermediatspezies verwendet.

1. Einführung

1.1. Der Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex – Ein Multienzymsystem

1.1.1. Gesamtreaktion, Komponenten und Stöchiometrie

Der Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex (PDH-Komplex, PDHc) gehört neben dem α -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplex und dem Verzweigtketten- α -Ketosäure-Dehydrogenase-Komplex zur Familie der α -Ketosäure-Dehydrogenase-Komplexe und ist eines der größten Multienzymsysteme, das in der Natur zu finden ist. Mit einem Molekulargewicht von 4-10 Megadalton und einem Durchmesser bis zu 500 Å ist er sogar größer als das Ribosom (4.22 MDa). Der PDH-Komplex tritt in fast allen pro- und eukaryotischen Systemen auf. Intensive Forschung während der letzten 50 Jahre haben detaillierte Informationen über diese molekulare Maschine ermöglicht. Studien zu PDH-Komplexen aus verschiedenen Organismen ermöglichten die detaillierte Aufklärung des Aufbaus, der katalysierten Reaktionen und der Regulation. Zu den besonders gut untersuchten PDH-Komplexen gehören u. a. aus dem Reich der Prokaryoten die Komplexe aus *Escherichia coli*, *Acetobacter vinelandii* (beide Gram-negativ) und *Bacillus stearothermophilus* (Gram-positiv), aus dem Reich der Pilze die Komplexe von *Saccharomyces cerevisiae* und *Neurospora crassa* und als pflanzlicher Modellkomplex dient der aus *Arabidopsis thaliana*. Die untersuchten PDH-Komplexe aus Säugetieren stammen aus den verschiedensten Quellen (Herz, Muskel, Niere aus Taube, Rind, Bison, Ratte u. v. m.). Für die Analyse des humanen PDH-Komplexes wird jedoch mit rekombinant gewonnenem Material gearbeitet.

Allen Komplexen gemein ist ihre sequentielle Reaktionsfolge. Das Substrat Pyruvat wird oxidativ zu Acetyl-CoA decarboxyliert (Reaktion 1.1) (Koike et al. 1960).



Diese Reaktion wird in allen Komplexen von mehreren Kopien dreier Enzyme realisiert (Abb. 1.1). Die Thiamindiphosphat-abhängige Pyruvat-Dehydrogenase (E1) bindet Pyruvat unter Bildung von 2-Laktyl-thiamindiphosphat (LThDP). Durch Decarboxylierung entsteht das Intermediat 2-Hydroxyethyl-ThDP (HETHDP) (Reaktion 1.2a). Anschließend überträgt die E1-Komponente die C2-Einheit in Form eines Acetylrestes auf den oxidierten Dithiolanring des Lipoamidarms (E2-Lip-S₂) der Dihydrolipoamid-Acetyltransferase (E2). Dabei wird der Lipoamidarm reduktiv acetyliert (E2-Acetyl-S-Lip-SH) (Reaktion 1.2b). Der Acetylrest wird durch die E2-Komponente auf Coenzym A übertragen, wodurch Acetyl-CoA gebildet wird (Reaktion 1.3). Der reduzierte Lipoamidarm der E2-Komponente (E2-Lip-(SH)₂) wird durch die FAD-abhängige Dihydrolipoamid-Dehydrogenase (E3) reoxidiert (Reaktion 1.4a). Durch Übertragung der Elektronen auf NAD⁺ wird anschließend das FADH₂ der E3-Komponente wieder zu FAD regeneriert (Reaktion 1.4b).

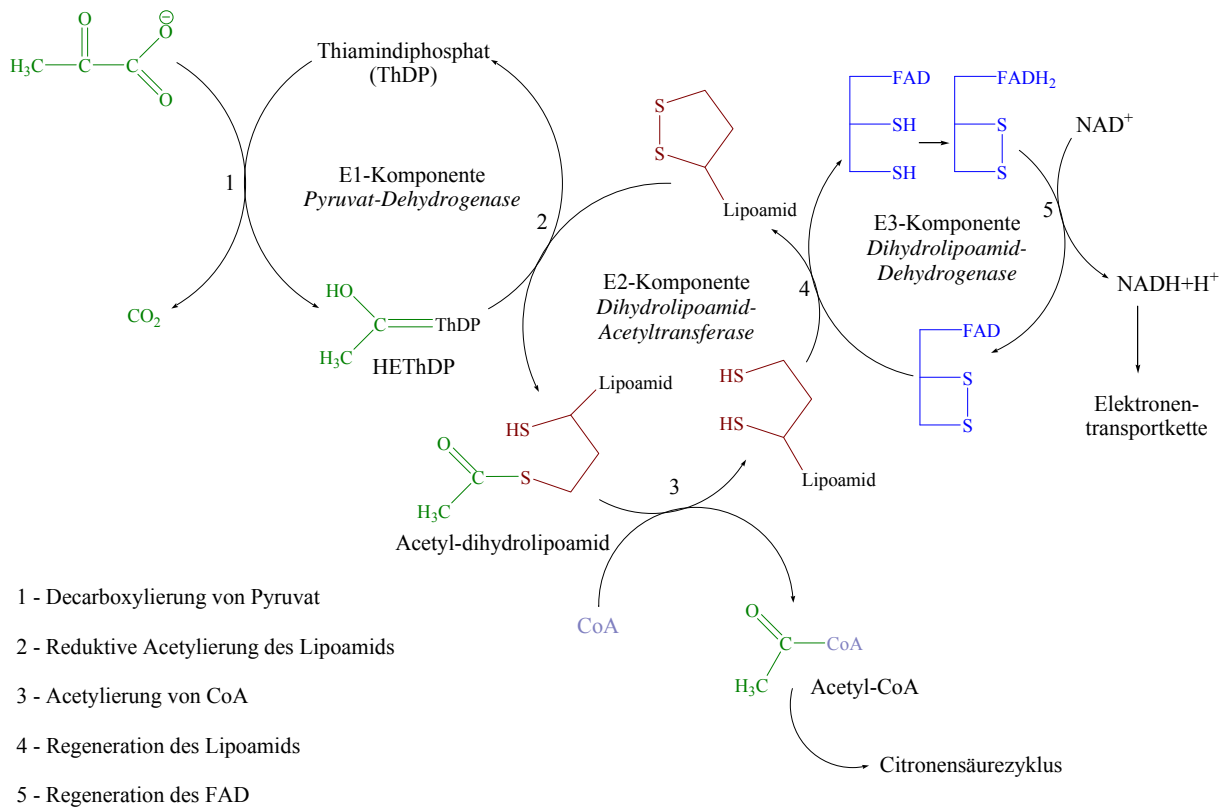
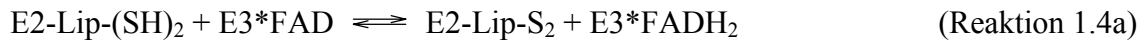
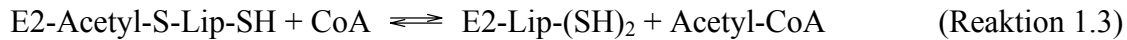
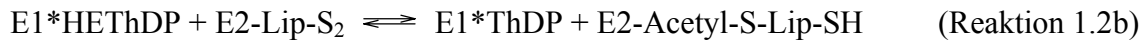


Abb. 1.1. Gesamtreaktion des PDH-Komplexes.

Das Reaktionsprodukt Acetyl-Coenzym A wird anschließend in den Tricarbonsäurezyklus eingespeist oder zur Biosynthese von Fettsäuren und Steroiden verwendet. NADH dient als Elektronendonator für die Elektronentransportkette zur Gewinnung von ATP (Patel und Roche 1990).

In allen Eukaryoten ist der PDH-Komplex in der mitochondrialen Matrix lokalisiert. Präkursor-Proteine aller Untereinheiten werden von nukleären Genen codiert und anschließend in die Mitochondrien transportiert (De Marcucci et al. 1988). In Pflanzen gibt es zusätzlich einen plastidären PDH-Komplex, der Verwandtschaft mit den für Prokaryoten typischen Komplexen zeigt (Tovar-Mendez et al. 2003). Der Aufbau des PDH-Komplexes ist hochstrukturiert. Die E2-Komponente bildet eine Kernstruktur, die von den anderen Komponenten wie eine Schale umgeben wird (Zhou et al. 2001b) (Abb.1.2).

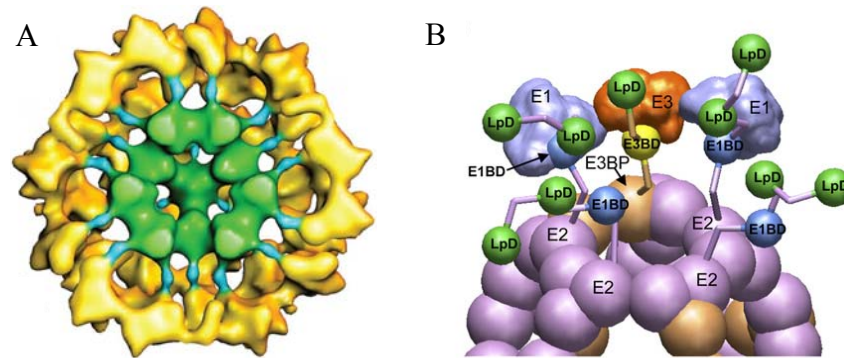


Abb. 1.2. A – Dreidimensionale Darstellung des bovinen PDHc, grün – Kernstruktur, blau – flexible *linker*, gelb – Schale aus E1 und E3 (Zhou et al. 2001b). B – Modell der PDHc – Organisation (BD – Bindedomäne, LpD – Lipoyldomäne) (Yu et al. 2008).

Auf Basis der Morphologie der Kernstruktur werden zwei Arten von Komplexen unterschieden. Eine oktahedrale Anordnung von 24 Untereinheiten der E2-Komponente tritt bei Gram-negativen Bakterien auf. Dagegen weisen Eukaryoten und einige Gram-positive Bakterien eine icosahedrale Anordnung des Kerns mit 60 Molekülen auf. Ein weiterer Unterschied zwischen den beiden Komplexfamilien ist die Oligomerstruktur der E1-Komponenten. Gram-negative Prokaryoten haben eine α_2 -Struktur, bei der anderen Klasse der E1-Komponenten handelt es sich um ein $\alpha_2\beta_2$ -Heterotetramer (Patel und Korochkina 2003). Eine weitere Komponente des PDH-Komplexes ist das E3-Bindeprotein (E3BP). Die ursprünglich als Protein X bezeichnete Komponente tritt nur im eukaryotischen System, jedoch nicht bei Pflanzen (Mooney et al. 2002) auf und vermittelt die Bindung der E3-Komponente (Dihydrolipoyl-Dehydrogenase) an die Kernstruktur (Jilka et al. 1986; Rahmatullah et al. 1989a). In prokaryotischen und pflanzlichen PDH-Komplexen wird diese Funktion von der Bindedomäne der E2-Komponente übernommen, die sowohl E1- als auch E3-Komponente binden kann.

Zusätzlich gibt es zwei weitere an den PDH-Komplex assoziierte regulatorische Enzyme in Eukaryoten mit Ausnahme der pflanzlichen plastidären PDH-Komplexe (Tovar-Mendez et al. 2003). Die Pyruvat-Dehydrogenase-Kinasen (PDKs) und die Pyruvat-Dehydrogenase-Phosphatasen (PDPs) sorgen durch Phosphorylierung/Dephosphorylierung für eine besonders stringente Form der Regulation (Linn et al. 1969b). In vielen Studien konnte gezeigt werden, dass die regulatorischen Enzyme zudem selbst einer komplexen und vom jeweiligen Stoffwechselzustand abhängigen Regulation unterliegen (Patel und Korotchkina 2001; Holness und Sugden 2003; Roche und Hiromasa 2007) (siehe Kap. 1.1.2.).

Im Folgenden sollen die Stöchiometrie und die einzelnen Komponenten in ihrem Aufbau der PDH-Komplexe aus Säugetieren (insbesondere des humanen Komplexes) kurz erläutert werden. Die ersten Präparationen von PDH-Komplexen aus Säugern zeigten, dass es sich um Multienzymsysteme von einigen Millionen Dalton handelte (Schweet et al. 1952; Ishikawa et al. 1966). Intensive Untersuchungen mit verschiedenen biochemischen und biophysikalischen Methoden während der letzten Jahrzehnte ergaben zunächst folgendes Modell: Der

Kernkomplex setzt sich aus 60 Molekülen (20 Trimere) der E2-Komponente und 12 Molekülen des E3-Bindeproteins zusammen (Organismus: *Saccharomyces cerevisiae*) (Stoops et al. 1997). Assoziiert an diese icosahedrale Struktur sind 20-30 E1-Komponenten, 6-12 E3-Komponenten und die regulatorischen Proteine [PDKs (1-3 Moleküle/Komplex) und PDPs (2-3 Moleküle/Komplex)] (Patel und Korochkina 2003).

Eine Studie der Gruppe um ROCHE beschäftigte sich detaillierter mit der Architektur des Kerns der Säugerkomplexe und stellte dem 60/12-Modell (Sanderson et al. 1996; Stoops et al. 1997) ein 48/12-Modell bezüglich E2 und E3BP gegenüber (Hiromasa et al. 2004). Diese Annahme wird, neben den biochemischen Experimenten, durch die Sequenzhomologie von 50% der assoziierenden C-terminalen Domäne von humaner E2 und humanem E3BP unterstützt (Harris et al. 1997). Im Jahr 2006 veröffentlichte die Arbeitsgruppe um LINDSAY eine Arbeit zur Organisation des humanen PDH-Komplexes in der zum einen das 60/12-Modell vertreten wird und zum anderen wird dargestellt, dass die Bindung eines E3-Homodimers durch das E3-Bindeproteine in einer 1:2-Stöchiometrie realisiert wird (Smolle et al. 2006). Die Arbeitsgruppe um CHUANG hingegen geht von einer Stöchiometrie des PDH-Komplexes *in vitro* von E2:E3BP:E1:E3 in einem Verhältnis von 40:20:40:20 aus (Brautigam et al. 2009). In Abbildung 1.3. sind die drei Strukturmodelle des Kernkomplexes gegenübergestellt.

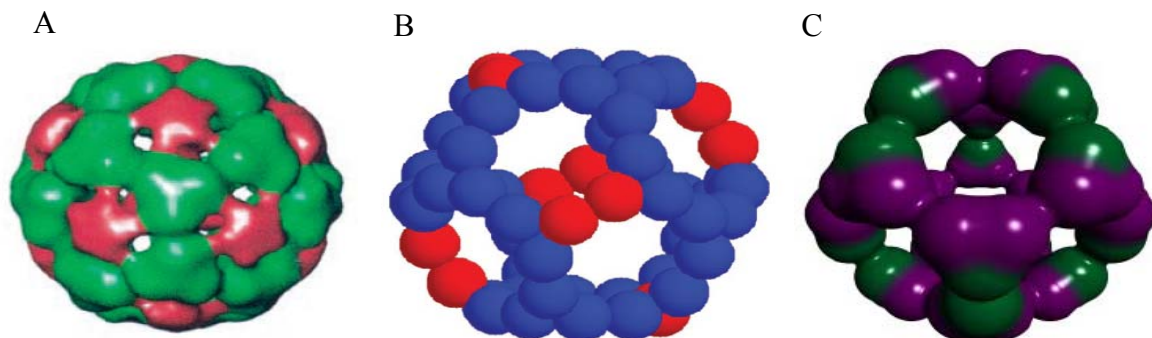


Abb. 1.3. A – 60/12-Modell, E2 – grün, E3BP – magenta (Reed 2001), B – 48/12-Modell, E2 – blau, E3BP – rot (Hiromasa et al. 2004), B – 40/20-Modell, E2 – violett, E3BP – grün (Brautigam et al. 2009).

Die *in vivo*-Stöchiometrie des humanen PDH-Komplexes hängt sicherlich vom jeweiligen Stoffwechselzustand der Zelle ab, da die Expression der Gene der einzelnen Komponenten stark durch den Glukose- und Energiehaushalt der Zelle beeinflusst wird. Eine endgültige Aussage über die tatsächliche Zusammensetzung des humanen PDH-Komplexes werden erst weitere Experimente mit neuen oder deutlich verbesserten Methoden wie Röntgenkristallographie und 3D-Elektronenmikroskopie erbringen.

Im einzelnen sind die Komponenten des humanen Komplexes wie folgt aufgebaut (Abb. 1.4): Die Pyruvat-Dehydrogenase (E1, MW ~ 154 kDa) ist ein Heterotetramer ($\alpha_2\beta_2$) mit zwei aktiven Zentren, die jeweils ein Thiamindiphosphat-Molekül über ein Magnesium-Ion nicht-kovalent binden (Ciszak et al. 2003). Die PP- und die Pyr-Domänen vermitteln die Bindung des Cofaktors ThDP. Die C-terminalen Domänen der β -Untereinheiten sind für die

Wechselwirkung mit der Bindedomäne der E2-Komponente verantwortlich (Korotchkina und Patel 2008). Die Dihydrolipoyl-Acetyltransferase (E2, MW ~ 60 kDa) kommt im Kern als Trimer vor. Sie besteht aus vier Domänen, die durch flexible *linker*-Regionen (auch *hinge*-Regionen genannt) verbunden sind. Die beiden N-terminalen Domänen sind die Lipoyl-Domänen (LBD). Sie tragen einen kovalent an Lysin gebundenen Lipoamidarm. Die dritte Domäne ist die E1-Bindedomäne. Sie vermittelt die Bindung zwischen E1 und E2. Die innere C-terminale Domäne hat zwei essentielle Funktionen. Zum einen sorgt sie für die Trimerisierung der E2-Komponente und somit für die Assoziation der Kernstruktur, zum anderen stellt sie die katalytische Domäne, welche die Übertragung des Acetylrestes vom Lipoamidarm auf Coenzym A katalysiert, dar (Rahmatullah et al. 1989b; Patel und Korochkina 2003). Das E3-Bindeprotein (E3BP, MW ~ 48 kDa) ist strukturell verwandt mit der E2-Komponente und besteht aus einer N-terminalen Lipoyl-Domäne gefolgt von einer E3-Bindedomäne und einer inneren Domäne. Während die Liponsäure des Lipoamidarms noch durch die E1-Komponente acetyliert werden kann, ist die innere Domäne auf Grund des fehlenden reaktiven Histidinrestes katalytisch inaktiv. Dem E3-Bindeprotein wurde dadurch nur eine strukturelle Funktion der selektiven Bindung der Dihydrolipoyl-Dehydrogenase zugeordnet (Jilka et al. 1986; Gopalakrishnan et al. 1989; Roche et al. 1989; Harris et al. 1997). Diese Funktion ist jedoch unabdingbar für den PDH-Komplex der Säugetiere, um seine vollständige katalytische Effizienz zu entfalten (Yang et al. 1997).

Die Dihydrolipoyl-Dehydrogenase (E3, MW ~ 100 kDa) ist die dritte katalytische Komponente des PDHc. Das Homodimer (α_2) besitzt zwei katalytische Zentren. Jede Untereinheit ist aus vier Domänen aufgebaut: der FAD-Bindedomäne, der NAD⁺-Bindedomäne, der inneren Domäne und der Grenzflächendomäne (Ciszak et al. 2006). Als Besonderheit der E3-Komponente soll an dieser Stelle erwähnt werden, dass sie im humanen System als regenerierendes Enzym für alle drei α -Ketosäure-Dehydrogenase-Komplexe und als Protein H in der Glycin-Synthase dient. Der einzige Organismus bei dem drei verschiedene Gene für drei verschiedene Dihydrolipoyl-Dehydrogenasen codieren ist *Pseudomonas putida* (Patel und Korochkina 2003).

Im humanen System gibt es vier Isoenzyme der homodimeren Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase (MW ~ 92 kDa, PDK 1-4) (Gudi et al. 1995; Rowles et al. 1996). Ihre Aufgabe besteht in der spezifischen Phosphorylierung regulatorisch relevanter Serinreste. Zwei Domänen bilden eine Untereinheit, wobei die katalytische C-terminale Domäne (Kinase-Aktivität) zwischen den Isoformen hohe Identität aufweist. Die N-terminale Domäne, die für die Bindung am Komplex und die Regulation verantwortlich ist, weist deutlich geringere Homologie unter den PDKs auf. Die Kinasen werden durch die Bindung an die Lipoyldomänen der E2-Komponente und des E3-Bindeproteins mit dem Gesamtkomplex assoziiert. Trotz ihrer Funktion gehören die PDKs strukturell nicht zu den klassischen cytoplasmatischen Serinkinasen. Sie zeigen viel mehr Verwandtschaft zu den bakteriellen Histidinkinasen (Roche und Hiromasa 2007). Die regulatorischen Gegenspieler der PDKs sind die Pyruvat-Dehydrogenase-Phosphatasen (MW ~ 148 kDa). Die beiden Isoformen (PDP1 und PDP2) treten als Heterodimere auf. Die katalytische Untereinheit, weist die Phosphataseaktivität auf und wird der Klasse 2C der Phosphatasen zugeordnet. Beide Isoenzyme haben die regulatorische Untereinheit gemein. Dabei handelt es sich um ein

Flavoprotein, dessen Funktion jedoch noch nicht eindeutig geklärt ist (Teague et al. 1982; Vassilyev und Symersky 2007). Auch die Phosphatasen sind über Wechselwirkungen mit den Lipoyldomänen mit dem Komplex verbunden (Chen et al. 1996; Huang et al. 1998a).

Auf die regulatorischen Eigenschaften von PDKs und PDPs und auf ihre eigene Regulation wird in Kapitel 1.1.2. näher eingegangen.

In Abbildung 1.4 sind die Domänen der einzelnen Komponenten und ihre Wechselwirkungen zueinander (mit Ausnahme der PDP, da für diese bisher keine vollständige Struktur aufgeklärt wurde) illustrativ dargestellt.

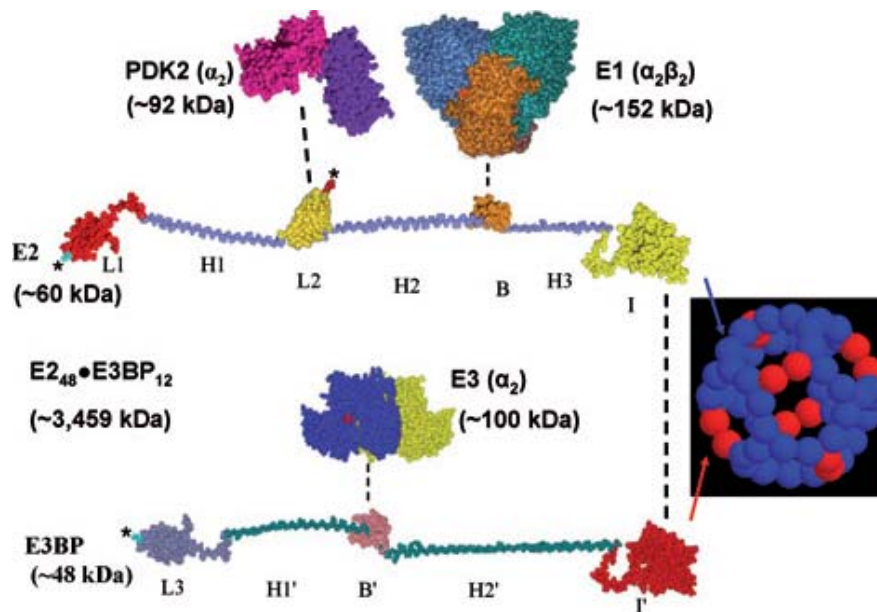


Abb. 1.4. Domänenstruktur der E2-Komponente und des E3BP des PDH-Komplexes.

L1/2/3 – Lipoyldomäne 1/2/3, H1/2/3 – *hinge*-Region 1/2/3, B – Bindedomäne, I – innere Domäne. Sternchen heben Lipoamidreste hervor. Untereinheitenstruktur der E1- und E3-Komponente sowie der PDK2. Entnommen aus Roche und Hiromasa 2007.

Ungeachtet der noch nicht mit Gewissheit beantworteten Frage zur Stöchiometrie des PDH-Komplexes (siehe oben) konnten durch umfangreiche Studien detaillierte Einblicke in die atomaren Wechselwirkungen der einzelnen Komponenten und Erklärungen für die Struktur-Wirkungs-Beziehung des Gesamtkomplexes gewonnen werden. Der anschließende Abriss fasst Ergebnisse aus Arbeiten zusammen, die hauptsächlich durch Elektronen-Cryomikroskopie (Cryo-EM) und Röntgenkristallographie detaillierte Aufschlüsse ermöglicht haben. Diese Ergebnisse helfen zu verstehen, wie diese große molekulare Maschine dazu in der Lage ist, einen Substrattransfer über mehrere Angström zu gewährleisten und dadurch die aus drei Schritten bestehende Reaktion in drei aktiven Zentren dreier verschiedener Enzyme ermöglicht.

Komplexe strukturelle Untersuchungen des E2-Kerns verschiedener Organismen zeigten, dass sowohl die oktahedrale als auch die icosahedrale Struktur aus 8 respektive 20 Trimeren der E2-Komponente besteht (Mattevi et al. 1992; Izard et al. 1999). Die Monomere assemblieren über einen großen Bereich ihrer Kontaktflächen durch Wasserstoffbrückenbindungen

miteinander. Für *Acetobacter vinelandii* wird beispielsweise eine Fläche von 3900 \AA^2 mit 48 Wasserstoffbrücken beschrieben (Mattevi et al. 1992). Benachbarte Trimere sind über eine Art hydrophobes Kugelgelenk („*ball-and-socket-connection*“) der C-terminalen Domänen miteinander verbrückt (Zhou et al. 2001a; Kato et al. 2006). Die katalytische Domäne der E2-Komponente besitzt einen Substratkanal, der sich von der äußeren Grenzfläche bis in das Innere der Kernstruktur erstreckt. Der äußere Eingang dient dem Einlass des Lipoamidarms der Lipoyldomänen, der innere dem Einlass von Coenzym A. Als besonderer katalytischer Mechanismus wird für Säuger- α -Ketosäure-Dehydrogenase-Komplexen ein Substrat-Takt-Mechanismus beschrieben. Erst die Bindung des CoA auf der einen Seite führt zur Öffnung des Substratkanals für den S-Acyl-Lipoamidarm. Nach Acyltransfer auf CoA und Freisetzung des reduzierten Lipoamidarmes wird der Kanal wieder geschlossen (Kato et al. 2006).

3D-elektronenmikroskopische Aufnahmen des Hefe-PDH-Komplexes deckten ein weiteres einzigartiges Merkmal der PDH-Komplexe auf. Auswertungen mehrerer hundert Bilder zeigten eine glockenförmige Größenverteilung der Partikel mit einer Abweichung bis zu 17%. Solche Verteilungen konnten sowohl für den isolierten Kernkomplex (nur E2), als auch für den Gesamtkomplex (E1, E2, E3 und E3BP) gezeigt werden. Als molekulare Grundlage für diese Eigenschaft wird eine mögliche Federwirkung der C-terminalen α -Helix, die unmittelbar vor dem Kugelgelenkmotiv (siehe oben) der E2-Komponente liegt, diskutiert. Die Schlussfolgerung aus diesem, als „atmenden Kern“ bezeichneten Phänomen ist, dass der Komplex durch die Flexibilität und Proteindynamik in der Lage ist, die sequentielle Katalyse bei der die Lipoyldomänen der E2-Komponente in ständiger „Bewegung“ sein müssen, zu gewährleisten (Zhou et al. 2001a).

In den elektronenmikroskopischen Studien zum PDH-Komplex wurde ein deutlicher Abstand ($70\text{-}90 \text{ \AA}$) zwischen dem E2-Kern und den peripher assoziierten Proteinen gefunden (Milne et al. 2002; Milne et al. 2006). Die Ursache dafür konnte lange Zeit nicht aufgeklärt werden. Eine kürzlich von LENGYEL und Mitarbeitern veröffentlichte Studie zeigte, dass die innere *linker*-Region der E2-Komponente (H3 in Abb. 1.4) für den Abstand von ca. 70 \AA zwischen dem Kern und der äußeren Schale des PDH-Komplexes verantwortlich ist. In dieser Arbeit wurde auch vorgeschlagen, dass durch eine *cis-trans*-Isomerisierung eines spezifischen Prolinrestes in dieser *linker*-Region eine laterale Bewegung der N-terminal von dieser Region liegenden Domänen ermöglicht (Lengyel et al. 2008).

Atomare Strukturen für den humanen Kernkomplex konnten bis heute noch nicht gelöst werden. Der Arbeitsgruppe um ZHOU gelang es jedoch mit Hilfe der eleganten Verbindung von Cryo-EM und der Verwendung einer homologen Atomstruktur (E2 aus *Acetobacter vinelandii* aus Mattevi et al. 1992) ein pseudoatomares Modell für die katalytische Domäne der humanen E2-Komponente (tE2) mit einer Auflösung von 3 \AA zu generieren. Während das katalytische Zentrum der prokaryotischen und der humanen verkürzten E2-Moleküle (nur innere Domäne) hoch konserviert ist, treten in anderen Bereichen starke Abweichungen in Sequenz und Struktur auf. Die Autoren weisen diese strukturellen Veränderungen den evolutionären Entwicklungen, wie der Inkooperation des E3-Bindeproteins und der Regulation durch PDKs und PDPs zu (Yu et al. 2008). Die Abbildung 1.5 zeigt zusammenfassend ein Strukturmodell des PDH-Komplexes.

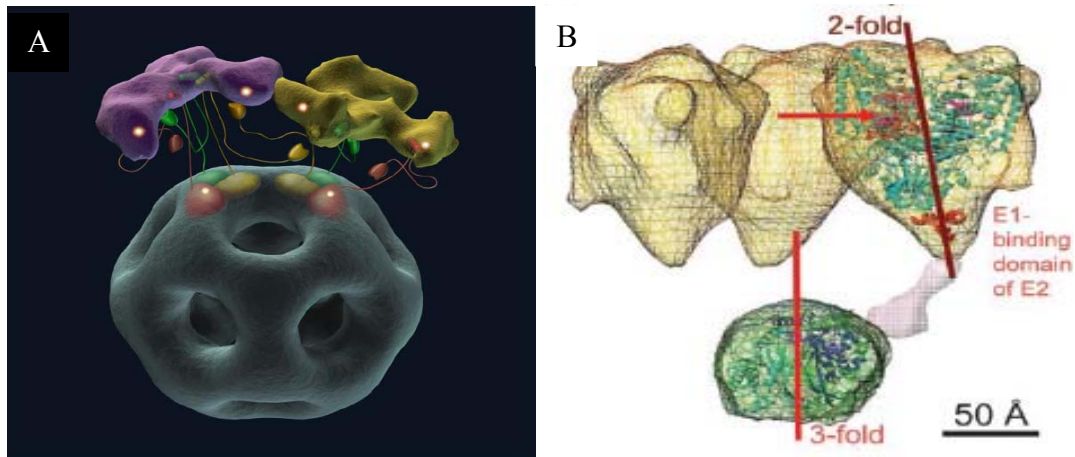


Abb. 1.5. A – Computergeneriertes Modell eines E1-E2-E3-Komplexes, drei E1-Moleküle – violett, drei E3-Moleküle – gold, zwei E2-Trimere – rot/gelb/grün (Milne et al. 2006). B – *wire-frame*-Darstellung des EM-Mantels mit eingebetteten Kristallstrukturen der E1 (hellblau), tE2 (hellgrün), *inner linker* (blau), E1-Bindedomäne (rot), Lipoyldomäne (orange) (Gu et al. 2003).

Die Röntgenkristallstrukturen der E1- und E3-Komponente, des E3BPs, der PDKs und PDPs und Subkomplexe dieser Proteine aus verschiedenen Organismen wurden während der letzten 20 Jahre gelöst (Abb. 1.4). Hier sollen jedoch nur einige für den humanen PDH-Komplex relevante Daten genannt werden, aber auf funktionelle Details nicht weiter eingegangen werden.

Die erste Kristallstruktur der humanen E1-Komponente wurde 2003 gelöst. Die Struktur verfügt über alle zu erwartenden Motive eines Thiamindiphosphat-abhängigen Enzyms und lässt Raum für Diskussionen über eine Halbseitenreaktivität (siehe Kapitel 3.1 für nähere Erläuterungen) (Ciszak et al. 2003; Frank et al. 2004). Die Bindung der humanen E1-Komponente an die E1-Bindedomäne konnte bisher nicht strukturell aufgeklärt werden. Im Jahr 2005 gelang dies für den Subkomplex aus *Bacillus stearothermophilus* (Frank et al. 2005). Basierend auf diesen strukturellen Daten untersuchten KOROTSCHKINA und PATEL die Wechselwirkungen zwischen der humanen E1-Komponente und der humanen E1-Bindedomäne mit Hilfe von analytischer Gelfiltration und *Biacore*-Messungen. Dabei wurden für die Bindung spezifische Aminosäuren identifiziert (Korotchkina und Patel 2008). Ein weiterer aufgeklärter Subkomplex ist der humane E3/E3BP-Komplex. Die Kristallstruktur zeigt, dass ein E3-Homodimer mit einer E3-Bindedomäne in Wechselwirkung tritt (Ciszak et al. 2006). Die Bindung zwischen E1 bzw. E3 und ihren jeweiligen Bindedomänen basiert hauptsächlich auf elektrostatischen Wechselwirkungen und führen kaum zu strukturellen Veränderungen der einzelnen Komponenten.

Zu den weiteren sehr interessanten Strukturen des humanen PDH-Komplexes gehören die der PDKs und PDPs. Studien zeigten, dass die PDK-Isoenzyme und PDP1 durch die Lipoyldomänen der E2-Komponente und des E3BPs in ihrer Aktivität stimuliert werden (Korotchkina und Patel 2001b; Roche et al. 2003). Die atomaren Strukturen der isolierten PDK2 und PDK4 konnten gelöst werden und geben Einblick in die Reaktivität des aktiven Zentrums und Regulation durch Aktivatoren und Inhibitoren (Steussy et al. 2001; Knoechel et al. 2006; Wynn et al. 2008). Die Struktur des Subkomplexes zwischen PDK3 und der

Lipoyldomäne 2 der E2-Komponente konnte 2006 von der Arbeitsgruppe um CHUANG gelöst werden. Es wurde gezeigt, dass es durch die Wechselwirkung der beiden Proteine zu deutlichen strukturellen Veränderungen kommt. Diese sind die Grundlage für die allosterische Aktivierung der PDK2 und PDK3 durch die Lipoyldomäne 2 (Kato et al. 2006; Devedjiev et al. 2007; Wynn et al. 2008).

Die Struktur einer humanen Pyruvat-Dehydrogenase-Phosphatase konnte noch nicht aufgeklärt werden. Bislang gelang es nur, die katalytische Untereinheit der PDP1 aus Ratte zu kristallisieren (Vassilyev und Symersky 2007). Die Autoren stellten, basierend auf strukturellen und biochemischen Daten, ein theoretisches Modell für Wechselwirkungen zwischen PDP1, Lipoyldomäne 2 und Calcium-Ionen auf. Nur die Anwesenheit aller drei Partner ermöglicht die Bindung an den PDH-Komplex und somit die katalytische Aktivität der PDP1.

Im folgenden Abschnitt soll auf Grundlage der Gesamtreaktion und dem Aufbau des humanen PDH-Komplexes die Vielschichtigkeit der Regulation dieser molekularen Maschine dargestellt werden.

1.1.2. Regulation des PDH-Komplexes auf verschiedenen Ebenen

Der Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex nimmt eine zentrale Rolle im Glukosestoffwechsel ein. Durch die Generierung des Acetyl-CoA ist der Komplex die Schaltstelle zwischen oxidativem Kohlenhydratabbau und der Synthese von Fettsäuren. Für die Zelle ist es enorm wichtig, den Glukosehaushalt in einem gewissen Fließgleichgewicht zu halten, ungeachtet in welchem Stoffwechselzustand (gesättigt oder fastend) sich der Organismus befindet. Er muss im Hungerzustand schnell dazu in der Lage sein, den Verbrauch von Kohlenhydraten zu reduzieren und auf den Abbau von Fetten zur Energiegewinnung umzustellen. Diese Homöostase kann nur durch eine strenge Regulation auf verschiedenen Ebenen des Stoffwechsels aufrechterhalten werden.

Anhand des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes ist die Evolution solcher Regulationsmechanismen von einfachen prokaryotischen Organismen wie z.B. *E. coli* zu hochorganisierten eukaryotischen Organismen wie z.B. dem Menschen exemplarisch zu verfolgen. Während das Bakterium einfache Regulationsmechanismen, wie *feedback*-Hemmung und allosterischer Regulation nutzt, gibt es im humanen Organismus ein außergewöhnlich vielschichtiges System, das sowohl lang- als auch kurzfristige Regulation ermöglicht. Besonders hervorzuheben ist dabei die Anpassung der Regulation auf gewebsspezifische Bedürfnisse. Im Gewebe des Gehirns beispielsweise muss gewährleistet sein, dass Energie jederzeit oxidativ aus Glukose gewonnen werden kann. Das bedeutet, dass der PDH-Komplex stets die gleiche Aktivität haben muss. Im Muskelgewebe wird die PDH-Aktivität dem Trainingszustand angepasst. Im ruhenden Zustand ist die Aktivität deutlich geringer als während einer Anstrengung der Muskulatur (Wieland 1983).

Die Regulationsvielfalt und die Realisierung der gewebsspezifischen Anpassung im humanen System werden im Folgenden dargestellt. Die Regulation des Komplexes erstreckt sich über verschiedene Ebenen. Um adäquat auf die physiologischen Stoffwechselprozesse reagieren zu

können, hat sich eine sogenannte *short-term*-Regulation (kurzfristig, Zeitraum: Minuten – Stunden) entwickelt. Die Mechanismen sind zum einen die Endprodukt-Hemmung, zum anderen die Phosphorylierung/Dephosphorylierung, die mit Inaktivierung/Aktivierung des PDH-Komplexes einhergeht. Längere Perioden der Veränderungen im Stoffwechsel durch etwaige Erkrankung oder hormonelle Umstellung des Organismus wird durch *long-term*-Regulation (langfristig, Zeitraum 1-2 Wochen) abgestimmt. Darunter versteht man die Änderung des Gesamtgehalts des PDH-Komplexes oder einzelner Komponenten durch transkriptionelle Kontrolle.

Die Gesamtreaktion des PDH-Komplexes ist aufgrund der Decarboxylierung im ersten Reaktionsschritt (Reaktion 2a) irreversibel. Wie die Reaktionsgleichungen 2a-4b zeigen, sind die Reaktionen der E2 und E3-Komponente reversibel. Die erste Form der Regulation ist daher die klassische *feedback*-Hemmung, die durch die Verhältnisse der Reaktionsprodukte zu den Ausgangsstoffen (Acetyl-CoA/CoA und NADH/NAD⁺) bestimmt wird. Diese Verhältnisse sind vom Stoffwechsellzustand der Zelle abhängig. Studien zur *feedback*-Hemmung zeigten, dass die K_M -Werte der Substrate und die K_I -Werte der Inhibitoren (Reaktionsprodukte) in einem ähnlichen mikromolaren Bereich liegen (Wieland 1983).

Die weitaus wichtigere Form der kurzfristigen Kontrolle ist die Inaktivierung/Reaktivierung des PDH-Komplexes durch Phosphorylierung/Dephosphorylierung.

Erstmalig beschrieben wurde dieser Mechanismus 1969 durch die Arbeitsgruppe um REED. Es wurde festgestellt, dass der Zusatz von ATP zu Präparationen des Gesamtkomplexes aus Rinderniere zur Inaktivierung, Zusatz von Magnesium-Ionen hingegen zur Aktivierung der Komplexaktivität führt. Weiterhin konnten eine mit dem Komplex assoziierte spezifische Kinase und eine ebenfalls gebundene spezifische Phosphatase identifiziert werden, die für diesen Mechanismus verantwortlich sind (Linn et al. 1969a; Linn et al. 1969b). Im gleichen Zeitraum wurde eine ähnliche Studie von WIELAND und v. JAGOW-ESTERMANN zum PDHc aus Schweineherz veröffentlicht, welche die Daten bestätigten (Wieland und Jagow-Estermann 1969). In diesen ersten Arbeiten konnte auch gezeigt werden, dass die Pyruvat-Dehydrogenase-Komponente und speziell die α -Untereinheit das Substrat der Phosphorylierung ist (Barrera et al. 1972). Die E1-Komponente katalysiert den ersten und irreversiblen Schritt der gesamten Reaktionskaskade (Reaktion 1.2a). Es ist demnach physiologisch sinnvoll, die Aktivität des Komplexes direkt durch die Regulation des Pyruvatverbrauchs durch E1 zu kontrollieren. Die Arbeitsgruppe um DIXON identifizierte drei spezifische Serinreste, die in phosphorylierter Form vorliegen können. Schon in diesen Experimenten zeigte sich, dass Position 1 deutlich schneller phosphoryliert wurde und den stärksten inhibitorischen Effekt auf den PDH-Komplex hatte (Yeaman et al. 1978). Diese Erkenntnisse führten zu einer Vielzahl von interessanten Experimenten und Studien zur Komplexität dieses Regulationsmechanismus. Die wesentlichen Resultate dieser Studien wurden in zahlreichen *Reviews* zusammengefasst (Wieland 1983; Patel und Roche 1990; Patel und Korotchkina 2001; Holness und Sugden 2003; Strumilo 2005; Patel und Korotchkina 2006) (u.v.m.).

Zuerst gefunden und bestätigt im Säugersystem konnte kurz darauf auch die Phosphorylierung/Dephosphorylierung für andere Eukaryoten wie dem Schlauchpilz *Neurospora crassa* (Wieland et al. 1972), dem Nematoden *Ascaris suum* (Huang et al. 1998b;

Patel und Korochkina 2003) und den mitochondrialen PDH-Komplexen aus Pflanzen (Randall und Rubin 1977) nachgewiesen werden. Die plastidären PDH-Komplexe der Pflanzen werden nicht durch Phosphorylierung/Dephosphorylierung reguliert (Tovar-Mendez et al. 2003). Für den PDH-Komplex aus *Saccharomyces cerevisiae* wurde zunächst angenommen, dass er diesem Regulationsmechanismus nicht unterliegt (Wieland 1983). Anschließende Studien ergaben jedoch, dass auch in Brauereife ein phosphorylierbarer Serinrest in der E1-Komponente vorliegt (Uhlinger et al. 1986). Gene für die Expression PDH-spezifischer Kinasen und Phosphatasen und deren Aktivität und Regulation wurden erst in neueren Studien identifiziert und charakterisiert (Krause-Buchholz et al. 2006; Gey et al. 2008). Ursache für die späte Identifikation der regulatorischen Enzyme ist die Tatsache, dass, im Unterschied zu den anderen eukaryotischen Komplexen, die Kinasen und Phosphatasen nicht mit dem Komplex assoziiert sind. Somit ist auch die Assoziation regulatorischer Enzyme und deren spezifische Regulation ein aussagekräftiges Beispiel für die Höherentwicklung im Zuge der Evolution der Eukaryoten. Andere Weiterentwicklungen sind u. a. die Anzahl der Phosphorylierungspositionen (1-3) und die Entwicklung von hochsensitiv regulierbaren und gewebespezifisch auftretenden Isoformen (PDK1-4, PDP1-2) (Patel und Korochkina 2003).

Die Abbildung 1.6 zeigt ein Schema der Regulation des humanen PDH-Komplexes nach gegenwärtigen Vorstellungen.

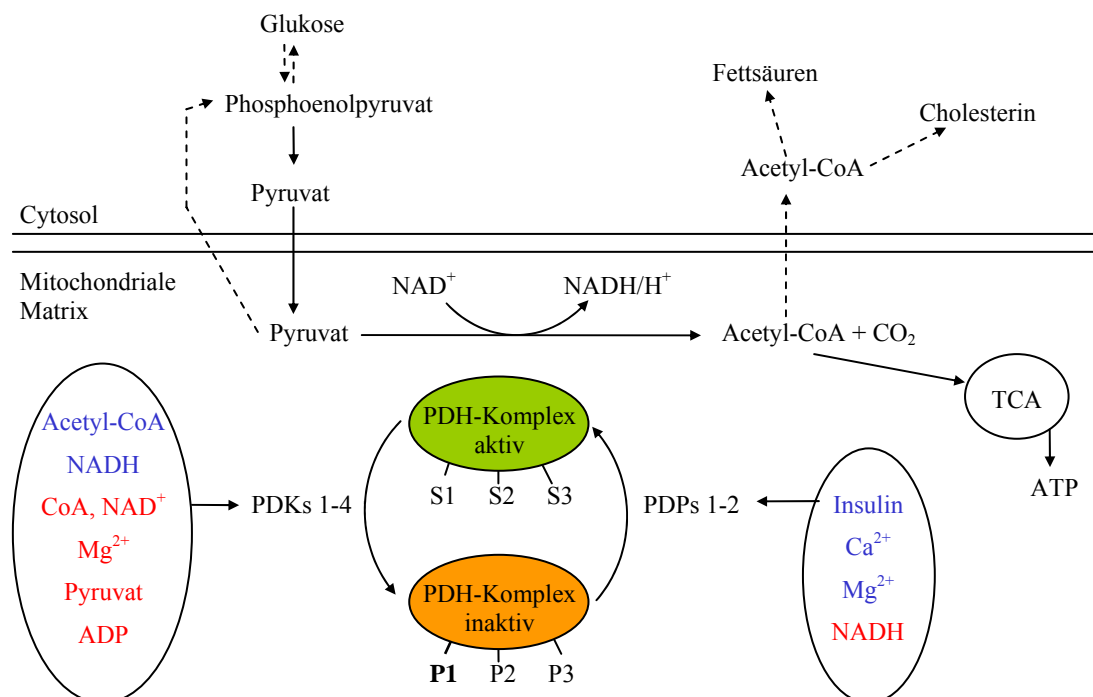


Abb. 1.6. Übersicht zur Regulation des humanen PDH-Komplexes durch Phosphorylierung/Dephosphorylierung (S 1-3 – Serinreste 1-3, P 1-3 – phosphorylierte Serinreste 1-3, TCA – Krebszyklus, rot hervorgehoben – inhibitorische Wirkung, blau hervorgehoben – aktivierende Wirkung). Modifiziert nach Patel und Korochkina 2003.

Wie bereits erwähnt, phosphorylieren die Kinasen drei Serinreste, die sich in der α -Untereinheit der humanen E1-Komponente befinden. Bereits die Phosphorylierung eines Serinrestes reicht aus, um den Komplex vollständig zu inaktivieren (Sugden und Randle 1978). Die Funktion und Wirkung der einzelnen Phosphorylierungsstellen auf die Katalyse der E1-Komponente wird in Kapitel 3.2. dargestellt und diskutiert. Dieses einleitende Kapitel konzentriert sich insbesondere auf die Ortsspezifität, Gewebsverteilung und Regulation der Pyruvat-Dehydrogenase-Kinasen und -Phosphatasen anhand der Übersicht Abb. 1.6.

Die vier humanen PDK-Isoenzyme zeigen eine Ortsspezifität gegenüber den drei Phosphorylierungspositionen in der E1-Komponente. Serin 264 (Pos. 1) wird von allen PDKs phosphoryliert, am effektivsten jedoch durch PDK2 und PDK4. Serin 271 (Pos. 2) wird sehr effizient durch PDK3 und PDK4, etwas schlechter durch PDK2 und PDK1 phosphoryliert. Die Phosphorylierungsposition 3 (Serin 203) kann nur durch PDK1 phosphoryliert werden. In allen Fällen konnte gezeigt werden, dass in Anwesenheit des Kernkomplexes E2-E3BP nur eine α -Untereinheit phosphoryliert wird (2 Phosphatreste/E1 für PDK2, 3, 4 und 3 Phosphatreste/E1 für PDK1), was trotzdem zur vollständigen Inaktivierung des PDH-Komplexes führt (Kolobova et al. 2001; Korotchkina und Patel 2001b). Dieses Phänomen ist ein Indiz für die Halbseitenreaktivität der E1-Komponente (siehe Kapitel 3.1.). Die isolierten PDKs sind jedoch auch in der Lage freie E1 zu phosphorylieren. Die Phosphorylierungsgeschwindigkeiten sind jedoch deutlich geringer (mit Ausnahme der PDK4) als in Anwesenheit von E2-E3BP. Diese Eigenschaft beruht auf der Regulation der PDKs durch die Wechselwirkung mit den Lipoyldomänen (siehe unten). Es wurde außerdem gezeigt, dass die Phosphorylierung einer Position keinen Einfluss auf die Phosphorylierungsraten der anderen Positionen hat (Korotchkina und Patel 2001b).

Die schnelle und vollständige Inaktivierung des PDH-Komplexes geht mit der Phosphorylierung des S264 einher (Korotchkina und Patel 1995). Die Phosphorylierung der Positionen 2 und 3 spielt scheinbar eine eher untergeordnete Rolle, die jedoch für die Regulation während verschiedener Stoffwechsellustände an Bedeutung gewinnt (siehe unten) (Patel und Korotchkina 2003; Holness und Sugden 2003).

Die Phosphatasen PDP1 und PDP2 sind in der Lage, alle drei phosphorylierten Serine zu dephosphorylieren mit einer Präferenz für S271 vor S203 und S264 (Karpova et al. 2003). Die Reaktivierung ist jedoch davon abhängig, welche PDK den PDH-Komplex inaktiviert hat. Die Reaktivierungsgeschwindigkeit durch die Phosphatasen nach Phosphorylierung durch PDK2 ist am schnellsten und durch PDK1 am langsamsten (2/3 für PDP1 und 1/6 für PDP2) (Kolobova et al. 2001). Die Reaktivität der PDP1 scheint den einzelnen Positionen gegenüber zufällig zu sein. Im Gegensatz dazu führen Phosphorylierungen an Position 2 und 3 neben Position 1 zur Reduktion der Dephosphorylierungsgeschwindigkeit der PDP2 (Karpova et al. 2003).

Die Gewebeverteilung der regulatorischen Enzyme ist in Tabelle 1.1 dargestellt.

Tabelle 1.1. Gewebeverteilung der PDKs nach Patel und Korotchkina 2006.

Gewebeverteilung	PDK1	PDK2	PDK3	PDK4	PDP1	PDP2
Gehirn		+++	++		++++	++++
Herz	+++++	++++	+	++++	+++++	+++++
Skelettmuskulatur	+++	++++		+++++		
Pankreas	+	+++				
Leber	++	+++		++		+++++
Niere		+++	++	+		+++++
Hoden		+++	++++		+++	
Milz		+	+			+
Lunge		+	+++	+++	+	

PDK2 ist ubiquitär verteilt, während die anderen PDKs und die PDPs eine limitierte Gewebeverteilung haben (Bowker-Kinley et al. 1998). An dieser Stelle soll eine relativ neue Studie der Arbeitsgruppe um DIXON erwähnt werden, die nochmals Fragen zur Gewebeverteilung und Ortsspezifität aufwirft. Es gelang, spezifische Antikörper gegen die Peptidsequenzen, welche die phosphorylierten Serine flankieren (N- und C-terminal \pm 4-6 Aminosäuren), zu generieren. Anschließend wurden die Antikörper zur Detektion der phosphorylierten E1-Komponente in verschiedenen Maus- und Rattengeweben (Niere, Herz, Leber) bzw. Zelllinien verwendet. Trotz der limitierten Gewebeverteilung der PDK1 (siehe Tab. 1.1) konnte die Phosphorylierung des S203, die ausschließlich durch PDK1 katalysiert wird, in allen Geweben außer in Hoden nachgewiesen werden (Rardin et al. 2009).

Ungeachtet dessen ist die unterschiedliche Verteilung in den Geweben von großer Bedeutung, denn diese haben unterschiedliche Ansprüche an die Glucosehomöostase und Energiebereitstellung durch den PDH-Komplex. Die Regulationsmechanismen, denen die PDKs unterliegen, sind sehr verschieden und wiederum gewebsspezifisch angepasst.

Die einzelnen PDKs unterliegen zum Teil sowohl auf posttranslationaler als auch auf transkriptioneller Ebene verschiedenen Regulationsmechanismen. Einige Kontrollmechanismen sind jedoch gleich. Alle PDKs sind bis zu einem gewissen Grad stimulierbar durch die E2-Komponente und inhibierbar durch Pyruvat und Dichloracetat (DCA, ein Pyruvatanalogon). Die Stärke des Einflusses ist jedoch vom jeweiligen Isoenzym abhängig (Cate und Roche 1978). Alle PDKs benötigen Kalium-Ionen für ihre Aktivität (Roche und Hiromasa 2007; Green et al. 2008).

In Untersuchungen der Aktivierung der PDKs durch E2 bzw. E2-E3BP wurde gezeigt, dass PDK2 und PDK3 am stärksten stimuliert werden (Korotchkina und Patel 2001b). Die Aktivierung war am effektivsten, wenn die Lipoyldomänen in reduzierter Form (80 % Aktivierung) bzw. in reduziert/acetylierter Form (zusätzlich dreifache Aktivierung) vorlagen

(Roche et al. 2003). Diese Form der Aktivierung ist demzufolge von den Konzentrationsverhältnissen $[\text{AcetylCoA}]/[\text{CoA}]$ und $[\text{NADH}]/[\text{NAD}^+]$ und der dadurch ausgelösten Rückreaktionen von E3 und E2 abhängig. Die Regulationsmechanismen für PDK2 und 3 unterscheiden sich jedoch. Während PDK3 bereits direkt durch die Lipoyldomäne 2 aktiviert werden kann, benötigt PDK2 die gesamte E2-Komponente um stimuliert zu werden (Baker et al. 2000). Ein weiterer wichtiger Unterschied der beiden bisher besprochenen PDKs ist ihre Hemmbarkeit durch Pyruvat, ADP und anorganisches Phosphat (P_i). PDK3 wird durch ADP und P_i , aber kaum durch Pyruvat inhibiert. PDK2 wird besonders empfindlich gegenüber Hemmung durch Pyruvat, wenn sie an E2 gebunden ist. Dies wird durch konformationelle Änderungen in der PDK2-Struktur realisiert. Pyruvat inhibiert PDK2 außerdem nur dann effizient, wenn sie als PDK2-ADP/ATP-Komplex vorliegt und blockiert die Dissoziation dieser Komplexe. Man spricht bei dem Effekt von ADP und Pyruvat auf die PDK2 von einer synergistischen Hemmung (Baker et al. 2000; Roche et al. 2003; Roche und Hiromasa 2007). Biochemische und strukturelle Daten zeigen, dass die Anwesenheit der prosthetischen Lipoylgruppe und einiger an der Oberfläche der Lipoyldomäne 2 befindlichen Aminosäuren essentiell für die Wechselwirkung zwischen PDKs und E2 sind (Roche et al. 2003). In einer Folge von Publikationen, die sich mit der Aktivierung der PDKs durch E2 und der Phosphorylierung vieler E1-Moleküle durch wenige komplexassoziierte PDKs beschäftigten, wurden mehrere Modelle vorgestellt. Die neueste strukturbasierte Studie schlägt aufgrund von asymmetrischen Monomeren der PDK2 (Homodimer) im Komplex mit L2 ein gerichtetes Modell des *hand-over-hand*-Mechanismus vor. Während sich ein Monomer an L2 gebunden im geschlossenen Zustand befindet, liegt das zweite Monomer in der zur ATP-Bindung und somit zur Phosphorylierung befähigten offenen Konformation vor (Devedjiev et al. 2007). Der *hand-over-hand*-Mechanismus wurde bereits 1995 vorgeschlagen (Liu et al. 1995b). Damals gingen die Autoren jedoch von einem zufälligen Binden und Dissoziieren jeweils eines PDK-Monomers von den an der Komplexoberfläche in hohen Konzentrationen vorliegenden L2-Domänen aus (Roche et al. 2003).

PDK1 ist die am wenigsten untersuchte Kinase. Sie wird jedoch auch direkt durch ADP und Pyruvat inhibiert und indirekt über die E2-Komponente durch NADH und Acetyl-CoA aktiviert (Patel und Korotchkina 2006).

Die Regulation der PDK4 hingegen ist aufgrund der interessanten *long-term*-Kontrolle gut untersucht. Im Gegensatz zu den anderen PDKs bindet PDK4 bevorzugt jedoch vergleichsweise schwach an Lipoyldomäne 1 (E2) und Lipoyldomäne 3 (E3-BP). Die Aktivierung durch E2-E3BP ist sehr gering, was mit der Eigenschaft einhergeht, dass PDK4 freie E1 am effektivsten phosphorylieren kann (Roche und Hiromasa 2007). Die Ursache für diese Eigenschaft liegt in der vor kurzem gelösten „metastabilen“ offenen Struktur des Homodimers (Wynn et al. 2008). PDK4 wird ebenfalls leicht synergistisch durch ADP und Pyruvat inhibiert (Roche und Hiromasa 2007) und indirekt durch Acetyl-CoA und NADH durch reduktive Acetylierung der Lipoyldomänen stimuliert (Roche et al. 2003). Besonders interessant jedoch ist die erhöhte Transkription (mRNA-Gehalt) und Proteinexpression der PDK4 während Hungerzuständen, Diabetes und Schilddrüsenüberfunktion. Unter diesen Umständen kommt es zur Lipolyse und somit zur Freisetzung von Fettsäuren. Diese können die Transkription des PDK4-Gens in Leber, Niere, Skelettmuskulatur und Herz durch die

Transkriptionsfaktoren PPAR α und δ (*peroxisome-proliferator-activated receptor alpha and delta*) aktivieren (Holness und Sugden 2003). Ein weiterer transkriptioneller Mechanismus wurde wie folgt beschrieben: Durch Erhöhung der Glycocorticoidkonzentration während des Fastens oder bei Diabetes wird der Histon-acetylierende Faktor p300/CBP-Komplex aktiviert. Dieser Komplex interagiert mit den Transkriptionsfaktoren FOXO und aktiviert die PDK4-Genexpression. Im Gegenzug kann Insulin (indikativ für hohen Blutglucosegehalt) durch Interaktion mit FOXO die PDK4-Genexpression unterdrücken und somit die weitere Phosphorylierung und Inaktivierung des PDH-Komplex unterbinden (Kwon et al. 2004). Außerdem wird die PDK4-Expression durch Insulin rückwirkend durch Reduktion des Fettabbaus reduziert (siehe oben). PDK2 unterliegt einer ähnlichen transkriptionellen Kontrolle (Patel und Korotchkina 2006).

Durch die Erhöhung des Kinasegehaltes kann es zur Hyperphosphorylierung der E1-Komponente kommen, was eine längere Reaktivierungszeit zur Folge hat. Dies ermöglicht dem Organismus eine optimale Einstellung auf die jeweiligen Stoffwechselverhältnisse (Holness und Sugden 2003).

Auch für die Gegenspieler der PDKs, die Phosphatasen, konnte gezeigt werden, dass sie einer transkriptionellen Kontrolle unterliegen. PDP1-Expression wird bei Diabetes und PDP2-Expression in Hungerzuständen reduziert (Huang et al. 2003; Holness und Sugden 2003). Die Regulation der PDPs ist ebenso vielschichtig wie die der PDKs. Ähnlich wie bei den PDKs ist die Aktivierung der Phosphatasen vom Energiehaushalt der Zelle abhängig. ATP liegt in der Zelle als ATP-Mg-Komplex vor. Durch Energieverlust erhöht sich die Konzentration von Magnesium-Ionen und PDPs werden aktiviert. Die Affinität der katalytischen Untereinheit (PDP1c) zu Mg⁺⁺ ist vom Zustand der regulatorischen Untereinheit (PDPr) abhängig. Durch Bindung des Polyamids Spermin wird die Affinität deutlich verbessert (Yan et al. 1996). Hohe Sperminkonzentrationen sind ein Indikator für einen hohen Blutzuckergehalt. Des Weiteren wird PDP1 durch Calcium-Ionen stimuliert. Ein erhöhter Calciumgehalt tritt in Zuständen erhöhter Muskelaktivität und während des Zellwachstums auf, was zu einem erhöhten Energiebedarf führt. Die Stimulation beruht auf der Ca⁺⁺-vermittelten Bindung der PDP1 an die L2-Domäne der E2-Komponente. Nur wenn alle drei Interaktionspartner (PDP1, Ca⁺⁺ und L2 in lipoylierter Form) vorhanden sind, kann PDP1 aktiv werden (Roche et al. 2003). Zusätzlich zu den beschriebenen Regulationsmechanismen kann Insulin durch Aktivierung der Proteinkinase C δ beide Phosphatase-Isoformen stimulieren. Die Proteinkinase C δ wird als Antwort auf Insulinverfügbarkeit in die Mitochondrien transportiert. Dort phosphoryliert und demzufolge aktiviert sie PDP1 und 2 (Caruso et al. 2001).

Die enorme Komplexität der Regulation von Pyruvat-Dehydrogenase-Kinasen und -Phosphatasen spiegelt die zentrale Rolle des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes im humanen Stoffwechsel wider. Die anderen Mitglieder der Familie der α -Ketosäure-Dehydrogenase-Komplexe unterliegen einer weniger komplexen Kontrolle. Der α -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplex unterliegt keiner Kontrolle durch Phosphorylierung/Dephosphorylierung. Für die Regulation des Verzweigtketten- α -Ketosäure-Dehydrogenase-Komplex wurden ein funktionelles Serin in der E1-Komponente, eine spezifische Kinase und eine spezifische Phosphatase identifiziert und charakterisiert. Die beiden regulatorischen

Enzyme unterliegen nur einer sehr limitierten metabolischen Kontrolle (Patel und Korochkina 2003).

Abschließend soll nochmals die *long-term*- Regulation des Komplexes thematisiert werden. Neben der transkriptionellen Kontrolle der Kinasen und Phosphatasen tritt diese in entsprechenden Stoffwechselluständen auch für die einzelnen Komponenten des PDH-Komplexes auf (Patel et al. 1995). Als Beispiel soll hier nur die transkriptionelle Kontrolle der Gene, die für die Pyruvat-Dehydrogenase (E1-Komponente) codieren, erwähnt werden. Die Promotorregionen der Gene für E1- α und E1- β weisen kohlenhydratsensitive Elemente auf. Die Transkription wird demnach durch Glucose stimuliert, der die intrazelluläre Konzentration an E1-Komponente steigt und somit die Gesamtaktivität des PDH-Komplexes (Tan et al. 1998).

Der humane Organismus hat umfangreiche Mechanismen entwickelt, um seinen Energiehaushalt optimal zu steuern. Die Regulation des PDH-Komplexes spielt dabei unumstritten eine entscheidende Rolle.

1.1.3. Medizinische Relevanz des humanen PDH-Komplexes

Aufgrund des Stellenwertes, den der Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex im humanen Stoffwechsel hat, ist eine Defizienz besonders problematisch für den Organismus. Die klinische Relevanz des PDH-Komplexes kommt in einer Vielzahl von Krankheitsbildern zum Ausdruck, die in zwei Gruppen eingeteilt werden können. Die eine Gruppe umfasst die Krankheitsbilder, die direkt durch Störungen, welche die einzelnen Komponenten hervorrufen, ausgelöst werden. Die andere Gruppe umfasst die Beeinträchtigung der PDH-Komplex-Aktivität durch eine Störung im Stoffwechsel der Patienten. PDHc-Defizienz führt bei Patienten unter anderem zu angeborener Milchsäureazidose, Leigh-Syndrom (subakute nekrotisierende Encephalomyelopathie) und mentaler Retardierung im Säuglings- bzw. Kindesalter. In ca. 80 % der Fälle liegt die Ursache in einem genetischen Defekt des PDHA1-Gens, das für die α -Untereinheit der E1-Komponente codiert. Die Auswirkungen bewegen sich zwischen moderaten neuronalen Störungen bis zu embryonaler Letalität (Lissens et al. 2000). Bis 2003 waren 150 Fälle von Mutationen im PDHA1-Gen aufgeklärt (Patel und Korochkina 2003). Jedoch werden ständig neue Fälle von verschiedenen Mutationen bekannt (Tulinius et al. 2005; Ostergaard et al. 2009). Die Folgen der Defekte sind mannigfaltig. Mitochondrialer Import, ThDP-Bindung, Assoziation der Untereinheiten und andere E1-Funktionen sind betroffen. Durch kontinuierliche Forschung konnten auch genetische Defekte in den Genen für die E1- β -Untereinheit (Hengeveld und De Kok 2002; Brown et al. 2004), die E2-Komponente (Head et al. 2005), E3-Komponente (Hong et al. 1996; Hengeveld und De Kok 2002) und E3BP (Schiff et al. 2006) gefunden werden. Die Behandlungstherapie umfasst eine Umstellung zu kohlenhydratarmer Ernährung, eine Nahrungsergänzung mit Thiamindiphosphat und die Verabreichung des Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase-Inhibitors Dichloracetat (DCA). Diese Therapien sind jedoch nicht im gewünschten Ausmaß erfolgreich (Patel und Korochkina 2003).

Eine weitere durch den PDH-Komplex verursachte Krankheit ist die ‚Primäre biliäre Zirrhose‘ (PBC, heute ‚Primäre biliäre Cholangitis‘ genannt). Dabei handelt es sich um eine Autoimmunerkrankung, wobei der Organismus Autoantikörper gegen die E2-Komponente des PDH-Komplexes bildet (Agmon-Levin et al. 2009). Als Hauptautoantigen konnte die Lipoyldomäne 2 identifiziert werden (Howard et al. 1998). Die Ursache dieser Krankheit ist bisher nicht eindeutig geklärt. Die Beteiligung von bakteriellen und/oder viralen Infektionen wird diskutiert (Agmon-Levin et al. 2009). Medikamentöse Behandlung bzw. Lebertransplantationen sind erfolgreiche Therapien für PBC-Patienten.

Neben diesen direkt durch den PDH-Komplex verursachten Krankheiten kommt es in erkrankten Organismen zur Beeinträchtigung und Fehlregulation des PDH-Komplexes und damit rückwirkend zur Verstärkung der Stoffwechselstörung.

Bei Krankheiten wie Diabetes, Herzkrankheiten (Ischämie) und Krebs ist die PDHc-Aktivität auf Grund des pathologischen Stoffwechsels stark reduziert. In Diabetes-Patienten wird durch das Fehlen von Insulin die Komplex-Aktivität trotz ausreichender Glukoseversorgung nicht hochreguliert. In unterversorgten Herzmuskelzellen ist die PDHc-Reaktion ebenfalls unterdrückt und in Krebszellen wird durch das Umschalten auf den Warburg-Stoffwechsel (Laktat-Bildung durch Glycolyse) die PDHc-Aktivität reduziert. In allen Fällen können PDK-Inhibitoren als potentielle Wirkstoffe dienen, um die Aktivität des Gesamtkomplexes zu erhöhen und die Homöostase wiederherzustellen (Roche und Hiromasa 2007).

Auch in neurodegenerativen Krankheiten ist der Aktivitätsverlust des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes von großer Bedeutung. So konnte eine Studie zeigen, dass das in der Alzheimer’schen Krankheit (AD) toxische β -Amyloid (Fragment 25-35) zu einer Reduktion der PDHc-Aktivität *in vitro* auf 35 % führt (Casley et al. 2002). Ähnlich orientierte Arbeiten dokumentierten die Reduktion der PDHc-Aktivität um 41 % und anderen am Krebszyklus beteiligten Enzymen in Gehirnen von Alzheimer-Patienten *post mortem*. Die Autoren schlagen eine unterstützende Behandlung des Glucosestoffwechsels in AD-Patienten vor (Bubber et al. 2005). Neben der Alzheimer’schen Krankheit können weitere neurodegenerative Krankheiten, wie Morbus Wilson (Sheline und Wei 2006) und das Wernicke-Korsakow-Syndrom (Martin et al. 2005) genannt werden, für die gezeigt wurde, dass die PDHc-Aktivität stark reduziert ist. Besonders die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS – *reactive oxygen species*) zeigten inhibitorische Effekte auf den PDHc.

Die direkte und indirekte Beteiligung des humanen Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes an vielen verschiedenen Krankheitsbildern zeigt einmal mehr seine herausragende Funktion im humanen Stoffwechsel. Das detaillierte Verständnis von Funktion und Regulation der einzelnen Komponenten ist trotz 60-jähriger Forschung nach wie vor von großer Bedeutung.

1.2. Zielstellung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag zum detaillierten Verständnis der von der E1-Komponente des humanen PDH-Komplexes katalysierten Reaktionen, der Bindung und Decarboxylierung von Pyruvat und der reduktiven Acetylierung des Liponamids der E2-Komponente auf molekularer Ebene leisten. Des Weiteren soll die Regulation der *hsPDH-E1* durch Phosphorylierung der drei Serinreste 264, 271 und 203 charakterisiert werden. Jede Position soll einzeln auf ihre regulatorische Funktion für die Katalyse untersucht werden. Aus diesem Grund werden die vier aus der Literatur bekannten Pseudophosphorylierungsvarianten S264E, S264Q, S271E und S203E als Surrogate für die phosphorylierten Proteine verwendet (Korotchkina und Patel 2001a).

Für die Thiamindiphosphat-abhängige *hsPDH-E1* sowie für verschiedene andere ThDP-abhängige Enzyme wird eine Halbseitenreaktivität beschrieben (Khailova und Korotchkina 1985; Frank et al. 2004). Direkte kinetische Beweise waren für die humane E1-Komponente bisher noch nicht bekannt. Die Untersuchung dieser kinetischen Eigenschaft gehört zu den zentralen Zielen dieser Arbeit.

Die Katalysekonstante der isolierten E1-Komponente beträgt etwa 2 s^{-1} für die Carbonyl-Addition zwischen dem C2-Atom des ThDP und dem Carbonylkohlenstoff des Pyruvats (Seifert et al. 2006). Der Gesamtkomplex hat jedoch einen k_{cat} -Wert von ca. 60 s^{-1} (Korotchkina und Patel 2001a). Die Ursache dieser Beschleunigung sollte im Rahmen dieser Dissertation durch die Untersuchung der Reaktion zwischen *hsPDH-E1* und der Lipoyldomäne 2 der E2-Komponente näher analysiert werden. Zur Klärung dieser Fragen wurden verschiedene Methoden ($^1\text{H-NMR}$, CD- und UV/Vis-Spektroskopie, Massenspektrometrie, Analytische Ultrazentrifugation, Röntgenkleinwinkelstreuung, ITC, Analytische Gelfiltration) eingesetzt.

Die für die biochemische Charakterisierung des Wildtyps der E1-Komponente etablierten Methoden wurden zur funktionellen Analyse der Pseudophosphorylierungsvarianten herangezogen. Das Hauptaugenmerk lag auf der Charakterisierung der Position 264. Durch die Phosphorylierung des Serin 264 wird der *hsPDH-Komplex* am effektivsten und schnellsten inaktiviert (Korotchkina und Patel 2001a; Korotchkina und Patel 2001b) und hat daher aus physiologischer Sicht die größte Bedeutung. Der Austausch von Serinen gegen Glutamate zeigte bereits für andere Enzyme, dass dadurch eine Phosphorylierung am Serin imitiert werden kann (Golbik et al. 2001). Frühere Studien zeigten, dass sich die Glutamat-Variante *hsPDH-E1* (S264E) analog zum phosphorylierten Enzym verhält (Korotchkina und Patel 2001a). Der Vorteil der Analyse der Glutamat-Varianten besteht darin, dass sie zum einen stabil und zum anderen selektiv für nur eine der drei möglichen Positionen sind. Zusätzlich wurde auch die Glutamin-Variante (S264Q) biochemisch charakterisiert. Das Ziel der Experimente mit den Varianten war es zu bestimmen, welchen Einfluss Größe und Ladung des Restes an Position 264 auf die Reaktivität der E1-Komponente hat. Die Varianten S271E und S203E sollten ebenfalls mit den etablierten Methoden untersucht werden, um einen Einblick in die molekularen Ursachen der Inaktivierung durch Phosphorylierung der beiden Positionen zu erhalten.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

Acetonitril	Merck KGaA
Acrylamid 4k Mix (30 %)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Agarose	AppliChem GmbH, Darmstadt
Agar-Agar	Carl Roth GmbH & Co
Ameisensäure (85 %)	VWR International GmbH, Darmstadt
Ammoniumperoxodisulfat	Serva Electrophoresis GmbH
Ampicillin (Natriumsalz)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck KGaA
BSA	AppliChem GmbH, Darmstadt
Chloramphenicol	AppliChem GmbH, Darmstadt
Coomassie-Brilliantblau G-250	AppliChem GmbH, Darmstadt
Deuteriumoxid (99,9 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
2,6-Dichlorphenolindophenol	Merck KGaA
DNase I	AppliChem GmbH, Darmstadt
1,4-Dithioerythritol	Carl Roth GmbH & Co
EDTA	VWR International GmbH, Darmstadt
Essigsäure (96 %)	VWR International GmbH, Darmstadt
Ethanol (vergällt, 99.8 %)	VWR International GmbH, Darmstadt
Ethidiumbromid (1 %)	Carl Roth GmbH & Co
β -D-Glucose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Glyzerin (87 %)	VWR International GmbH, Darmstadt
Hefeextrakt	AppliChem GmbH, Darmstadt
Imidazol	AppliChem GmbH, Darmstadt
IPTG	AppliChem GmbH, Darmstadt
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co
Kaliumchlorid	AppliChem GmbH, Darmstadt
Kaliumhydroxid	VWR International GmbH, Darmstadt
Kanamycinsulfat	AppliChem GmbH, Darmstadt
Liponsäure (D,L-alpha)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Lysozym	AppliChem GmbH, Darmstadt
Magnesiumchlorid	VEB Laborchemie Apolda
Magnesiumsulfat (Heptahydrat)	Merck KGaA
β -Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH & Co
Natriumchlorid	VWR International GmbH, Darmstadt
Natriumhydroxid	VWR International GmbH, Darmstadt
Phosphorsäure (85 %)	VWR International GmbH, Darmstadt
Pyruvat (Natriumsalz)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH

Salzsäure (37 %)	VWR International GmbH, Darmstadt
SDS	Serva Electrophoresis GmbH
Streptomycinsulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
TCA	Carl Roth GmbH & Co
TEMED	Merck KgaA
Thiamin (Hydrochlorid)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Thiamindiphosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Tris	AppliChem GmbH, Darmstadt
Trypton	AppliChem GmbH, Darmstadt

Das Substratanalogon Methylacetylphosphonat sowie HETHDP und die Vorstufen der ThDP-Analoga N3'-Pyridylthiamin und Thiaminthiazolon wurden freundlicherweise von PD Dr. Ralph Golbik zur Verfügung gestellt. Die Phosphorylierung der beiden Vorstufen erfolgte während den praktischen Arbeiten der Promotion nach der Methode von Karrer und Viscontini (Viscontini und Karrer 1949) in Zusammenarbeit mit PD Dr. Ralph Golbik.

2.1.2. Geräte und Verbrauchsmaterialien

Geräte

Thermocycler	Biometra
Autoklav	Tuttenauer
Biostat C-DCU (Fermenter)	B. Braun Biotech Int.
Gaulin Hochdruckhomogenisator	AVP, Lübeck
Zentrifugen/Rotoren	
RC-5B/SLA-3000	Sorvall Hanau
L8-60M Ultrazentrifuge/Ti40	Beckman Instruments, USA
J2-HC/JA 10 und JS-4.3	Beckman Instruments, USA
Spectrafuge Minizentrifuge Modell C1301	Abimed, Langenfeld
Biofuge pico	UniEquip, Martinsried
Optima XL-A Zentrifuge/ An50Ti	Beckman Instruments, USA
FPLC	Amersham Pharmacia, Freiburg
HPLC	Beckman Instruments, USA
Säulen	
Ni-NTA	Amersham Pharmacia, Freiburg
Superdex 75	Amersham Pharmacia, Freiburg
TSK 3000	TOSOH corporation
Spektrometer	
V-560 (UV/Vis)	JASCO corporation
SX-18MV (<i>stopped flow</i>)	Applied Photophysics, GB
SX-20 (<i>stopped flow</i>)	Applied Photophysics, GB
J-810 (CD)	JASCO corporation

Chirascan (CD)	Applied Photophysics, GB
Bruker ARX 400 Avance (NMR)	Bruker BioSpin, Karlsruhe
Ultraflex 2 MALDI TOF/TOF (MS)	Bruker Daltonics GmbH, Bremen
RQF-3 (<i>rapid-quenched-flow</i>)	Kintek, Austin/Texas USA
VP-ITC MicroCalorimeter	MicroCal™
EPS 301 (Gelelektrophorese)	Amersham Biosciences
pH-Meter	WTW, Weilheim
Waagen	Obhaus, Schweiz & Satorius

Verbrauchsmaterialien

Dialyseschlauch (27 mm)	Serva, Heidelberg
ZipTip _{C4}	Millipore™, Bedford USA
Polystyrolküvetten	Carl Roth GmbH & Co
UV- und CD-Küvetten	Hellma GmbH & Co
Vivaspin 20 ml <i>concentrator</i>	Vivascience AG, Hannover
45 µM Filter	Nalgene, New York, USA

2.1.3. Material für die molekularbiologischen Arbeiten

Agarose	Cambrex Bioscience Rockland Inc.
<i>gel purification kit</i>	Qiagen GmbH
<i>PCR purification kit</i>	Qiagen GmbH
<i>miniprep kit</i>	Qiagen GmbH
dNTP's (Mix 1.25 mM)	New England Biolabs GmbH
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase (2.5 U/µl)	Fermentas
<i>Pfu</i> -Puffer (zehnfach)	Fermentas
<i>Bsa</i> I (10000 U/ml)	New England Biolabs GmbH
<i>Bam</i> HI (20000 U/ml)	New England Biolabs GmbH
BSA (10 mg/ml)	New England Biolabs GmbH
NEB Puffer 3 (zehnfach)	New England Biolabs GmbH
Alkalische Phosphatase (CIP) (20000 U/ml)	New England Biolabs GmbH
T4 DNA-Ligase (20000 U/ml)	New England Biolabs GmbH
T4-Ligase-Puffer (zehnfach)	New England Biolabs GmbH
Elektrophorese-Apparatur	Owl preparation systems
XL-1 <i>blue</i> -Zellen	Invitrogen
DNA-Puffer (sechsfach)	Fermentas
DNA-Marker (1 kb, 100 bp)	Fermentas/ New England Biolabs GmbH

Für die DNA-Analyse wurden 1 %-ige Agarosegele unter Verwendung von TAE-Puffer und mit einer Ethidiumbromidkonzentration von 0.33 µg/ml angefertigt.

2.1.4. Stämme

Die Gene der humanen Varianten der E1-Komponente *hsPDH-E1* (Wildtyp, S264E, S264Q, S271E und S203E) wurden in dem Expressionsstamm *E. coli* – M15 (DH5 α) überexprimiert. Der Stamm enthält zwei Plasmide. Zum einen enthält er das Plasmid pDMI.1 mit der Kanamycinresistenz und dem Gen für den lac-Repressor. Zum anderen enthält der Stamm das Plasmid pQE-9-6HE1 α /E1 β mit den codierenden Sequenzen für die Coexpression der α - und β -Untereinheiten der *hsPDH-E1* und einer Ampicillinresistenz (Korotchkina et al. 1995). Als Stamm zur Expression der *hsPDH-E2LII* wurde der Stamm *E. coli* BL 21 C+RP verwendet. Zusätzlich zu dem für die Expression des Zielproteins notwendigen pETSUMO-E2LipII (Kanamycinresistenz) enthält dieser Stamm einen Vektor für die Produktion von optimierten tRNA-Synthetasen für die Aminosäuren Arginin und Prolin. Dieser Vektor trägt auch eine Chloramphenicolresistenz.

2.2. Methoden

2.2.1. Molekularbiologische Arbeiten zur Generierung der *hsPDH-E2LII*

Die Lipoyldomäne 2 (AS 120-233) des humanen PDHc wurde schon in früheren Arbeiten anderer Arbeitsgruppen genutzt (Liu et al. 1995a; Howard et al. 1998). Die Domäne sollte jedoch in dieser Arbeit unter Verwendung des SUMO-Systems (*small ubiquitin-like modifier*) rekombinant hergestellt werden. Bei dieser Methode handelt es sich um ein Verfahren, ein Fusionsprotein, das aus dem Zielprotein und dem Faltungshelfer SUMO besteht, rekombinant zu produzieren. Während der letzten Jahre wurde das SUMO-System für viele problematische Proteinexpressionen in *E. coli* (Löslichkeit, Faltung, Proteingehalt) das Expressionssystem der Wahl. Im Vergleich zu anderen Fusionsproteinen (Maltosebindeprotein, Glutathion-S-Transferase) erwies es sich als deutlich effizienter (Zuo et al. 2005). Ein großer Vorteil der Fusion mit SUMO ist die einfache Abspaltung des SUMO-Anteils durch die SUMO-Protease. Diese erkennt die Tertiärstruktur des SUMO-Proteins als Motiv für die proteolytische Spaltung (Malakhov et al. 2004). Somit wird ein nativer N-Terminus des Zielproteins erhalten, was bei den anderen Expressionssystemen dieser Art nicht gewährleistet ist. Für eine effiziente Reinigung wurden SUMO-Protein und SUMO-Protease mit einem N-terminalen His-tag versehen, so dass das Zielprotein durch eine einfache Affinitätschromatographie abgetrennt werden kann (Malakhov et al. 2004). Der in dieser Arbeit verwendete pETSUMO-Expressionsvektor wurde im Vorfeld durch Einführung einer umfangreichen *multi cloning site* modifiziert (Abb. A1) (Bosse-Doenecke et al. 2008). Es ist wichtig an dieser Stelle zu erwähnen, dass das SUMO-Protein zwar ein Molekulargewicht von ca. 13 kDa hat, in der SDS-PAGE jedoch auf einer Höhe von 17 kDa erscheint (Malakhov et al. 2004). Dies ist bei der Präparation der *hsPDH-E2LII* mit einem Molekulargewicht von ca. 12.5 kDa ein günstiger Umstand für die Auswertung der SDS-PAGE-Analyse.

Die Grundlage für die Klonierung des Konstruktes *hsPDH-E2LII* bildete das Gesamtgen der humanen E2-Komponente. Es besteht aus 1845 Basenpaaren (bp) und wurde für die

Expression in *E. coli* optimiert synthetisiert (Geneart AG). Das DNA-Gen wurde in einen pUK-Transportvektor kloniert (pUK-E2). Das Gen, welches für die E2-Domäne *hsPDH-E2LII* codiert, besteht aus 339 bp. Dabei handelt es sich um die Sequenz von Nukleotid 378 bis Nukleotid 716 des Gesamtgens. Für die Amplifizierung des Genabschnittes wurden folgende Oligonukleotide (Synthese durch MWG) genutzt:

forward-Primer: 5' ATG GTC TCA TGG TTC TGC GCA GGC GCC G 3'

reverse-Primer: 5' CTA GGA TCC CTA TTA CGG AAC CTG CGG TTT CAG 3'

Die Verwendung der aufgeführten Oligonukleotide ermöglicht das Einführen von Restriktionsschnittstellen (unterstrichen) zur Gewährleistung der Klonierung in einen anderen Vektor. Der *forward*-Primer beinhaltet eine Restriktionsschnittstelle für *BsaI* und der *reverse*-Primer führt eine Restriktionsschnittstelle für *BamHI* ein (in der Sequenz jeweils unterstrichen). Die Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Amplifizierung des Zielkonstrukts wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt (Die Konzentrationen der einzelnen Lösungen finden sich in Kap. 2.1.3.):

Reaktionsansatz (50 µl):

1.5 µl	<i>Pfu</i> DNA-Polymerase
5 µl	<i>Pfu</i> -Puffer (zehnfach)
2.5 µl	<i>forward</i> -Primer (0.5 pmol/µl)
2.5 µl	<i>reverse</i> -Primer (0.5 pmol/µl)
1 µl	dNTP's (Mix 1.25 mM)
1 µl	pUK-E2 (40 ng/µl)
36.5 µl	H ₂ O

PCR-Programm:

1. 95 °C 5 min
2. 95 °C 1 min
3. 74 °C 1 min + 0.5°C pro Zyklus
4. 72 °C 45 sec
5. Wiederholung von Schritt 2. – 4. für 9 Zyklen
6. 95 °C 1min
7. 72 °C 1 min 45 sec
8. Wiederholung von Schritt 6. – 7. für 20 Zyklen
9. 72 °C 3 min
10. 4 °C

Zur Analyse der PCR wurde der Ansatz mit DNA-Puffer (sechsfach) versetzt und auf ein 1 %-iges Agarosegel aufgetragen.

Nach einer präparativen PCR wurde das PCR-Produkt mit Hilfe eines *PCR purification kit* gereinigt und in 40 µl Wasser aufgenommen. Für den präparativen Verdau wurden 35 µl des gereinigten Konstrukts eingesetzt (Die Konzentration wurde nicht bestimmt).

Verdau (50 µl):

5 µl NEB-Puffer 3 (zehnfach)

2.5 µl *BsaI*

35 µl PCR-Produkt

5 µl BSA (1:10 Verdünnung)

- Inkubation des Ansatzes für 4-5 h bei 50 °C

Zugabe von 2.5 µl *BamHI*

- Inkubation des Ansatzes für 4-5 h bei 37 °C
- Inaktivierung der Restriktionsenzyme für 1 h bei 65 °C
- Zugabe von 1.5 µl alkalischer Phosphatase (gilt nur für pETSUMO-Verdau)

Nach der Auftragung des verdauten *Inserts* auf ein 1%-iges Agarosegel wurde die Bande bei ca. 370 bp (Zielgen + Überhänge durch die eingeführten Restriktionsschnittstellen) ausgeschnitten. Die DNA wurde aus dem Gel gereinigt (*gel purification kit*) und mit 40 µl Wasser eluiert. Die Konzentration der Lösung wurde mit Hilfe eines analytischen Agarosegels abgeschätzt.

Zur Expression des Gens wurde der Zielvektor pETSUMO adapt (siehe Anhang) verwendet. Der Vektor trägt eine Kanamycinresistenz und eine umfangreiche *multi cloning site*. 1 µl des Vektors (20 ng) wurde in 1 ml elektrokompente XL1 *blue* – Zellen transformiert. Die Zellsuspension wurde 1 h bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (5 min, 13000 rpm). Der Überstand wurde durch Dekantieren entfernt. Das noch im Reaktionsgefäß verbliebene LB-Medium (ca. 50 µl) wurde zur Resuspension der Zellen verwendet. Die Zellsuspension wurde auf Kanamycin-haltige LB-Agarplatten (30 µg/ml Kan) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Kolonien der Platte wurden zum Animpfen von 15 ml-Flüssigkulturen (50 µg/ml Kan) verwendet. Nach 12-stündiger Inkubation bei 37 °C wurden jeweils 5 ml Zellsuspension abzentrifugiert. Das Plasmid wurde mit Hilfe eines *miniprep kits* (Qiagen) aus den Zellen isoliert und in 30-50 µl destilliertem Wasser aufgenommen.

Im Anschluss wurde die DNA-Konzentration bei 260 nm bestimmt (Mülhardt 2000) und 3 µg DNA für den präparativen Verdau eingesetzt. Der Verdau erfolgte nach dem oben beschriebenen Protokoll. Anschließend wurde ein analytisches Gel angefertigt um die Konzentration abzuschätzen.

Die Berechnung der *Insert*-Masse (m_{Insert}) für die Ligation bei einer festgelegten Vektormasse (m_{Vektor}) von 100 ng/50 ng erfolgte nach folgender Gleichung.

$$m_{\text{Insert}}(\text{ng}) = \frac{5 \cdot m_{\text{Vektor}}(\text{ng}) \cdot \text{bp}(\text{Insert})}{\text{bp}(\text{Vektor})} \quad \text{Gl. 2.1}$$

bp (*Insert*) – 370 Basenpaare, bp (Vektor) – 5643 Basenpaare

Für 10 μl Ligationsansatz wurden 1 μl T4 DNA-Ligase und 1 μl T4-Puffer eingesetzt. Das fehlende Volumen wurde durch bidestilliertes Wasser aufgefüllt. Die Ligation erfolgte für 16 h bei einer Temperatur von 16 °C. Jeweils 1 μl der Ligationsansätze wurden zur Transformation in elektrokompente XL1 *blue*-Zellen eingesetzt. Nach 60-minütiger Inkubation der Zellen bei 37 °C wurden die Zellen wie oben beschrieben behandelt und auf Kanamycin-haltigen LB-Agarplatten (30 $\mu\text{g/ml}$ Kan) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die auf den Platten gewachsenen Kolonien wurden durch eine Kolonie-PCR auf positive Klone getestet. Die Kolonie-PCR wurde nach dem oben beschriebenen PCR-Protokoll durchgeführt. Das *template* wird jedoch durch 5 μl einer Zellsuspension ersetzt. Diese wird durch Resuspension der Zielkolonien in 50 μl bidestilliertem Wasser und Kochen der Suspension für 10 min bei 110 °C gewonnen. Die Proben wurden anschließend durch ein 1%-iges Agarosegel analysiert. Zellen von positiv identifizierten Kolonien wurden zum Animpfen einer 15 ml-Flüssigkultur verwendet und über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Aus den Zellen der Kultur wurde am nächsten Tag wie oben beschrieben Plasmid präpariert und anschließend die DNA-Konzentration bei 260 nm bestimmt. Eine Menge von 1 μg Plasmid-DNA wurde sequenziert (MWG). Das Plasmid mit der richtigen Sequenz wird im folgenden pETSUMO-E2LipII genannt. Der Vektor pETSUMO-E2LipII wurde für Expressionstests in verschiedenen Stämmen von *E. coli* verwendet. Ausführlich werden die Arbeitsschritte in der Diplomarbeit von Herrn Dipl.-Biochem. Bert Güttler beschrieben (Güttler 2008). Als geeigneter Expressionstamm erwies sich die Zelllinie BL21 C+ RP mit einer Antibiotikaresistenz für Chloramphenicol (CA). Zellen mit transformiertem Plasmid pETSUMO-E2LipII wurden in Form einer Glycerinkultur bei -70 °C gelagert.

2.2.2. Expression und Reinigung der *hsPDH-E2LII*

Die Domäne *hsPDH-E2LII* (AS 121-233) hat ein Molekulargewicht von 12281 Da in ihrer nicht-lipoylierten Form und 12469 Da in ihrer lipoylierten Form. In Kapitel 2.2.1. wird aufgeführt, dass sich Zelllinie *E. coli* BL21 C+ RP als geeigneter Expressionsstamm erwiesen hat. Zellen einer Glyzerinkultur dieses Stammes wurden auf einer LB-Platte (50 µg/ml Kan, 30 µg/ml CA) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Eine Einzelkolonie dieser Platte wurde zum Animpfen einer Vorkultur (200 ml LB-Medium, 50 µg/ml Kan, 30 µg/ml CA) genutzt. Die Flüssigkultur inkubierte schüttelnd über Nacht bei 37 °C. Die Zellen wurden anschließend abzentrifugiert (20 min, 6000 rpm, 4 °C) und in 30 ml frischem LB-Medium (Kan, CA) resuspendiert. Jeweils 5 ml der Suspension wurden zum Animpfen von je einem Liter der Hauptkultur (LB-Medium, 50 µg/ml Kan, 30 µg/ml CA) verwendet. Die Hauptkultur wurde unter Schütteln bei 37 °C inkubiert bis eine optische Dichte von 0.8-1 erreicht war. Anschließend wurde die Proteinexpression durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1 mM) und Liponsäure (Endkonzentration 1 mM) induziert. Die Expression erfolgte unter Schütteln für 4 h bei 37 °C.

Die Zellen (10-15 g Feuchtgewicht) wurden durch Zentrifugation (20 min, 6000 rpm, 4 °C) geerntet und bei -20 °C gelagert.

Die Proteinreinigung erfolgte nach folgendem Protokoll. Zunächst wurden 8-10 g Zellen in 30-40 ml Resuspensionpuffer (0.05 M Kaliumphosphat, 1 mM EDTA, 10 mM Imidazol, pH 7.0) aufgetaut. Der Suspension wurde PMSF (Endkonzentration 1 mM) zugesetzt. Nach Inkubation mit Lysozym (Endkonzentration 1 mg/ml), DNase I (Endkonzentration 5 µg/ml) und MgSO₄ (Endkonzentration 5 mM) für 30 min bei 8 °C wurden die Zellen mittels Hochdruckhomogenisation aufgeschlossen (p = 1200 bar). Die Zelltrümmer wurden durch Ultrazentrifugation (40 min, 30000 rpm, 4 °C) abgetrennt. Der Überstand wurde mit 0.8 % (w/v) Streptomycinsulfat versetzt und 30 min bei 8 °C unter Rühren inkubiert. Anschließend folgte eine zweite Ultrazentrifugation (40 min, 30000 rpm, 4 °C). Der Überstand wurde mit Resuspensionspuffer 1 : 4 verdünnt und mit KCl (Endkonzentration 300 mM) versetzt. Die proteinhaltige Lösung wurde mit einer Peristaltikpumpe (Flussgeschwindigkeit 5 ml/min) auf eine Ni-NTA-Chromatographiesäule (V = 14 ml) aufgetragen. Die Säule wurde im Anschluss mit 100 ml Puffer A (0.05 M Kaliumphosphat, 0.3 M KCl, 20 mM Imidazol, pH 7.0) bei einer Flussgeschwindigkeit von 2 ml/min gespült. Die Elution des Fusionsproteins erfolgte über ein Volumen von 100 ml mittels eines Gradienten von 20-200 mM Imidazol und weiteren 50 ml Puffer B (0.05 M Kaliumphosphat, 0.3 M KCl, 200 mM Imidazol, pH 7.0). Die Flussgeschwindigkeit betrug 2 ml/min und es wurden 2 ml pro Fraktion gesammelt. Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE nach LAEMMLI (Laemmli 1970) analysiert und die zielproteinhaltigen Fraktionen wurden vereinigt. Anschließend wurde die Proteinkonzentration des Fusionsproteins bestimmt (siehe Kap. 3.2.1.). Die Spaltung des Fusionsproteins erfolgte mit Hilfe der SUMO-Protease (freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch Dr. Eva Bosse-Doenecke und Frau Dipl.-Biochem. Annett Weidner). Das Enzym wurde in einem molaren Verhältnis von 1:5000 eingesetzt. Der Verdau wurde über Nacht bei 8 °C unter Rühren inkubiert. Die

Vollständigkeit des Verdaus wurde über SDS-PAGE ermittelt. Um das SUMO-Protein von der *hsPDH-E2LII* zu trennen, wurde ein zweiter Ni-NTA-Lauf durchgeführt. Ein His-tag befindet sich am N-Terminus des SUMO-Proteins und der SUMO-Protease, so dass diese am Säulenmaterial binden und die *hsPDH-E2LII* im Durchlauf eluiert wird. Die Proteinlösung wurde 1:3 mit Puffer A verdünnt, um die Imidazolkonzentration zu senken und dadurch die Bindekapazität des SUMO-Proteins und der SUMO-Protease zu erhöhen. Anschließend wurde die Lösung mit einer Peristaltikpumpe (Flussgeschwindigkeit 3 ml/min) über die Ni-NTA-Säule gepumpt. Das SUMO-Protein wurde mit 50 ml Puffer B von der Säule eluiert. Der Durchlauf und das Eluat wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Der zielproteinhaltige Durchlauf wurde in Konzentratoren (Ausschluss 10 kDa, Zentrifugation bei 4000 rpm und 4 °C) auf 4 ml konzentriert. Durch eine Gelfiltration über eine Superdex 75-Säule wurden weitere Verunreinigungen abgetrennt und die *hsPDH-E2LII* in ihren Lagerpuffer überführt (0.1 M Kaliumphosphat, 0.3 M KCl, pH 7.6). Die Flussgeschwindigkeit betrug 1.5 ml/min und pro Fraktion wurden 0.75 ml gesammelt. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE analysiert und die zielproteinhaltigen Fraktionen vereinigt. In einigen Fällen war die Proteinprobe noch mit SUMO-Protein verunreinigt. Deshalb wurde ein dritter Ni-NTA-Lauf angeschlossen, bei dem die Proteinlösung erneut über die Säule gepumpt (Peristaltikpumpe 3 ml/min) und der Durchlauf aufgefangen wurde. Die Reinheit der Proteinlösung wurde erneut mit Hilfe von SDS-PAGE ermittelt. Das gereinigte Protein wurde mittels Konzentratoren auf eine Konzentration von ca. 40-50 mg/ml konzentriert. Anschließend wurden Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Aus 8-10 g Zellmaterial konnten 80-100 mg gereinigte *hsPDH-E2LII* gewonnen werden.

2.2.3. Expression und Reinigung der *hsPDH-E1*

Die Zellanzucht zur Expression der *hsPDH-E1* erfolgte mittels Fermentation. Zellen einer Glycerinkultur des Stammes *E. coli* M15 (DH5 α), die das Plasmid pQE-9-6HE1 α /E1 β zur Expression der *hsPDH-E1* enthalten, wurden auf eine LB-Agar-Platte (25 μ g/ml Kan, 100 μ g/ml Amp) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Eine Kolonie dieser Platte diente zum Animpfen der Vorkultur (2 x 200 ml LB-Medium, Kan 25 μ g/ml, Amp 100 μ g/ml). Die Inkubation erfolgte über Nacht unter Schütteln bei 37 °C. Die Zellen der Vorkultur wurden abzentrifugiert (20 min, 6000 rpm, 4 °C) und in 100 ml frischem LB-Medium resuspendiert. Die Resuspension diente als Inokulum für die 6-Liter-Fermentation mit Hefeextrakt. Die Vorbereitung der Fermentation erfolgte nach einem allgemeinen Standardprotokoll.

Der Fermentation wurden Ampicillin (100 μ g/ml) und Kanamycin (25 μ g/ml) als Antibiotika zugesetzt. Die Fermentationparameter wurden wie folgt eingestellt: pH 7.0 (mit 10 % H₃PO₄ und 10 % KOH), T = 37 °C, pO₂ = 30 %. Für den Rührer und den Luftstrom wurde ein Kaskadenprogramm aktiviert, das sich am Sauerstoffgehalt orientierte. Das Zellwachstum wurde durch Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) verfolgt. Der Glukosegehalt wurde durch entsprechende Messstäbchen ermittelt. Als die Glucose verbraucht war, wurde mit dem Zufüttern einer Glycerin-haltigen Lösung (300 g/L

Hefeextrakt, 250 ml/L Glycerin) begonnen. Bei einer OD_{600} von 40-60 wurde die Temperatur auf 25 °C eingestellt. Die Produktion der *hsPDH-E1* wurde nach Erreichen der Temperatur von 25 °C durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1 mM) und Thiamin (Endkonzentration 100 µg/ml) gestartet. Die Expression erfolgte über Nacht. Vor der Zellernte wurde eine OD_{600} von 80-100 erreicht. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation für 20 min bei 6000 rpm und 4 °C. Das Zellpellet (800-1300 g Feuchtwicht) wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Für die Proteinreinigung der *hsPDH-E1* wurden 100-150 g Zellen in Resuspensionspuffer (0.05 M Kaliumphosphat, 1 mM EDTA, 1 mM DTE, 10 mM Imidazol, pH 7.0) aufgetaut, so dass die Zellsuspension ein Endvolumen von maximal 300 ml hatte. Der Suspension wurde 1 mM PMSF zugesetzt und anschließend ein Lysozym- und DNase I-Verdau durchgeführt (1 mg/ml Lysozym, 5 µg/ml DNase I, 5 mM $MgSO_4$). Der Ansatz wurde für 30 min bei 8 °C gerührt. Anschließend erfolgten der Zellaufschluss und das Abtrennen der Zellrümpfer wie in Kap. 3.2.2. beschrieben.

Die Proteinlösung wurde 1:4 mit Resuspensionspuffer verdünnt und mit 300 mM KCl versetzt. Dann wurde die Lösung mittels einer Peristaltikpumpe (Flussgeschwindigkeit 3 ml/min) auf eine Ni-NTA-Chromatographiesäule aufgetragen. Unspezifisch gebundene Proteine wurden durch einen Waschschrift mit 150 ml Puffer A (0.05 M Kaliumphosphat, 0.3 M KCl, 20 mM Imidazol, pH 7.0) bei einem Fluss von 2 ml/min entfernt. Ein Gradient von 20-200 mM Imidazol über 100 ml und anschließend 50 ml Puffer B (0.05 M Kaliumphosphat, 0.3 M KCl, 200 mM Imidazol, pH 7.0) dienten zur Elution des Zielproteins. Die Flussgeschwindigkeit des Elutionsschritts betrug 2 ml/min und pro Fraktion wurden 2 ml gesammelt. Die Analyse der Fraktionen erfolgte mittels SDS-PAGE. Die zielproteinhaltigen Fraktionen wurden vereinigt und die Lösung in Konzentratoren auf 4 ml aufkonzentriert. Anschließend folgte ein weiterer Reinigungsschritt mit Hilfe der Gelfiltration. Die Vorgehensweise erfolgte wie in Kap. 3.2.2. beschrieben unter den gleichen Pufferbedingungen. Nach der Prüfung der Reinheit durch SDS-PAGE wurden die entsprechenden Fraktionen vereinigt. Die Konzentration der *hsPDH-E1* wurde durch Konzentrieren auf 30-40 mg/ml eingestellt. Aliquots des gereinigten Enzyms wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Aus 100 g Zellmaterial konnten ca. 60 mg *hsPDH-E1* gereinigt werden.

2.2.4. Konzentrationsbestimmung der untersuchten Proteine mittels UV/Vis-Spektroskopie

UV/Vis-Spektroskopie ist eine Methode, bei der die Wechselwirkungen der zu analysierenden Probe mit elektromagnetischen Wellen im ultravioletten und sichtbaren Wellenlängenbereich genutzt werden. Eine Detektion von Absorption ist dann möglich, wenn die Probe chromophore Gruppen besitzt. In der Biochemie wird diese Methode auf vielfältige Weise genutzt. Enzymatische Reaktionen können verfolgt werden, wenn sich die Absorptionseigenschaften der Lösung z.B. durch Verbrauch eines chromophoren Substrats

oder die Bildung eines chromophoren Produkts während eines Umsatzes ändern. Die Grundlage der Absorptionsspektroskopie bildet das Lambert-Beer'sche Gesetz (Gl. 2.2).

$$E = c \cdot d \cdot \varepsilon \quad \text{Gl. 2.2}$$

E – Extinktion, c – Konzentration, d – Weglänge des Lichtes, ε – Extinktionskoeffizient

In Proteinen dienen sowohl die Polypeptidkette, als auch die Seitenketten der aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin als Chromophore.

Während die Peptidbindung Absorptionsmaxima bei 190 nm ($\varepsilon \sim 7000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) und 220 nm ($\varepsilon \sim 100\text{-}200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) zeigt, treten die Absorptionsmaxima der chromophoren AS im längerwelligen Bereich auf. So besitzt Tryptophan bei 280 nm ($\varepsilon \sim 6000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), Tyrosin bei 275 nm ($\varepsilon \sim 1500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) und Phenylalanin bei 260 nm ($\varepsilon \sim 200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) ein Maximum (Lottspeich und Engels 2006). Als weiteres Chromophor muss Cystin (zwei verbrückte Cysteinreste) mit einem Extinktionskoeffizienten von $120 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ bei 280 nm genannt werden. Die Absorption von Proteinen bei 280 nm ist jedoch im Wesentlichen auf Tryptophan und Tyrosin zurückzuführen und wird zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen durch UV/Vis-Spektroskopie genutzt. Anhand der Aminosäuresequenz (Molekulargewicht) der verwendeten Proteine und der exakten molaren Extinktionskoeffizienten von Tyrosin ($\varepsilon_{\text{M},280\text{nm}} = 1280 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) und Tryptophan ($\varepsilon_{\text{M},280\text{nm}} = 5680 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) bei 280 nm kann der Extinktionskoeffizient genau bestimmt werden (Gill und von Hippel 1989). Die Absorption von Cystin kann bezogen auf die in dieser Arbeit verwendeten Proteine vernachlässigt werden, da das Cytosol von *E. coli* (Produktionsort der Proteine) ein reduzierendes Milieu darstellt.

Die molaren Extinktionskoeffizienten zur Bestimmung der Proteinkonzentration der für diese Arbeit relevanten Proteine wurden nach der Methode von GILL und von HIPPEL berechnet. Die Daten sind in Tabelle 2.1 zusammengefasst.

Tabelle 2.1.

Protein	Mittlerer molarer ε ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	Mittleres Molekulargewicht (g/mol)	E = 1 entspricht c (mg/ml)
<i>hs</i> PDH-E1 ($\alpha_2\beta_2$)	33660	38060	1.13
SUMO- <i>hs</i> PDH-E2LII (lipoyliert)	9970	25867	2.39
<i>hs</i> PDH-E2LII (lipoyliert)	9530	12469	1.30
<i>hs</i> PDH-E2LII (nicht lipoyliert)	9530	12281	1.29

2.2.5. Thermodynamische und kinetische Methoden

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten wurden mit den Programmen Kaleidagraph, SigmaPlot und Origin ausgewertet.

2.2.5.1. Analytische Ultrazentrifugation

Das Oligomerengleichgewicht der *hsPDH-E1* und ihrer Varianten sollte mit Hilfe der Methode der analytischen Ultrazentrifugation untersucht werden. Diese Methode ermöglicht die Bestimmung des Molekulargewichts, des Sedimentationskoeffizienten und liefert Informationen über Homogenität, Assoziationszustände und Form eines Proteins. Durch die Zentrifugation bei hohen Drehzahlen wirkt auf die zu analysierenden Partikel eine Zentrifugalkraft. Dieser wirken Reibungskraft und Auftriebskraft entgegen. Während der gesamten Zentrifugation stellt sich eine konstante Wanderungsgeschwindigkeit ein, die für die Partikel charakteristisch sind. Der partikelspezifische Sedimentationskoeffizient s ergibt sich aus der Zusammensetzung der genannten Kräfte und wird durch die Gleichung 2.3 beschrieben.

$$s = \frac{u}{\omega^2 r} = \frac{M(1 - \bar{v}\rho)}{Nf} \quad \text{Gl. 2.3}$$

s – Sedimentationskoeffizient (Svedberg: 10^{-13} s), u – Geschwindigkeit, ω – Winkelgeschwindigkeit (Radien/s), r – radiale Entfernung vom Rotationszentrum, M – Molekulargewicht (g/mol), \bar{v} – partielles spezifisches Volumen, ρ – Dichte des Lösungsmittels, N – Avogadro-Zahl, f – Reibungskoeffizient (Ralston 1993).

Anhand der Änderung des Sedimentationskoeffizienten bei verschiedenen Proteinkonzentrationen und dem bekannten Molekulargewicht der *hsPDH-E1* kann auf ein Dimer-Tetramer-Gleichgewicht geschlossen und der K_D -Wert für dieses Gleichgewicht bestimmt werden.

Die Proteinproben wurden wie folgt für die Experimente vorbereitet. Ein Milliliter der Proteinlösung (1 mg/ml *hsPDH-E1*, 0.1 mM ThDP, 1 mM MgSO_4) wurde über Nacht bei 8 °C gegen 40 ml der Pufferlösung (0.1 M Kaliumphosphat, 0.3 M KCl, pH 7.6, 0.1 mM ThDP, 1 mM MgSO_4) dialysiert. Um das Dimer-Tetramer-Gleichgewicht unter Umsatzbedingungen zu untersuchen, wurde dem Ansatz Pyruvat (Endkonzentration 2 mM) zugesetzt. Bei der Analyse des Apoenzyms wurden kein ThDP und MgSO_4 zugegeben. Anschließend wurde eine Konzentrationsreihe von 0.02-1 mg/ml Protein hergestellt und analysiert. Die Sedimentationsgeschwindigkeits-Läufe erfolgten bei einer Absorption von 230 bzw. 280 nm und 40000 rpm. Der Sedimentationsgleichgewichts-Lauf erfolgte bei 8000 rpm. Für dieses Experiment wurde eine Proteinkonzentration von 1 mg/ml gewählt. Die Experimente wurden in einer Doppelsektorzelle bei 20 °C durchgeführt. Als Rotor diente der An50Ti in einer Beckman Optima XL-A Zentrifuge. Die experimentellen Daten wurden mit Hilfe der von Beckman Instruments (Palo Alto, CA) zur Verfügung gestellten Software ausgewertet und anschließend mit dem Programm SigmaPlot weiter bearbeitet. Zur

Bestimmung des K_D -Werts des Dimer-Tetramer-Gleichgewichts ($2D \leftrightarrow T$) wurde folgende Gleichungen verwendet:

$$s = \frac{s_D \cdot [D] + s_T \cdot [T]}{[D] + [T]} \quad (\text{Gl. 2.4})$$

Gleichung 2.4 beschreibt, woraus sich der aus den Originaldaten ermittelte s -Wert zusammensetzt. Er ist vom Sedimentationsverhalten des Dimers (s_D) und Tetramers (s_T) sowie deren Konzentrationen in Lösung abhängig ($[D]$ und $[T]$). Die Gleichgewichtskonstante K kann entsprechend dem Massenwirkungsgesetz durch Gleichung 2.5 beschrieben werden.

$$K = \frac{[D]^2}{[T]} \quad (\text{Gl. 2.5})$$

Nun kann nach einfacher Umstellung der Gl. 2.5 der Term T in Gl. 2.4 ersetzt werden und es resultiert Gleichung 2.6.

$$s = \frac{s_D \cdot [D] + s_T \cdot (K \cdot [D]^2)}{[D] + K \cdot [D]^2} \quad (\text{Gl. 2.6})$$

Anschließend muss noch der Term D ersetzt werden. Dies erfolgt unter Berücksichtigung der molaren Konzentration P_0 bezogen auf die Gesamtkonzentration und erneuter Umstellung der Gleichung 2.5 nach $(D)^2$ (Gl. 2.8). Nach Umstellung und Lösung der entstandenen quadratischen Gleichung erhält man einen Term für D , der durch K und P_0 beschrieben wird (Gl. 2.11).

$$P_0 = [D] + 2[T] \quad (\text{Gl. 2.7})$$

$$[D]^2 = K \cdot [T] \quad (\text{Gl. 2.8})$$

$$[D]^2 = \frac{K}{2} \cdot (P_0 - [D]) = \frac{K \cdot P_0}{2} - \frac{K \cdot [D]}{2} \quad (\text{Gl. 2.9})$$

$$0 = [D]^2 + \frac{K}{2} \cdot [D] - \frac{K \cdot P_0}{2} \quad (\text{Gl. 2.10})$$

$$[D]_{1/2} = -\frac{K}{4} \pm \sqrt{\left(\frac{K^2}{16} + \frac{K \cdot P_0}{2}\right)} \quad (\text{Gl. 2.11})$$

$$[D]_I = -\frac{K}{4} + \sqrt{\left(\frac{K^2}{16} + \frac{K \cdot P_0}{2}\right)} \quad (\text{Gl. 2.12})$$

Für die Auswertung wurde D aus Gleichung 2.12 in Gleichung 2.6 eingesetzt und die experimentell gewonnenen s -Werte in Abhängigkeit von P_0 angepasst. Da es sich beim Sedimentationskoeffizienten um eine apparente Größe handelt, wird der s -Wert in Kapitel

3.1.1.3. als s_{app} bezeichnet. Die Auswertung der Originaldaten erfolgte freundlicherweise durch PD Dr. Hauke Lilie.

2.2.5.2. Isothermale Titrationskalorimetrie

Die isothermale Titrationkalorimetrie (ITC) dient der Analyse von Bindungsereignissen durch Abgabe oder Aufnahme von Wärme infolge der Wechselwirkung zwischen zwei Bindungspartnern. Die Auswertung eines ITC-Experiments liefert die Bindungsenthalpie ΔH , Bindungsentropie ΔS , Bindungsenergie ΔG , Anzahl der Bindungsstellen (n) und die entsprechenden K_D -Werte.

Die Arbeitsgruppe um CHUANG konnte 2004 für den humanen Verzweigtketten- α -Ketosäure-Dehydrogenase-Komplex (BCKDC) zeigen, dass die Wechselwirkung zwischen der lip-LBD (AS-Reste 1-84) und der E1b (analoges Protein des BCKDC zur *hsPDH-E1*) durch ITC-Messungen analysiert werden kann (Wynn et al. 2004). Diese Methode sollte auch für die in dieser Promotion verwendeten Proteine *hsPDH-E1* und *hsPDH-E2LII* angewandt werden.

Das Experiment wurde an einem VP-ITC MicroCalorimeter von MicroCal™ durchgeführt. Der Puffer enthielt die Komponenten 0.1 M Kaliumphosphat, 0.3 M KCl, pH 7.6, 0.1 mM ThDP und 1 mM MgSO₄. Als Titrant diente eine Lösung, die 800 μ M (9.98 mg/ml) *hsPDH-E2LII* enthielt. Die Reaktantenlösung enthielt 40 μ M aktive Zentren der *hsPDH-E1* (3.08 mg/ml). Die Geräteparameter waren: T = 20 °C, Anzahl der Injektionen 29 (à 10 μ l), *reference power* 15 μ cal/s, *initial decay* 300 s und Rührgeschwindigkeit 90 rpm.

Die Daten der ITC-Messungen wurden mit dem Programm Origin ausgewertet.

2.2.5.3. CD-Spektroskopie

Die CD-Spektroskopie basiert auf der Wechselwirkung von linear polarisiertem Licht mit optisch aktiven Substanzen. Der links und der rechts circularpolarisierende Anteil des Lichtes werden in Abhängigkeit von der Wellenlänge λ durch diese Substanzen unterschiedlich stark absorbiert. Dieses Phänomen kann in Form der Messgröße Elliptizität Θ spektroskopisch erfasst werden.

Für Proteine ergeben sich entsprechend ihrer Absorptionseigenschaften im UV/Vis-Bereich zwei relevante Wellenlängenbereiche. Im Fern-UV-CD (160-250 nm) wird die Absorption durch Peptidbindungen detektiert. Dies ermöglicht die Analyse der Sekundärstruktur von Proteinen. Nah-UV-CD-Spektren (250-400 nm) ergeben die Möglichkeit der Untersuchung der aromatischen Aminosäuren (Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin) und deren Umgebung bzw. Wechselwirkungen mit anderen Substanzen.

In dieser Arbeit wurden sowohl Fern- als auch Nah-UV-CD angewandt. Zur Untersuchung der Sekundärstruktur der beiden Proteine *hsPDH-E1* und *hsPDH-E2LII* wurde mit Fern-UV-CD gearbeitet. Zur Analyse der Intermediate des ThDP wurden Nah-UV-CD-Spektren aufgenommen.

Thiamindiphosphat ist ein prochirales Molekül, das in freier Lösung kein CD-Spektrum aufweist. Durch die Wechselwirkung mit der Proteinkomponente während der Bildung des Holoenzym bzw. während der Bildung von Intermediaten durch die Reaktion des Holoenzym mit Substraten oder Analoga, kann es zur Absorption kommen, die durch CD-Spektroskopie detektierbar ist.

Bereits 1980 konnte für die Holo-Pyruvatoxidase gezeigt werden, dass durch die Bindung des Substratanalogons Methylacetylphosphonat eine Veränderung des CD-Spektrums der Probe im Bereich von 290-300 nm auftritt (O'Brien et al. 1980).

Die CD-Experimente wurden am Jasco-Spektrometer J-810 durchgeführt.

- **Sekundärstruktur der *hsPDH-E2LII***

Die Fern-UV-CD-Spektren der *hsPDH-E2LII* (0.2 mg/ml, 16 μ M) wurde in 20 mM Kaliumphosphat, pH 7.6 und 20 °C gemessen. Folgende Parameter wurden eingestellt: $\lambda_{\text{Start}} = 260$ nm, $\lambda_{\text{End}} = 190$ nm, Datenintervall 0.2 nm, kontinuierlicher Modus, Standardempfindlichkeit (100 mdeg), Aufnahmegeschwindigkeit 100 nm/s, *response* 1 s, Spaltbreite 1 nm, 10 Akkumulationen.

- **Bestimmung des K_{app} -Werts für die Bindung von Methylacetylphosphonat**

Die Bestimmung der Dissoziationskonstanten (K_{app}) für die Bindung von Methylacetylphosphonat (MAP) und die verschiedenen *hsPDH-E1* Varianten erfolgte durch die Verfolgung der Bildung einer charakteristischen Bande bei einer Wellenlänge von 290 nm. Durch die Bindung des Substratanalogons an ThDP entsteht 2-Phosphonolaktyl-ThDP (PLThDP). Das Enzym ist nicht in der Lage PLThDP umzusetzen und bleibt auf dieser Reaktionsstufe stehen. Dabei bildet sich das 1',4'-Iminotautomer des Cofaktors. Im Falle der *hsPDH-E1* wird diesem Tautomer das Signal bei 290/305 nm zugeordnet.

In einem Volumen von 150 μ l wurden *hsPDH-E1* (Wildtyp und Varianten) in einer Konzentration von 2 mg/ml in Gegenwart von 0.1 mM ThDP und 1 mM MgSO₄ für 5 min rekombiniert. Im Falle der Messungen mit *hsPDH-E2LipII* wurde dem Ansatz die Domäne äquimolar zu den aktiven Zentren der E1-Komponente (25.97 μ M = 0.324 mg/ml) zugesetzt. Der Messpuffer enthielt 0.1 M Kaliumphosphat, 0.3 M KCl bei pH 7.6. Für die Untersuchung der pH-Abhängigkeit wurden pH-Werte zwischen 6 und 8 eingestellt. Zunächst wurde ein CD-Spektrum des Holoenzym aufgenommen. Danach wurde MAP in entsprechenden Konzentrationen zum Holoenzym titriert. Nach der Zugabe des Substratanalogons wurde der Ansatz jeweils 15 min bei 20 °C inkubiert. Anschließend wurde das CD-Spektrum aufgenommen. Die Parameter für die Spektrenaufnahme wurden wie folgt gewählt: $\lambda_{\text{Start}} = 370$ nm, $\lambda_{\text{End}} = 270$ nm, Datenintervall 0.2 nm, kontinuierlicher Modus, Standardempfindlichkeit (100 mdeg), Aufnahmegeschwindigkeit 200 nm/s, *response* 0.5 s, Spaltbreite 1 nm, 12 Akkumulationen, T = 20 °C. Als Messküvette diente eine schwarze reduzierte Quarzküvette mit einer Zentrumshöhe von 15 mm und einer Schichtdicke von 10 mm (Hellma, Typ-Nr. 105.201-QS). Für die Auswertung wurden die einzelnen Spektren

nach Volumen und Puffer (0.1 mM ThDP, 1 mM MgSO₄) korrigiert und anschließend auf einen Amplitude von 0 mdeg bei 370 nm normiert. Die Elliptizitäten im Bereich von 290-293 nm wurden gemittelt und gegen die MAP-Konzentration aufgetragen. Die Punkte wurden mit Hilfe einer Hyperbel nach Gleichung 2.13 angepasst:

$$\Theta = \frac{\Theta_{\max} \cdot [\text{MAP}]}{K_{\text{app}} + [\text{MAP}]} \quad (\text{Gl. 2.13})$$

Θ – Elliptizität, K_{app} – Dissoziationskonstante, [MAP] – Konzentration von Methylacetylphosphonat.

- **Untersuchung der IP- und der AP-Bande des ThDP gebunden an die *hsPDH-E1***

Für das Holoenzym *hsPDH-E1* wurde eine Bande bei 330 nm beschrieben, die von dem Aminotautomer des ThDP herrühren soll. Diese Bande verschwindet während der Reaktionen mit Pyruvat oder MAP, da während der Bildung des Intermediats 2-Laktyl-ThDP (LThDP) bzw. PLThDP die Iminoform des ThDP auftritt. Diese hat im Falle der *hsPDH-E1* ein spektroskopisches Signal bei 290/305 nm, weist jedoch keine Bande bei 330 nm auf (Korotchkina et al. 1995; Nemeria et al. 2007b).

Die spektroskopischen Parameter und das Puffersystem für diese Versuche entsprechen den im vorherigen Abschnitt beschriebenen Bedingungen. Die Proteinkonzentration der *hsPDH-E1* wurde in einem Volumen von 150 μl auf ca. 6 mg/ml eingestellt. Zunächst wurde ein Spektrum des Apoenzyms aufgenommen. Im Anschluss wurde das Enzym für 5 min in Gegenwart von 0.25 mM ThDP oder N^{3'}-Pyridyl-ThDP und 1 mM MgSO₄ rekombiniert und erneut jeweils ein Spektrum aufgenommen. Für die Reaktion wurden Pyruvat (Endkonzentration 1.3 mM) oder MAP (Endkonzentration 13.2 mM) als Liganden eingesetzt und Spektren nach 5 bzw. 15 min Reaktionszeit aufgenommen. Die Spektren wurden für die Auswertung nach Volumen und Puffer korrigiert und anschließend wie oben beschrieben bei 370 nm normiert.

2.2.5.4. UV/Vis - Spektroskopie

Die UV/Vis-Spektroskopie beruht auf denen in Kapitel 2.2.4. beschriebenen Grundlagen. Alle konventionellen UV/Vis-spektroskopischen Experimente wurden am Jasco V560-Spekrophotometer durchgeführt.

- **DCPIP-Test**

Die Aktivität der *hsPDH-E1* nach der Proteinpräparation wurde mit Hilfe des artifiziellen Elektronenakzeptors 2,6-Dichlorphenolindophenol (DCPIP) gemessen. Die oxidierte Form des DCPIP hat eine blaue Farbe. Durch Reduktion wird DCPIP farblos. Diese Reaktion lässt sich bei einer Wellenlänge von 600 nm verfolgen (Hübner et al. 1986). Im Fall der *hsPDH-E1* werden Elektronen des Intermediats 2-Hydroxyethyl-ThDP (HEThDP), das nach Bindung und Decarboxylierung von Pyruvat entsteht, auf DCPIP übertragen. Die ermittelten Werte spiegeln jedoch nicht die wahre Reaktionsgeschwindigkeit der E1-Komponente wieder, da die Elektronenübertragung durch den relativ langen Substratkanal (ca. 14 Å) auf den sperrigen Elektronenakzeptor deutlich langsamer verläuft, als die Bindung und Decarboxylierung von Pyruvat (Seifert et al. 2006). Trotzdem wurde der Test zur Bestimmung verschiedener Konstanten ($K_{M,app}$ (ThDP) und $K_{M,app}$ (Pyruvat)) der E1-Komponente genutzt. Das Ansatzvolumen betrug 1 ml in einer Plastikkuvette. Die *hsPDH-E1* wurde in einer Konzentration von 0.1-0.3 mg/ml eingesetzt und in Gegenwart von 0.1 mM ThDP und 1 mM $MgSO_4$ für 5 min rekombiniert. Dem Ansatz wurde einer finalen DCPIP-Konzentration von 82.5 µM realisiert. Nach Messung eines Blindwerts über 12 min (unspezifische Reduktion durch Protein) wurde die Reaktion durch Zugabe von Pyruvat (Endkonzentration 2.5 mM) gestartet und für 4 min bei 600 nm verfolgt. Die Reaktionstemperatur betrug 30 °C und der Puffer enthielt 0.1 M Kaliumphosphat, 0.3 M KCl bei pH 7.6. Für die Bestimmung der apparenten K_M -Werte für ThDP wurde die Cofaktor-Konzentration variiert und bei konstanter Pyruvatkonzentration (5 mM) gemessen.

Die Auswertung des Anfangsanstiegs der Progresskurven erfolgte unter Verwendung des Extinktionskoeffizienten von DCPIP bei 600 nm ($\epsilon_{600} = 17700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) und der eingesetzten Enzymkonzentration (Gl. 2.14). Die spezifischen Aktivitäten lagen für den Wildtyp und die Varianten im Bereich von 40-60 U/g.

$$A_{\text{spez}} = \frac{\Delta E / \Delta t}{[E1]_{\text{Küvette}} \cdot \epsilon_{600\text{nm}} \cdot d} \quad (\text{Gl. 2.14})$$

A_{spez} – spezifische Aktivität (U/g), $\Delta E / \Delta t$ – Extinktionsabnahme pro Zeit in min bei 333 nm, d – Weglänge des Lichtstrahls (cm), $\epsilon_{600\text{nm}} = 17700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $[E1]_{\text{Küvette}}$ – Konzentration der *hsPDH-E1* (oder Varianten) in der Küvette (g/l).

- **Kontinuierlicher Aktivitätstest für die reduktive Acetylierung**

Die Liponsäure, der Cofaktor der *hsPDH-E2LII*, zeigt in ihrer oxidierten Form (Dithiolanring geschlossen) eine spektroskopische Bande bei 333 nm (Barltrop et al. 1954; Reed et al. 1958). Dieses Signal tritt im reduzierten Zustand nicht auf, da der Dithiolanring geöffnet vorliegt. Aus diesem Grund diente das Signal als optische Sonde für einen Aktivitätstest, bei dem die reduktive Acetylierung verfolgt werden sollte. Zunächst wurde der Extinktionskoeffizient für die *hsPDH-E2LII* in Messpuffer (0.1 M Kaliumphosphat, 0.3 M KCl, pH 7.6) bestimmt (Güttler 2008). Das Experiment ergab einen molaren Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{333\text{nm}}$ von $131.6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Für Pyruvat wurde bei einer Wellenlänge von 333 nm in dem verwendeten Messpuffer ein Extinktionskoeffizient von $18.9 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ bestimmt. Beide Spezies werden bei der hier untersuchten Reaktion in einem äquimolaren Verhältnis (1 Molekül Pyruvat und 1 Molekül *hsPDH-E2LII*) verbraucht. Für die Auswertung muss demnach ein additiver Extinktionskoeffizient von $150.5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ verwendet werden.

Die Messungen erfolgten in einem Volumen von 180 μl oder 450 μl in einer schwarzen reduzierten Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 10 mm und einer Fensterbreite von 2 mm (Hellma, Typ-Nr. 104B-QS). Die Konzentration der *hsPDH-E1* lag zwischen 0.1 und 1 mg/ml. Die Rekombination zum Holoenzym erfolgte für 5 min lang bei Raumtemperatur (RT) in Gegenwart von 0.25 mM ThDP und 1 mM MgSO_4 bzw. verschiedenen ThDP-Konzentrationen für die Bestimmung der apparenten K_M -Werte für ThDP der verschiedenen E1-Varianten. Nach der Rekombinationszeit wurden dem Reaktionsgemisch 1 mM bzw. 0.35 mM *hsPDH-E2LII* (entspricht 12.469 mg/ml bzw. 4 mg/ml) zugesetzt. Die Lösung wurde 5 min bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurde ein Spektrum aufgenommen. Die Parameter wurden wie folgt gewählt; $\lambda_{\text{Start}} = 650 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{End}} = 290 \text{ nm}$, Datenintervall 0.2 nm, Aufnahmegeschwindigkeit 100 nm/s, Spaltbreite 0.1 nm, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 bzw. 10 mM Pyruvat gestartet und die Reaktionskinetik bei 333 nm für 30 min verfolgt. Dann wurde erneut ein Spektrum aufgenommen. Die Spektren wurden für die Auswertung wie folgt bearbeitet. Das Spektrum vor der Reaktion und das nach der Reaktion mit 1 mM Pyruvat wurde durch ein Pufferspektrum mit 0.25 mM ThDP und 1 mM MgSO_4 korrigiert. Die Kinetiken zeigten, dass man im Fall der Messungen mit 1 mM Pyruvat und 1 mM *hsPDH-E2LII* davon ausgehen darf, dass beide Substrate während der 30 minütigen Reaktionszeit vollständig verbraucht wurden. Dies rechtfertigt die beschriebene Korrektur. Aufgrund des Signals von Pyruvat bei 333 nm muss das Spektrum nach der Reaktion mit 10 mM Pyruvat mit Hilfe eines Pufferspektrums korrigiert werden, dass neben ThDP und MgSO_4 noch ca. 9 mM Pyruvat enthält. Das ist eine hinreichende Korrektur, da das molare Umsatzverhältnis zwischen Liponsäure und Pyruvat 1:1 beträgt (siehe oben).

Für die Bestimmung der kinetischen Parameter der reduktiven Acetylierung der *hsPDH-E2LII* durch die *hsPDH-E1* bei konstanter Pyruvatkonzentration (10 mM) wurde die *hsPDH-E2LII*-Konzentration zwischen 0.3 und 2.75 mM variiert. Die Reaktionskinetiken wurden unter den genannten Bedingungen für 10 min verfolgt und wie anschließend beschrieben ausgewertet.

Der Anfangsanstieg in $\Delta E/\Delta t$ in 1/min der jeweiligen Progresskurve diente zur Berechnung der spezifischen Aktivität A_{spez} in U/mg unter Verwendung des Lambert-Beer'schen Gesetzes:

$$A_{\text{spez}} = \frac{\Delta E / \Delta t}{[E1]_{\text{Küvette}} \cdot \epsilon_{333\text{nm}} \cdot d} \quad (\text{Gl. 2.15})$$

A_{spez} – spezifische Aktivität (U/mg), $\Delta E / \Delta t$ – Extinktionsabnahme pro Zeit in min bei 333 nm, d – Weglänge des Lichtstrahls (cm), $\epsilon_{333} = 150 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $[E1]_{\text{Küvette}}$ – Konzentration der *hsPDH-E1* (oder Varianten) in der Küvette (mg/ml).

Hierbei entspricht $\epsilon_{333\text{nm}}$ dem additiven Extinktionskoeffizient der beiden Substrate Pyruvat und *hsPDH-E2LipII* bei 333 nm. Mit Hilfe der spezifischen Aktivität konnte die Katalysekonstante k_{obs} nach folgender Gleichung bestimmt werden.

$$k_{\text{obs}} = \frac{A_{\text{spez}}}{E_0} \quad (\text{Gl. 2.16})$$

Der Wert E_0 entspricht der Stoffmenge n des Proteins in einem Milligramm Protein. Das Molekulargewicht eines aktiven Zentrums der *hsPDH-E1* beträgt ca. 77000 g/mol. Daraus ergibt sich für E_0 ein Wert von 12.987 nmol in einem Milligramm. Der erhaltene k_{obs} -Wert wird in s^{-1} angegeben.

Weiterhin wurden die erhaltenen Progresskurven für die ThDP-Abhängigkeit mit Hilfe einer Gleichung für einen einfach exponentiellen Reaktionsverlauf angepasst (Gl. 2.17). Die erhaltenen k_{obs} -Werte wurden gegen die variierende ThDP-Konzentration aufgetragen.

$$\text{Abs}_{333\text{nm}} = \Delta \text{Abs}_{\text{max}} \cdot (1 - e^{(-k_{\text{obs}} \cdot t)}) + A_{\text{Start}} \quad (\text{Gl. 2.17})$$

mit $\text{Abs}_{333\text{nm}}$ – Absorption bei 333 nm, $\Delta \text{Abs}_{\text{max}}$ – maximale Änderung der Absorption bei 333 nm, k_{obs} – beobachtete Geschwindigkeitskonstante (s^{-1}), A_{Start} – Startabsorption bei 333 nm, t – Reaktionszeit

- **Aufnahme von Differenzspektren zur Visualisierung des Absorptionssignals der 1',4'-iminofom des PLThDP**

In Kapitel 2.2.5.3. wird das CD-Signal für die 1'4'-iminotautomere Form des ThDP während der Bildung von PLThDP nach der Reaktion der *hsPDH-E1* mit dem Substratanalogon MAP beschrieben. CD-Signale setzen eine Absorption von Licht voraus. Demzufolge kann das Signal des PLThDP auch durch UV/Vis – Spektroskopie sichtbar gemacht werden.

Der Reaktionsansatz erfolgte in einem Volumen von 300 μl in einer schwarzen, reduzierten Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 10 mm und einer Fensterbreite von 2 mm (Hellma, Typ-Nr. 104B-QS). Die Aufnahme der Spektren erfolgte mit folgenden Parametern; $\lambda_{\text{Start}} = 600 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{End}} = 270 \text{ nm}$, Datenintervall 0.2 nm, Aufnahmegeschwindigkeit 200 nm/s, Spaltbreite 0.1 nm, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$. Der Messpuffer enthielt 0.1 M Kaliumphosphat, 0.3 M KCl, pH 7.6. Die Proteinkonzentration der *hsPDH-E1* betrug 4 mg/ml. Das Enzym wurde durch Zugabe von 0.2 mM ThDP und 1 mM MgSO_4 mit einer Rekombinationzeit von 5 min bei Raumtemperatur in seine Holoform überführt. Dann wurde ein Spektrum (Spektrum 3) aufgenommen. Anschließend wurde MAP zugegeben, so dass eine finale Konzentration von

10 mM vorlag. Der Reaktionsansatz wurde 15 min bei 30 °C inkubiert. Danach erfolgte die Aufnahme des Spektrums (Spektrum 4). Zur Auswertung war die Aufnahme zweier weiterer Spektren notwendig. Zum einen die Aufnahme des Pufferspektrums (Spektrum 1, die Lösung enthielt 0.2 mM ThDP und 1 mM MgSO₄), zum anderen die Aufnahme eines MAP-Spektrums (Spektrum 2, die Lösung enthielt 0.2 mM ThDP, 1 mM MgSO₄ und 10 mM MAP). Das Differenzspektrum des PLThDP-Signals konnte durch folgenden Modus ermittelt werden:

Spektrum 2 – Spektrum 1 = Spektrum A (pufferkorrigiertes MAP-Spektrum)
Spektrum 3 – Spektrum 1 = Spektrum B (pufferkorrigiertes Proteinspektrum)
Spektrum 4 – Spektrum 1 = Spektrum C (pufferkorrigiertes Proteinspektrum nach PLThDP-Bildung)

Spektrum C – Spektrum A = Spektrum D (Korrektur um MAP-Signal)
Spektrum D – Spektrum B = Spektrum E > *Differenzspektrum des Intermediats*

- ***stopped-flow-Technik***

Die *stopped-flow*-Methode ist eine kinetische Methode der Fluoreszenz-, CD- und UV/Vis-Spektroskopie, wird aber aufgrund der besonderen Gerätetechnik gesondert beschrieben. Die Gerätetechnik eines *stopped-flow*-Spektrometers erlaubt das schnelle Messen von Reaktionen mit einer Totzeit der Mischung von nur 2 ms. Die miteinander reagierenden Proben werden durch hohen Druck gleichzeitig in die Messzelle geschossen und die Datenaufnahme beginnt direkt mit der Mischung. Daher ermöglicht das Messen mit der *stopped-flow*-Technik die kinetische Analyse sehr schneller Reaktionen und die Auflösung von Reaktionsphasen, die an konventionellen UV/Vis-Spektrometern nicht möglich ist. Die Experimente wurden an *stopped-flow*-Geräten der Firma Applied Photophysics (SX-18MV und SX-20 mit Photodioden-*array*) durchgeführt.

- **Reaktion der *hsPDH-E1* mit Pyruvat**

Aufgrund des kleinen Extinktionskoeffizienten von Pyruvat ($18.9 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ unter den gewählten Pufferbedingungen) und der verhältnismäßig kleinen Geschwindigkeitskonstante der C-C-Bindungsbildung der isolierten E1-Reaktion ($k_{1A}' = 2.3 \text{ s}^{-1}$ bestimmt mittels ¹H-NMR) eignet sich die direkte spektroskopische Analyse des Substrats Pyruvat nicht zur Bestimmung kinetischer Konstanten, da der Proteinverbrauch zur Erzeugung hinreichend hoher Signalamplituden immens wäre. Daher wurde die Reaktion bei nur einer Pyruvatkonzentration untersucht. Die Reaktion wurde an einem *stopped-flow*-Spektrometer mit Photodioden-*array* verfolgt, wozu zeitaufgelöste Spektren aufgenommen wurden. Nach 1+1-Mischung der Reaktionslösungen lagen folgende Konzentrationen vor: 7.5 mg/ml (97.4 μM aktive Zentren) *hsPDH-E1*, 0.25 mM ThDP, 1 mM MgSO₄, 1 mM Pyruvat. Die Reaktion erfolgte bei 0.1 M Kaliumphosphat, 0.3 M KCl, pH 7.6 und 30 °C. Insgesamt wurden 200 Spektren im Bereich von 185-720 nm in 10 s aufgenommen.

○ **Reaktion der *hsPDH-E1* mit Methylacetylphosphonat**

Im diesem Kapitel wurde bereits das Absorptionssignal der 1',4'-iminoform des PLThDP beschrieben. Die Bande um 295 nm diente als Messgröße für die *stopped-flow*-Experimente. Das Experiment ermöglichte die direkte Verfolgung der MAP-Bindung durch *hsPDH-E1* bzw. die Varianten.

Die Enzymlösung enthielt 4 mg/ml *hsPDH-E1* rekombiniert mit 0.2 mM ThDP und 1 mM MgSO₄ für 5 min bei Raumtemperatur. Die Substratlösung enthielt MAP in verschiedenen Konzentrationen. Als Puffer diente 0.1 M Kaliumphosphat, 0.3 M KCl, pH 7.6. Die Lösungen wurden bei 30 °C mindestens 5 min inkubiert und dann in 1+1-Mischung zur Reaktion gebracht. Die Messparameter wurden wie folgt gewählt; $\lambda = 295$ nm, Datenpunkte 2000, $t = 20-100$ sec, $T = 30$ °C. Für jede Konzentration wurden 3-5 Progresskurven aufgenommen und gemittelt. Die Auswertung der Progresskurven wird im Ergebnisteil (Kap. 3.1.1.6.) beschrieben.

○ **Reduktive Acetylierung der *hsPDH-E2LII***

Die Versuche dienten der Untersuchung der Acetylierungsreaktion der *hsPDH-E2LII* durch die *hsPDH-E1* bei hohen Enzymkonzentrationen unter verschiedenen Startbedingungen. Die *hsPDH-E1*-Konzentration wurde entsprechend der in den ¹H-NMR-Experimenten gewählt, um die Ergebnisse optimal miteinander vergleichen zu können. Zudem liegt die *hsPDH-E1* unter diesen Bedingungen hauptsächlich in ihrer heterotetrameren Form vor (siehe Kap. 2.2.5.1.). Um die gesamte Reaktion gut verfolgen zu können, wurde die *stopped-flow*-Methode genutzt. Die Acetylierungsreaktion durch die Anwendung dieser Methode auch unter verschiedenen Startbedingungen bezüglich der Substratzugabe (Pyruvat und *hsPDH-E2LII*) charakterisiert werden. Drei verschiedene Inkubationsansätze wurden durchgeführt. Im Postinkubationsansatz wurde zunächst *hsPDH-E1* (Endkonzentration 15 mg/ml) mit 0.5 mM ThDP und 1 mM MgSO₄ bei RT rekombiniert. Anschließend wurde *hsPDH-E2LII* in einer finalen Konzentration von 2.175 mM zugefügt und bei 30 °C mindestens 5 min inkubiert. Diese Lösung wurde in einem Mischungsverhältnis von 1+1 mit einer 2 millimolaren Pyruvatlösung zusammengebracht. Die Reaktion wurde daraufhin für 50 s bei 30 °C und einer Wellenlänge von 333 nm verfolgt. Es wurden 2000 Datenpunkte aufgenommen. Die Reaktionskomponenten hatten nach der Mischung folgende Konzentrationen: 7.5 mg/ml *hsPDH-E1* (97.4 μ M aktive Zentren), 0.25 mM ThDP, 0.5 mM MgSO₄, 1.0875 mM *hsPDH-E2LII*, 1 mM Pyruvat. Der verwendete Puffer enthielt 0.1 M Kaliumphosphat, 0.3 M KCl und pH 7.6. Für den simultanen Reaktionsansatz wurden die gleichen Konzentrationen der Komponenten und Messbedingungen gewählt. Die *hsPDH-E1* wurde wie beschrieben mit ThDP und MgSO₄ rekombiniert. Diesmal wurden die beiden Substrate gleichzeitig zur E1-Komponente geschossen und anschließend die Reaktion bei 333 nm verfolgt. Der Präinkubationstest wurde wie folgt durchgeführt. Nach der Bildung des Holoenzym der *hsPDH-E1* (s.o.) wurde die Reaktion mit Pyruvat gestartet. Nach einer Reaktionszeit von 2 min wurde die *hsPDH-E2LII* in einem Verhältnis von 1+1 mit dem Reaktionsgemisch zusammengeschossen. Die Reaktion wurde für 50 s verfolgt. Zur

detaillierten Analyse des Anfangsbereiches wurden die 2000 Datenpunkte wie folgt aufgeteilt: 0.2 s-1000 Punkte, 49.8 s-1000 Punkte. Die Konzentrationen der Komponenten und Messbedingungen wurden für den Präinkubationstest entsprechend denen des Postinkubationstests gewählt.

Die ermittelten Progresskurven konnten anschließend mit Hilfe der integrierten Michaelis-Menten-Gleichung ausgewertet werden. Die detaillierte Auswertung wird im Ergebnisteil der Arbeit (Kap. 3.1.2.4.) dargestellt und diskutiert.

Für den Wildtyp der *hsPDH-E1* wurde ein zusätzliches *stopped-flow*-Experiment durchgeführt. Mit Hilfe eines Photodioden-arrays konnten zeitaufgelöste Spektren der reduktiven Acetylierungsreaktion aufgenommen werden. Das Experiment wurde als Präinkubationsansatz durchgeführt. Folgende Bedingungen wurden gewählt (Angaben nach 1+1 Mischung); 7.5 mg/ml (97.4 μ M aktive Zentren) *hsPDH-E1*, 12.469 mg/ml (1 mM) *hsPDH-E2LII*, 0.25 mM ThDP, 1 mM MgSO₄, 1 mM Pyruvat, 0.1 M Kaliumphosphat, 0.3 M KCl, pH 7.6 bei 30 °C. Die Spektrenaufnahme erfolgte gestaffelt mit 50 Spektren in 0.25 ms und weiteren 100 Spektren in 50 s.

2.2.5.5. ¹H-NMR

Die kernmagnetische Resonanz (*nuclear magnetic resonance*, NMR) ist ein Phänomen, das auftritt, wenn Atomkerne mit elektromagnetischer Strahlung in Wechselwirkung treten. Die Anwendbarkeit der NMR-Spektroskopie ist von den Eigenschaften der Atomkerne abhängig. Ausschlaggebend für die Detektion mittels NMR ist die Kernspinqantenzahl I, die ganz-, halbzahlig oder Null sein kann. Nur Kerne, deren Anzahl an Protonen und Neutronen nicht beide geradzahlig sind und somit ein I ungleich Null aufweisen, können durch NMR detektiert werden. Besonders gut eignen sich Kerne mit einem hohen gyromagnetischen Verhältnis γ . Je höher dieses Verhältnis ist, desto höher ist auch die Sensitivität des Kerns. Tabelle 2.2 zeigt Kernspin I, gyromagnetisches Verhältnis γ und die relative Sensitivität (Detektionseffizienz bei konstantem Magnetfeld und gleicher Anzahl an Atomkernen) für H- und C-Isotope.

Tabelle 2.2. (Lottspeich und Engels 2006)

Kernisotop	Kernspin I	γ (10^7 rad T ⁻¹ s ⁻¹)	relative Sensitivität
¹ H	1/2	26.7519	1.00
² H (D)	1	4.1066	$9.65 \cdot 10^{-3}$
¹² C	0	-	-
¹³ C	1/2	6.7283	$1.59 \cdot 10^{-2}$

Die Detektionsgröße der NMR ist die chemische Verschiebung δ (Einheit ppm). Sie gibt den Frequenzunterschied zwischen dem gemessenen Signal und dem Signal des Standardmoleküls Tetramethylsilan ($\delta = 0$) an. Die chemische Verschiebung wird durch die Umgebung eines

Kerns beeinflusst. Ein Kern kann durch Wechselwirkung mit der ihn umgebenden Elektronenhülle und benachbarten Atomen Abschirmung oder Entschirmung erfahren. Diese Wechselwirkungen beeinflussen das NMR-Signal.

Der Cofaktor der *hsPDH-E1*, Thiamindiphosphat, eignet sich als Sonde in der NMR-Spektroskopie. Zum einen kann durch H/D-Austausch-Experimente die C2-Deprotonierungsgeschwindigkeit des Cofaktors bestimmt werden (Kern et al. 1997).

Zum anderen können durch Intermediatanalyse die mikroskopischen Geschwindigkeitskonstanten einzelner Reaktionsschritte der ThDP-abhängigen Enzyme bestimmt werden. Der Reaktionsablauf wird somit auf kinetisch mikroskopischer Ebene aufgeklärt. Bei diesem experimentellen Ansatz dient das nichtaustauschende Proton am C6'-Atom des Aminopyrimidinrings als innerer Standard die Natur des Intermediats. Alle Substitutionen am reaktiven C2-Atom des ThDP, wie etwa die Bindung eines Substrats, können durch Veränderung der chemischen Verschiebung des C6'-H-Signals detektiert werden (Tittmann et al. 2003). Die Signale können durch den Vergleich mit synthetisierten Referenzsubstanzen identifiziert werden. Der Vorteil des ThDP und seiner Intermediate ist, dass sie durch Säure-*quenching* vom Protein abgetrennt werden können, da sie selbst säurestabil sind.

- **H/D-Austausch**

Die H/D-Austausch-Experimente wurden in 0.1 M Kaliumphosphat, 0.3 M KCl und pH 7.6 bei einer Temperatur von 30 °C durchgeführt. Eine *hsPDH-E1*-Lösung mit einer Konzentration von 15.5 mg/ml (201.3 µM aktive Zentren) wurde mit einer finalen Konzentration von 201.3 µM (äquimolar) ThDP und 2 mM MgSO₄ zur Rekombination gebracht. Anschließend wurde die Probe 1+1 mit 99.9 %-igem D₂O gemischt. Nach definierten Zeitpunkten wurde die Reaktion durch Zugabe einer Quenchlösung (1 M HCl, 12.5 % w/v TCA in D₂O) gestoppt. Reaktionszeiten von 10-500 ms wurden durch den Einsatz einer *rapid-quenched-flow*-Apparatur realisiert. Durch das Absinken des pH-Werts unter 1 denaturiert das Enzym und der Enzym-ThDP-Komplex dissoziierte. Das Protein konnte durch Zentrifugation und Filtration vom Cofaktor getrennt werden. Die Austauschgeschwindigkeit des ThDP bei diesem pH-Wert beträgt $\sim 10^{-7} \text{ s}^{-1}$, sodass der Austausch während der NMR-Messung vernachlässigt werden kann (Tittmann 2000).

Zur Analyse der Proben wurde ein Bruker *Avance ARX 400 NMR* Spektrometer genutzt. Die Parameter wurden wie folgt gewählt:

Protonenresonanzfrequenz – 400.13 MHz,

Pulslänge zur Wasservorunterdrückung – 2 s ,

Pulsstärke zur Wasservorunterdrückung – 55 dB,

Pulslänge zur Protonenanregung – 9 µs,

Pulsstärke zur Protonenanregung – 2 dB,

spektrale Weite – 7 kHz,

Datenpunkte – 32 k

Detektion - Quadraturdetektion.

Die Daten wurden in ASCII-Format konvertiert und mit dem Programm Kaleidagraph ausgewertet. Die Gleichungen zur Datenbearbeitung werden in Kapitel 3.1.1.3. beschrieben und diskutiert.

- **¹H-NMR-Intermediatanalyse**

Die Verteilung der Intermediate bzw. Thiamindiphosphat wurde für die Reaktion von *hsPDH-E1* mit Pyruvat in An- und Abwesenheit der *hsPDH-E2LII* unter folgenden Bedingungen analysiert. Zwischen 10 und 15 mg/ml *hsPDH-E1* (129.9-194.8 μ M) wurden in einem Volumen von 200 μ l mit einer äquimolaren Menge ThDP und 1 mM MgSO₄ für 5 min bei RT rekombiniert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 200 μ l Substratlösung gestartet. Die Substratlösung enthielt 60 mM Pyruvat für die *single-turnover*-Experimente, ein Gemisch aus 20 mM Pyruvat und 2.172 mM *hsPDH-E2LII* für die Analyse der Gesamtreaktion und 20 mM MAP für die Bildung von PLThDP. Die Reaktion wurde zu bestimmten Zeitpunkten durch Zugabe der Quenchlösung beendet und die Proben NMR-spektroskopisch analysiert. Analog zu den H/D-Austauschexperimenten wurde für Reaktionszeiten unter 2 s eine *rapid-quenched-flow*-Apparatur verwendet. Die Messungen erfolgten mit den oben genannten Geräteeinstellungen. Der verwendete Reaktionspuffer enthielt 0.1 M Kaliumphosphat, 0.3 M KCl und pH 7.6. Die Reaktionstemperatur betrug 25 bzw. 30 °C.

2.2.5.6. Massenspektrometrie

Die Methode der Massenspektrometrie beruht auf der Analyse von Teilchen nach ihrem Masse-Ladungs-Verhältnis. Es erfolgt eine Überführung der zu analysierenden Substanz in die Gasphase und eine Ionisierung. Die ionisierten Teilchen werden anschließend in einem elektrischen Feld beschleunigt. Die Fluggeschwindigkeit hängt vom Masse-Ladungs-Verhältnis ab. In der Biochemie ist die Massenspektrometrie ein wichtiges Werkzeug für die Proteinanalytik (Aminosäuresequenz, chemische Modifikationen) geworden (Lottspeich und Engels 2006). Die in dieser Arbeit verwendete Methode ist die MALDI-MS (Matrix-assistierte Laserdesorption/Ionisation). Als Matrix diente Sinapinsäure. Durch die reduktive Acetylierung des an die *hsPDH-E2LII* gebundenen Lipoamids kommt es zu einer Molekulargewichtszunahme um 44 Da. Dieser Masseunterschied ist durch MALDI-MS gut detektierbar. Erstmals wurde diese Methode für die reduktive Acetylierung der Lipoyldomänen 2003 von der Arbeitsgruppe um JORDAN vorgeschlagen (Wei et al. 2003). Die diskontinuierliche Kinetik der reduktiven Acetylierung wurde wie folgt aufgenommen. Die *hsPDH-E1*-Konzentration betrug zwischen 4 und 15 mg/ml (51.9-198.4 μ M) und wurde durch Rekombinatin mit 0.5 mM ThDP und 1 mM MgSO₄ für 5 min in die Holoenzymform überführt. Anschließend wurde *hsPDH-E2LII* entweder äquimolar zur *hsPDH-E1* oder in einem Überschuss (2.17 mM) zum Reaktionsansatz gegeben. Die Reaktion wurde durch 1+1-Mischung mit einer Pyruvatlösung (2 oder 20 mM) gestartet und durch Zugabe von 85 %-iger Ameisensäure (Volumen entsprechend dem des Reaktionsansatzes) beendet. Die Zugabe der

Ameisensäure führt zu einem sofortigen Abfall des pH-Werts auf 2, sodass die enzymatische Reaktion sofort gestoppt wird. Das Puffersystem enthielt 0.1 M Kaliumphosphat, 0.3 M KCl bei pH 7.6. Die Messtemperatur betrug 30 °C.

Die Voraussetzung für die Analyse der Proben in der Massenspektrometrie ist, dass diese salzfrei vorliegen. Aus diesem Grund wurden die Proben wie folgt behandelt. Zur Entsalzung wurden mit C4-Säulenmaterial ausgestattete Pipettenspitzen (*ZipTips*) genutzt. Diese wurden zunächst fünfmal mit je 10 µl Acetonitril/1 % HCOOH (70/30) äquilibriert. Anschließend wurde mit zehnmal 10 µl 1% HCOOH gewaschen. Dann wurde das Säulenmaterial mit 10 µl der Probe beladen und erneut zwanzigmal mit 10 µl 1 % HCOOH gewaschen. Die Elution des entsalzten Proteins erfolgte mit 10 µl Acetonitril/1% HCOOH (70/30). Die Proben wurden anschließend zur massenspektrometrischen Analyse gegeben. Die Daten wurden mit dem Programm Kaleidagraph ausgewertet. Die erhaltenen Peaks für die oxidierte Form der *hsPDH-E2LII* bei 12469 Da und für die reduktiv acetylierte Form bei 12513 Da wurden über die Bereiche 12450 – 12500 Da und 12500 – 12550 Da integriert. Der relative Anteil der beiden Spezies bezogen auf die Summe beider Spezies wurde gegen die Zeit aufgetragen.

2.2.6. Strukturelle Methoden

2.2.6.1. Röntgenkleinwinkelstreuung

Die Methode der Röntgenkleinwinkelstreuung mit Synchrotronstrahlung (*small angle X-ray solution scattering*, SAXS) ermöglicht eine strukturelle Untersuchung von Proteinen in Lösung. Die diffusen Streubilder, die durch das Bestrahlen von proteinhaltigen Proben mit Röntgenstrahlen entstehen, können Aufschluss über Molekulargewicht, Oligomierzustand und Molekülform der Proteine geben. Die Auflösung, die mit heutiger Technik erreicht wird, beträgt 7 Angström. Die Streubilder werden in Streukurven umgewandelt und geben durch den Gyrationradius (R_g) und die Anfangsintensität (I_0) Informationen über Molekülform und Molekulargewicht.

Die SAXS-Experimente für die *hsPDH-E1* und ihre Varianten dienten zur Bestätigung der Ergebnisse der analytischen Ultrazentrifugation. Durch die Kombination beider Methoden konnte ein Konzentrationsbereich zwischen 0.02 mg/ml und 12 mg/ml abgedeckt werden.

Von der *hsPDH-E1* und ihren Varianten wurde eine Konzentrationsreihe des Holoenzym (0.5 mM ThDP, 1 mM $MgSO_4$) sowie unter Substratumsatzbedingungen (10 mM Pyruvat) durchgeführt. Für den Wildtyp wurde außerdem eine Konzentrationsreihe in Gegenwart von Methylacetylphosphonat vermessen. Außerdem wurde die mögliche Komplexbildung zwischen *hsPDH-E1* und der *hsPDH-E2LII* untersucht. Dies erfolgte sowohl unter Zusatz des natürlichen Cofaktors ThDP (0.25 mM), als auch unter Verwendung des Cofaktoranalogs Thiaminthiazolondiphosphat (TTDP, 0.25 mM). Bei dieser Versuchsreihe wurde sowohl die E1-Konzentration (0, 2.5 und 5 mg/ml) als auch die *hsPDH-E2LII*-Konzentration (0, 0.5, 5, 10 mg/ml) variiert.

Als Puffer diente 0.05 M Kaliumphosphat, 0.05 M KCl, pH 7.6. Die Temperatur betrug für alle Messungen 20 °C. Die Datenerhebung erfolgte an der *beam line* X33 am DESY in

Hamburg (EMBL) unter folgenden Bedingungen: mar345 *image plate*, Kameralänge 2.7 m, 1/5 mM DTT, Messzeit 120 s. Die S-Achse wurde mit Tripalmitin kalibriert. Als Standard für das Molekulargewicht diente BSA. Die primäre Datenauswertung erfolgte mit dem Programm Automar. Anschließend wurden die Daten mit den Programmen Primus und Gnom bearbeitet (Svergun 1992; Konarev et al. 2003).

Die Auswertung der Originaldaten erfolgte freundlicherweise durch PD Dr. Stephan König.

2.2.6.2. Kristallisation

Ziel der Kristallisation von Proteinen ist es Proteinkristalle mit hohem Streuvermögen zu erhalten. Um diese Kristalle zu erhalten, sind für jedes Protein individuelle Bedingungen notwendig. Für die moderne Kristallographie werden sogenannte Kits angeboten, die viele verschiedene Puffersysteme enthalten. So können gleichzeitig unterschiedlichste Bedingungen für die Kristallisation getestet werden. Die Kristallisation der Variante S264E der *hsPDH-E1* wurde in der Arbeitsgruppe um PATEL durchgeführt. Die entsprechenden Kristallisationsbedingungen sind in (Seifert et al. 2007) beschrieben.

2.2.6.3. Röntgenkristallstrukturanalyse

Die Röntgenkristallographie ermöglicht die atomare strukturelle Analyse von Proteinen. Die dreidimensionale Struktur eines Proteins gibt zum einen Informationen über seine Faltung, lässt aber in vielen Fällen auch Aussagen über den katalytischen Mechanismus zu.

Im Rahmen dieser Promotion wurde durch Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um Professor PATEL die Struktur der *hsPDH-E1*-Variante S264E gelöst. Die Datenaufnahme und die Strukturaufklärung wurden von Dr. E. CISZAK durchgeführt und sind in (Seifert et al. 2007) ausführlich beschrieben. Die Struktur hat eine Auflösung von 1.9 Å und ist unter dem PDB-Code 2OZL in der Proteindatenbank www.rcsb.org abgelegt.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1. *hs*PDH-E1 – Einleitung

Die E1-Komponente des humanen PDH-Komplexes (*hs*PDH-E1) gehört zu den Thiamindiphosphat-abhängigen Enzymen. Thiamindiphosphat (ThDP) ist die biologisch aktive Form des Vitamin B1. ThDP ist ein intensiv untersuchter Cofaktor (Kluger 1987; Schellenberger 1998; Kluger und Tittmann 2008). Er ermöglicht im enzymatischen System den vielfältigen Umsatz von α -Ketosäuren, Aldehyden und Zuckern. Die Reaktionen der Enzyme bestehen immer aus zwei Halbreaktionen. In der ersten Halbreaktion wird eine C-C-Bindung, die einer Carbonylgruppe benachbart ist, gespalten. Dabei entsteht als Zwischenprodukt ein Enamin/Carbanion. Der zweite Schritt der Katalyse ist sehr vielfältig und vom zweiten Substrat des jeweiligen Enzyms abhängig. Im einfachsten Fall handelt es sich bei dem zweiten Substrat um ein Proton (z.B. Pyruvatdecarboxylase). Bei den Transketolasen kommt es zur Knüpfung einer neuen C-C-Bindung (Transferasereaktion). Bei den α -Ketosäure-Dehydrogenase-Komplexen wird in einer oxidativen Reaktion eine energiereiche C-S-Bindung (Thioesterbindung) mit dem zweiten Substrat Lipoamid gebildet (Frank et al. 2007).

Die Struktur des *hs*PDH-E1-Holoenzym weist alle allgemeinen Motive eines ThDP-abhängigen Enzyms auf (Abb. 3.1 oben) (Ciszak et al. 2003). Das Heterotetramer vom $\alpha_2\beta_2$ -Typ hat ein Molekulargewicht von 154 kDa (α – 41 kDa, β – 36 kDa). Das Enzym besitzt zwei aktive Zentren mit jeweils einem gebundenen Magnesiumion und einem Molekül ThDP. Die Struktur zeigt, dass die den Diphosphatanker bindene PP-Domäne von der α -Untereinheit und die den Aminopyrimidinring bindene Pyr'-Domäne von der β' -Untereinheit bereitgestellt wird. Das zweite aktive Zentrum wird demnach von der α' - und der β - Untereinheit gebildet. Die Stabilisierung der Quartärstruktur wird durch hydrophobe Wechselwirkungen zweier Helices der α - und β - bzw. α' - und β' -Untereinheiten realisiert. Es ist also naheliegend, dass sich zunächst zwei Heterodimere bilden ($\alpha\beta$ und $\alpha'\beta'$). Anschließend werden durch Tetramerisierung die beiden aktiven Zentren ausgebildet ($\alpha'\beta$ und $\alpha\beta'$) (Ciszak et al. 2003). Wie alle ThDP-abhängigen Enzyme weist die *hs*PDH-E1 das ThDP-Bindemotiv GDGX₂₄₋₂₇NN auf (Hawkins et al. 1989). Die Abbildung 3.1 unten zeigt das aktive Zentrum der humanen E1-Komponente. Die C-terminale Domäne (Abb. 3.1 oben) ist für die Wechselwirkung mit der E1-Bindedomäne der E2-Komponente und damit für die Assoziation der *hs*PDH-E1 mit dem Gesamtkomplex verantwortlich (Korotchkina und Patel 2008).

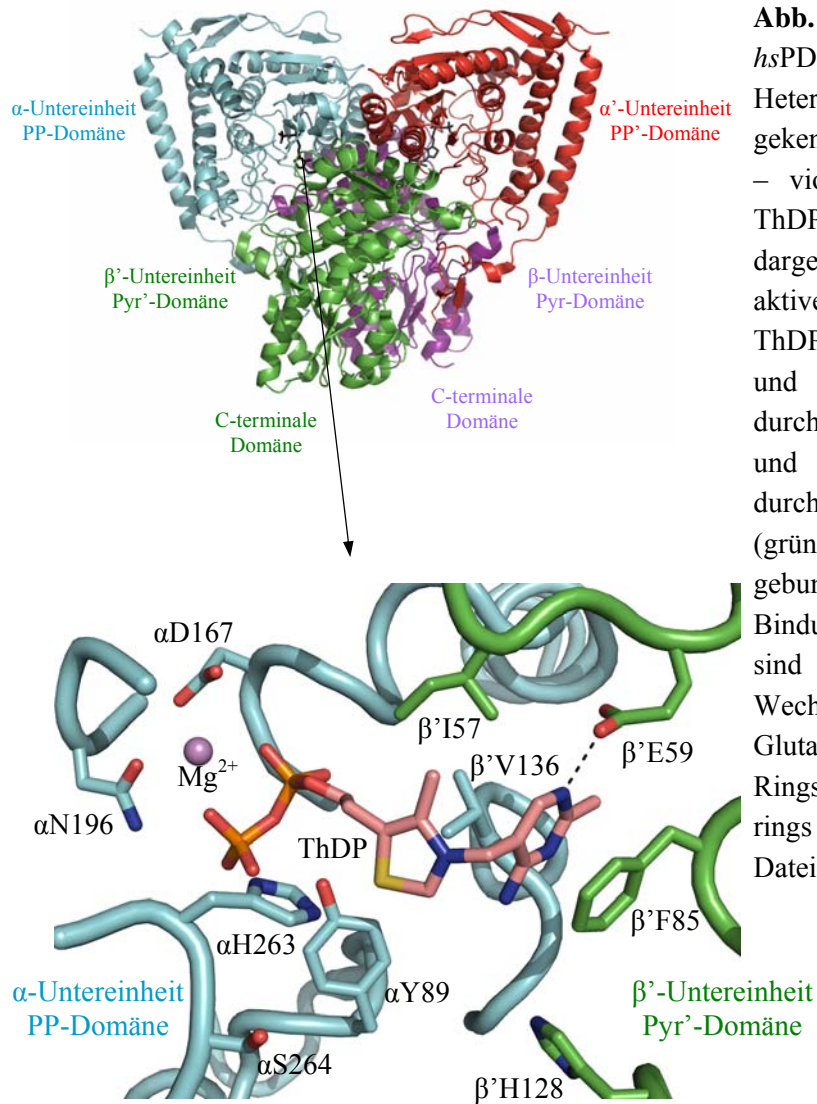


Abb. 3.1. Oben: Kristallstruktur der *hsPDH-E1*. Die Untereinheiten des Heterotetramers sind wie folgt gekennzeichnet: α – blau, α' – rot, β – violett, β' – grün. Die beiden ThDP-Moleküle sind dunkelgrau dargestellt. Unten: Ausschnitt des aktiven Zentrums der *hsPDH-E1*. ThDP wird über den Diphosphatrest und das Magnesiumion (violett) durch PP-Domäne der α -UE (blau) und über den Aminopyrimidinring durch die Pyr'-Domäne der β' -UE (grün) in seiner V-Konformation gebunden. Einige an der ThDP-Bindung beteiligte Aminosäurereste sind dargestellt. Zudem ist die Wechselwirkung zwischen dem Glutamat 59 (β' -UE) und dem N1'-Ringstickstoff des Aminopyrimidinrings hervorgehoben (---). (PDB-Datei 1NI4, erstellt mit *pymol*).

- **C2-Ionisierung des ThDP**

Die chemische Struktur des ThDP ist seit 1936 bekannt (Williams 1936) (Abb. 3.2). Der Cofaktor besteht aus drei charakteristischen Gruppen: dem Thiazoliumring, dem Aminopyrimidinring und einem Diphosphatanker.

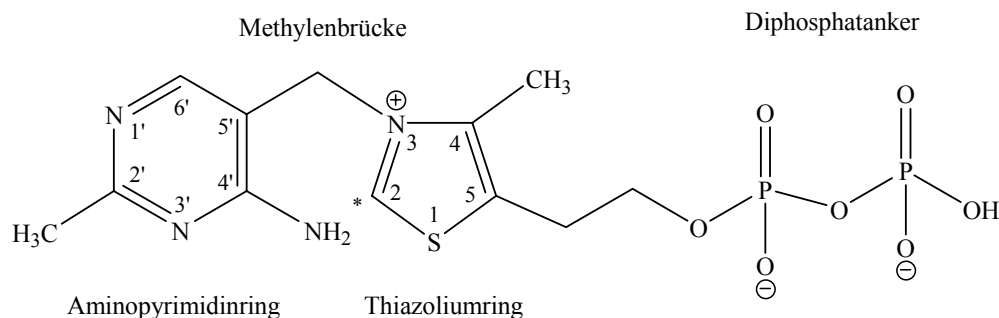


Abb. 3.2. Strukturformel und Nomenklatur des Thiamindiphosphat, Das Sternchen markiert das reaktive C2-Atom des Thiazoliumrings.

Nach intensiver Forschung und verschiedenen Modellvorschlägen konnte BRESLOW 1957 das C2-Atom des Thiazoliumrings als Ort der Katalyse identifizieren (Breslow 1957; Breslow 1958). Um seine katalytische Wirksamkeit zu entfalten, muss das C2-Atom deprotoniert vorliegen. Die in C2-Stellung deprotonierte Cofaktorspezies wird als Ylid bezeichnet. Die hieraus resultierende Nucleophilie ermöglicht den Angriff des Carbonylkohlenstoffatoms von α -Ketosäuren. Im nichtenzymatisch gebundenen Zustand hat das C2-Atom jedoch einen pK_a -Wert von 17-19 und ist somit kaum CH-azid (Breslow 1962; Washabaugh und Jencks 1988). Demnach musste die Wechselwirkung des Cofaktors mit der Proteinkomponente zu einer Beschleunigung der Abstraktion des Protons am C2-Atom führen, um die Geschwindigkeitskonstanten für die Reaktionen zu erklären. Einen Zugang zu dieser Fragestellung war die 1992 aufgeklärte Struktur der Holo-Transketolase aus Bäckerhefe (Lindqvist et al. 1992). Diese Struktur und viele weitere dokumentierte Strukturen ThDP-abhängiger Enzyme zeigen, dass ThDP in der energetisch ungünstigen V-Konformation im aktiven Zentrum der Enzyme gebunden ist. Dass diese Konformation des ThDP im enzymgebundenen Zustand vorliegt, wurde 1967 erstmals von SCHELLENBERGER vorgeschlagen (Schellenberger 1967). In der V-Konformation befindet sich die 4'-Aminogruppe des Aminopyrimidinrings in räumlicher Nähe zum C2-Proton des Thiazoliumrings, was die Deprotonierung des C2-Atoms begünstigt (Kern et al. 1997). Die entsprechende Basizität der Aminogruppe wird durch ein Protonenrelais erzielt. Ein hochkonserviertes Glutamat (in *hsPDH-E1* β -Glutamat 59, Abb. 3.1 unten), das sich in Wasserstoffbrückendistanz zum Aminopyrimidinring befindet, protoniert das N1'-Atom und überführt den Cofaktor in seine 1',4'-iminotautomere Form. Das Imin ist dann in der Lage das C2-Atom des Thiazoliumrings zu deprotonieren, was zur Bildung des reaktiven Ylids führt (Kern et al. 1997). Damit erfährt der Cofaktor im enzymgebundenen Zustand eine um bis zu 5 Größenordnungen gesteigerte Beschleunigung der Deprotonierung (freies ThDP bei pH 7.0 – $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ und an Hefe-PDC gebundenes ThDP – $> 6 \times 10^2 \text{ s}^{-1}$) (Kern et al. 1997). Abbildung 3.3 zeigt die Aktivierung des Cofaktors im Enzym und damit den ersten Schritt der Katalyse ThDP-abhängiger Enzyme.

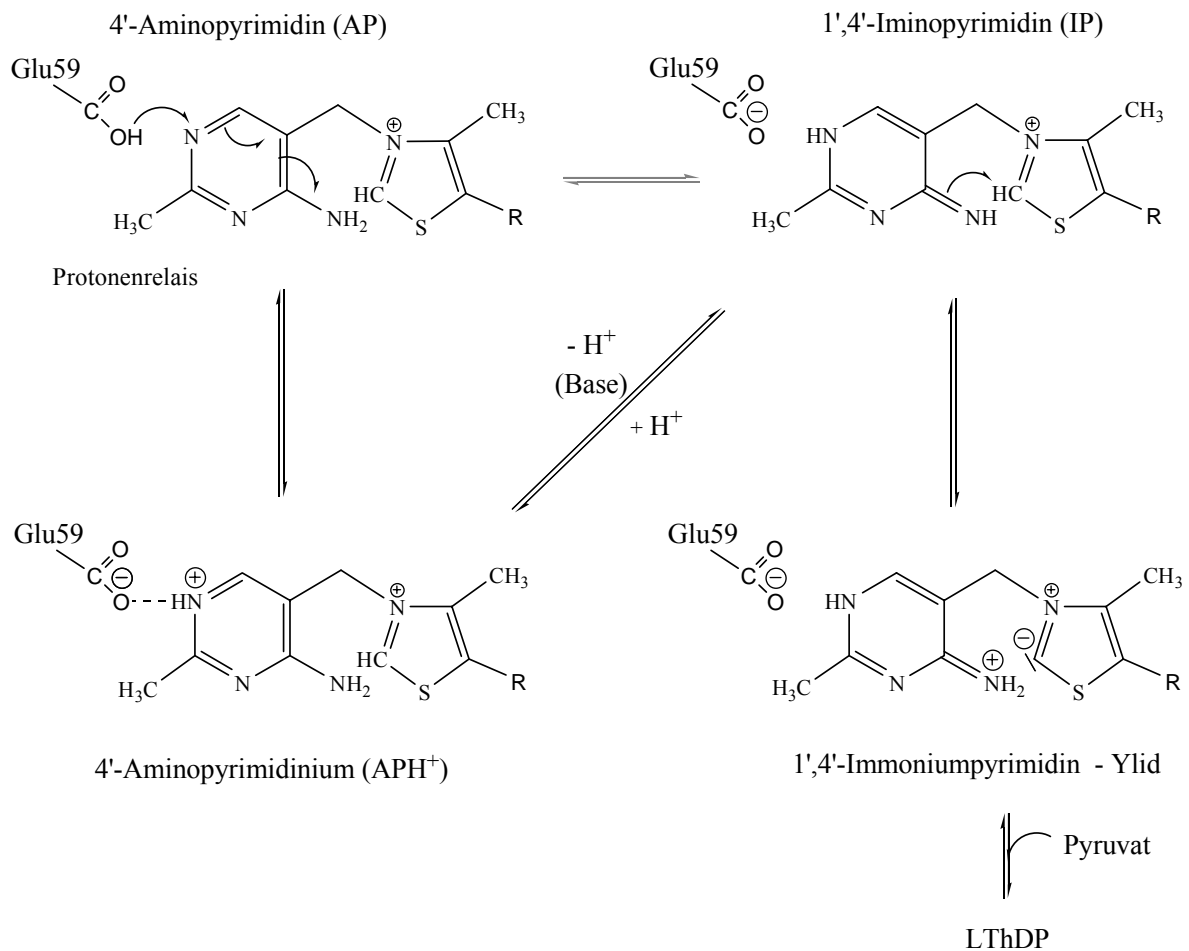


Abb. 3.3. Vorgeschlagerener Mechanismus der C2-Ionisierung von ThDP in Enzymen. Darstellung der möglichen tautomeren Formen des Cofaktors. Die schwarzen Pfeile zeigen den wahrscheinlichen Reaktionsweg. Die Bezeichnung Glu59 bezieht sich auf die *hsPDH-E1*. R – $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{P}_2\text{O}_7\text{H}^{2-}$.

- **Substratbindung, Decarboxylierung und reduktive Acetylierung**

Die E1-Komponente des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes katalysiert in der ersten Halbreaktion die Decarboxylierung von Pyruvat. Zunächst wird Pyruvat am C2-Atom des Thiazoliumrings des ThDP gebunden. Die Carbonylgruppe des Pyruvats wird durch das Ylid nukleophil angegriffen. Dabei entsteht durch C-C-Bindungsbildung 2-Laktyl-ThDP. Dieses Intermediat wird anschließend quasi-irreversibel decarboxyliert. Dabei entsteht 2-(1-Hydroxyethyl)-thiamindiphosphat (HETHDP, Enamin/Carbanion). Im zweiten Reaktionsschritt wird die C2-Einheit in Form eines Acetylrests auf das Schwefelatom S8 des Dithiolanrings des Lipoamidarms der E2-Komponente übertragen. Der gesamte Reaktionsablauf der *hsPDH-E1* ist in den Abbildungen 3.4 und 3.5 schematisch dargestellt.

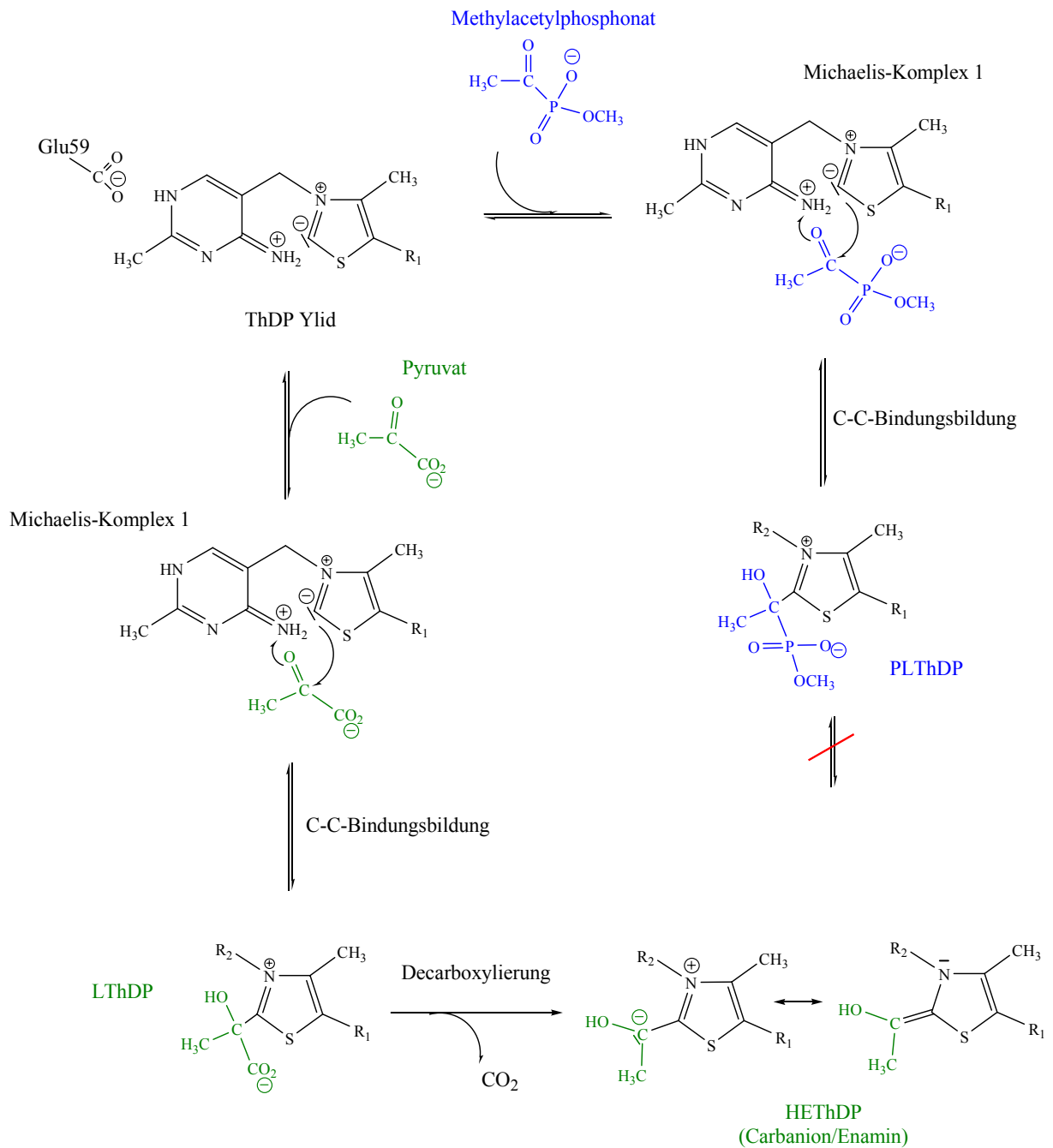


Abb. 3.4. Reaktionschema der Bindung und Decarboxylierungsreaktion von Pyruvat (grün) und der Bindung des Pyruvatanalogs MAP (blau) der *hsPDH-E1*. R₁ – -CH₂CH₂P₂O₇H²⁻, R₂ – Aminopyrimidinkomponente.

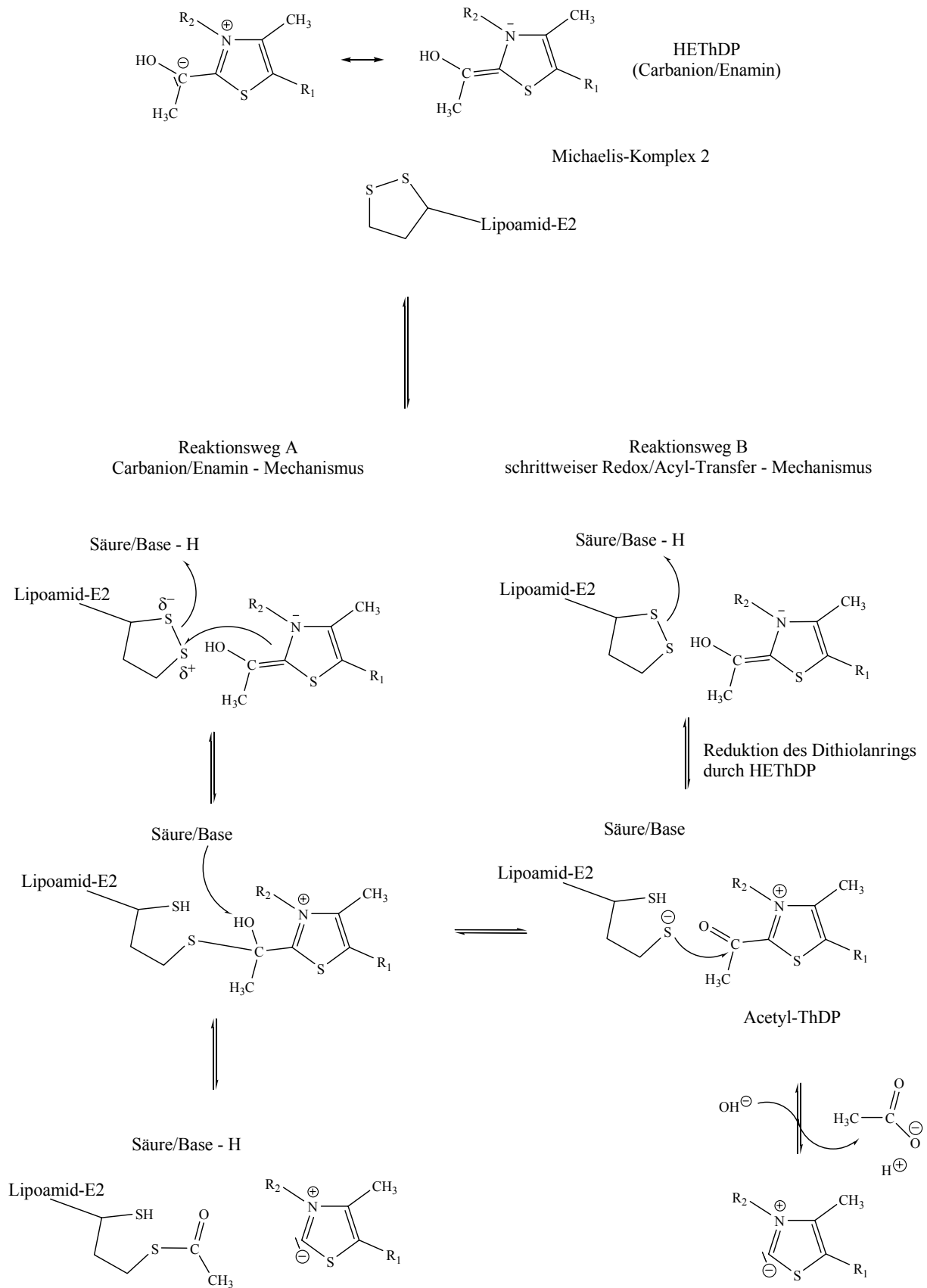


Abb. 3.5. Reaktionsschema der reduktiven Acetylierungsreaktion der *hsPDH-E1*. Für die Reaktion wurden zwei mögliche Mechanismen vorgeschlagen: Reaktionswege A und B modifiziert nach Kluger und Tittmann 2008. R₁ – -CH₂CH₂P₂O₇H²⁻, R₂ –Aminopyrimidinkomponente.

In zahlreichen Studien wurden die E1-Komponenten verschiedener Organismen und ihre Reaktionsmechanismen intensiv mit Hilfe von kinetischen, thermodynamischen, NMR-spektroskopischen und kristallographischen Methoden charakterisiert. Als Untersuchungsobjekte dienten die E1-Komponenten und Lipoyldomänen verschiedener α -Ketosäure-Dehydrogenase-Komplexe, vor allem aber der PDHc und BCKDC aus *E. coli*, *Bacillus stearothermophilus* und der Komplexe aus Säugetieren. Im Folgenden sind einige wichtige Erkenntnisse zusammengefasst. Für einige E1-Komponenten konnte gezeigt werden, dass die ThDP-Bindung im Enzym mit der Ausbildung von *loop*-Strukturen einhergeht, wobei das aktive Zentrum strukturiert wird (Li et al. 2004; Kato et al. 2008). Für die E1-Komponente aus *E. coli* wurde diese konformationelle Änderung nicht gefunden (Chandrasekhar et al. 2006). In allen E1-Komponenten ist das ThDP-Bindemotiv und das katalytisch relevante Glutamat (siehe oben) konserviert (Frank et al. 2007).

Als besonders wichtige Aminosäurereste für die Reaktivität haben sich zwei Histidinreste im aktiven Zentrum erwiesen. Im Fall der humanen E1-Komponente handelt es sich dabei um α -Histidin 263 und β -Histidin 128 (Abb. 3.1). Diese Reste werden in den α -Ketosäure-Dehydrogenasen als phosphatnahe (hier: α H263) und thiazoliumnahe (hier: β 'H128) Histidine bezeichnet. Eine eindeutige katalytische Rolle konnte dem phosphatnahen Histidin zugeordnet werden. Zum einen übt es eine strukturelle Funktion in der Ausbildung und Stabilisierung des aktiven Zentrums aus (Arjunan et al. 2006; Kale et al. 2007; Pei et al. 2008). Zum anderen dient es während der reduktiven Acetylierung als Protonendonator für das S6-Schwefelatom des Dithiolanrings (Nemeria et al. 2002; Wynn et al. 2003; Pei et al. 2008). Die Klärung der Rolle des thiazoliumnahen Histidins gestaltete sich etwas schwieriger. Die Funktion dieses Restes liegt höchstwahrscheinlich in der Orientierung des Substrats im Michaelis-Komplex und der Reaktionsintermediate des ThDP durch Induktion elektrostatischer Wechselwirkungen (Wynn et al. 2003; Frank et al. 2007; Pei et al. 2008). Da das thiazoliumnahe Histidin als Protonendonator für die erste Halbreaktion der E1-Komponente ausgeschlossen wurde (Frank et al. 2007), ist die Annahme, dass die 4'-Aminogruppe als Protonendonator für den Keto-Sauerstoff des Pyruvats dient, sehr wahrscheinlich (Schellenberger 1998) (Abb. 3.4).

Umfangreiche Studien zur Wechselwirkung zwischen der E1-Komponente und den Lipoyldomänen der E2-Komponente der α -Ketosäure-Dehydrogenase-Komplexe ermöglichten ein gutes Verständnis der reduktiven Acetylierungsreaktion, bei der ein Acetylrest vom HEThDP auf den Dithiolanring des proteingebundenen Lipoamids übertragen wird (Abb. 3.5). Alle Lipoyldomänen haben eine ähnliche Struktur, dennoch werden sie spezifisch von ihren adäquaten E1-Komponenten erkannt (Graham et al. 1989; Jones et al. 2001) (Abb. 3.6). Die korrekte Faltung der Domänen ist für die reduktive Acetylierungsreaktion ausschlaggebend. Untersuchungen mit freiem Lipoamid oder kurzen, das Lipoyllysin tragenden Peptiden zeigten, dass die E1-Komponente diese Substrate um mehrere Größenordnungen schlechter umsetzte (Graham et al. 1989; Liu et al. 2001). Des Weiteren ist die an den Lysinrest gebundene prosthetische Gruppe Lipoamid sowohl für die Reaktivität als auch für die Erkennung essentiell (Liu et al. 2001; Jones et al. 2001). Neben diesen Determinanten wurde für die humane Lipoyldomäne 2 das dem Lipoyllysin N-terminal

benachbarte Aspartat und ein N-terminal drei Aminosäuren entferntes Glutamat als essentiell für die E1-Lipoyldomänen-Wechselwirkung identifiziert (Gong et al. 2000).

Ein für verschiedene Organismen dokumentierter Fakt ist, dass die Bindungskonstanten (K_S) der Lipoyldomänen deutlich höher sind als ihre apparenten K_M -Werte (Graham und Perham 1990; Liu et al. 2001; Jones et al. 2001). Als adäquate Begründung wurde angeführt, dass die reduktive Acetylierung und die Produktfreisetzung sehr schnell ablaufen. JONES und Mitarbeiter konnten mittels struktureller NMR-Studien zeigen, dass Pyruvat einen Einfluss auf die Wechselwirkung zwischen den Domänen zu haben scheint, was eine Erklärung für die Diskrepanz zwischen den K_S - und K_M -Werten sein könnte (Jones et al. 2001).



Abb. 3.6. Gegenüberstellung der Domänenstruktur der Lipoyldomänen (*cartoon*) dreier verschiedener Organismen mit dem lipoylierbaren Lysin (*sticks*). grün – humane Lipoyldomäne 2 (PDB 1FYC) aus Howard et al. 1998. orange – Lipoyldomäne 3 aus *E. coli* (innerste, PDB 1LAC) aus Jones et al. 2000. rot – Lipoyldomäne aus *Bacillus stearothermophilus* (PDB 1QJO) aus Dardel et al. 1993.

Für den molekularen Ablauf der reduktiven Acetylierungsreaktion wurden, wie in Abb. 3.5 dargestellt, zwei alternative Reaktionswege vorgeschlagen (Kluger und Tittmann 2008). Reaktionsweg A zeigt den Enamin/Carbanion-Mechanismus, bei dem ohne Zwischenschritt ein kovalentes Intermediat zwischen HETHDP und dem Lipoamid gebildet wird und aus dem anschließend die Produkte ThDP und der reduktiv acetylierte Lipoamidarm hervorgehen. Dabei stellt man sich vor, dass das Enamin ein Schwefelatom des Dithiolanrings nukleophil angreift und das zweite Schwefelatom durch eine saure Gruppe im aktiven Zentrum protoniert wird (Pan und Jordan 1998). Als Protonendonator wird, wie bereits erwähnt, das phosphatnahe Histidin vorgeschlagen (Nemeria et al. 2002; Wynn et al. 2003). ^1H -NMR-Studien haben gezeigt, dass der S8-Schwefel acetyliert und der S6-Schwefel protoniert werden (Yang und Frey 1986).

Der Reaktionsweg B zeigt einen schrittweisen Redox/Acyl-Transfer Mechanismus, bei dem als Reaktionsintermediat 2-Acetyl-ThDP entsteht. Von diesem Intermediat aus würde die C2-Einheit von dem bereits partiell reduzierten Lipoamid durch Angriff des Carbonylkohlenstoffs übernommen. Dieser Mechanismus beruht auf der Voraussetzung, dass Elektronen über eine Distanz von ca. 14 Angström tunneln können (Marcus und Sutin 1985). Beim Eintauchen in den Substratkanal würde der S8-Schwefel des Dithiolanring demnach bereits eine Reduktion durch das HETHDP erfahren können. Gleichzeitig würde ein Proton wahrscheinlich vom phosphatnahen Histidin auf den S6-Schwefel übertragen. Durch den Elektronentransfer würde sich am ThDP ein Acetylrest bilden und somit AcThDP entstehen. Die Reaktion wäre auch thermodynamisch günstig, denn das Standardredoxpotential des HETHDP liegt mit -0.76 V

deutlich unter dem des Dithiolanrings mit ca. -0.32 V (Tittmann et al. 2005; Tittmann 2009). Das Intermediat AcThDP wurde durch enzymatischen Umsatz von 3-Fluorpyruvat generiert. Es konnte gezeigt werden, dass dieses Intermediat in der Lage ist die Acetylgruppe auf Dihydrolipoamid zu übertragen (Flournoy und Frey 1986). Außerdem wurde das Intermediat AcThDP mittels $^1\text{H-NMR}$ -Intermediatanalyse als Reaktionsintermediat des PDHc aus *E. coli* nachgewiesen (Tittmann 2009). Da die Reaktionsstufe, bei der AcThDP entsteht, im Gleichgewicht mit der des kovalenten Reaktionsintermediats des Reaktionsweges A liegt, ist das Auftreten des AcThDP ein starkes Indiz, jedoch kein ausreichender Beweis für Reaktionsweg B (Abb. 3.5). Für den Reaktionsweg B kann man sich auch einen radikalischen Mechanismus vorstellen, bei dem die Elektronen einzeln und damit sequentiell vom HETHDP auf den Dithiolanring übertragen werden. Bisher konnte in diesem Zusammenhang zwar ein HETHDP-Radikal vom π -Typ mit Hilfe von EPR-Messungen detektiert werden, das korrespondierende Thiylradikal am Dithiolanring wurde jedoch nicht gefunden (Kluger und Tittmann 2008; Frank et al. 2008). Das HETHDP-Radikal könnte auch durch Nebenreaktionen mit Sauerstoff entstehen und ist somit kein Beweis für einen radikalischen Katalysemechanismus.

Der reduktiv acetylierte Lipoylamid-Arm der E2-Komponente verlässt anschließend das aktive Zentrum. Damit sind die beiden Halbreaktionen der E1-Komponente abgeschlossen.

- **Halbseitenreaktivität**

Die Halseitenreaktivität oder auch der Mechanismus der alternierenden aktiven Seiten wird für ThDP-abhängige Enzyme schon seit vielen Jahren diskutiert. Im Allgemeinen ist die kleinste katalytische Einheit eines ThDP-Enzyms ein Dimer, welches zwei aktive Zentren umfasst. Dies stellt eine wesentliche Voraussetzung für das Vorliegen dieses Reaktionsmechanismus dar. Es wird davon ausgegangen, dass das postulierte Verhalten auf kommunizierenden aktiven Zentren beruht. Für die E1-Komponente des Säuger-PDH-Komplexes wurde die Halbseitenreaktivität erstmals in den späten 70iger Jahren diskutiert. Es wurde in unabhängigen Studien gezeigt, dass die Phosphorylierung einer α -Untereinheit ausreichend für die vollständige Inaktivierung des gesamten PDH-Komplexes ist (Yeaman et al. 1978; Sugden und Randle 1978). Diese Daten wurden in späteren Studien bestätigt (Korotchkina und Patel 1995; Kolobova et al. 2001; Korotchkina und Patel 2001b). KHAILOVA und KOROTCHKINA konnten 1985 weitere Indizien für die Halbseitenreaktivität dokumentieren. Durch Studien zur Wechselwirkung der E1-Komponente aus Taubenbrust und dem Intermediat HETHDP konnte gezeigt werden, dass sich die aktiven Zentren gegenüber dem Intermediat nicht äquivalent verhalten (Khailova und Korochkina 1985).

Wie bereits erwähnt, gelang der Arbeitsgruppe um PATEL 2003 die Strukturaufklärung der humanen E1-Komponente. In der gleichen Veröffentlichung wird ein auf Konformationsänderungen beruhender Flip-Flop-Mechanismus beschrieben. Der konformationelle Zustand des aktiven Zentrums ist demnach vom jeweiligen Reaktionsschritt abhängig. Die Hypothese beruht auf computergestützten Modellierungen (Ciszak et al. 2003). Eine andere These zum Mechanismus der kommunizierenden aktiven Zentren wurde 2004 von FRANK und Mitarbeitern publiziert. Als Referenzenzym diente die E1-Komponente des PDHc aus

Bacillus stearothermophilus. Die Grundlage ist ein sogenannter Protonenkanal, der die beiden aktiven Zentren miteinander verbindet. Die Autoren schlagen vor, dass die über Wasserstoffbrückenbindungen miteinander verbundenen Reste in diesem Kanal zum konzertierten Transport eines Protons zwischen den beiden für die Cofaktor-Aktivierung relevanten Glutamaten befähigt sind. In einem aktiven Zentrum findet die Reaktion statt. Danach kommt es zur konzentrierten Leitung des Protons zum zweiten aktiven Zentrum und die Reaktion kann in diesem Zentrum ablaufen. Aminosäureaustausche der im Protonenkanal gelegenen Reste führten in allen Fällen zu deutlichen Aktivitätsverlusten sowohl der E1-Komponente, als auch des Gesamtkomplexes (Frank et al. 2004). Der Protonenkanal wurde bereits 1994 in Transketolase entdeckt. Es wurde diesem damals jedoch keine Funktion zugeordnet (Nikkola et al. 1994). Die Ausprägung des Protonenkanals variiert jedoch unter den ThDP-Enzymen. Die Funktionalität des Kanals ist sicher nicht in jedem Fall gegeben. Als weitere Beweise für die Theorie der alternierenden Zentren konnten strukturelle Asymmetrien verschiedener ThDP-Enzyme festgestellt werden. Beispielsweise wurde nur in der Hälfte der aktiven Zentren der Acetohydroxysäure-Acetolaktat-Synthase gebundenes Herbizid gefunden. Ebenfalls nur die Hälfte der aktiven Zentren der Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase war mit dem radikalischen Intermediat besetzt (Frank et al. 2007). Direkte kinetische Beweise für die Ausprägung der Halbseitenreaktivität sind jedoch bisher nur spärlich zu finden. Die Abbildungen 3.7 und 3.8 illustrieren die vorgeschlagenen Theorien zur Realisierung der Halbseitenreaktivität.

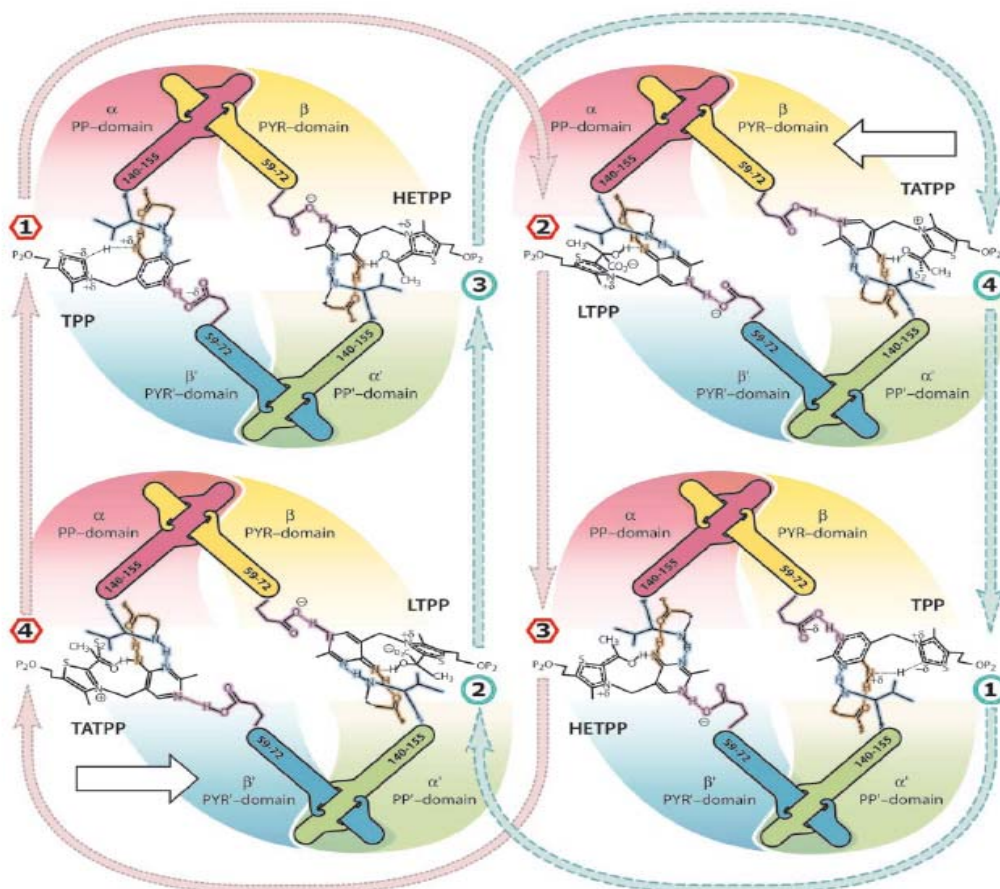


Abb. 3.7. Modell des Flip-Flop-Mechanismus der humanen E1-Komponente. Entnommen aus Ciszak et al. 2003.

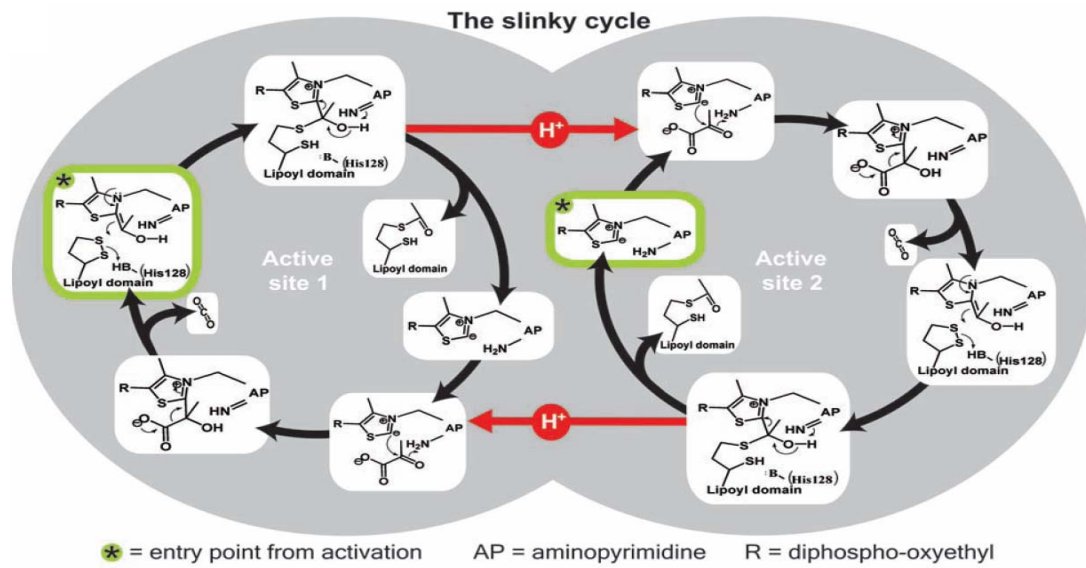


Abb. 3.8. Modell des Protonenkanals der E1-Komponente aus *Bacillus stearothermophilus*. Entnommen aus Frank et al. 2004.

3.1.1. Biochemische Charakterisierung der *hsPDH-E1*

3.1.1.1. Expression und Reinigung der *hsPDH-E1*

Das ursprüngliche Protokoll zu Expression der *hsPDH-E1* beinhaltete die Anzucht der Zellen in Schüttelkultur (Korotchkina et al. 1995). Die Proteinausbeuten nach Präparation aus dem erhaltenen Zellmaterial waren jedoch sehr gering (10-14 mg gereinigtes Protein/70 g Zellmaterial aus 12 Liter Schüttelkultur) (Seifert 2005). Die Methoden, die in dieser Arbeit angewendet wurden, erforderten jedoch erhebliche Mengen an Protein (z.B. 15 mg/ml für die NMR-Messungen). Zur Erhöhung der Zellmaterialausbeute wurde ein Fermentationsprotokoll entwickelt (Kap. 2.2.3.). Das Feuchtgewicht der Zellen betrug ca. 1 kg. Der Aufschluss von 150 g Zellmaterial resultierte in einer Proteinausbeute von 80 - 100 mg zur Homogenität gereinigter *hsPDH-E1* (Abb. 3.9).

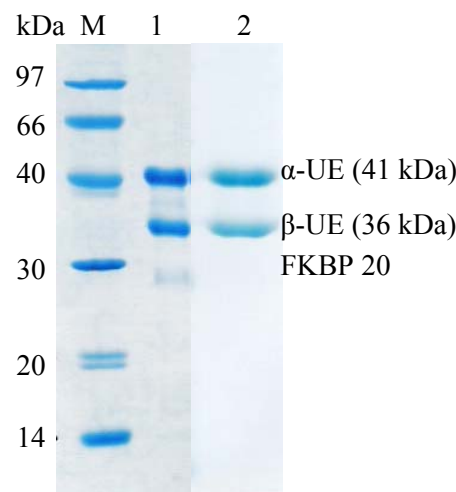


Abb. 3.9. SDS-Gel (10 %) der gereinigten *hsPDH-E1*. M – Größenstandard, 1 – *hsPDH-E1* nach Gelfiltration, 2 – *hsPDH-E1* nach Konzentrierung.

Sowohl die Zellausbeute als auch die Produktion der *hsPDH-E1* konnten durch die Fermentation gesteigert werden. Während nach Zellanzucht durch Schüttelkultur etwa 0.2 mg/g Zellmaterial *hsPDH-E1* gereinigt wurden, konnten durch die Überexpression in fermentierten Zellen 0.67 mg/g Zellmaterial gereinigtes Enzym erhalten werden. Das entspricht einer Steigerung der Proteinausbeute um ca. 30 %. Die Expression und Reinigung der E1-Varianten S264E, S264Q, S271E und S203E verliefen entsprechend der des Wildtyp-Proteins. Die Messung der enzymatischen Aktivität des gereinigten Proteins erfolgte mit Hilfe des DCPIP-Tests (Kap. 2.2.5.4.) und ergab spezifische Aktivitäten von 40-60 U/g. Diese Werte entsprechen zuvor beschriebenen Daten (Korotchkina et al. 1995).

3.1.1.2. Das Oligomergleichgewicht der *hsPDH-E1*

Die E1-Komponente des humanen PDH-Komplexes ist ein heterotetrameres Enzym mit einer $\alpha_2\beta_2$ -Struktur und einem Molekulargewicht von ca. 154 kDa. Je ein Heterodimer ($\alpha\beta'$ und $\alpha'\beta$) bildet ein aktives Zentrum. An der Kontaktfläche der beiden Untereinheiten werden ein ThDP-Molekül und ein Magnesiumion gebunden. Die strukturellen Daten deuten darauf, dass die Stabilisierung der Tertiärstruktur mit einer starken hydrophoben Wechselwirkung zwischen zwei α -Helices der α -Untereinheit und der β -Untereinheit sowie der α' -Untereinheit und der β' -Untereinheit einhergeht (Ciszak et al. 2003). Dabei entsteht ein Dimer, das kein aktives Zentrum besitzt. Durch die Tetramerisierung werden die beiden aktiven Zentren gebildet. Die tatsächliche Reihenfolge der Teilschritte des Oligomerisierungsprozesses ist jedoch nicht bekannt.

Für Untersuchungen der isolierten *hsPDH-E1* war es von Interesse, das Oligomergleichgewicht des Heterotetramers zu untersuchen (Reaktion 3.1).



- Analytische Ultrazentrifugation

Die analytische Ultrazentrifugation bietet sich an, um Oligomergleichgewichte dieser Art über einen Konzentrationsbereich bis zu 1 mg/ml zu analysieren. Das Gleichgewicht wurde sowohl für die Apo- als auch für die Holo-*hsPDH-E1* untersucht. In Abbildung 3.10 sind die Konzentrationsprofile eines Sedimentationsgeschwindigkeits-Laufs und die Konzentrationsabhängigkeit der apparenten Sedimentationskoeffizienten (s_{app}) gezeigt.

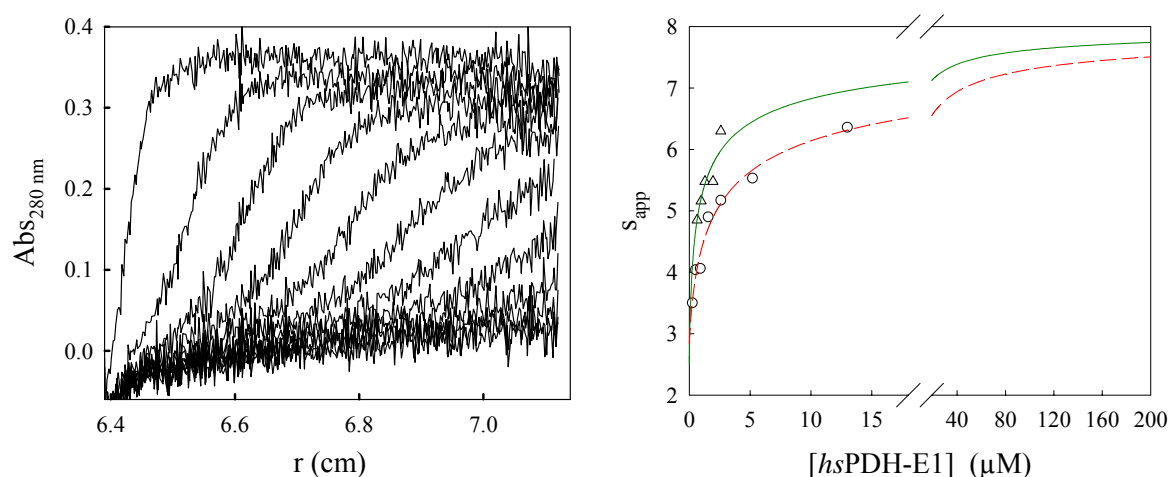


Abb. 3.10. Links: Konzentrationsprofile des Sedimentationsgeschwindigkeits-Laufs bei 0.4 mg/ml *hsPDH-E1* (5.2 µM aktive Zentren) im Abstand von je 20 min. Rechts: Abhängigkeit des apparenten Sedimentationskoeffizienten von der molaren Konzentration der *hsPDH-E1* bezogen auf die aktiven Zentren. Apoenzym (–Δ–), Holoenzym (–○–) mit 0.1 mM ThDP, 1 mM MgSO₄, Puffer: 0.1 M KPP, 0.3 M KCl, pH 7.6, T = 20 °C.

Die Daten zeigten eindeutig, dass ein Oligomergleichgewicht vorliegt. Obwohl anhand der apparenten Sedimentationskoeffizienten erkennbar wird, dass im unteren Konzentrationsbereich bereits ein Zerfall in die Monomere stattfindet ($s_{app} \sim 3.5$ entspricht etwa einem Molekulargewicht von 40 kDa (McRorie und Voelker 1993)), wurde diese Tatsache zur Vereinfachung vernachlässigt und die Daten nach einem Dimer-Tetramer-Gleichgewicht angepasst (Gl. 2.6, Kap. 2.2.5.1.).

Für ein 154 kDa schweres globuläres Protein erwartet man einen s_{app} -Wert um 8 (McRorie und Voelker 1993). Der aus der Anpassung extrapolierte s_{app} -Wert für das Tetramer der *hsPDH-E1* (Holoenzym) beträgt 8.05. Anzumerken ist, dass die Qualität der Daten für die Untersuchung des Holoenzymen erheblich schlechter als die für das Apoenzym ist. Dies ist der zusätzlichen Absorption durch den Cofaktor ThDP bei der analytischen Wellenlänge (230 nm) und der daraus resultierenden Verschlechterung des Signal-Rausch-Verhältnisses geschuldet. Der apparente K_D -Wert für das Dimer-Tetramer-Gleichgewicht der *hsPDH-E1* beträgt bezogen auf die Aktive-Zentren-Konzentration für die Apoform $0.35 \mu\text{M}$ (0.054 mg/ml Heterotetramer) und für die Holoform $1.3 \mu\text{M}$ (0.2 mg/ml Heterotetramer). Die ermittelten Konstanten liegen in einem ähnlichen Wertebereich. Die Abweichung der Daten ist auf die oben beschriebene Ursache zurückzuführen. Es kann demnach davon ausgegangen werden, dass sich das Oligomerisierungsverhalten von Apo- und Holo-*hsPDH-E1* nicht signifikant voneinander unterscheidet.

In einem anschließenden Sedimentationsgleichgewichts-Lauf wurde die *hsPDH-E1* bei einer Konzentration von 1 mg/ml untersucht (Abb. 3.11). Die Auswertung ergab ein Molekulargewicht von etwa 141 kDa.

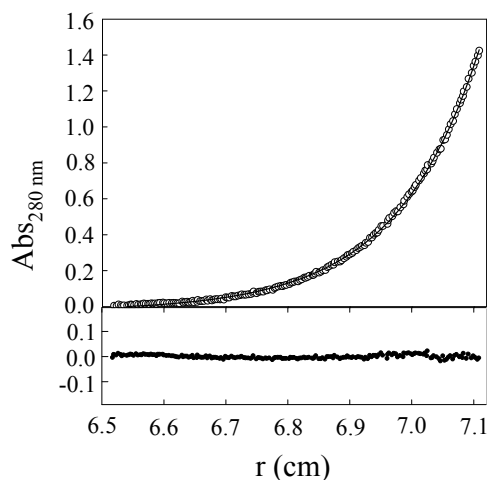


Abb. 3.11. Oben: Gleichgewichtsprofil (\circ) und Anpassung nach Gleichung in Anhang App3 ($—$) des Sedimentationsgleichgewichts-Laufs bei 1 mg/ml *hsPDH-E1* mit 0.1 mM ThDP, 1 mM MgSO_4 , 0.1 M KPP, 0.3 M KCl, pH 7.6, $T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$, Sedimentations-geschwindigkeit 8000 rpm . Unten: Abweichung der Daten von der Anpassung (Residualauftragung).

Die Ergebnisse beider Experimente zeigten, dass bei einer Enzymkonzentration von 1 mg/ml noch ein signifikanter Anteil des Enzyms im dimeren Zustand vorliegt. Für die Sedimentationsgeschwindigkeits-Läufe handelt es sich um ca. 25 % Dimer und für den Sedimentationsgleichgewichts-Lauf ca. 10 %. Diese Abweichungen sind auf experimentelle Fehler zurückzuführen und ändern nichts an der Gesamtaussage.

- **Röntgenkleinwinkelstreuung**

Um die Ergebnisse der analytischen Ultrazentrifugationsmessungen zu bestätigen, wurden Experimente mit Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS) mit Synchrotronstrahlung durchgeführt. Die Konzentrationsabhängigkeit des Oligomergleichgewichts der *hsPDH-E1* wurde in einem Bereich von 1-12 mg/ml untersucht. Da die Daten der analytischen Ultrazentrifugation zeigen konnten, dass sich Apo- und Holoenzym im Hinblick auf ihr Assoziationsvermögen ähnlich verhalten, wurde für die SAXS-Messungen nur das Holoenzym verwendet. Die Originaldaten wurden mit den Programmen *Primus-mar* (Korrektur des Puffers, des Detektorrauschens und der S-Achsen-Kalibrierung, (Konarev et al. 2003)) und *Gnom* (Berechnung des Gyrationradius, (Svergun 1992)) ausgewertet. Der Vergleich der berechneten Streukurve der heterotetrameren *hsPDH-E1*, erstellt mit Hilfe des Computerprogramms *crysol* (Svergun et al. 1995) auf der Basis der Kristallstruktur (Ciszak et al. 2003), und der experimentell erhaltenen Streukurve des Enzyms bei 1.1 mg/ml zeigte eine gute Übereinstimmung (Abb. 3.12 oben links). Im Gegensatz dazu zeigt der Vergleich mit der berechneten Streukurve für das Dimer deutliche Unterschiede im Verlauf der Kurven (Abb. 3.12 oben rechts). Dieser Befund spricht für die Aussage, dass unter den gewählten Untersuchungsbedingungen das Tetramer die dominante Spezies ist.

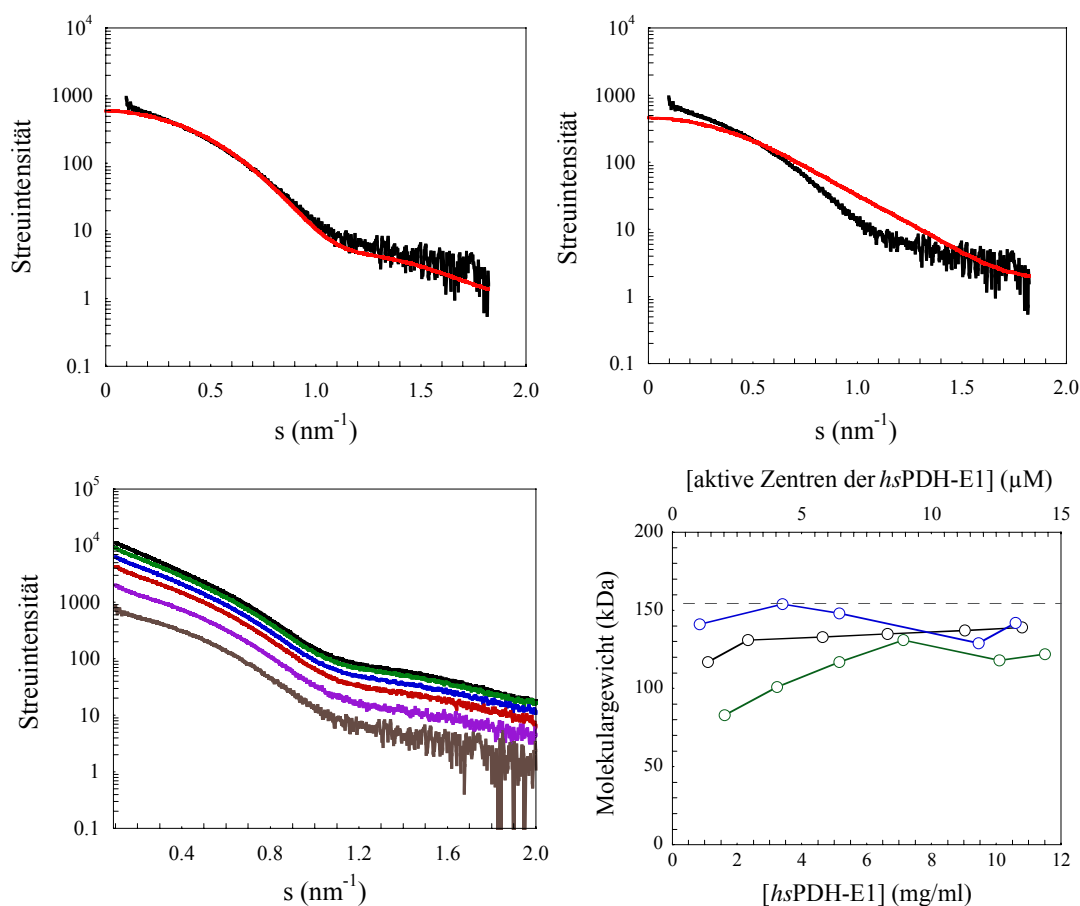


Abb. 3.12. Oben links: Superposition der auf Basis der Kristallstruktur der *hsPDH-E1* (PDB-Datei 1NI4) kalkulierten Streukurve für das Heterotetramer (—) und der experimentell ermittelten Streukurve (—) bei 1.1 mg/ml *hsPDH-E1* (1.3 μM aktive Zentren). Oben rechts: Superposition der auf Basis der Kristallstruktur der *hsPDH-E1* (PDB-Datei 1NI4) kalkulierten Streukurve für das Heterodimer (—) und der experimentell ermittelten Streukurve (—) bei 1.1 mg/ml *hsPDH-E1* (1.4 μM aktive Zentren). Unten links: Experimentell erstellte und normierte Streukurven der *hsPDH-E1* bei verschiedenen Enzymkonzentrationen (10.8 mg/ml (—), 9.04 mg/ml (—), 6.64 mg/ml (—), 4.64 mg/ml (—), 2.34 mg/ml (—), 1.10 mg/ml (—)). Unten rechts: Darstellung des aus den SAXS-Messungen bestimmten Molekulargewichts in Abhängigkeit von der *hsPDH-E1*-Konzentration ohne Zusatz (—○—), bei 10 mM Pyruvat (—○—) und bei 10 mM MAP (—○—). Bedingungen: 0.1 mM ThDP, 1 mM MgSO_4 , 1 mM DTE, 50 mM KPP, 50 mM KCl, pH 7.6, $T = 20^\circ\text{C}$. BSA diente als

Auch die SAXS-Daten ließen eine Konzentrationsabhängigkeit des Oligomergleichgewichts erkennen. Im höheren Konzentrationsbereich liegt der größte Anteil der *hsPDH-E1* als Tetramer vor (Abb. 3.12 unten rechts).

Die Gegenwart von Pyruvat oder MAP beeinflusst den Oligomerisierungsgrad des Enzyms nur geringfügig (Abb. 3.12 unten rechts). Das Substratanalogon MAP scheint eine leicht stabilisierende Wirkung auf den höheren Oligomerzustand zu haben.

3.1.1.3. Mechanistische Charakterisierung der Halbseitenreaktivität der *hsPDH-E1* mittels $^1\text{H-NMR}$

Die Einleitung dieses Kapitels (3.1.) behandelt u.a. die Hypothese der Halbseitenreaktivität von ThDP-abhängigen Enzymen und im Besonderen der E1-Komponenten der α -Ketosäuredehydrogenase-Komplexe. In konventionellen kinetischen *assays* wie dem DCPIP-Test kann dieser Mechanismus kinetisch nicht aufgelöst werden. Des Weiteren ist nicht bekannt, welchen Einfluss der sterisch relativ anspruchsvolle Elektronenakzeptor 2,6-Dichlorphenolindophenol (DCPIP) und die sich der Reaktion anschließende Hydrolyse des 2-Acetyl-ThDP auf die Gesamtreaktion der *hsPDH-E1* haben. Wie sich herausstellte, spiegeln die erhaltenen Werte für die spezifische Aktivität (in dieser Arbeit $A_{\text{spez}} = 60 \text{ U/g}$) und die daraus resultierende katalytische Konstante ($k_{\text{cat}} = 0.08 \text{ s}^{-1}$) nicht die intrinsischen Eigenschaften der *hsPDH-E1* wider (Seifert et al. 2006).

Mit Hilfe verschiedener $^1\text{H-NMR}$ -Experimente soll im Zuge dieser Arbeit die Reaktion der isolierten *hsPDH-E1* mit Pyruvat genauer untersucht werden. Es war zudem von Interesse, ob die postulierte Halbseitenreaktivität der *hsPDH-E1* direkt kinetisch nachweisbar ist.

Die $^1\text{H-NMR}$ -Experimente wurden aus gerätetechnischen Gründen bei relativ hohen Proteinkonzentrationen von 10-15 mg/ml durchgeführt. Die Daten der analytischen Ultrazentrifugation und der SAXS-Messungen haben gezeigt, dass die *hsPDH-E1* bei diesen Konzentrationen im heterotetrameren Zustand ($\alpha_2\beta_2$) vorliegt (siehe Kap. 3.1.1.2.). Diese Aussage ist für die Interpretation der Daten im Hinblick auf die Halbseitenreaktivität essentiell.

- **H/D-Austausch**

Zunächst wurde die Methode des H/D-Austauschs angewandt, um zwei Aspekte der ThDP-Aktivierung (Abb. 3.3) in der *hsPDH-E1* zu untersuchen. Zum einen sollte die Aktivierungsgeschwindigkeit bestimmt und zum anderen geprüft werden, ob die Halbseitenreaktivität schon für die Aktivierung des Cofaktors in Erscheinung tritt. Die Datenqualität vorangegangener Experimente ließ bisher keine eindeutige Aussage zu (Kreß 2003).

Ein optimales Experiment wird mit einem äquimolaren Verhältnis von aktiven Zentren des Enzyms und dem eingesetzten Cofaktor ThDP erreicht. Bei einem Überschuss an ThDP würden die Signalverhältnisse keine exakte Auswertung ergeben. Die Voraussetzung für diese Art des experimentellen Ansatzes ist entweder eine quasi-irreversible Cofaktorbinding oder bei einer reversiblen Cofaktorbinding mit einem schnelleren H/D-Austausch des enzymgebundenen ThDP ($k_{\text{E-ThDP}} > 10 \times k_{\text{ThDP}}$) und einem K_{D} -Wert $< 15 \mu\text{M}$ ThDP (Tittmann 2000).

Für die vorliegende Arbeit wurde eine Konzentration von 15.5 mg/ml *hsPDH-E1* (Apoenzym, 201.3 μM aktive Zentren) mit einer äquimolaren Menge an ThDP und 5 mM MgSO_4 rekombiniert. Der fluorimetrisch bestimmte K_{D} -Wert für ThDP und *hsPDH-E1* liegt im nanomolaren Bereich ($K_{\text{D}} = 0.47 \mu\text{M}$ aus (Kreß 2003) und $K_{\text{D}} = 0.11 \mu\text{M}$ aus (Kato et al. 2008)). Unter Verwendung der K_{D} -Werte in Gleichung 3.1 kann berechnet werden, dass unter

den gewählten Bedingungen mehr als 95 % der aktiven Zentren der *hsPDH-E1* mit ThDP besetzt sind (Gl. 3.2).

$$[E - \text{ThDP}] = \frac{[\text{ThDP}]_0 + [E]_0 + K_D}{2} - \sqrt{\frac{([\text{ThDP}]_0 + [E]_0 + K_D)^2}{4} - [\text{ThDP}]_0 \cdot [E]_0} \quad \text{Gl. 3.1}$$

$$E - \text{ThDP}(\%) = \frac{[E - \text{ThDP}]}{[\text{ThDP}]_0} \quad \text{Gl. 3.2}$$

$[E - \text{ThDP}]$ – Konzentration des gebundenen ThDP (Holoenzym), $[\text{ThDP}]_0$ – Gesamtkonzentration des ThDP, $[E]_0$ – Gesamtkonzentration der aktiven Zentren des Enzyms, K_D – Dissoziationskonstante des ThDP

Das H/D-Austauschexperiment beruht auf der Deprotonierung/Reprotonierung bzw. Deuterierung des reaktiven C2-Atoms des Thiazoliumrings (Abb. 3.13 oben). Durch die Verwendung eines Lösungsmittelgemisches von Puffer (H_2O -Basis) und D_2O kommt es zur Reprotonierung und Redeuterierung, bis sich ein Gleichgewicht zwischen C2-H und C2-D eingestellt hat. Dieses Gleichgewicht ist vom Fraktionierungsfaktor des C2-Atoms und vom Anteil des Wasserstoffisotops (D) nach Reaktionsstart abhängig (Gl. 3.3).

$$\Phi = \frac{[\text{C2} - \text{D}] \cdot [\text{H}_2\text{O}]}{[\text{C2} - \text{H}] \cdot [\text{D}_2\text{O}]} \cdot \frac{1 - n_D}{n_D} \quad \text{Gl. 3.3}$$

Φ – Fraktionierungsfaktor des C2-Atoms, $[\text{C2} - \text{D}]$ – Konzentration des deuterierten C2, $[\text{C2} - \text{H}]$ – Konzentration des protonierten C2, n_D – molarer Anteil an Deuterium nach Reaktionsstart

Die Fraktionierungsfaktoren wurden sowohl für den freien ($\Phi_{\text{ThDP}} = 1.00$), als auch für den enzymgebundenen Cofaktor ($\Phi_{E-\text{ThDP}} = 0.98$) mit etwa 1 bestimmt (Harris und Washabaugh 1995; Tittmann 2000). Durch die 1+1-Mischung der Proteinprobe mit 99.9 % D_2O war der finale Anteil an austauschbarem Deuterium 50 % ($n_D = 0.5$). Unter der Annahme von $\Phi \sim 1$ ergibt sich, dass die Signalamplitude des C2-H-Signals bei vollständigem H/D-Austausch auf 50 % sinkt (Abb. 3.13 unten links).

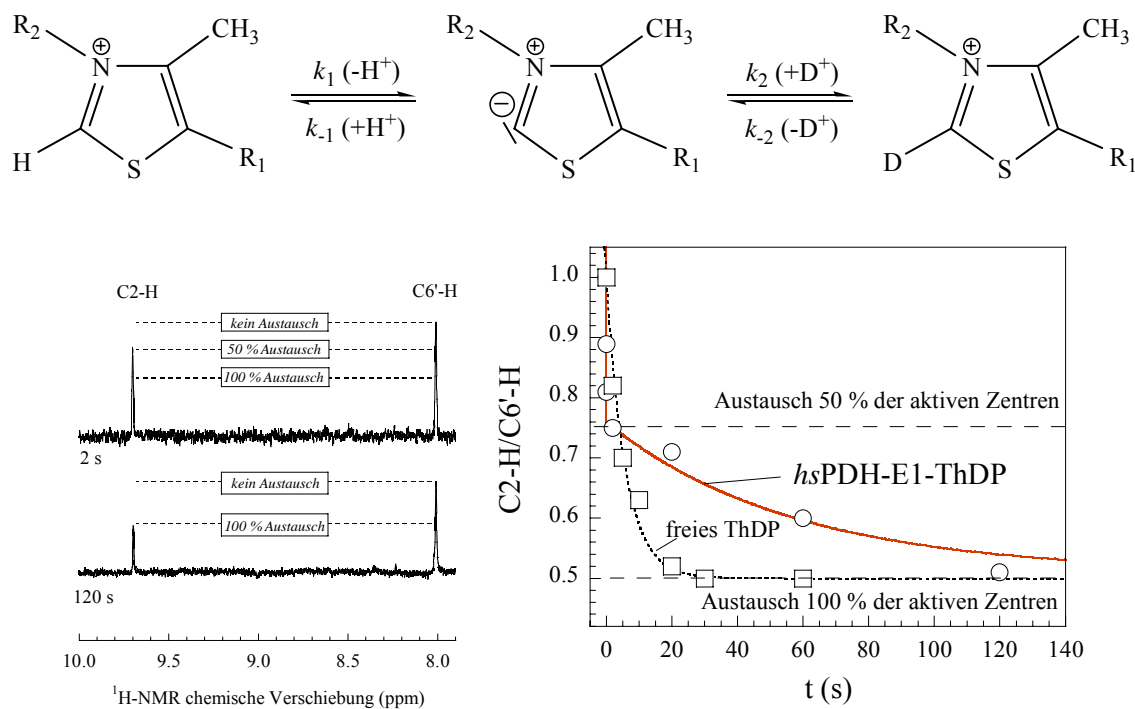


Abb. 3.13. Oben: Reaktionsschema des Lösungsmittelaustauschs von ThDP in 50 % D_2O ($\text{R}_1 - \text{CH}_2\text{CH}_2\text{P}_2\text{O}_7\text{H}^2$, $\text{R}_2 - \text{Aminopyrimidinkomponente}$). Unten links: $^1\text{H-NMR}$ -Spektren des H/D-Austauschs des C2-H von *hsPDH-E1*-gebundenen ThDP nach Säure-*quenching* und ThDP-Isolierung nach 2 s und 120 s. Unten rechts: Zeitliche Abhängigkeit der integralen Intensität C2-H-Signals von freiem ThDP (\square) und ThDP gebunden an *hsPDH-E1* (\circ). Bedingungen nach 1+1-Mischung mit 99.9 % D_2O : 7.75 mg/ml (100.65 μM aktive Zentren) *hsPDH-E1*, 100.65 μM ThDP, 1 mM MgSO_4 , Puffer der Lösung vor 1+1-Mischung: 0.1 M KPP, 0.3 M KCl, pH 7.6, $T = 30^\circ\text{C}$.

Die Auswertung der NMR-Spektren erfolgte durch Bestimmung der Peakintegrale des C2-H-Signals und des nichtaustauschenden C6'-H-Signals als interner Standard. Deren Verhältnis wurde gegen die Zeit aufgetragen (Abb. 3.13 unten rechts) Die H/D-Austauschreaktion ist eine Reaktion pseudo 1. Ordnung. Dadurch können die Daten einer einfach exponentiellen Funktion angepasst werden. Prinzipiell ist mit dem Auftreten zweier Exponentialterme zu rechnen, wovon der eine den H/D-Austausch des freien, der andere den H/D-Austausch am enzymgebundenen ThDP charakterisiert (Tittmann 2000) (Gl. 3.4).

$$\frac{\int \text{C2-H}}{\int \text{C6'-H}}(t) = \frac{[\text{E-ThDP}]}{[\text{ThDP}]_0} \cdot \Phi_{\text{E-ThDP}} \cdot \left(1 - \frac{\int \text{C2-H}(\text{eq})}{\int \text{C6'-H}(\text{eq})} \right) \cdot \exp(-k_{\text{E-ThDP}} \cdot t) + \left(1 - \frac{[\text{E-ThDP}]}{[\text{ThDP}]_0} \right) \cdot \Phi_{\text{ThDP}} \cdot \left(1 - \frac{\int \text{C2-H}(\text{eq})}{\int \text{C6'-H}(\text{eq})} \right) \cdot \exp(-k_{\text{ThDP}} \cdot t) + \frac{\int \text{C2-H}(\text{eq})}{\int \text{C6'-H}(\text{eq})}$$

Gl. 3.4

$$\frac{\int \text{C2-H}}{\int \text{C6'-H}}(t) - \text{Verhältnis der Peakintegrale zum Zeitpunkt } t, \quad \frac{\int \text{C2-H}(\text{eq})}{\int \text{C6'-H}(\text{eq})} - \text{Verhältnis der Peakintegrale im}$$

Gleichgewicht, $k_{\text{E-ThDP}}$ – H/D-Austauschgeschwindigkeitskonstante des enzymgebundenen ThDP, k_{ThDP} – H/D-Austauschgeschwindigkeitskonstante des freien ThDP

Unter der Voraussetzung, dass der Anteil an freiem Cofaktor nur 0.05 % beträgt (siehe oben, Gl. 3.5), so kann der Term für die H/D-Austauschgeschwindigkeit des freien Cofaktors vernachlässigt werden ($0.95 \gg 0.05$). Weiterhin entspricht das Verhältnis der Integrale von 2-H und 6'-H im Gleichgewicht n_D und beträgt damit 0.5 (siehe Gl. 3.3). Die Fraktionierungsfaktor $\Phi_{\text{E-ThDP}}$ wird 1 gesetzt. Nach diesen Vereinfachungen ergibt sich Gleichung 3.5, die zur Datenanpassung bei einer Auftragung von $\frac{\int \text{C2-H}}{\int \text{C6'-H}}$ gegen die Zeit

verwendet werden kann, sofern sich die Untereinheiten des Enzyms im Hinblick auf den H/D-Austausch äquivalent verhalten.

$$\frac{\int \text{C2-H}}{\int \text{C6'-H}}(t) \approx 0.5 \cdot \exp(-k_{\text{obs}}^{\text{E-ThDP}} \cdot t) + 0.5 \quad \text{Gl. 3.5}$$

Der erhaltene k -Wert ist eine makroskopische Geschwindigkeitskonstante ($k_{\text{obs}}^{\text{E-ThDP}}$), die sich aus den Geschwindigkeitskonstanten der Deuterierung (k_D) und der Reprotonierung (k_H) zusammensetzt (Gl. 3.6).

$$k_{\text{obs}}^{\text{E-ThDP}} = k_H + k_D \quad \text{Gl. 3.6}$$

Setzt man die mikroskopischen Geschwindigkeitskonstanten aus Abb. 3.13 oben für die Werte von k_H und k_D ein so erhält man Gleichung 3.7.

$$k_{\text{obs}}^{\text{E-ThDP}} = \frac{k_1 \cdot k_2 + k_{-1} \cdot k_{-2}}{k_{-1} + k_2} \quad \text{Gl. 3.7}$$

Es kann angenommen werden, dass die Deuterierung und die Reprotonierung des C2-Atoms diffusionskontrolliert und daher mit sehr ähnlichen Geschwindigkeitskonstanten ($k_{-1} \approx k_2$) ablaufen und somit gilt Gleichung 3.8.

$$k_{\text{obs}}^{\text{E-ThDP}} \leq \frac{1}{2}(k_1 + k_{-2}) \quad \text{Gl. 3.8}$$

Da gezeigt wurde, dass k_{obs} und k_1 nicht gleich sind, kann die Geschwindigkeitskonstante des H/D-Austauschs nicht die tatsächliche Deprotonierungsgeschwindigkeit widerspiegeln, jedoch als unterer Grenzwert betrachtet werden (Tittmann 2000).

Die Auftragung der Datenpunkte des H/D-Austauschs für die *hsPDH-E1* zeigte eine Signalamplitude von 0.475. Dies entspricht der erwarteten Besetzung von ca. 95 % der aktiven Zentren (s.o.). Der Verlauf der Kinetik ergab jedoch ein für ThDP-Enzyme zuvor noch nicht gezeigtes Bild. Während die eine Hälfte des enzymgebundenen ThDP innerhalb von 2 s austauschte, benötigte der Austausch der anderen Hälfte ThDP-Moleküle eine Zeit von 120 s. Durch das Auftreten von zwei Phasen trotz gerechtfertigter Vernachlässigung des Anteils an freiem Cofaktor (s.o.) nimmt die Gleichung für die Datenanpassung folgende Form an (Gl. 3.9):

$$\frac{\int \text{C2-H}}{\int \text{C6'-H}}(t) = \frac{0.25 \cdot [\text{E-ThDP}]}{[\text{ThDP}]_0} \cdot \exp(-k_{\text{obs}}^{\text{E-ThDP1}} \cdot t) + \frac{0.25 \cdot [\text{E-ThDP}]}{[\text{ThDP}]_0} \cdot \exp(-k_{\text{obs}}^{\text{E-ThDP2}} \cdot t) + 0.5 \quad \text{Gl. 3.9}$$

Erläuterung der Geschwindigkeitskonstanten im Text.

Die Anpassung der Daten nach einer doppelt-exponentiellen Reaktion pseudo 1. Ordnung ergaben für den schnell austauschenden Anteil des enzymgebundenen ThDP eine apparente Geschwindigkeitskonstante $k_{\text{obs}}^{\text{E-ThDP1}}$ von $51 \pm 15 \text{ s}^{-1}$ und für den langsam austauschenden Anteil $k_{\text{obs}}^{\text{E-ThDP2}}$ von $0.018 \pm 0.005 \text{ s}^{-1}$ (Abb. 3.13 unten rechts). Die Amplituden der beiden Phasen entsprachen ungefähr einem Wert von 0.25 und somit 50 % der Gesamtamplitude. Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass sich unter den gewählten Bedingungen in *hsPDH-E1* ein aktives Zentrum in einem reaktiven und das zweite aktive Zentrum in einem inaktiven bzw. ruhenden Zustand befinden.

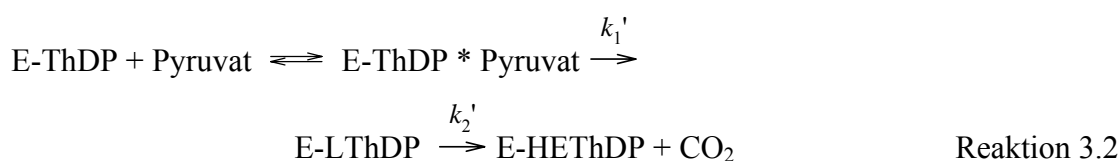
Vergleicht man die Geschwindigkeitskonstante der C2-Ionisierung des „schnellen“ aktiven Zentrums mit der für den PDHc bestimmten Katalysekonstante (k_{cat}) von $50\text{-}70 \text{ s}^{-1}$ (Liu et al. 2001; Korotchkina und Patel 2001a), zeigt sich, dass durch den ersten Schritt der E1-Reaktion, die Geschwindigkeit der Gesamtreaktion des Komplexes realisiert werden kann und dieser nicht geschwindigkeitsbestimmend für den *hsPDH-Komplex* ist.

Bemerkenswert ist, dass der langsam austauschende Anteil an enzymgebundenen ThDP ca. zehnmals langsamer austauscht als der freie Cofaktor ($k_{\text{obs}}^{\text{ThDP}} = 0.14 \pm 0.02 \text{ s}^{-1}$). Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass die langsame Seite durch die Proteinkomponente vom Lösungsmittel abgeschirmt ist.

- **¹H-NMR-Intermediatanalyse**

Die Methode der ¹H-NMR-Intermediatanalyse erlaubt die Bestimmung mikroskopischer Geschwindigkeitskonstanten der Reaktionsschritte von ThDP-abhängigen Enzymen (Tittmann et al. 2003). Durch die Änderung des elektronischen Zustands des reaktiven C2-Atoms während der Katalyse kommt es zu einer Veränderung des Ringstroms der π -Elektronen der beiden heterozyklischen Ringsysteme des Cofaktors. Das verursacht eine chemische Umgebungsveränderung und somit eine Verschiebung des ¹H-NMR-Signals des C6'-H-Atoms. Jedes Reaktionsintermediat des ThDP-Moleküls besitzt eine definierte chemische Verschiebung und konnte durch Verwendung einer jeweiligen Referenzsubstanz genau zugeordnet werden (Tittmann et al. 2003). Aufgrund der Korrelation der Integrale der NMR-Signale und der Anzahl der detektierten Kerne erhält man ein Maß für die relativen Konzentrationen der Intermediate zu definierten Zeitpunkten der Reaktion. Wie in Kapitel 2.2.5.6. bereits erwähnt, sind ThDP und seine Intermediate säurestabil. Dies ermöglicht die Trennung von Protein und Cofaktor bzw. Intermediat durch sogenanntes Säure-*quenching* nach bestimmten Inkubationszeiten. Die quantitative Verteilung der Reaktionsintermediate zu definierten Zeitpunkten der Reaktion erlaubt folglich die Bestimmung von mikroskopischen Geschwindigkeitskonstanten sowohl unter *steady-state*- als auch unter *single-turnover*-Bedingungen.

Die isolierte E1-Komponente katalysiert die Decarboxylierung von Pyruvat unter Bildung des Reaktionsintermediats HETHDP (Carbanion/Enamin). Dabei wird als transientes Intermediat LThDP durchlaufen (Reaktion 3.2). HETHDP (Carbanion/Enamin) ist das Produkt dieser Reaktionssequenz, da in Abwesenheit externer Oxidationsmittel kein weiterer Umsatz des enzymgebundenen HETHDP erfolgen kann. Bei vollständigem Umsatz liegt in allen aktiven Zentren der *hsPDH*-E1 das Intermediat HETHDP vor.



Die chemischen Verschiebungen der für die E1-Reaktion relevanten Intermediate sind in Abbildung 3.14 gezeigt.

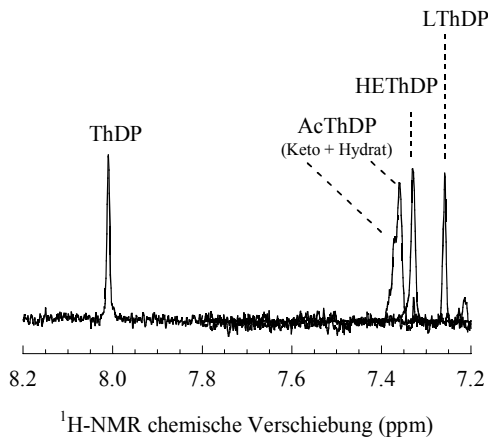


Abb. 3.14. Standardsignale der C6'-Protonen im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum für die Intermediate der Reaktion von enzymgebundenem ThDP mit Pyruvat. ThDP – Thiamindiphosphat ($\delta = 8.01$ ppm), LThDP – 2-Laktyl-Thiamin-diphosphat ($\delta = 7.27$ ppm), HEThDP – 2-Hydroxyethyl-Thiamindiphosphat ($\delta = 7.33$ ppm), AcThDP – 2-Acetyl-Thiamindiphosphat (δ (Ketoform) = 7.37 ppm und δ (Hydrat) = 7.36 ppm).

Der Reaktionsverlauf und die mikroskopischen Geschwindigkeitskonstanten der *hsPDH-E1*-Reaktion wurden in einem *single-turnover*-Experiment bestimmt. Pro aktivem Zentrum wird dabei nicht mehr als ein Pyruvatmolekül umgesetzt. Diese Annahme ist gerechtfertigt, da die Abspaltung von Acetaldehyd als Nebenreaktion unter 5 % der E1-Gesamtaktivität liegt und daher nicht auf der Zeitskala der durchgeführten NMR-Experimente in Erscheinung tritt (bestimmt mit Hilfe des Holzer-Tests, Daten nicht gezeigt). Analog zu den H/D-Austauschexperimenten wurde die *hsPDH-E1* mit äquimolaren Mengen ThDP und einem Überschuss an MgSO_4 rekombiniert. Die Reaktion wurde im Anschluss daran durch Zugabe von Pyruvat gestartet und wie beschrieben nach definierten Zeitpunkten durch Säure-*quenching* gestoppt.

In Abbildung 3.15 sind zum einen ausgewählte $^1\text{H-NMR}$ -Spektren während der Reaktion, zum anderen die Zeitabhängigkeit der LThDP- und HEThDP-Bildung der *single-turnover*-Reaktion der *hsPDH-E1* dargestellt.

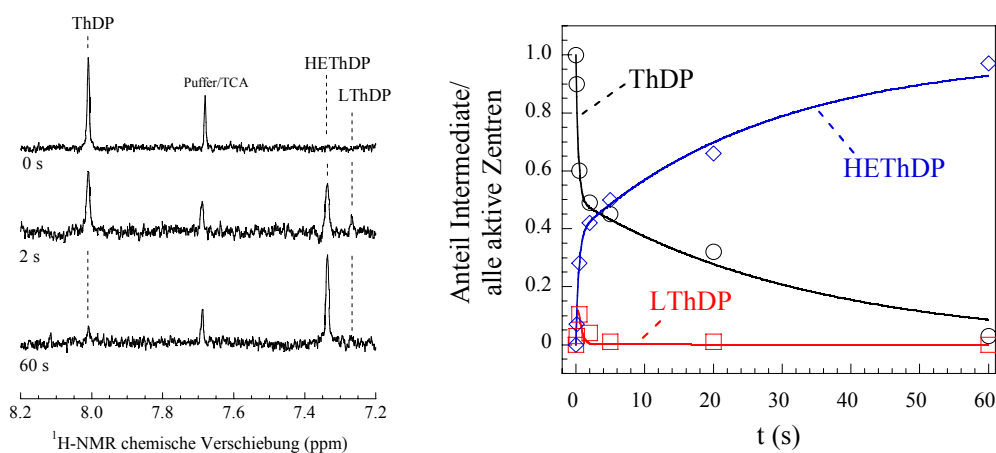


Abb. 3.15. Links: $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der kovalenten ThDP-Intermediate der *hsPDH-E1*-Reaktion mit Pyruvat unter *single-turnover*-Bedingungen nach Säure-*quenching* und Intermediatanalyse nach 0, 2 und 60 s. Rechts: Zeitliche Abhängigkeit der Intermediatverteilung der *hsPDH-E1*-Reaktion mit Anpassung nach Gl. 3.10 für ThDP (—○—), Gl. 3.11 für LThDP (—□—) und Gl. 3.12 für HEThDP (—◇—). Bedingungen nach 1+1-Mischung von Substrat und Enzym: 7.75 mg/ml (100.65 μM aktive Zentren) *hsPDH-E1*, 100.65 μM ThDP, 1 mM MgSO_4 , 25 mM Pyruvat, 0.1 M KPP, 0.3 M KCl, pH 7.6, $T = 30^\circ\text{C}$.

Die Auftragung des zeitlichen Verlaufs der Reaktion zeigte deutlich zwei Phasen mit einer Amplitude von jeweils ca. 0.5 Molfraktion. Man kann demnach davon ausgehen, dass die beiden aktiven Zentren nicht gleichwertig arbeiten, sondern eine Halbseitenreaktivität vorliegt. Die Reaktion der schnell arbeitenden Seite ist nach ca. 2 s abgeschlossen, während der gesamte Umsatz ca. 60 s dauert. Des Weiteren ist die Bildung und der Zerfall des transienten Intermediats LThDP zu erkennen (Abb. 3.15 rechts). Der detektierte Anteil des LThDP betrug in diesem Experiment ca. 10 %. Die Gesamtreaktion entspricht einer Folgereaktion. Unter der Bedingung der Substratsättigung ist die Geschwindigkeitskonstante der Gesamtreaktion von der Geschwindigkeitskonstante der C-C-Bindungsbildung zwischen dem C2 des ThDP und dem Carbonylkohlenstoff des Pyruvats (k_1') und der Geschwindigkeitskonstante der Decarboxylierung des LThDP (k_2') abhängig (Reaktion 3.2). Für die Auswertung der Daten muss die Halbseitenreaktivität beachtet werden, so dass sich die genannten Geschwindigkeitskonstanten in jeweils zwei Konstanten unterteilen: k_{1A}' und k_{1B}' für die C-C-Bindungsbildung und k_{2A}' und k_{2B}' für die Decarboxylierung. Dabei repräsentiert A die „schnelle“, B die „langsame“ Seite. Die Anteile der einzelnen Spezies E-ThDP, E-LThDP und E-HETHP (Reaktion 3.2) sind durch die Geschwindigkeitskonstanten ihrer Bildung und ihres Zerfalls beschrieben (Gl. 3.10 – 3.12).

$$[E - \text{ThDP}](t) = 0.5 [E - \text{ThDP}]_0 \cdot \exp(-k_{1A}' \cdot t) + 0.5 [E - \text{ThDP}]_0 \cdot \exp(-k_{1B}' \cdot t) \quad \text{Gl. 3.10}$$

$$\begin{aligned} [E - \text{LThDP}](t) = & 0.5 [E - \text{ThDP}]_0 \frac{k_{1A}'}{k_{2A}' - k_{1A}'} \cdot [\exp(-k_{1A}' \cdot t) - \exp(-k_{2A}' \cdot t)] \\ & + 0.5 [E - \text{ThDP}]_0 \frac{k_{1B}'}{k_{2B}' - k_{1B}'} \cdot [\exp(-k_{1B}' \cdot t) - \exp(-k_{2B}' \cdot t)] \end{aligned} \quad \text{Gl. 3.11}$$

$$\begin{aligned} [E - \text{HETHP}^-](t) = & 0.5 [E - \text{ThDP}]_0 \cdot \left[1 + \frac{k_{1A}' \exp(-k_{2A}' \cdot t) - k_{2A}' \exp(-k_{1A}' \cdot t)}{k_{2A}' - k_{1A}'} \right] \\ & + 0.5 [E - \text{ThDP}]_0 \cdot \left[1 + \frac{k_{1B}' \exp(-k_{2B}' \cdot t) - k_{2B}' \exp(-k_{1B}' \cdot t)}{k_{2B}' - k_{1B}'} \right] \end{aligned} \quad \text{Gl. 3.12}$$

Erläuterungen der Geschwindigkeitskonstanten im Text.

Zunächst wurde das Zeitprofil des enzymgebundenen ThDP (E-ThDP) nach Gleichung 3.10 angepasst. Die erhaltenen Werte für k_{1A}' und k_{1B}' wurden zur Anpassung der Datenpunkte von E-LThDP und E-HETHP nach Gleichungen 3.11 und 3.12 verwendet. Danach konnten k_{2A}' und k_{2B}' entsprechend berechnet werden. Die ermittelten Werte für die mikroskopischen Geschwindigkeitskonstanten sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

Tabelle 3.1. Kinetische Konstanten für die Einzelschritte des Pyruvatumsatzes der *hsPDH-E1* bestimmt durch $^1\text{H-NMR}$ -Intermediatanalyse.

Mikroskopische Geschwindigkeitskonstante		<i>hsPDH-E1</i>
LThDP-Bildung (C-C-Bindung),	k_{1A}' (s^{-1})	2.3 ± 0.5
	k_{1B}' (s^{-1})	0.029 ± 0.005
LThDP-Decarboxylierung (HThDP-Bildung),	k_{2A}' (s^{-1})	5.1 ± 1.3
	k_{2B}' (s^{-1})	$\gg k_{1B}'$

Die aktive Seite der *hsPDH-E1* arbeitet zwei Größenordnungen schneller als die ruhende Seite. Betrachtet man die Aktivierung des Cofaktors und die C-C-Bindungsbildung, so zeigt sich für die aktive Seite, dass die apparente Ionisierungsgeschwindigkeit mit einem Faktor von 22 deutlich schneller als die C-C-Bindungsbildung ist ($k_{\text{obs}}^{\text{E-ThDP1}} = 51 \pm 15 \text{ s}^{-1}$). Im Fall der langsamen Seite liegen die Werte in einem ähnlichen Bereich ($k_{\text{obs}}^{\text{E-ThDP2}} = 0.018 \pm 0.005 \text{ s}^{-1}$).

Wie bereits erwähnt, traten während des gesamten Reaktionsverlaufs nur ca. 10 % des enzymgebundenen Cofaktors als LThDP in Erscheinung. Bereits nach 5 s war LThDP wieder vollständig zerfallen (Abb. 3.15). Die detektierte LThDP-Fraktion muss in diesem Fall der schnellen Seite zugeordnet werden. Wäre das LThDP beiden aktiven Zentren zuzuordnen, müsste das LThDP-Signal über einen längeren Zeitraum stabil detektierbar sein, da die Geschwindigkeitskonstante der C-C-Bindungsbildung der langsamen Seite nur 0.029 s^{-1} betrug. Der Anteil an maximal gebildetem LThDP kann unter Annahme einer Halbseitenreaktivität nach Gleichung 3.13 berechnet werden.

$$\frac{[\text{LThDP}]_{\text{max}}}{[\text{aktive Zentren}]_{\text{gesamt}}} = 0.5 \left(\frac{k_{1A}'}{k_{2A}'} \right)^{\frac{-k_{2A}'}{(k_{1A}' - k_{2A}')}} \quad \text{Gl. 3.13}$$

Nach Verwendung der zuvor bestimmten Geschwindigkeitskonstanten erhält man eine maximale Molfraktion an LThDP von 0.12 relativ zur Konzentration an aktiven Zentren. Dieser Wert stimmt gut mit dem experimentell bestimmten Wert von 0.1 (10 %) überein.

Die Daten der H/D-Austauschexperimente und der Intermediatanalyse mit dem Substrat Pyruvat implizieren das Vorliegen einer Halbseitenreaktivität der *hsPDH-E1*. In einem weiteren $^1\text{H-NMR}$ -Experiment sollte die Hypothese dieses alternierenden Mechanismus durch ein weiteres Ergebnis unterstützt werden.

Für dieses Experiment wurde das Substratanalogon Methyacetylphosphonat (MAP) eingesetzt. Die humane E1-Komponente kann MAP unter der Bildung von PLThDP binden, jedoch nicht weiter umsetzen. Der Grund dafür ist die durch das Enzym nichtspaltbare Phosphonatbindung ($\text{C}_\alpha\text{-P}$) anstelle der C-C-Bindung zwischen dem Carbonylkohlenstoff und dem C-Atom der Carboxylatgruppe (Abb. 3.4). Die Holoform der *hsPDH-E1* wurde mit einer

hohen Konzentration an MAP für 15 min zur Reaktion gebracht und nach Probenbehandlung mittels $^1\text{H-NMR}$ analysiert. Das resultierende NMR-Spektrum ist in Abbildung 3.16 dargestellt.

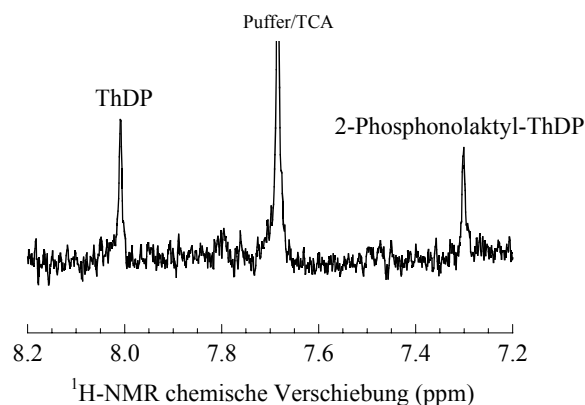


Abb. 3.16. $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des kovalenten ThDP-Intermediats der *hsPDH-E1*-Reaktion mit MAP mit einem $\text{C6}'\text{-H}$ -Signal des PLThDP bei 7.30 ppm. Bedingungen nach 1+1-Mischung von Substratanalogon und Enzym: 7.16 mg/ml *hsPDH-E1* (93 μM aktive Zentren), 93 μM ThDP, 0.5 mM MgSO_4 , 10 mM MAP, $t = 15$ min, Puffer: 0.1 M KPP, 0.3 M KCl, pH 7.6, $T = 30$ °C.

Dieses Spektrum zeigt, dass MAP von der *hsPDH-E1* unter der Bildung von PLThDP gebunden wird. Trotz der langen Reaktionszeit konnten maximal nur 50 % des Intermediatanalogons PLThDP detektiert werden. Dieser Befund unterstützt die Theorie der Nichtäquivalenz der beiden aktiven Zentren der *hsPDH-E1*.

3.1.1.4. CD-spektroskopische Charakterisierung der IP- und AP-Bande des ThDP in der *hsPDH-E1* unter Verwendung von Substrat- und Cofaktoranaloga

Eine elegante Methode zur Detektion verschiedener Zustände des ThDP wurde in den letzten Jahren in der Gruppe von JORDAN intensiv entwickelt (Jordan et al. 2002; Jordan et al. 2003; Nemeria et al. 2004; Jordan und Nemeria 2005; Nemeria et al. 2006; Nemeria et al. 2007a; Nemeria et al. 2007b; Nemeria et al. 2009). In Studien zu verschiedenen ThDP-abhängigen Enzymen konnte gezeigt werden, dass sich die tautomeren Formen des Aminopyrimidinrings des enzymgebundenen Cofaktors in ihren spektroskopischen Eigenschaften im Nah-UV-CD voneinander unterscheiden. Es existieren vier verschiedene Zustände: das 4'-Aminopyrimidintautomer (AP), das 4'-Aminopyrimidiniumtautomer (APH^+), das 1',4'-Iminotautomer (IP) und das reaktive Ylid (Abb. 3.3). Die unterschiedliche Wechselwirkung der einzelnen tautomeren Zustände des enzymgebundenen Cofaktors mit eingestrahltm Licht ermöglicht die spektroskopische Untersuchung der ThDP-Katalyse. Die einzelnen Reaktionsintermediate können anhand ihres tautomeren Zustands zugeordnet werden. Es wurde folgende Zuordnung vorgeschlagen: Die AP-Form zeigt ein negatives Nah-UV-CD-Signal bei ca. 320-330 nm, die IP-Form hingegen verursacht ein positives Signal zwischen 290 und 305 nm. Für die APH^+ -Spezies wird kein CD-Signal detektiert (Nemeria et al. 2009). Die Bildung des Signals um 330 nm beruht vermutlich auf einen Ladungs-Transfer-Komplex zwischen dem Aminopyrimidinring und dem Thiazoliumring (Nemeria et al. 2004). Das Signal im Bereich um 300 nm wird möglicherweise durch die chemische Struktur des 1',4'-Iminopyrimidinrings verursacht (Baykal et al. 2006). Andere Arbeiten zeigen jedoch, dass die

Zuordnung der CD-Banden nicht in jedem Fall eindeutig bzw. das Auftreten der Banden auf die genannten Ursachen zurückzuführen ist. Es wird vielmehr davon ausgegangen, dass die Wechselwirkung des prochiralen ThDP mit seiner chiralen Umgebung, der Proteinkomponente, zu einer enzymespezifischen Bandenstruktur führt (Asztalos 2008). Die Zuordnung der Banden, die in der vorliegenden Arbeit analysiert wurden, orientiert sich an den Ergebnissen der Arbeitsgruppe um JORDAN.

Zunächst sollten diese Ergebnisse in Nah-UV-CD-Experimenten mit der *hsPDH-E1* bestätigt werden. In der Abbildung 3.17 sind die Nah-UV-CD-Spektren für Apo- und Holo-*hsPDH-E1* dargestellt. Dabei zeigte sich eine negative Bande bei 328 nm. Die Gruppe von JORDAN konnte für die Holo-*hsPDH-E1* zudem eine positive Bande bei 300 nm detektieren (Nemeria et al. 2009). Die Autoren interpretierten das simultane Auftreten beider Banden wie folgt: In einem aktiven Zentrum ist die iminotautomere Form, in dem anderen die aminotautomere Form des Cofaktors populiert. Mit dieser Aussage wird auch die Halbseitenreaktivität unterstützt. Die entsprechende Bande ist in den CD-Spektren der Holo-*hsPDH-E1*, die in dieser Arbeit generiert wurden, nicht stark ausgeprägt.

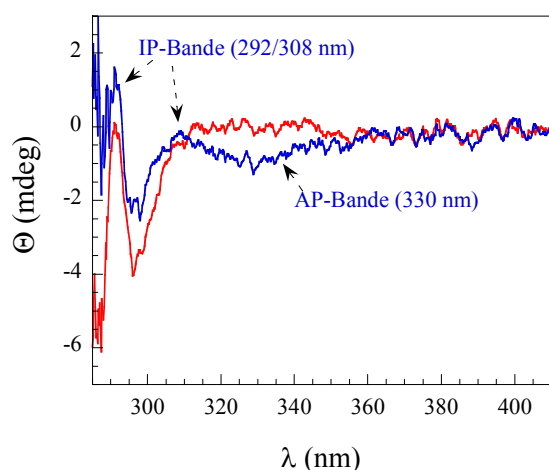


Abb. 3.17. Nah-UV-CD-Spektren der *hsPDH-E1* in ihrer Apoform (—, ohne ThDP und MgSO₄) und ihrer Holoform (—).

Bedingungen: 4 mg/ml (52 μM aktive Zentren) *hsPDH-E1*, 0,25 mM ThDP, 1 mM MgSO₄, 20 mM KPP, pH 7.6, T = 30 °C.

In zwei weiteren Experimenten sollte die Identität der Banden im Fall der *hsPDH-E1* weiter untersucht werden. Zum einen wurde das native Substrat Pyruvat, zum anderen das Substratanalogon MAP einer Holoenzymlösung zugefügt. Die CD-Spektren ergaben folgendes Bild (Abb. 3.18): Nach der Zugabe von Pyruvat verschwand die Bande bei 330 nm. Dies zeigt, dass der Cofaktor nicht mehr in seiner AP-Form vorliegt. Es kommt jedoch auch nicht zur Population der IP-Form, da sich im Bereich um 300 nm kein Signal zeigte. Das finale Intermediat der isolierten E1-Reaktion ist HETHDP (Carbanion/Enamin). Die Daten sprechen demnach dafür, dass das gebildete HETHDP in der APH⁺-Form vorliegt. Diese Annahme ist in guter Übereinstimmung mit dem von der Gruppe um JORDAN vorgeschlagenen Modell, nach dem die Carbanion/Enamin-Struktur entweder in der AP- oder in der APH⁺-Form vorliegen sollte (Nemeria et al. 2009).

Die Zugabe von MAP führte zu einem deutlichen positiven CD-Signal bei 290-293 nm mit einer Schulter bei 305-308 nm. Diese Bande kann dem Intermediatanalogon PLThDP zugewiesen werden. Bisherige Beobachtungen zeigten, dass tetrahedrale ThDP-Intermediate in der 1',4'-iminotautomeren Form vorliegen und ein Signal in diesem Wellenlängenbereich

hervorrufen (Abb. 3.18 rechts, 3.20 links). Für die iminotautomere Form wurden zumeist Signale bei 305-308 nm gefunden. Das CD-Spektrum der *hsPDH-E1* nach Bildung von PLThDP zeigte jedoch ein Maximum im oben genannten Bereich mit einer Schulter bei 305 nm.

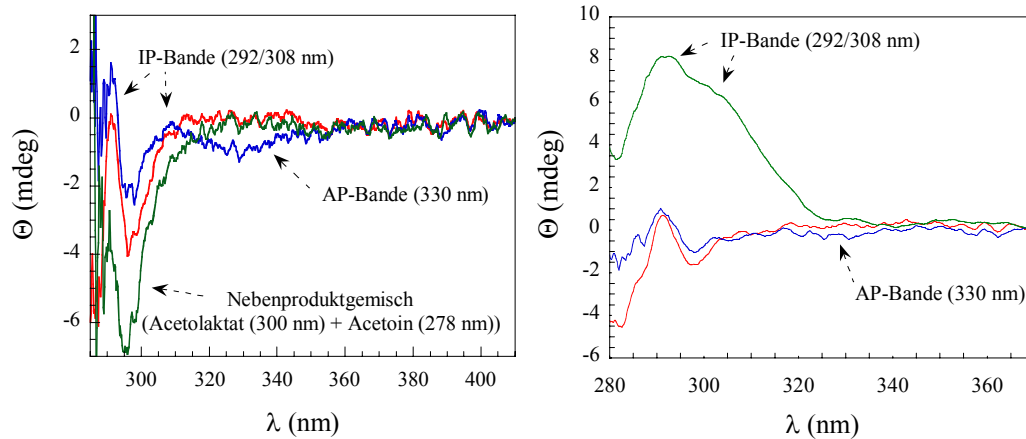


Abb. 3.18. Nah-UV-CD-Spektren der *hsPDH-E1* in ihrer Apoform (—, ohne ThDP und MgSO_4) und ihrer Holoform (—, links) und nach Zugabe von Pyruvat (—, links) oder MAP (—, rechts). Bedingungen: links: 4 mg/ml (52 μM aktive Zentren) *hsPDH-E1*, 0.25 mM ThDP, 1 mM MgSO_4 , 10 mM Pyruvat, $t = 1$ min, Puffer: 20 mM KPP, pH 7.6, $T = 30$ °C. rechts: 2 mg/ml (26 μM aktive Zentren) *hsPDH-E1*, 0.1 mM ThDP, 5 mM MgSO_4 . links: 10 mM MAP, $t = 15$ min, 0.1 M KPP, 0.3 M KCl, pH 7.6, $T = 20$ °C.

In einem weiteren Experiment wurde die *hsPDH-E1* mit dem katalytisch inaktiven ThDP-Analogon N3'-Pyridyl-ThDP rekombiniert (Seifert 2005). Das resultierende CD-Spektrum zeigte eine zu 320 nm verschobene negative Bande. Diese kann der Aminopyridin-Form des Cofaktoranalogs zugeordnet werden. Auch nach der Zugabe von Pyruvat blieb das Signal unverändert (Abb. 3.19). Dieses Ergebnis beweist, dass N3'-Pyridyl-ThDP ein unreaktives Cofaktoranalogen ist. Die Verschiebung der Bande kann auf den fehlenden Ringstickstoff an Position 1' im Aminopyridinring zurückgeführt werden. Die elektronische Veränderung verursacht vermutlich eine leichte Perturbation des Ladungs-Transfer-Komplexes bzw. der Wechselwirkung mit der Proteinkomponente. Eine vergleichbare Bandenstruktur des enzymgebundenen N3'-Pyridyl-ThDP wurde mit der Transketolase aus *E. coli* beobachtet (Asztalos 2008).

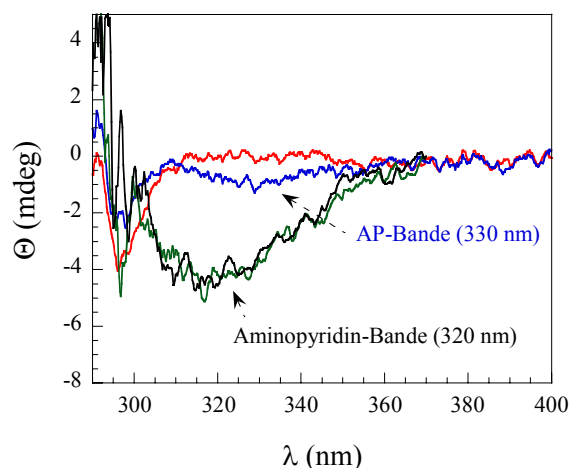


Abb. 3.19. Nah-UV-CD-Spektren der *hsPDH*-E1 in ihrer Apoform (—, ohne ThDP und MgSO_4) und ihrer Holoform mit ThDP (—) bzw. N^3 '-Pyridyl-ThDP und nach Zugabe von Pyruvat (—) zu der mit N^3 '-Pyridyl rekombinierten *hsPDH*-E1; Bedingungen: für Apo- und Holoform s. Abb. 3.17; 5.75 mg/ml (74.7 μM aktive Zentren) *hsPDH*-E1, 0.25 mM N^3 '-Pyridyl-ThDP, 1 mM MgSO_4 , 1.33 mM Pyruvat, $t = 5$ min, 0.1 M KPP, 0.3 M KCl, pH 7.6, $T = 20$ °C.

Die Nah-UV-CD-spektroskopischen Experimente mit der *hsPDH*-E1 bestätigen im Wesentlichen die für verschiedene ThDP-Enzyme erhaltenen Daten der Arbeitsgruppe um JORDAN. Ein weiterer Beweis für die konkrete Zuordnung der Bande bei 292/308 nm wäre das CD-Spektrum einer LThDP-Decarboxylierungs-defizienten Variante der *hsPDH*-E1. Dieses müsste eine ähnliche Struktur wie das Spektrum von enzymgebundenen PLThDP zeigen. Entsprechende Experimente mit der PDC aus *Zymomonas mobilis* waren bereits erfolgreich (Meyer 2009).

Die Verschiebung der CD-Bandenstruktur der *hsPDH*-E1 rekombiniert mit N^3 '-Pyridyl-ThDP kann zu der bestehenden Liste der CD-Signale für ThDP-abhängige Enzyme hinzugefügt werden. Es zeigt sich, dass das finale Produkt der isolierten E1-Reaktion HETHDP wahrscheinlich in der APH^+ -Form vorliegt (Abb. 3.20 rechts).

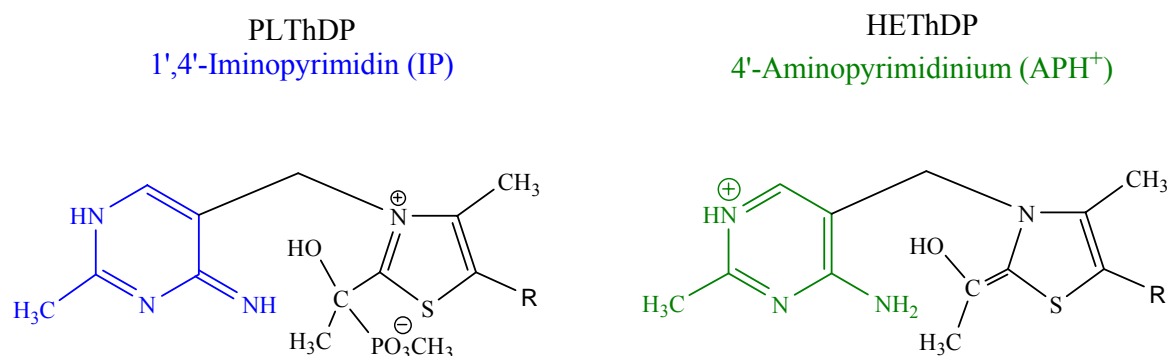


Abb. 3.20. Hypothetische Strukturformeln von PLThDP (links) und HETHDP (rechts) gebunden an *hsPDH*-E1.

3.1.1.5. Kinetische Untersuchung der Reaktion der *hsPDH-E1* mit Pyruvat

Die Reaktion der *hsPDH-E1* mit ihrem nativen Substrat Pyruvat konnte mittels $^1\text{H-NMR}$ -Experimenten kinetisch charakterisiert werden. Mittels einer Geräteanordnung von *stopped-flow* und Photodioden-*array* wurde der Pyruvatumsatz zudem kontinuierlich über einen Wellenlängenbereich von 185 nm bis 720 nm durch die Aufnahme von zeitaufgelösten Spektren verfolgt (Abb. 3.21 links).

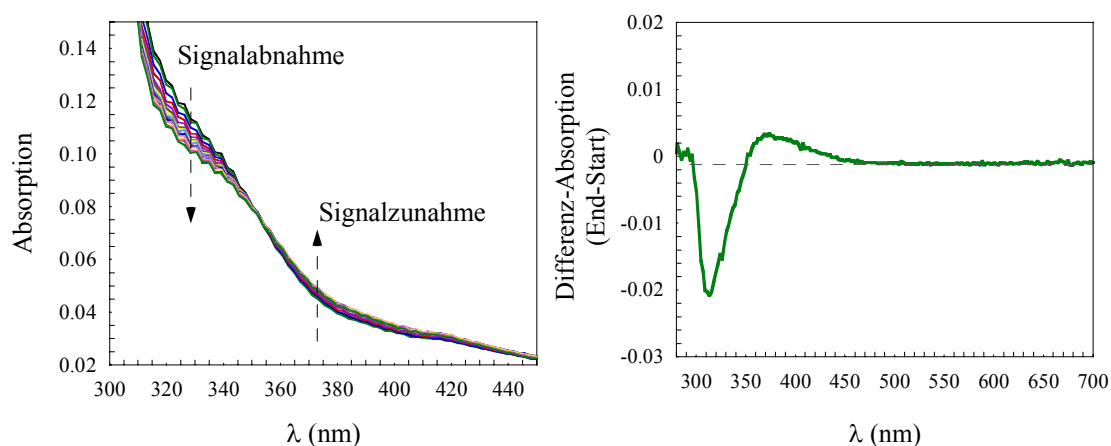


Abb. 3.21. Links: Zeitaufgelöste Spektren der Reaktion der *hsPDH-E1* mit Pyruvat. Rechts: Differenz-Absorptionsspektrum (Spektrum 0.05 s – Spektrum 10 s). Bedingungen nach 1+1-Mischung: 7.5 mg/ml *hsPDH-E1*, 0.25 mM ThDP, 1 mM MgSO_4 , 1 mM Pyruvat, 0.1 M KPP, 0.3 M KCl, pH 7.6, $T = 30\text{ }^\circ\text{C}$.

Die Spektren zeigten einen charakteristischen Verlauf. Im Wellenlängenbereich um 330 nm nahm die Absorption mit der Zeit ab und im Bereich um 373 nm zu (Abb. 3.22). Die Spektren wiesen einen isosbestischen Punkt bei 352 nm auf.

Die Interpretation der Signalabnahme bei 330 nm bedarf einer Vorbetrachtung: Freies Pyruvat zeigt ein Absorptionssignal bei einer Wellenlänge von 333 nm. Unter den gewählten Bedingungen (Messpuffer und $T = 30\text{ }^\circ\text{C}$) konnte ein Extinktionskoeffizient von $18.9\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ bestimmt werden. Im beobachteten Zeitfenster von 10 s kann man für die isolierte E1-Reaktion von einem *single-turnover* ausgehen (Abb. 3.4). Die eingesetzte Enzymkonzentration betrug $97.4\text{ }\mu\text{M}$ aktive Zentren. Demnach wurden $97.4\text{ }\mu\text{M}$ Pyruvat umgesetzt. Unter Verwendung des Lambert Beer'schen Gesetzes (Gl. 2.2) ergibt sich daraus eine sehr kleine Extinktionsänderung bei 333 nm von 0.00184.

Betrachtet man jedoch die aufgenommenen Spektren, zeigte sich in diesem Bereich eine deutlich größere Amplitude von 0.012. Diese Extinktionsänderung kann durch den Substratverbrauch allein nicht erklärt werden. Die Ursache der Absorptionsabnahme kann wie folgt erklärt werden: Das 4'-Aminotautomer des ThDP wird durch den Umsatz von Pyruvat zunächst in die IP-Form (LThDP) und anschließend in die APH^+ -Form (HEThDP) überführt. Die AP-Form des ThDP zeigt ein negatives CD-Signal bei 330 nm. Sowohl die IP-, als auch die APH^+ -Form weisen dieses Signal nicht auf (Kap. 3.1.1.4.). Die detektierte Absorptionbande bei 330 nm kann demzufolge dem 4'-aminotautomeren Zustand des

Cofaktors zugeordnet werden. Die Abnahme dieses Signals geht sowohl mit der Substratabnahme, als auch mit der Änderung des tautomeren Zustands des ThDP und damit der *hs*PDH-E1-Reaktion einher. Der zeitliche Verlauf der Signalabnahme folgt einer einfach exponentiellen Abhängigkeit. Die Anpassung der Daten an eine entsprechende Gleichung (Gl. 3.14) ergibt einen k_{obs} -Wert von $2.02 \pm 0.10 \text{ s}^{-1}$ (Abb. 3.22 links). Dieser Wert liegt im gleichen Größenordnungsbereich der Geschwindigkeitskonstante der C-C-Bindungsbildung von 2.3 s^{-1} , bestimmt durch $^1\text{H-NMR}$ -Intermediatanalyse (Kap. 3.1.1.3.). Auf Grund der gewählten Zeitskala des Experiments wird nur das schnell arbeitende aktive Zentrum betrachtet.

$$\Delta\text{Abs}(t) = \Delta\text{Abs}_{\text{max}} \exp(-k_{\text{obs}} \cdot t) + \text{Abs}_{\text{Start}} \quad \text{Gl. 3.14}$$

$$\Delta\text{Abs}(t) = \Delta\text{Abs}_{\text{max}} (1 - \exp(-k_{\text{obs}} \cdot t)) + \text{Abs}_{\text{Start}} \quad \text{Gl. 3.15}$$

$\Delta\text{Abs}(t)$ – Zeitabhängige Absorptionsänderung, $\Delta\text{Abs}_{\text{max}}$ – maximale Amplitude des Signals, k_{obs} – beobachtete Geschwindigkeitskonstante der Signaländerung in s^{-1} , $\text{Abs}_{\text{Start}}$ – Absorption zu Beginn der Messung

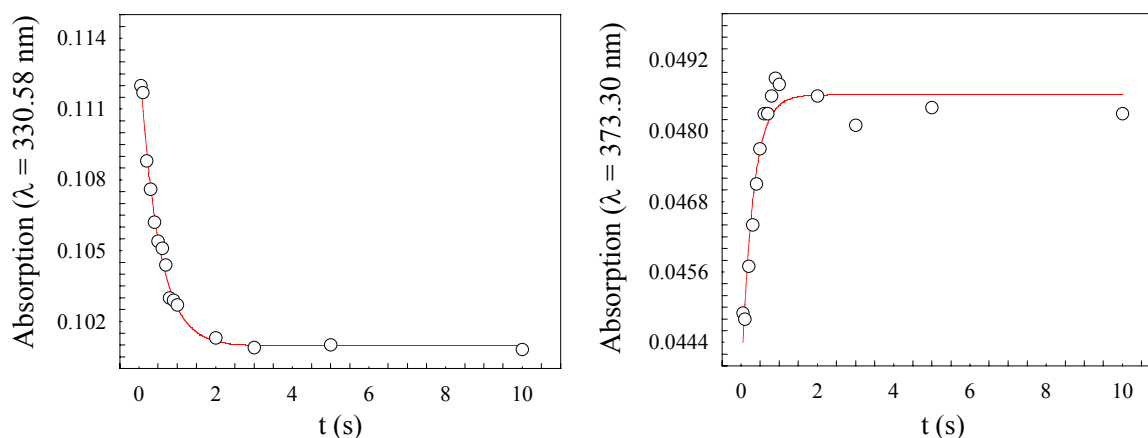


Abb. 3.22. Links: Zeitliche Abhängigkeit des Absorptionssignals bei 330.58 nm mit Anpassung an Gl. 3.14 (—○—). Rechts: Zeitliche Abhängigkeit des Absorptionssignals bei 373.30 nm mit Anpassung an Gl. 3.15 (—○—). Bedingungen nach 1+1-Mischung: 7.5 mg/ml *hs*PDH-E1, 0.25 mM ThDP, 1 mM MgSO_4 , 1 mM Pyruvat, 0.1 M KPP, 0.3 M KCl, pH 7.6, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$.

Das zweite Signal zeigt eine Zunahme bei 373.3 nm (Abb. 3.22 links). Auch die Kinetik der Bildung dieses Signals kann einfach exponentiell angepasst werden (Gl. 3.15) (Abb. 3.22 rechts). Der erhaltene k_{obs} -Wert beträgt $3.33 \pm 0.57 \text{ s}^{-1}$. Die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten des Verschwindens des Signals bei 330 nm und der Bildung des Signals bei 373 nm liegen in der gleichen Größenordnung. Dieser Befund zeigt, dass es sich um den gleichen Prozess handelt. Die Signalzunahme bei 373 nm kann demnach dem Produkt der isolierten E1-Reaktion, dem HETHDP (Carbanion/Enamin) zugeordnet werden. Dieses Signal wurde für die *hs*PDH-E1 bisher nicht beschrieben. Für das an die humane E1-Komponente gebundene HETHDP (Carbanion/Enamin) wurde bisher auch keine entsprechende Bande im Nah-UV-CD detektiert. Dies kann durchaus mit einem sehr kleinen Extinktionskoeffizienten

oder den Chiralitätseigenschaften zusammenhängen. Möglicherweise spiegelt das Absorptionssignal aber auch den Ladungs-Transfer-Komplex zwischen dem Aminopyrimidinring (AP-Form) und dem Thiazoliumring des HETHDP wider. Da das HETHDP jedoch hauptsächlich in der APH^+ -Form vorliegt (siehe Kap. 3.1.1.4.), ist die Amplitude der Absorptionsbande sehr klein. Die maximale Amplitude dieses Signals beträgt lediglich 0.005. Ein Absorptionssignal für enzymgebundenes HETHDP wurde erstmals von der Arbeitsgruppe um JORDAN 2002 beschrieben (Jordan et al. 2002).

Als Vergleich wurde ein analoges Experiment mit der Pyruvatdecarboxylase aus *Zymomonas mobilis* (*ZmPDC*) durchgeführt. Diese PDC decarboxyliert Pyruvat und nach Protonierung des HETHDP (Carbanion/Enamin) wird Acetaldehyd abgespalten. Die *ZmPDC*-Variante E473Q akkumuliert aufgrund der beeinträchtigten Produktabspaltung das Intermediat HETHDP (Carbanion/Enamin) (Meyer 2009). Diese Variante stellt somit ein geeignetes Referenzenzym zur *hsPDH-E1* dar. Die Abbildung 3.23 zeigt jeweils zwei Spektren zu Beginn und nach Ablauf der Reaktion sowie das jeweilige Differenzspektrum des *stopped-flow*-Experiments mit Photodioden-array der Variante E473Q und des Wildtyps der *ZmPDC*. Die Reaktion des Wildtypenzyms ist bereits nach etwa 300 ms abgeschlossen ($k_{\text{cat}} = 150 \text{ s}^{-1}$). Es ist keine entsprechende Signalbildung im relevanten Wellenlängenbereich zu detektieren. Im Fall der Variante E473Q zeigt sich eine deutliche Signalbildung im Bereich um 355 nm (Abb. 3.23 links). Dieses Signal ist dem HETHDP (Carbanion/Enamin) zuzuordnen (Meyer 2009).

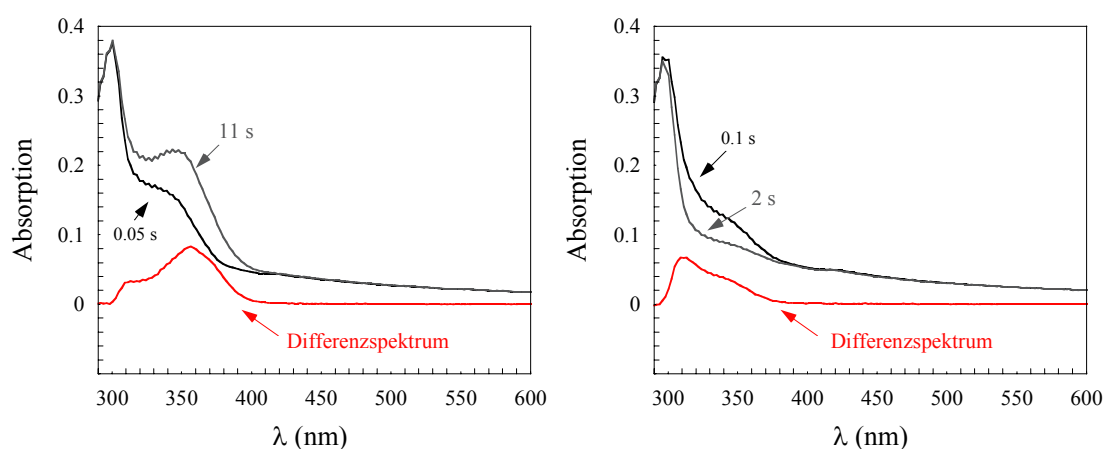
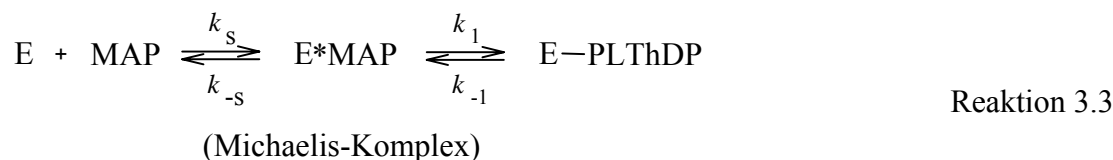


Abb. 3.23. Links: Spektren der Reaktion der *ZmPDC* E473Q mit Pyruvat nach 0.05 s (—), nach 11 s (—) und das entsprechende Differenzspektrum (—). Rechts: Spektren der Reaktion der *ZmPDC* (Wildtyp) mit Pyruvat nach 0.1 s (—), nach 2 s (—) und das entsprechende Differenzspektrum (—). Bedingungen nach 1+1-Mischung: 8.5 mg/ml E473Q, 10 mg/ml *ZmPDC*, 0.05 mM ThDP, 0.5 mM MgSO_4 , 2.5 mM Pyruvat, 25 mM Mes, pH 6.0, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.1.1.6. Thermodynamische und kinetische Untersuchungen der Reaktion der *hs*PDH-E1 mit Methylacetylphosphonat

Ziel dieser Untersuchungen war es, die Substratbindung der *hs*PDH-E1 durch die Verwendung des nichtdecarboxylierbaren Substratanalogons MAP genauer zu charakterisieren (Abb. 3.4). Die Reaktion folgt dem Zweischrittmechanismus (Reaktion 3.3).



$$\text{Es gelten } K_s = \frac{k_{-s}}{k_s} \text{ und } K_1 = \frac{k_{-1}}{k_1}.$$

mit k_s – Geschwindigkeitskonstante der Bildung des Michaelis-Komplexes, k_{-s} – Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation von Substrat und Enzym, K_s – Gleichgewichtskonstante der Bildung des Michaelis-Komplexes, k_1 – Geschwindigkeitskonstante der C-C-Bindungsbildung, k_{-1} – Geschwindigkeitskonstante der C-C-Bindungsspaltung, K_1 – Gleichgewichtskonstante der C-C-Bindungsbildung.

In Kapitel 3.1.1.4. werden die CD-spektroskopischen Eigenschaften des enzymgebundenen ThDP behandelt. Durch die Bindung von MAP an das Holoenzym der *hs*PDH-E1 bildet sich das tetraedrale 2-Phosphonolaktyl-ThDP. Dieses lässt sich durch die Signalbildung im Bereich von 290-295 nm in Nah-UV-CD nachweisen (Abb. 3.18). In einem Titrationsexperiment konnte eine thermodynamische Dissoziationskonstante von $46.4 \pm 0.41 \mu\text{M}$ für die Bindung zwischen der *hs*PDH-E1 und MAP bei einem pH-Wert von 7.6 bestimmt werden (Abb. 3.24). Die ermittelte Dissoziationskonstante ist eine apparente Konstante (K_{app}), die sich aus den Konstanten der Einzelschritte der Reaktion 3.3 wie folgt zusammensetzt (Gl. 3.16, siehe Mathematischer Appendix App1):

$$K_{\text{app}} = \frac{(K_s \cdot K_1)}{(1 + K_1)} \quad \text{Gl. 3.16}$$

Im Falle der vorliegenden Reaktion (Reaktion 3.3) kommt der K_{app} -Wert dem K_D -Wert (Gl. 3.20) numerisch sehr nahe, da aufgrund des weit auf die Seite des C-C-Addukts verschobenen Gleichgewichts der K_1 -Wert deutlich kleiner als 1 ist.

Die Auswertung des Experiments ist in Kapitel 2.2.5.3. beschrieben. Zudem wurde die pH-Abhängigkeit der Dissoziationskonstanten untersucht. Das pH-Optimum der MAP-Bindung (kleinste K_{app} -Werte) liegt bei pH 7.4-7.6 (Abb. 3.24). Diese Beobachtung stimmt hinreichend mit dem in der Literatur angegebenen pH-Optimum von pH 7.0-7.5 der E1-Aktivität überein (Nemeria et al. 2007b).

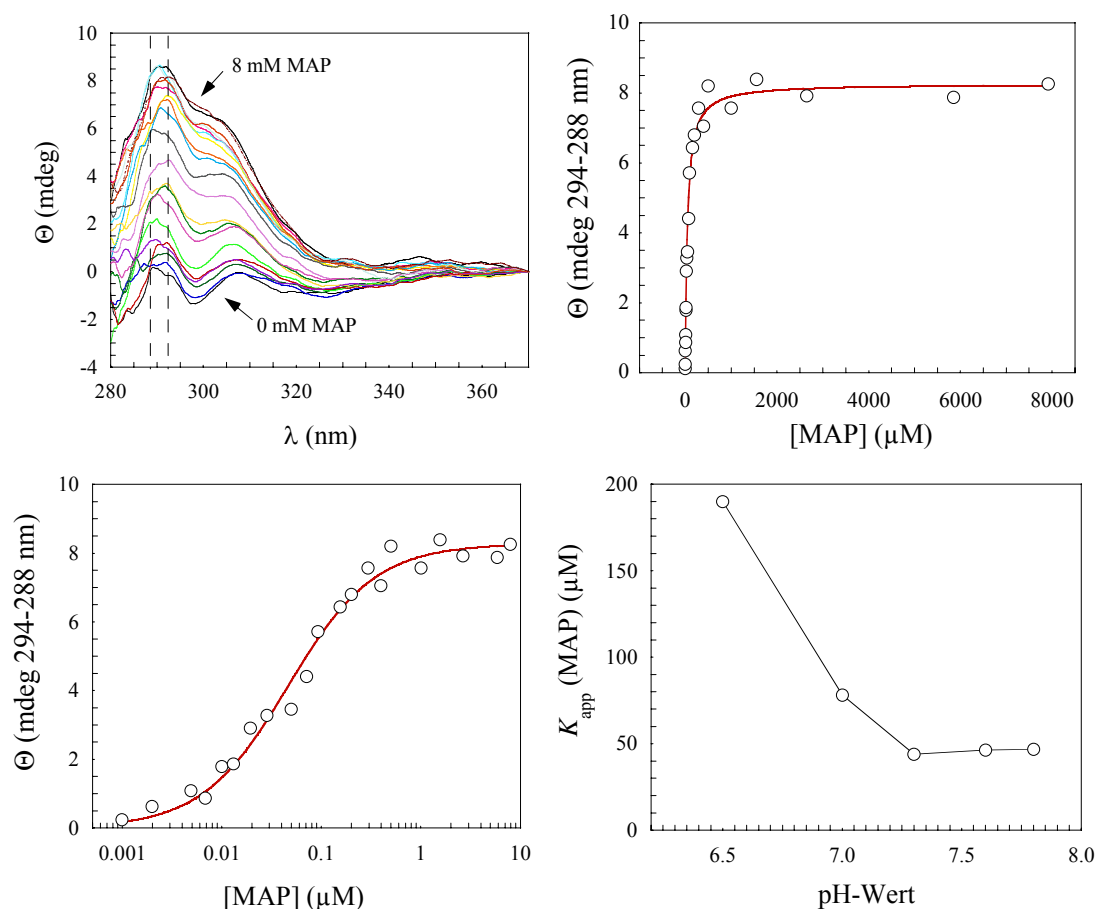


Abb. 3.24. Charakterisierung der Bindung von MAP an die *hsPDH-E1*. Oben links: CD-Spektren der Titration. Oben rechts: Abhängigkeit des CD-Signals (Mittelwert von 288 – 294 nm) von der MAP-Konzentration (\circ) mit Anpassung an eine Hyperbel nach Gl. 2.13 (—). Unten links: Darstellung der Abhängigkeit mit halblogarithmischer Auftragung. Unten rechts: pH-Abhängigkeit des K_{app} -Werts. Bedingungen: 2 mg/ml (26 μM aktive Zentren) *hsPDH-E1*, 0.1 mM ThDP, 5 mM MgSO_4 , 0.1 M KPP, 0.3 M KCl, pH 7.6, $T = 20^\circ\text{C}$.

Der für die *hsPDH-E1* thermodynamisch bestimmte K_{app} -Wert liegt im mikromolaren Bereich. Die im artifiziellen DCPIP-Assay bestimmten K_{M} -Werte für Pyruvat sind um den Faktor 5 bis 10 kleiner als der K_{app} -Wert für MAP (Korotchkina und Patel 2001a; Seifert et al. 2006). Dieser Unterschied lässt sich damit erklären, dass die K_{M} -Werte kinetisch bestimmt sind. Die Bindung von Pyruvat wird durch die anschließende Decarboxylierung kinetisch getrieben. Der für den Gesamtkomplex bestimmte K_{M} -Wert für Pyruvat von 52 μM stimmt gut mit dem CD-spektroskopisch ermittelten K_{app} -Wert für MAP überein (Korotchkina und Patel 2001a).

Das Auftreten eines CD-Signals setzt die Existenz einer Absorptionsbande im selben Wellenlängenbereich voraus. Aus diesem Grund sollte das Signal der 1',4'-iminotautomeren Form auch absorptionsspektroskopisch nachgewiesen werden. Die Abbildung 3.25 zeigt das entsprechende Spektrum.

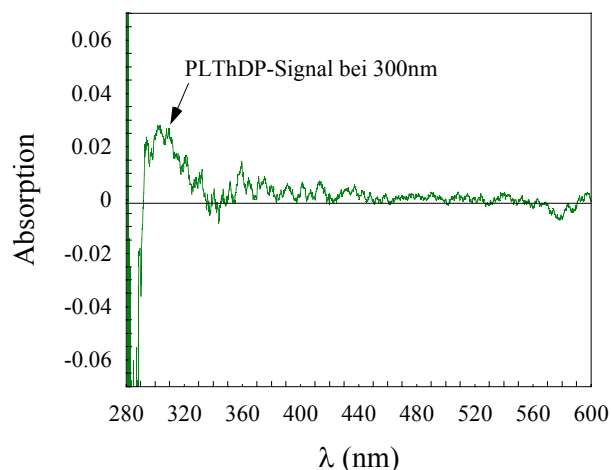


Abb. 3.25. Differenzspektrum der *hsPDH-E1* nach Bindung von MAP (—). Bedingungen: 2 mg/ml (26 μM aktive Zentren) *hsPDH-E1*, 0.25 mM ThDP, 0.5 mM MgSO_4 , 10 mM MAP, $t = 15$ min, Puffer: 0.1 M KPP, 0.3 M KCl, pH 7.6, $T = 30$ °C.

Dieses Signal wurde zur kinetischen Analyse der MAP-Bindung in *stopped-flow*-Experimenten genutzt. Die Messwellenlänge wurde auf 295 nm festgelegt und die Signaländerung bei verschiedenen MAP-Konzentrationen verfolgt. Auf der Basis des ^1H -NMR-Experiments mit *hsPDH-E1* und MAP war bekannt, dass in der gewählten Reaktionszeit nur eine aktive Seite PLThDP bildet (Kap. 3.1.1.3.). Da demnach ein Analogonmolekül pro Heterotetramer kovalent gebunden wird, konnten die Progresskurven mit einer einfach-exponentiellen Gleichung angepasst werden (Abb. 3.26 links, Gl. 3.17).

$$\Delta\text{Abs}(t) = \Delta\text{Abs}_{\text{max}} (1 - \exp(-k_{\text{obs}} \cdot t)) \quad \text{Gl. 3.17}$$

$\Delta\text{Abs}(t)$ – zeitabhängige Absorptionsänderung, $\Delta\text{Abs}_{\text{max}}$ – maximale Amplitude des Signals, k_{obs} – beobachtete Geschwindigkeitskonstante der Signalzunahme in s^{-1} .

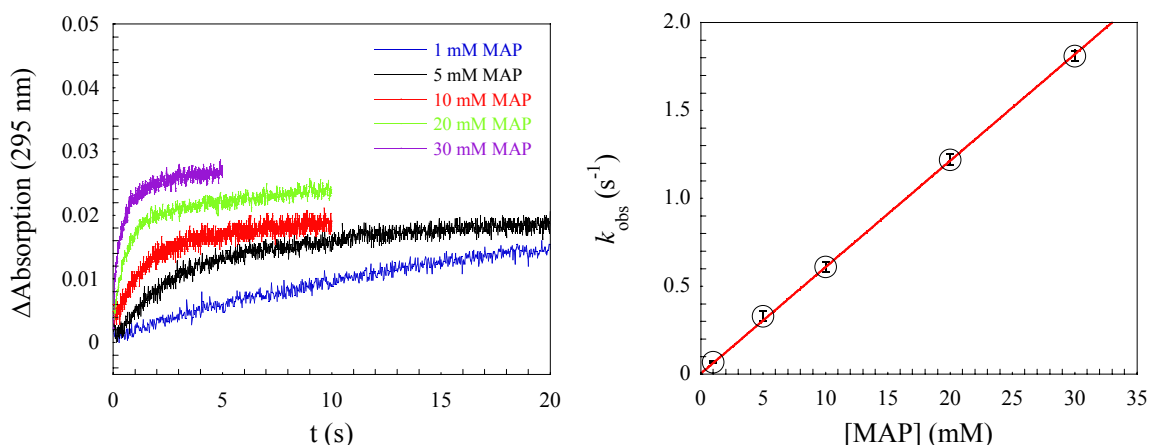


Abb. 3.26. Links: *stopped-flow*-Kinetiken für die Bindung von MAP an die *hsPDH-E1* unter Bildung des stabilen PLThDP (auf Startabsorption 0 normiert). Rechts: Abhängigkeit der k_{obs} -Werte von der MAP-Konzentration (—○—), Fehlerbalken beziehen sich auf jeweils 3 Messungen. Bedingungen: 2 mg/ml (26 μM aktive Zentren) *hsPDH-E1*, 0.25 mM ThDP, 0.5 mM MgSO_4 , 0.1 M KPP, 0.3 M KCl, pH 7.6, $T = 30$ °C.

Die Anpassung der Progresskurven erfolgte nach der Gleichung 3.17. Anschließend wurden die erhaltenen k_{obs} -Werte gegen die MAP-Konzentration aufgetragen. Der den k_{obs} -Werten zugrundeliegende geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist die C-C-Bindungsbildung, der die Fixierung des MAP in der *docking site* vorausgeht. In Übereinstimmung mit klassischen Resultaten zur Substratbindung an Enzymen kann angenommen werden, dass die primäre Substratfixierung im aktiven Zentrum sehr schnell erfolgt (Eigen und Hammes 1963; McClendon et al. 2005). Unter dieser Voraussetzung ist k_{obs} gegeben durch (siehe Reaktion 3.3 und Mathematischer Appendix App2 im Anhang):

$$k_{\text{obs}} = \frac{k_1 \cdot (\text{MAP})}{K_S + (\text{MAP})} + k_{-1} \quad \text{Gl. 3.18}$$

Die apparente Geschwindigkeitskonstante k_{obs} zeigt eine lineare Abhängigkeit von der MAP-Konzentration (Abb. 3.26 rechts). Ein linearer Zusammenhang zwischen k_{obs} und MAP wird nur unter Bedingungen $K_S \gg (\text{MAP})$ erhalten. Gleichung 3.18 reduziert sich dann zu:

$$k_{\text{obs}} = \frac{k_1}{K_S} \cdot (\text{MAP}) + k_{-1} \quad \text{Gl. 3.19}$$

Daher ist aus den vorliegenden Daten k_1/K_S bzw. k_{-1} bestimmbar. Die Größe k_1/K_S wird in der vorliegenden Arbeit als k_{eff} ausgewiesen. Die Reaktion ist im vermessenen MAP-Konzentrationsbereich demnach von dem der Bildung der kovalenten Bindung vorgelagerten Gleichgewicht der Bildung des Michaelis-Komplexes beeinflusst (Reaktion 3.3). Die Geschwindigkeitskonstante 2.-Ordnung k_{eff} für die MAP-Bindung der *hsPDH-E1* wurde aus dem Anstieg der linearen Anpassung bestimmt und hat einen Wert von $60 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Abb. 3.26 rechts). Für die Dissoziationskonstante k_{-1} konnte ein Wert von 0.0027 s^{-1} anhand des Schnittpunktes der Gerade mit der Ordinate bestimmt werden. Der k_{obs} -Wert bei 30 mM MAP beträgt 1.8 s^{-1} . Die Geschwindigkeitskonstante der C-C-Bindungsbildung für Pyruvat (25 mM) hat einen Wert von 2.3 s^{-1} (Kap. 3.1.1.3.). Beide Ergebnisse zeigen gute Übereinstimmung. Die Bindung von MAP durch die *hsPDH-E1* ist demnach eine aussagekräftige Referenz zur Bindung von Pyruvat.

Die Zugänglichkeit des k_{eff} - und k_{-1} -Werts der MAP-Bindung ermöglicht auch die kinetische Bestimmung des K_D -Werts nach Gleichung 3.20 (siehe Mathematischer Appendix App2 im Anhang).

$$K_D = \frac{k_{-1}}{k_{\text{eff}}} = K_1 \cdot K_S \quad \text{Gl. 3.20}$$

Der kinetisch bestimmte K_D -Wert beträgt $45 \text{ }\mu\text{M}$ und entspricht, wie erwartet, nahezu dem in der thermodynamischen Messung bestimmten K_{app} -Wert von $46 \text{ }\mu\text{M}$ (siehe oben).

Die maximale Amplitude war etwa 0.028. Ein vergleichbarer Wert (0.025) konnte unter den gleichen Bedingungen auch im Differenzspektrum bestimmt werden (Abb. 3.25).

3.1.2. Mechanistische Untersuchungen der Wechselwirkung und der Acetylierungsreaktion zwischen *hsPDH-E1* und der Lipoyldomäne *hsPDH-E2LII*

Das folgende Kapitel beschäftigt sich mit der zweiten Teilreaktion der *hsPDH-E1*-Katalyse. Nach der Bindung und Decarboxylierung von Pyruvat wird die entstandene C2-Einheit in Form eines Acetylrestes auf das S8-Atom des Dithiolanrings des Lipoamidarms der E2-Komponente übertragen. Das S6-Atom wird durch die E1-Komponente protoniert und ein reaktiv acetylierter Dithiolanring entsteht (siehe Einleitung Kap. 3.1.).

Die im Folgenden dargestellten Experimente dienen zur Aufklärung mehrerer Sachverhalte: Beschreibung der Wechselwirkung zwischen *hsPDH-E1* und der E2-Domäne *hsPDH-E2LII*, kinetische Charakterisierung der Acetylierungsreaktion durch verschiedene *assays*, Überprüfung der Reaktion auf einen radikalischen Mechanismus unter den gewählten Standardbedingungen.

Zunächst werden die Ergebnisse zur Generierung und Charakterisierung der *hsPDH-E2LII* vorgestellt.

3.1.2.1. Expression, Reinigung und Charakterisierung der *hsPDH-E2LII*

Die E2-Domäne *hsPDH-E2LII* besteht aus 113 Aminosäuren (AS 121-233) und hat ein Molekulargewicht von 12281 Da in der nicht lipoylierten und 12469 Da in der lipoylierten Form (Abb. 3.28). Zur Expression der für das Konstrukt codierenden DNA wurde das SUMO-System verwendet. Die *hsPDH-E2LII* wird demnach zunächst als Fusionsprotein mit dem SUMO-Protein exprimiert. Im Verlauf der Proteinpräparation wird das Fusionsprotein durch Einsatz der hochspezifischen SUMO-Protease gespalten (Malakhov et al. 2004). Wie in Kapitel 2.2.1. beschrieben, wurde zunächst das aus 370 bp bestehende DNA-Konstrukt (339 bp Gen + Restriktionsschnittstellen) durch Verwendung geeigneter Primer aus dem parentalen Vektor pUK-E2 amplifiziert. Sowohl das Konstrukt als auch der Zielvektor pETSUMO adapt wurden mit entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut und anschließend zur Ligation gebracht. Die Abbildung 3.27 zeigt Agarosegele, auf denen sowohl das PCR-Produkt für die *hsPDH-E2LII* (links) als auch der verdaute (linearisierte) Zielvektor pETSUMO adapt (Mitte) abgebildet sind.

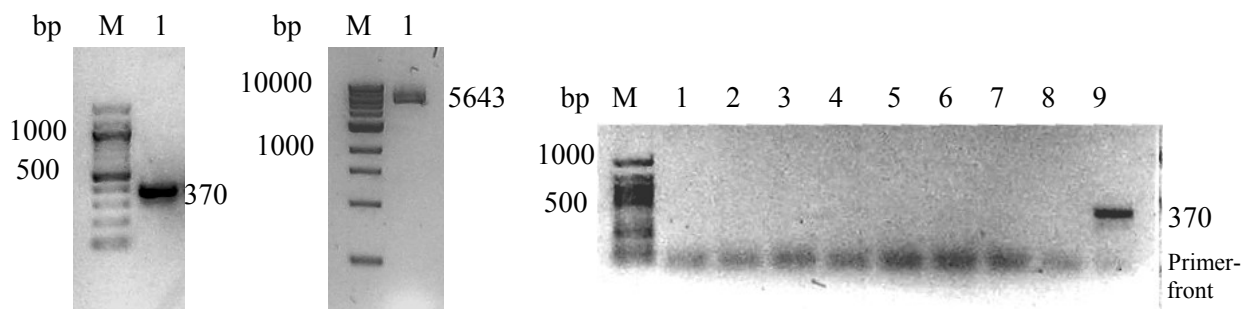


Abb. 3.27. Links: Agarosegel mit dem PCR-Produkt für das Gen der *hsPDH-E2LII*. M – 100 bp-Leiter, 1 – PCR-Produkt mit 370 bp. Mitte: Agarosegel mit dem verdauten (linearisierten) Vektor pETSUMO adapt, M – 1 kb-Leiter, 1 – linearisierter pETSUMO adapt mit 5643 bp. Rechts: Agarosegel der Proben der Kolonie-PCR, M – 100 bp-Leiter, 1 – 8 negative PCR-Läufe, 9 – positiver PCR-Lauf mit dem 370 bp-Konstrukt.

Die Ligationsansätze wurden in elektrokompetente *XL1 blue* – Zellen transformiert. Die erhaltenen Kolonien wurden mittels Kolonie-PCR auf einen Vektor getestet, der das Zielkonstrukt für die Expression der *hsPDH-E2LII* besitzt. Unter 40 getesteten Kolonien befand sich ein positiver Klon (Abb. 3.27 rechts). Die Sequenzierung des Zielvektors ergab, dass sich das Gen für die *hsPDH-E2LII* in richtiger Orientierung im Plasmid befindet. Dieser Vektor wurde für die Expression des Zielgens eingesetzt und als pETSUMO-E2LipII bezeichnet.

Expressionstests in verschiedenen Zellstämmen zeigten eine gute Proteinexpression des Fusionsproteins (Güttler 2008). Als Expressionsstamm wurde für die weiteren Arbeiten die Zelllinie BL21 C+ RP verwendet.

Die Produktion des Fusionsproteins erfolgte in Schüttelkultur und die erhaltene Zellmaterialausbeute belief sich auf 8-10 g Feuchtgewicht/6 L Medium. Erst die Zugabe von 1 mM Liponsäure zur Schüttelkultur ermöglichte die Produktion der lipoylierten *hsPDH-E2LII*. Ohne diesen Zusatz wurde überwiegend nicht-lipoyliertes Protein produziert. Die Präparation der *hsPDH-E2LII* erfolgte wie in Kapitel 2.2.2. beschrieben. Die Ausbeute betrug ca. 10 mg *hsPDH-E1*/g Zellmaterial bzw. 16 mg/L Zellkultur. Diese Ausbeute ist etwas höher als die für die in der Literatur beschriebenen Konstrukte mit *GST-tag* (3-14 mg/L Zellkultur) (Liu et al. 1995a). Die Abbildung 3.28 unten zeigt ein SDS-Gel, das den Verlauf einer *hsPDH-E2LII*-Präparation dokumentiert. Die Lipoyldomäne 2 des humanen PDHc wurde zur Homogenität präpariert.

121 SAQAPGSSYP 131 PHMQVLLPAL 141 SPTMTMGTV 151 RWEKKVGEKL 161 SEGDLLAEIE
 171 TDKATIGFEV 181 QEEGYLAKIL 191 VPEGTRDVPL 201 GTPLCHIVEK 211 EADISAFADY
 221 RPTEVTDLKP 231 QVP

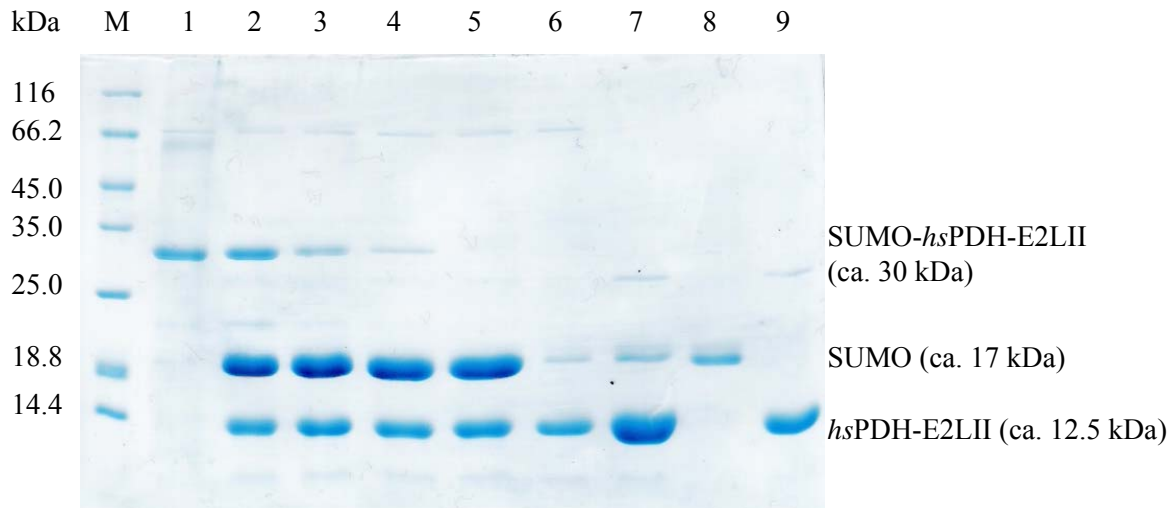


Abb. 3.28. Oben: Aminosäuresequenz der *hsPDH-E2LII*. Das rotmarkierte K entspricht dem lipoylierbaren Lysin. Die unterstrichenen und in verschiedenen Grüntönen dargestellten Sequenzen entsprechen den drei durch tryptischen Verdau und MALDI-MS identifizierte Peptiden. Unten: Analyse einer *hsPDH-E2LII*-Präparation mittels SDS-PAGE. M – Größenstandard, 1 – Elution nach Ni-NTA 1, 2 – Verdau nach 1 h, 3 – Verdau nach 2 h, 4 – Verdau nach 4 h, 5 – Verdau nach 18 h, 6 – Durchlauf nach Ni-NTA 2, 7 – Elution nach Gelfiltration, 8 – Elution nach Ni-NTA 3, 9 – Durchlauf nach Ni-NTA 3 (gereinigte *hsPDH-E2LII*).

Neben der Analyse durch SDS-PAGE wurde *hsPDH-E2LII* mittels unabhängiger Methoden charakterisiert. Zum einen sollte das Molekulargewicht und der Lipoylierungsgrad durch Massenspektrometrie überprüft werden, zum anderen wurde die Sekundärstruktur durch Fern-UV-CD untersucht (Abb. 3.29). Darüberhinaus wurde die Struktur der Domäne in Lösung durch Röntgenkleinwinkelstreuung analysiert. Die experimentelle Streukurve wurde mit zwei berechneten Streukurven verglichen. Die berechneten Streukurven wurden mit Hilfe des Programmes *crysol* auf der Basis der PDB-Dateien für die NMR-Struktur der nicht lipoylierten humanen Lipoyldomäne 2 (AS 128-229) (Howard et al. 1998) und der Kristallstruktur der lipoylierten humanen Lipoyldomäne 2 (AS 126-233) (Kato et al. 2005) erhalten (Abb. 3.29).

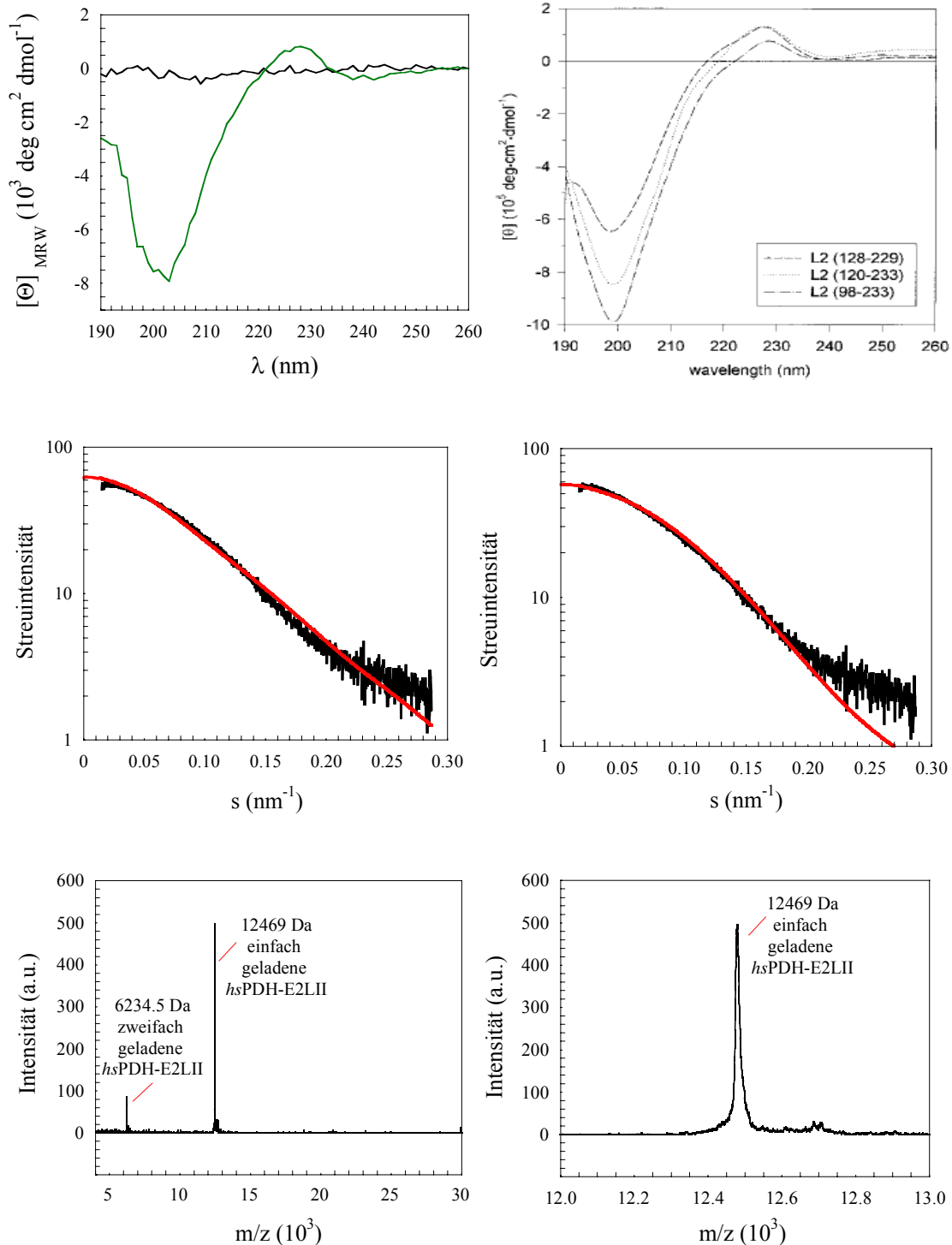


Abb. 3.29. Oben links: Fern-UV-CD-Spektrum der *hsPDH-E2LII* (—) und Pufferspektrum (—), Bedingungen: 0.2 mg/ml *hsPDH-E2LII*, 20 mM KPP, pH 7.6, T = 20 °C, d = 1 mm. Oben rechts: Fern-UV-CD-Spektren verschiedener humaner Lipoyldomänen (aus (Liu et al. 2001)). Mitte links: Superposition der auf Basis der NMR-Struktur (PDB-Datei 1FYC) berechneten Streukurve für die humane Lipoyldomäne (AS 128-229) (—) und der experimentell ermittelten Streukurve (—) bei 5 mg/ml *hsPDH-E2LII*. Mitte rechts: Superposition der auf Basis der Kristallstruktur (PDB-Datei 1Y8N) berechneten Streukurve für die humane Lipoyldomäne (AS 126-233) (—) und der experimentell ermittelten Streukurve (—) bei 5 mg/ml *hsPDH-E2LII*, 50 mM KPP, 50 mM KCl, 1 mM DTE, pH 7.6, T = 20 °C. Unten links: MALDI-Massenspektrum der *hsPDH-E2LII* nach der Präparation. Unten rechts: Ausschnitt des MALDI-Massenspektrums der *hsPDH-E2LII*.

Das Ergebnis der MALDI-TOF Analyse bestätigt, dass nach der Präparation eine vollständig lipoylierte *hsPDH-E2LII* mit dem entsprechenden Molekulargewicht von 12469 Da vorlag. Der Vergleich des Fern-UV-CD-Spektrums mit dem in der Literatur beschriebenen zeigt hinreichende Übereinstimmung. Zudem verläuft die experimentell ermittelte SAXS-Streukurve der *hsPDH-E2LII* kongruent zu den aus den PDB-Dateien berechneten Kurven (Abb. 3.30). Das durch Röntgenkleinwinkelstreuung ermittelte Molekulargewicht von 13 kDa stimmt mit dem theoretischen Molekulargewicht von 12.469 kDa gut überein (Tab. 3.2a). In einem weiteren Experiment wurde ein Trypsinverdau der entsalzten Domäne durchgeführt und die gewonnenen Peptide mittels MALDI-MS analysiert. Dabei konnte die Identität des Proteins mit drei Peptiden bestätigt werden (Abb. 3.28 oben). Demnach kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem präparierten Protein tatsächlich um die Lipoyldomäne 2 des humanen PDHc handelt.

Literaturrecherchen zur Liponsäure ergaben, dass die oxidierte Form des isolierten Dithiolanrings (Trimethylendisulfid) ein Absorptionssignal bei einer Wellenlänge um 330 nm aufweist (Abb. 3.30). Die vollständig reduzierte Form hat in diesem Bereich kein optisches Signal. Der Extinktionskoeffizient der oxidierten Spezies wird mit ca. $150 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ angegeben (Barltrop et al. 1954; Reed et al. 1958). Dieses Absorptionssignal sollte für die kinetischen Arbeiten als spektroskopische Sonde für die reduktive Acetylierung der *hsPDH-E2LII* durch die *hsPDH-E1* herangezogen werden. Dazu war es notwendig, den Extinktionskoeffizienten der an die *hsPDH-E2LII* gebundenen Liponsäure zu bestimmen. Der Koeffizient wurde aus der linearen Abhängigkeit der Extinktion bei 333 nm von der Konzentration der lipoylierten *hsPDH-E2LII* berechnet. Es ergab sich ein Wert von $\epsilon_{333\text{nm}} = 131.56 \pm 0.63 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Abb. 3.31).

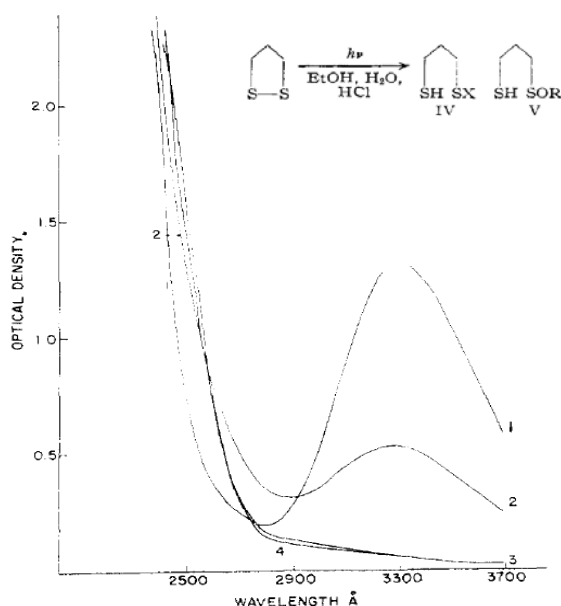


Abb. 3.30. Photolyse von Trimethylendisulfid (TMS) in wässrig-alkoholischer Lösung bei Raumtemperatur: 1 – Absorptionsspektrum von TMS, 2 nach 15 min Photolyse, 3 – nach 60 min Photolyse, 4 – nach 105 min Photolyse. Entnommen aus Barltrop et al. 1954.

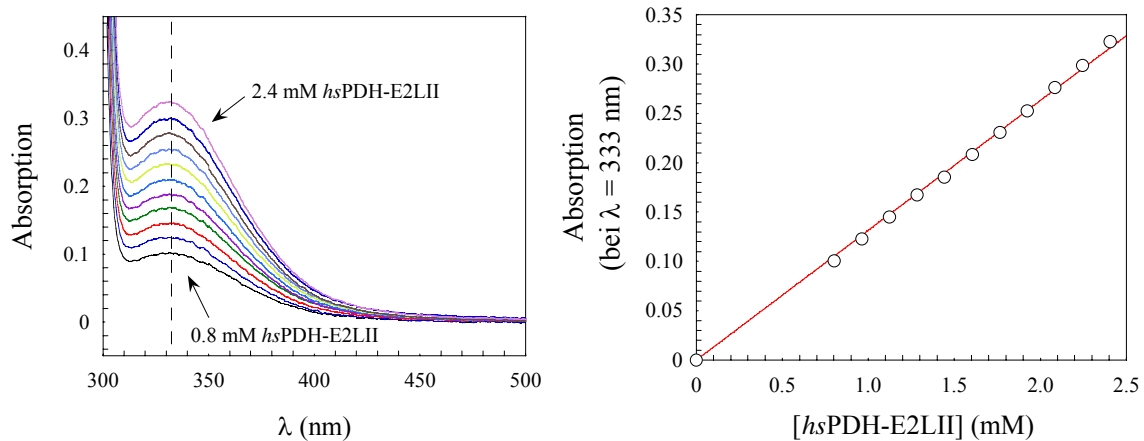


Abb. 3.31. Links: Absorptionsspektren (pufferkorrigiert) der lipoylierten *hsPDH-E2LII* in 0.1 M KPP, 0.3 M KCl, pH 7.6 und $T = 30$ °C. Rechts: Lineare Abhängigkeit der Absorption bei 333 nm von der Konzentration der *hsPDH-E2LII* (—○—).

3.1.2.2. Protein-Protein-Wechselwirkung

- **Isothermale Titrationskalorimetrie**

Mittels isothermaler Titrationskalorimetrie (ITC) sollte die Wechselwirkung zwischen *hsPDH-E1* und *hsPDH-E2* unter den gewählten Bedingungen untersucht werden. Durch Bindungsereignisse zwischen Proteinen kommt es in der Regel zu Enthalpieänderungen, die durch die ITC detektiert werden können. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die ITC-Experimente unter den Bedingungen durchgeführt, die auch für die kinetischen Experimente verwendet wurden.

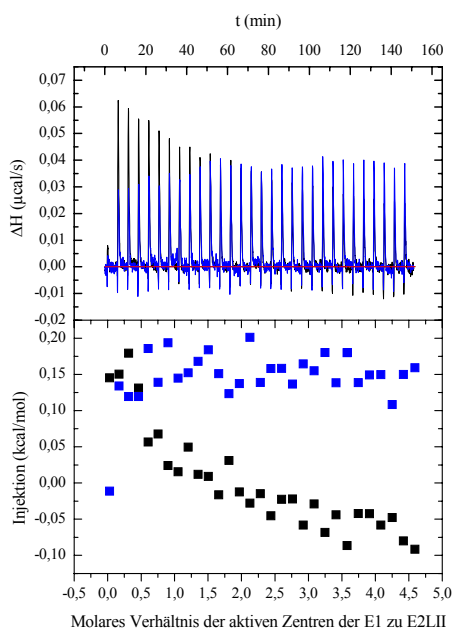


Abb. 3.32. ITC-Experiment zur Analyse der Wechselwirkung zwischen *hsPDH-E1* und *hsPDH-E2LII* (blau – Referenztitration in Abwesenheit von *hsPDH-E1*, schwarz – Titration in Anwesenheit von *hsPDH-E1*). Bedingungen: 3.08 mg/ml (40 μ M aktive Zentren) *hsPDH-E1* (E1, in Messzelle), 9.98 mg/ml (800 μ M) *hsPDH-E2LII* (E2LII, in Spritze), 0.1 mM ThDP, 1 mM $MgSO_4$, 0.1 M KPP, 0.3 M KCl, pH 7.6, $T = 20$ °C

Es wurde keine signifikante Enthalpieänderung während der Titration von *hsPDH-E2LII* zu *hsPDH-E1* detektiert (Abb. 3.32). Neben den Experimenten mit beiden Proteinen in ihrer Holoform wurden auch Experimente mit nicht-lipoylierter *hsPDH-E2LII* bzw. *hsPDH-E1* ohne ThDP und Magnesiumionen durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Im Allgemeinen schliessen auch Enthalpieänderungen von 0 die Assoziationen nicht völlig aus, da der Assoziationsprozess prinzipiell auch komplett entropiegetrieben sein könnte. Dieses Ergebnis war dennoch überraschend, da andere Arbeiten zur Wechselwirkung zwischen E1-Komponente und Lipoyldomänen, sowohl für den humanen BCKDC als auch den humanen PDHc deutliche Enthalpieänderungen zeigten (Wynn et al. 2004; Kato et al. 2008). Die in diesen Arbeiten ermittelten K_D -Werte für die Bindung zwischen E1 und Lipoyldomäne liegen im Bereich von 26 μM für die Komponenten des BCKDC und 1.29 μM für die Komponenten des humanen PDHc. Dabei sind jedoch folgende Fakten zu berücksichtigen: Die ITC Experimente wurden unter reduzierenden Bedingungen durch Zusatz von 5 bzw. 10 mM β -Mercaptoethanol durchgeführt. Man kann demnach keine Aussage über den tatsächlichen Redoxzustand des Lipoamids und der daraus resultierenden Reaktivität des reduzierten Dithiolanrings treffen. Die im Fall des humanen Systems eingesetzte Lipoyldomäne bestand aus den AS 128-265 und ist damit um 32 Aminosäuren länger als die in dieser Arbeit verwendete *hsPDH-E2LII*. Zudem entsprachen die hier gewählten Pufferbedingungen nicht denen von CHUANG, die Ergebnisse sind daher nur bedingt vergleichbar.

- **Röntgenkleinwinkelstreuung**

Die Wechselwirkung der beiden Proteine *hsPDH-E1* und *hsPDH-E2LII* wurde auch mittels Röntgenkleinwinkelstreuung mit Synchrotronstrahlung analysiert. Es wurden zwei verschiedene Bedingungen für die Analyse gewählt. Eine Messreihe wurde mit der *hsPDH-E1* nach Rekonstitution mit dem nativen Cofaktor ThDP durchgeführt. In einer zweiten Messreihe wurde das Cofaktoranalogen Thiaminthiazolondiphosphat (TTDP) eingesetzt. Dieses Analogon imitiert auf Grund einer Doppelbindung in C2-Stellung des Thiazolrings den Enamin-Zustand des Cofaktor auf der Reaktionsstufe des HETHDP (Abb. 3.33). Es war von Interesse zu untersuchen, ob die Imitation dieser Reaktionsstufe die Wechselwirkung der beiden Proteinkomponenten im Vergleich zum Grundzustand beeinflusst.

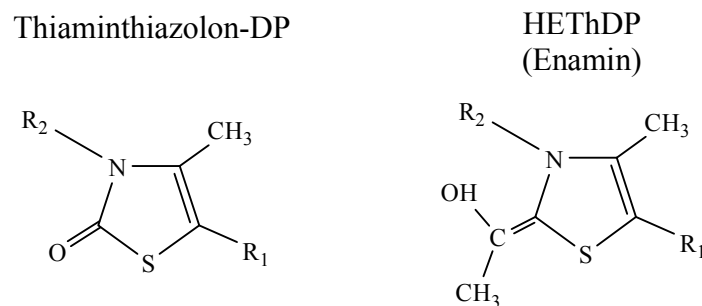


Abb. 3.33. Strukturformeln für Thiaminthiazolondiphosphat und HETHDP. R₁ – -CH₂CH₂P₂O₇H²⁻, R₂ – Aminopyrimidinkomponente.

Das Experiment wurde bei zwei verschiedenen *hsPDH-E1*-Konzentrationen (2.5 und 5 mg/ml) durchgeführt. Die Konzentration der *hsPDH-E2LII* wurde zwischen 0 und 10 mg/ml variiert. Die Darstellung der Ergebnisse beruht auf den maximalen Gyrationradien der vermessenen Partikel, das bedeutet die Abstandsverteilungsfunktion impliziert auch die höheren Oligomere (Abb. 3.34 oben/Mitte rechts). Die Abbildung 3.34 unten zeigt die maximalen Gyrationradien ($R_{g_{\max}}$) der vermessenen Probe in Abhängigkeit von der *hsPDH-E2LII*-Konzentration.

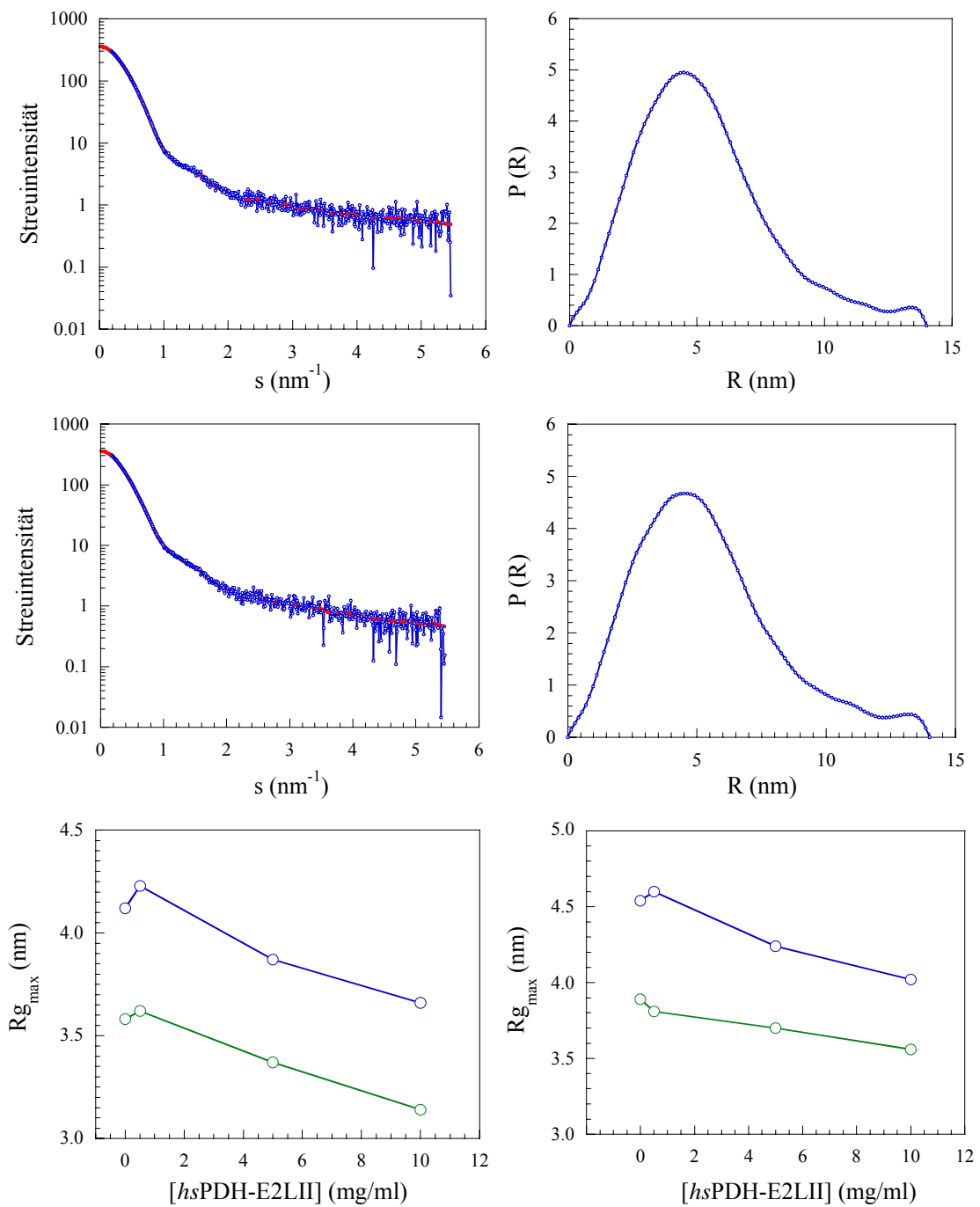


Abb. 3.34. Oben/Mitte links: experimentelle ($\text{---}\circ\text{---}$) und berechnete (---) Streukurve der Probe mit 2.5 mg/ml *hsPDH-E1* in Abwesenheit (oben) und Anwesenheit (Mitte) von 0.5 mg/ml *hsPDH-E2LII*. Oben/Mitte rechts: Abstandsverteilungsfunktion des zugehörigen Gyrationradius ($P(R)$). Unten links: Abhängigkeit des maximalen Gyrationradius von der *hsPDH-E2LII*-Konzentration bei 2.5 mg/ml *hsPDH-E1* rekombiniert mit ThDP ($\text{---}\circ\text{---}$) oder Thiaminthiazolon-DP ($\text{---}\circ\text{---}$). Unten rechts: Abhängigkeit des maximalen Gyrationradius von der *hsPDH-E2LII*-Konzentration bei 5 mg/ml *hsPDH-E1* rekombiniert mit ThDP ($\text{---}\circ\text{---}$) oder Thiaminthiazolon-DP ($\text{---}\circ\text{---}$). Bedingungen: 0.25 mM ThDP/TTDP, 1 mM MgSO_4 , 50 mM KPP, 50 mM KCl, pH 7.6, $T = 20$ °C.

Die Daten zeigen zunächst, dass es wahrscheinlich einen strukturellen Unterschied zwischen der *hsPDH-E1*ThDP* und der *hsPDH-E1*TTDP* geben muss. Der maximale Gyrationradius ändert sich trotz ähnlicher Werte des experimentell bestimmten Molekulargewichts, deutlich (Tabelle 3.2a). Dieses Ergebnis kann ein Indiz dafür sein, dass es während des Umsatzes von Pyruvat zu einer strukturellen Änderung in der E1-Komponente kommt. Das Verhalten der verschiedenen Holoformen der *hsPDH-E1* mit der Lipoyldomäne ist jedoch gleich (Abb. 3.34) und wird im Folgenden interpretiert.

Befinden sich in der zu untersuchenden Lösung zwei Proteinspezies, so verhält sich der mittlere Gyrationradius entsprechend der Gleichung 3.21, sofern diese keine Assoziation miteinander eingehen (Pessen et al. 1973).

$$\overline{Rg^2} = \frac{(c_1 \cdot M_1 \cdot Rg_1^2) + (c_2 \cdot M_2 \cdot Rg_2^2)}{(c_1 \cdot M_1) + (c_2 \cdot M_2)} \quad \text{Gl. 3.21}$$

Rg – Gyrationradius, c_1 – molare Konzentration der *hsPDH-E1*, M_1 – Molekulargewicht der *hsPDH-E1*, Rg_1 – Gyrationradius der *hsPDH-E1* bei c_1 , c_2 – molare Konzentration der *hsPDH-E2LII*, M_2 – Molekulargewicht der *hsPDH-E2LII*, Rg_2 – Gyrationradius der *hsPDH-E2LII* bei c_1 .

Die Berechnung konnte nicht für die Lösungen mit einer *hsPDH-E2LII*-Konzentration von 0.5 mg/ml durchgeführt werden, da auf Grund der geringen Proteinkonzentration keine Streukurve erstellt werden konnte.

Vergleicht man die experimentell ermittelten Gyrationradien mit den berechneten mittleren Gyrationradien, so zeigt sich, dass die experimentellen Werte in jedem Fall größer sind (Tab. 3.2b). Dieses Ergebnis führt zu der Vermutung, dass noch eine weitere Partikelspezies in der vermessenen Lösung vorliegt. Diese Spezies könnte der Komplex aus E1-Komponente und Lipoyldomäne sein.

Tabelle 3.2a. SAXS-Ergebnisse zur Wechselwirkung zwischen *hsPDH-E1* und *hsPDH-E2LII*.

Cofaktor	$R_{g,max}$ (nm)				Molekulargewicht (kDa)			
	E1 2.5 mg/ml	E1 5 mg/ml	ohne E1	ohne E1	E1 2.5 mg/ml	E1 5 mg/ml	ohne E1	ohne E1
ThDP	-	-	-	-	4.12 ± 0.010	4.54 ± 0.000	-	-
	0.5	0.5	-	-	4.23 ± 0.009	4.60 ± 0.011	-	-
	5	5	-	-	3.87 ± 0.000	4.24 ± 0.000	-	-
	10	10	-	-	3.66 ± 0.009	4.02 ± 0.007	-	-
Thiamin- thiazolon -DP	-	-	-	-	3.58 ± 0.009	3.89 ± 0.006	-	-
	-	-	-	-	3.62 ± 0.000	3.81 ± 0.005	-	-
	-	-	-	-	3.37 ± 0.005	3.70 ± 0.005	-	-
	-	-	-	-	3.14 ± 0.005	3.56 ± 0.005	-	-
-	-	5	-	-	-	1.69 ± 0.004	13	
-	-	10	-	-	-	1.65 ± 0.003	11	

Anmerkung zu Tabelle 3.2a: Die molaren Verhältnisse zwischen der Lipoyldomäne und den aktiven Zentren der E1-Komponente sind wie folgt: 0.5 – 2.5 mg/ml = 1.25, 5 – 2.5 mg/ml = 12.5, 10 – 2.5 mg/ml = 25, 0.5 – 5 mg/ml = 0.625, 5 – 5 mg/ml = 6.25, 10 – 5 mg/ml = 12.5. n.r. – Auf Grund der Assoziate in der Lösung sind die bestimmten molekularen Massen nicht repräsentativ.

Tabelle 3.2b. Gegenüberstellung der empirischen und berechneten Gyrationradien bei verschiedenen Konzentrationsverhältnissen von *hsPDH-E1* und *hsPDH-E2LII*.

	2.5 mg/ml <i>hsPDH-E1</i> + 5 mg/ml <i>hsPDH-E2LII</i>	2.5 mg/ml <i>hsPDH-E1</i> + 10 mg/ml <i>hsPDH-E2LII</i>	5 mg/ml <i>hsPDH-E1</i> + 5 mg/ml <i>hsPDH-E2LII</i>	5 mg/ml <i>hsPDH-E1</i> + 10 mg/ml <i>hsPDH-E2LII</i>
$R_{g_{\max}}$ (nm) gemessen mit ThDP	3.87	3.66	4.24	4.02
$R_{g_{\max}}$ (nm) gemessen mit Thiaminthiazolon- DP	3.37	3.14	3.70	3.56
$\overline{R_g}$ (nm) berechnet	2.75	2.36	3.43	2.95

Die SAXS-Experimente lassen die Schlussfolgerung zu, dass unter den gewählten Bedingungen Wechselwirkungen zwischen der *hsPDH-E1* und der *hsPDH-E2LII* stattfinden. Das die SAXS-Experimente eine Wechselwirkung zwischen den Proteinen zeigen, steht nicht im Widerspruch zu den ITC-Experimenten. Aus messtechnischen Gründen wurde die KCl-Konzentration in den SAXS-Messungen auf 50 mM gesenkt (ITC-Experimente: 300 mM). In Kapitel 3.1.2.6. wird deutlich, dass die KCl-Konzentration einen Einfluss auf die untersuchte Interaktion hat. Die Reduktion der KCl-Konzentration hat jedoch zur Folge, dass die E1-Komponente stärker zu Aggregationen neigt. Dies wird im Anfangsbereich der Streukurven deutlich (Abb. 3.34 oben links). Die experimentellen Daten im Anfangsbereich (0-0.2 nm⁻¹) sind aufgrund der Aggregationen nicht auswertbar.

3.1.2.3. Einfluss der *hsPDH-E2LII* auf die Bindung von Methylacetylphosphonat

Zur näheren Charakterisierung der biochemischen Wechselwirkung zwischen *hsPDH-E1* und *hsPDH-E2LII* sollte untersucht werden, ob die Anwesenheit der Lipoyldomäne 2 einen Einfluss auf die Dissoziationskonstante für die Bindung des Substratanalogons MAP hat. Dazu wurden die *hsPDH-E1* mit einer zu den aktiven Zentren äquimolaren Konzentration an *hsPDH-E2LII* präinkubiert und danach MAP hinzu titriert. Die Auswertung des Titrationsexperiments ergab einen K_{app} -Wert von $73.8 \pm 1.0 \mu\text{M}$ (Abb. 3.35). Die Anwesenheit der *hsPDH-E2LII* scheint die thermodynamische Dissoziationskonstante und damit die Bindung von MAP durch die *hsPDH-E1* nur leicht zu beeinträchtigen, denn der Wert in Abwesenheit der Domäne betrug $46 \mu\text{M}$. Bei diesem Ereignis kann es sich um eine schwache kompetitive Hemmung durch die Lipoyldomäne handeln, die mit MAP um die Bindung an das aktive Zentrum der *hsPDH-E1* konkurriert.

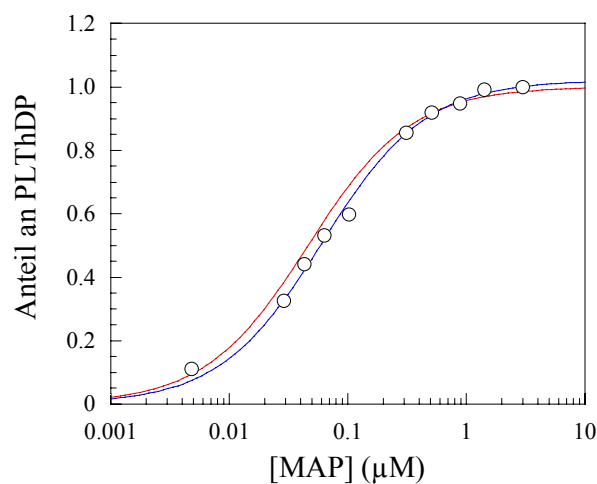


Abb. 3.35. Bindung von MAP an die *hsPDH-E1* in Anwesenheit oder Gegenwart von *hsPDH-E2LII*. Halblogarithmische Auftragung der Abhängigkeit des CD-Signals (normierter Θ -Mittelwert von 289 – 292 nm) von der MAP-Konzentration (\circ) mit Anpassung an eine Hyperbel nach Gl. 2.13 (—) und der Vergleich zur Anpassung in Abwesenheit der Lipoyldomäne (—). Bedingungen: 1.8 mg/ml (23.4 μM aktive Zentren) *hsPDH-E1*, 0.292 mg/ml (23.4 μM) *hsPDH-E2LII* 0.1 mM ThDP, 1 mM MgSO_4 , 0.1 M KPP, 0.3 M KCl, pH 7.6, $T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$

3.1.2.4. Geschwindigkeit der reduktiven Acetylierung von *hsPDH-E2LII* durch *hsPDH-E1* in Abhängigkeit von der Enzym-, Substrat- und Cofaktorkonzentration

Eine Zielstellung dieser Arbeit war die Untersuchung der Reaktionsgeschwindigkeit der E1-Komponente in Anwesenheit der Lipoyldomäne 2. Vergleicht man die Geschwindigkeitskonstante der isolierten E1-Reaktion ($k_{1A}' = 2.3 \text{ s}^{-1}$, Kap. 3.1.1.3.) mit der des vollständig rekonstituierten humanen PDHc ($k_{\text{cat}} = 68 \text{ s}^{-1}$ (Korotchkina und Patel 2001a)), so zeigt sich, dass die Reaktion der isolierten E1-Komponente um den Faktor 30 langsamer ist. Daraus ergab sich die Frage, ob die Beschleunigung der *hsPDH-E1*-Reaktion durch die Anwesenheit der Lipoyldomäne *hsPDH-E2LII* realisiert wird.

In diesem Kapitel werden zwei neuartige Aktivitätstests zur Charakterisierung der reduktiven Acetylierung der *hsPDH-E2LII* durch die *hsPDH-E1* vorgestellt. Bisher veröffentlichte Studien beschreiben die Charakterisierung dieser Reaktion zum einen durch eine indirekte Methode. Bei diesem *assay* werden radioaktives $[2-^{14}\text{C}]$ -Pyruvat und verschiedene E2-Konstrukte als Substrate eingesetzt. Nach Abstoppen der Reaktion wird der Einbau des radioaktiven ^{14}C -Kohlenstoffs in das E2-Konstrukt detektiert (Gong et al. 2000; Liu et al. 2001). Eine massenspektrometrische Methode zur Analyse der reduktiven Acetylierung von Lipoyldomänen wurde erstmals 2003 durch die Arbeitsgruppe von JORDAN vorgeschlagen (Wei et al. 2003). Auch hierbei handelt es sich um eine diskontinuierliche Methode.

Im Rahmen dieser Arbeit wird dazu die MALDI-MS Methode für kinetische Analysen nach Säure-*quenching* etabliert. In Kapitel 3.1.2.1 wurden die Absorptionseigenschaften des oxidierten Dithiolanringes der lipoylierten *hsPDH-E2LII* beschrieben. Diese sollten im Rahmen dieser Arbeit genutzt werden, um eine kontinuierlichen Aktivitätstest für die reduktive Acetylierung von Lipoyldomänen zu entwickeln. Die erhaltenen Daten werden mit den Ergebnissen der massenspektrometrischen Experimente verglichen.

Die reduktive Acetylierungsreaktion der E1-Komponenten der α -Ketosäure-Dehydrogenase-Komplexe folgt im Hinblick auf die Lipoyldomänen einer Michaelis-Menten-Kinetik (Graham et al. 1989). In einer kurzen allgemeinen Vorbetrachtung dieses kinetischen Verhaltens soll zunächst das Prinzip der Auswertung der im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Progresskurven für die reduktive Acetylierung vorgestellt werden.

Die klassische Auswertung der Progresskurven erfolgt durch Bestimmung der Initialgeschwindigkeit und der daraus ermittelten spezifischen Aktivität. Diese wird dann gegen die in dem Experiment variierte Konzentration (Substrat, Cofaktor) aufgetragen. Im Falle hyperboler Verläufe wird die Michaelis-Menten-Gleichung (Hyperbelfunktion) (Gl. 3.22) zur Anpassung genutzt und daraufhin die Michaelis-Konstante (K_M) und die Maximalgeschwindigkeit (V_{max}) ermittelt.

$$v = \frac{V_{\text{max}} \cdot [S_0]}{[S_0] + K_M} \quad \text{Gl. 3.22}$$

v – Geschwindigkeit im *steady-state* (z.B. angegeben in spezifischer Aktivität), V_{max} – maximale Geschwindigkeit, $[S_0]$ – Substratkonzentration zum Zeitpunkt t_0 , K_M – Michaelis-Konstante.

Aus der Maximalgeschwindigkeit lässt sich anschließend unter Einbeziehung der Enzymkonzentration (E_0) die Katalysekonstante k_{cat} der Reaktion berechnen (Kap. 2.2.5.5., Gl. 2.16).

Im Fall der reduktiven Acetylierung der *hsPDH-E2* durch die *hsPDH-E1* können die einzelnen Progresskurven zudem mit Hilfe der integrierten Michaelis-Menten-Gleichung (Gl. 3.23) ausgewertet werden. Diese Gleichung spiegelt die Beziehung zwischen Reaktionszeit und Produktkonzentration wider. Voraussetzung für die Anwendung dieser Gleichung ist, dass während der Aufnahme der Progresskurve ein signifikanter Substratverbrauch stattfindet und die Reaktionsgeschwindigkeit der Enzymreaktion ohne wesentliche Verzögerung folgt. Die Anwendung der integrierten Michaelis-Menten-Gleichung erlaubt unter diesen Bedingungen die Bestimmung von V_{max} und K_M aus einer einzigen Progresskurve (Gl. 3.23).

$$\frac{t}{[P]} = \frac{K_M}{V_{\text{max}}} \cdot \frac{2.3}{[P]} \log \frac{[S_0]}{[S_0] - [P]} + \frac{1}{V_{\text{max}}} \quad \text{Gl. 3.23}$$

[P] – Produktkonzentration zum Zeitpunkt t , t – Reaktionszeit, K_M – Michaelis-Konstante, V_{max} – maximale Geschwindigkeit, $[S_0]$ – Substratkonzentration zum Zeitpunkt t_0

Die Auswertung wird hier am Beispiel von drei verschiedenen Progresskurven für die reduktive Acetylierung demonstriert. Dabei handelt es sich um Progresskurven aus einem *stopped-flow*-Experiment (Postinkubationstest) (1), einem UV/Vis-Experiment (2) und einem massenspektrometrischen Experiment (3) (Abb. 3.36). Zunächst wurden jeweils die Kurven des Substratverbrauchs der Experimente (1) und (2) in eine Produktbildungskurve unter der Annahme des vollständigen Substratverbrauchs umgewandelt. Die Daten des MS-Experiments (3) wurden direkt als Produktbildung ausgewertet. Auf den Produktbildungskurven basierend, wurde die Anpassung der experimentellen Daten nach Gl. 3.23 durchgeführt.

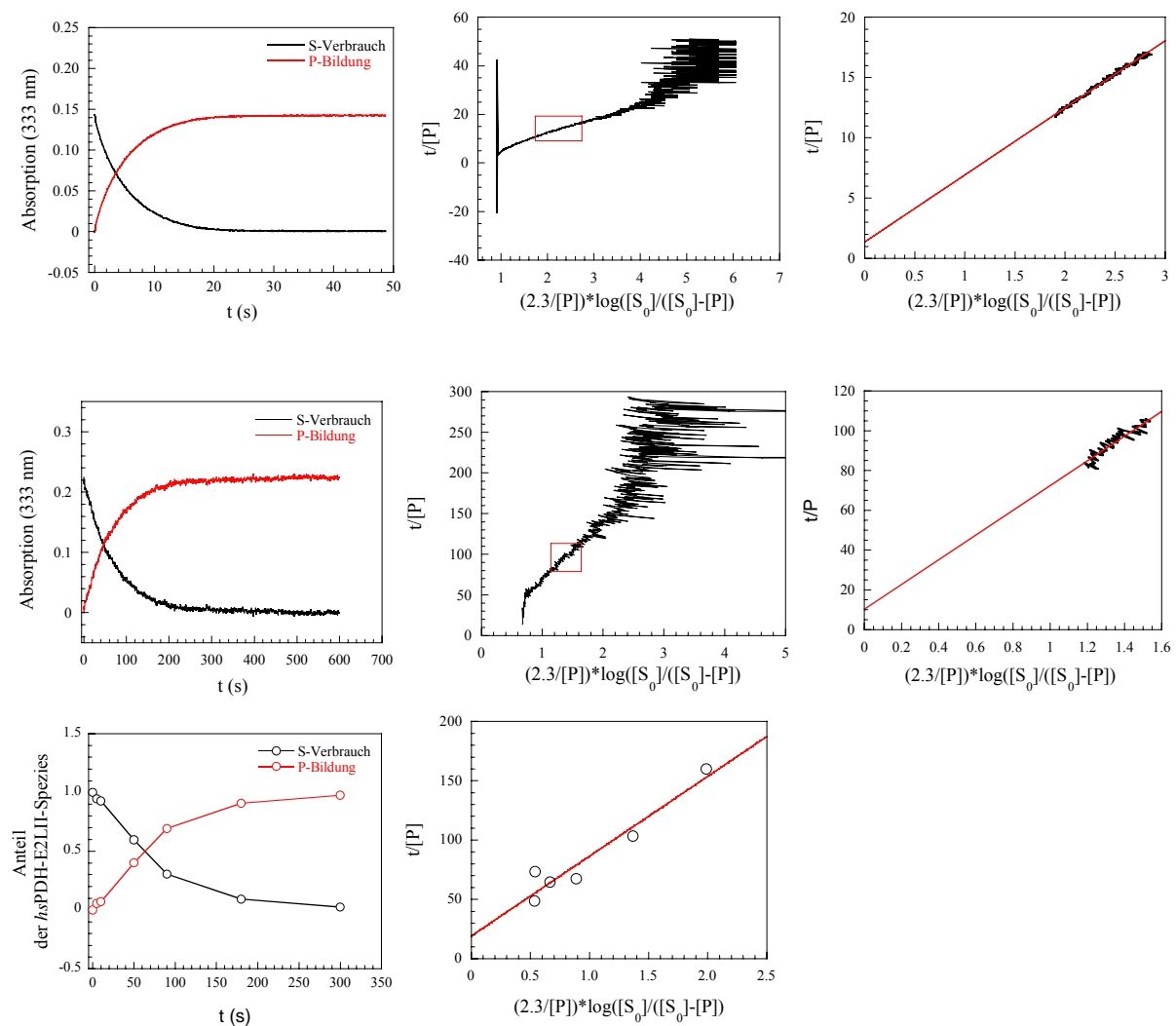


Abb. 3.36. Darstellung der Auswertung drei verschiedener Progresskurven der reduktiven Acetylierung nach der integrierten Michaelis-Menten-Gleichung. Oben: Auswertung eines *stopped-flow*-Experiments (Postinkubation). Mitte: Auswertung eines UV/Vis-Experiments. Unten: Auswertung eines massenspektrometrischen Experiments. Die linke Abbildung zeigt jeweils die originale Progresskurve des Substratverbrauchs und die Umwandlung in die Produktbildung. Die mittlere Abbildung zeigt jeweils die Anpassung an Gl. 3.23. Die rechte Abbildung zeigt für Experiment (1) und (2) den auswertbarer Bereich (rotes Kästchen Mitte) mit linearer Anpassung (—).

Die Auswertung nach der integrierten Michaelis-Menten-Gleichung resultiert in einer linearen Abhängigkeit (Schellenberger 1989). Es wird jedoch deutlich, dass nur ein begrenzter Abschnitt der Progresskurven (1) und (2) dieser Linearität folgen. Dies ist auf Messungenauigkeiten am Anfang und durch den zunehmenden Substratverbrauch am Ende der Reaktion zurückzuführen. Die Daten des MS-Experiments lassen sich entsprechend anpassen. Der Schnittpunkt mit der Ordinate ergibt den reziproken Wert der Maximalgeschwindigkeit und der Anstieg beinhaltet K_M/V_{\max} . Der Vorteil dieser Methode ist, dass aus einer einzelnen Progresskurve die kinetischen Parameter bestimmt werden können.

Der Vergleich mit den klassisch erstellten Werten dient einer besseren Einschätzung der Genauigkeit der Daten.

Des Weiteren werden die der Michaelis-Menten-Kinetik folgenden Progresskurven normiert dargestellt. Diese Betrachtung dient zum einen der Interpretation der durch massenspektrometrische Experimente erstellten Progresskurven und der Beurteilung ihrer Zuverlässigkeit (siehe Massenspektrometrie in diesem Kapitel), zum anderen dem Verständnis der Methode der Auswertung für die ThDP-Abhängigkeit der *hsPDH-E1* während der reduktiven Acetylierung der *hsPDH-E2LII* (siehe unten in diesem Kapitel).

Die Normierung bedarf einer skalierten Zeit (τ , Abszisse), die zur größeren Verallgemeinerung V_{\max} und K_M impliziert. Diese beiden Werte sind für alle Progresskurven einer betrachteten Reaktion konstant. Folgende Herleitung kann für die Normierung durchgeführt werden:

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S_0]}{[S_0] + K_M} = -\frac{d[S]}{dt} \quad \rightarrow \quad \int_{S_0}^S \frac{K_M + [S_0]}{V_{\max} \cdot [S_0]} d[S_0] = -\int_0^t dt = -t \quad \rightarrow$$

$$\left| \int_{S_0}^S \frac{K_M}{V_{\max} \cdot [S_0]} d[S_0] + \int_{S_0}^S \frac{1}{V_{\max}} d[S_0] \right| = -t \quad \rightarrow \quad \left[\frac{K_M}{V_{\max}} \ln|S_0| \right]_{S_0}^S + \left[\frac{1}{V_{\max}} [S_0] \right]_{S_0}^S = -t \quad \rightarrow$$

$$\frac{K_M}{V_{\max}} \ln \left| \frac{[S]}{[S_0]} \right| + \frac{1}{V_{\max}} ([S] - [S_0]) = -t \quad \rightarrow \quad \frac{K_M}{V_{\max}} \ln \left| \frac{[S_0]}{[S]} \right| + \frac{1}{V_{\max}} ([S_0] - [S]) = t \quad \rightarrow$$

$$\ln \left| \frac{[S_0]}{[S]} \right| + \frac{1}{K_M} ([S_0] - [S]) = \frac{K_M}{V_{\max}} t, \text{ mit } \tau = \frac{K_M}{V_{\max}} t \quad \text{Gl. 3.24}$$

Die Auftragung erfolgt durch den Anteil des Substrats (S/S_0) gegen τ . Das τ entspricht der skalierten Zeit. Der Wert für K_M ist aus den Auswertungen bekannt. Mit Hilfe der Gleichung 3.24 und des Programms SigmaPlot wurden Progresskurven bei verschiedenen Ausgangskonzentrationen an Substrat (S_0) generiert (Abb. 3.37).

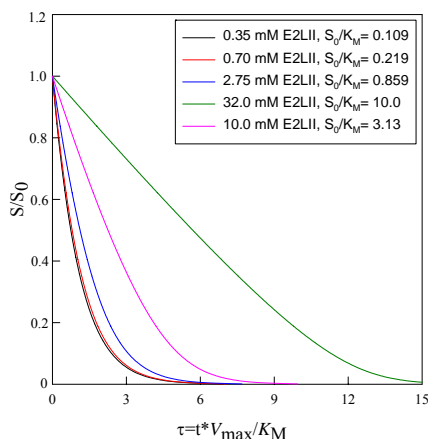


Abb. 3.37. Simulation normierter Progresskurven nach einer Michaelis-Menten-Kinetik am Beispiel der reduktiven Acetylierung der *hsPDH-E2LII* (in Abb. E2LII). Der K_M -Wert wurde auf 3.2 mM festgelegt (siehe unten).

Folgende Aussagen können getroffen werden: Je größer die Ausgangskonzentration an Substrat ist, desto flacher verlaufen die Progresskurven. Je höher also $[S_0]$, desto größer ist auch die Halbwertszeit des Substratverbrauchs. Die Progresskurven bleiben bei höheren Ausgangskonzentrationen an S länger linear, da v entsprechend des Sättigungsverhaltens bei höheren $[S]$ weniger empfindlich von $[S]$ abhängt als bei niedrigen Substratkonzentrationen. Wählt man die Substratkonzentrationen sehr klein, liegen die Progresskurven übereinander. Nutzt man diese Bedingung, das heißt, wählt man $S_0 \ll K_M$, so kann man folgende Vereinfachung der oben aufgeführten Herleitung vornehmen:

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S_0]}{K_M} = -\frac{d[S]}{dt} \quad \rightarrow \quad \int_{S_0}^S \frac{K_M}{V_{\max}} \frac{1}{[S_0]} d[S_0] = -\int_0^t dt = -t \quad \rightarrow$$

$$\frac{K_M}{V_{\max}} [\ln|S_0|]_{S_0}^S = -t \quad \rightarrow \quad \frac{K_M}{V_{\max}} [\ln|S_0|]_S^{S_0} = t \quad \rightarrow \quad \frac{K_M}{V_{\max}} \ln \left| \frac{[S_0]}{[S]} \right| = t \quad \rightarrow$$

$$\ln \left| \frac{[S_0]}{[S]} \right| = \frac{K_M}{V_{\max}} t, \text{ mit } \tau = \frac{K_M}{V_{\max}} t \quad \rightarrow \quad \frac{[S_0]}{[S]} = e^\tau \quad \rightarrow \quad \frac{[S]}{[S_0]} = e^{-\tau} \quad \text{Gl. 3.25}$$

Demnach folgen die Progresskurven bei sehr niedrigen Substratkonzentrationen einer einfach exponentiellen Funktion (Gl. 3.25). Die Abbildung 3.38 veranschaulicht, dass die Anpassung an eine einfach exponentielle Funktion nur bei niedrigen Substratkonzentrationen gerechtfertigt ist. Je näher man dem K_M -Wert kommt, desto stärker ist die Abweichung. Auch diese Auswertung dient der Vergleichbarkeit der angewandten Methoden zur Charakterisierung der reduktiven Acetylierungsreaktion der *hsPDH-E1*. Der Vorteil der beschriebenen Auswertungsverfahren ist, dass die gesamte Progresskurve in die Anpassung eingeht und somit der Fehler minimiert werden kann.

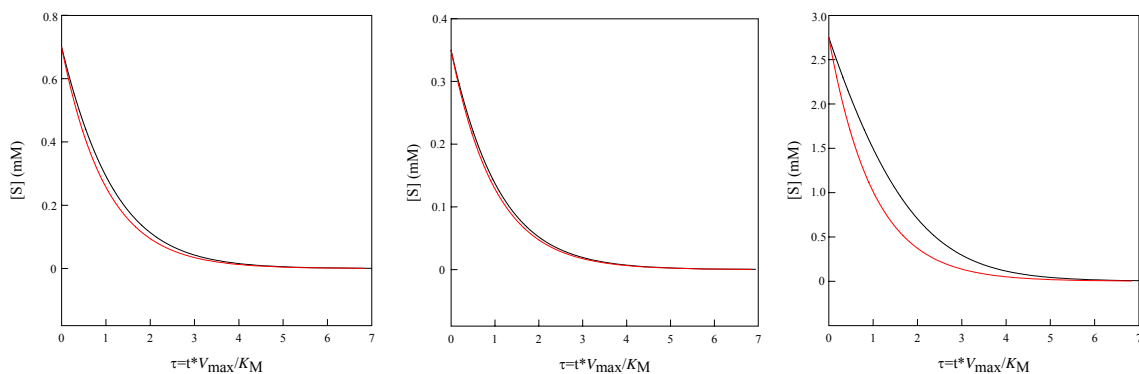


Abb. 3.38. Einfach exponentielle Approximation (—) von Progresskurven bei verschiedenen Substratkonzentrationen am Beispiel der reduktiven Acetylierung der *hsPDH-E2LII* (—). K_M -Wert wurde auf 3.2 mM festgelegt (siehe unten in diesem Kapitel). Links: 0.35 mM *hsPDH-E2LII*, Mitte: 0.7 mM *hsPDH-E2LII*. Rechts: 2.7 mM *hsPDH-E2LII*.

- **Kontinuierlicher Test (UV/Vis-Absorptionsspektroskopie)**
 - *stopped-flow*

In ersten Experimenten wurden *stopped-flow*-Messungen durchgeführt, da noch nicht abzuschätzen war, wie schnell die Reaktion ablaufen würde. Um die Daten im Nachhinein mit den NMR-Messungen für die isolierte *hsPDH-E1* (Kap. 3.1.1.3.) vergleichen zu können und den tetrameren Oligomerisierungszustand uniform zu gewährleisten (Kap. 3.1.1.2.), wurde die Konzentration der *hsPDH-E1* auf 7.5 mg/ml (97.4 μM aktive Zentren) eingestellt. Da der molare Extinktionskoeffizient der *hsPDH-E2LII* mit $131.6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ relativ klein ist, wurde eine Konzentration von 1.0875 mM gewählt, um eine deutliche Signalamplitude zu erhalten. Als Konzentration des ersten Substrates Pyruvat wurde 1 mM gewählt. Das Verhältnis der Substrate wurde äquimolar eingesetzt, um zu sicherzustellen, dass pro umgesetztem Molekül Pyruvat ein Molekül *hsPDH-E2LII* reduktiv acetyliert wird und keine unerwünschten Nebenreaktionen auftreten. Pyruvat zeigt auch eine Absorption bei 333 nm. Der molare Extinktionskoeffizient von $\epsilon_{333\text{nm}}$ (Pyruvat) = $18.9 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ wurde unter den für die Reaktionsexperimente gewählten Bedingungen bestimmt (Daten nicht gezeigt). Für die Auswertung ist zu beachten, dass sich der für die Reaktion relevante $\epsilon_{333\text{nm}}$ additiv aus den molaren Extinktionskoeffizienten der beiden Substrate zusammensetzt und demnach einen Wert von $150.5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ hat.

Es wurden drei experimentelle Ansätze gewählt, die sich in der Reihenfolge der Substratzugabe unterschieden: Beim Postinkubationstest wurden zunächst *hsPDH-E1* und *hsPDH-E2LII* gemeinsam vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Pyruvat gestartet. Für den Simultantest wurden beide Substrate (Pyruvat und *hsPDH-E2LII*) gemeinsam zu *hsPDH-E1* gegeben. Der Präinkubationstest erfolgte durch einminütige Vorinkubation von *hsPDH-E1* und Pyruvat unter Bildung von HETHDP (Carbanion/Enamin) (siehe Kap. 3.1.1.3.). Anschließend wurde die reduktive Acetylierungsreaktion durch Zugabe von *hsPDH-E2LII* gestartet. Die Abbildung 3.39 zeigt die *stopped-flow*-Progresskurven der drei Experimente. Die Gesamtamplituden der Progresskurven spiegeln den Anteil an verbrauchtem Substrat wider. Bei einem Verbrauch von 1 mM Pyruvat und 1 mM *hsPDH-E2LII* erwartet man eine theoretische Amplitude von 0.1505 (entsprechend dem additiven Extinktionskoeffizienten). Für die drei Experimente wurden folgende Amplituden gefunden: Präinkubationstest 0.123 (82 %), Simultantest 0.134 (89 %), Postinkubationstest 0.148 (98 %). Die verhältnismäßig große Abweichung für den Präinkubationstest ist durch den Verlauf der Progresskurve im Anfangsbereich zu erklären. Durch die Überlagerung zweier Signale (siehe unten) geht ein Teil der Amplitude des *hsPDH-E2LII*-Signals verloren. Die Abweichungen der Amplituden der beiden anderen Experimente lagen in einem akzeptablen Fehler und können auf geringfügige Fehler bei der Konzentrationsbestimmung und der Probenhandhabung zurückzuführen sein. Für die Auswertung konnte demzufolge ein vollständiger Substratverbrauch innerhalb der gewählten Reaktionszeit angenommen werden.

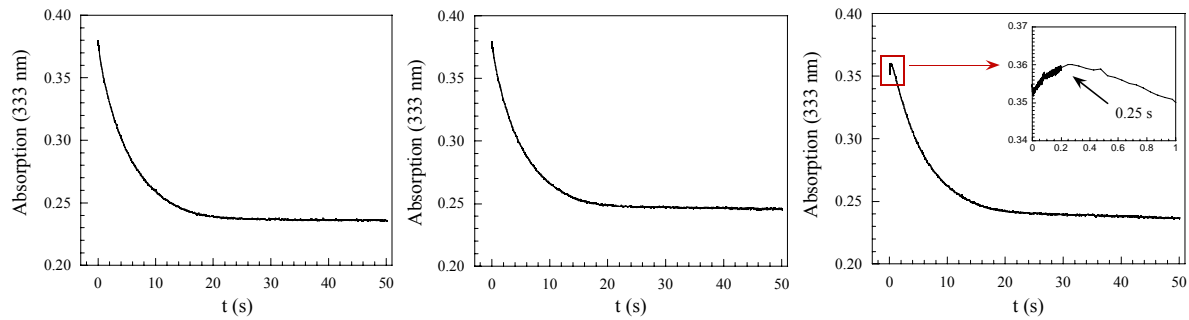


Abb. 3.39. Stopped-flow-Progresskurven für die reduktive Acetylierung von *hsPDH-E2LII* durch *hsPDH-E1*. Links: Postinkubationstest. Mitte: Simultantest. Rechts: Präinkubationstest mit *inset* des Ausschnitts der ersten Sekunde der Reaktion. Die Durchführung ist im Text beschrieben. Bedingungen nach 1+1-Mischung: 7.5 mg/ml (97.4 μ M aktive Zentren) *hsPDH-E1*, 13.56 mg/ml (1.0875 mM) *hsPDH-E2LII*, 0.25 mM ThDP, 0.5 mM $MgSO_4$, 1 mM Pyruvat, 0.1 KPP, 0.3 M KCl, pH 7.6, $T = 30\text{ }^\circ\text{C}$.

Die Auswertung der Progresskurven erfolgte zum einen durch die Ermittlung des Anfangsanstieges zur Bestimmung von k_{obs} und zum anderen durch Verwendung der integrierten Michaelis-Menten-Gleichung (Gl. 3.23).

Der Anfangsanstieg der Progresskurven ermöglicht die Berechnung der spezifischen Aktivität und damit der beobachteten Geschwindigkeitskonstante (k_{obs}) unter den gewählten Bedingungen. Für das Postinkubationsexperiment und das Simultanexperiment wurde der Bereich von 0.05-0.33 s für die Bestimmung des Anfangsanstieges verwendet. Durch die Besonderheit der Progresskurve des Präinkubationstests (siehe unten) konnte dieser Bereich nicht zur Bestimmung des Anfangsanstiegs genutzt werden. Es wurde der Bereich von 0.6-2 s genutzt. Die Berechnung der spezifischen Aktivität und der beobachteten Geschwindigkeitskonstante erfolgte wie in Kapitel 2.2.5.5. beschrieben.

Die Auswertung der Daten nach der integrierten Michaelis-Menten-Gleichung (Gl. 3.23) erfolgte wie oben ausführlich beschrieben. Für die drei Experimente wurde der gleiche lineare Bereich für die Auswertung nach integrierten der Michaelis-Menten-Bedingungen gewählt (Abb. 3.37 oben rechts). Die Tabelle 3.3 fasst die Auswertung der drei Experimente zusammen.

Tabelle 3.3. Kinetische Parameter für die Reaktion der *hsPDH-E1* ($c = 7.5$ mg/ml) bei unterschiedlicher Reihenfolge der Substratzugabe.

Parameter	Postinkubation	Simultan	Präinkubation
V_{\max} (mM/s)	0.73 ± 0.06	0.89 ± 0.13	0.86 ± 0.08
k_{cat} (s^{-1})	7.48 ± 0.62	9.13 ± 1.34	8.81 ± 0.82
K_M (mM) (für <i>hsPDH-E2LII</i>)	4.06 ± 0.03	4.41 ± 0.06	4.92 ± 0.04
A_{spez} (U/mg)	2.31 ± 0.018	2.18 ± 0.015	0.92 ± 0.01
k_{obs} (s^{-1})	2.96 ± 0.022	2.79 ± 0.02	1.18 ± 0.013

Zunächst kann festgestellt werden, dass sich die reduktive Acetylierung der *hsPDH-E2LII* durch die *hsPDH-E1* direkt durch Absorptionsspektroskopie verfolgen lässt. Die Daten der drei durchgeführten Experimente lassen sich wie folgt interpretieren: Die k_{cat} -Werte für die Gesamtreaktion der *hsPDH-E1* (Bindung und Umsatz von Pyruvat und reduktive Acetylierung der *hsPDH-E2LII*), berechnet aus den Maximalgeschwindigkeiten sind im Vergleich zu der Geschwindigkeitskonstante der C-C-Bindungsbildung (2.3 s^{-1}) bestimmt durch $^1\text{H-NMR}$ (Kap. 3.1.1.3.) um einen Faktor von 3-4 erhöht. Die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten liegen unter den k_{cat} -Werten, da die Sättigung durch das Substrat *hsPDH-E2LII* bei 1 mM noch nicht erreicht ist.

Der k_{obs} -Wert des Präinkubationsexperiments ist niedriger als der für die beiden anderen Experimente. Dies ist darauf zurückzuführen, dass der exakte Anfangsanstieg der Progresskurve aufgrund der Besonderheit ihres Verlaufs nicht bestimmt werden konnte (siehe unten). Der k_{cat} -Wert, der für das Präinkubationsexperiment bestimmt wurde, entspricht jedoch den in den beiden anderen experimentellen Ansätzen bestimmten k_{cat} -Werten. Zwei Aussagen können getroffen werden: Die Reihenfolge der Substratzugabe hat keinen signifikanten Einfluss auf die Geschwindigkeitskonstante der Gesamtreaktion. Die Daten deuten daraufhin, dass die Pyruvatbindung und die Decarboxylierung des LThDP leicht beschleunigt werden, aber weiterhin die geschwindigkeitsbestimmenden Schritte der E1-Katalyse sind. Eine Beschleunigung der Reaktion, die die Geschwindigkeitskonstante des *hsPDHc* widerspiegeln würde, konnte nicht detektiert werden.

Die hohen K_M -Werte, die für die *hsPDH-E2LII* unter den gewählten Bedingungen bestimmt werden konnten, bestätigen das Ergebnis der Studien zur Protein-Protein-Wechselwirkung mittels ITC. In dieser Untersuchung konnte kein stabiler Komplex zwischen *hsPDH-E1* und *hsPDH-E2LII* detektiert werden (Kap. 3.1.2.2.). Weiterhin sprechen die hohen K_M -Werte für eine transiente Komplexbildung während der Katalyse.

Die *stopped flow*-Progresskurve des Präinkubationstests wies im Vergleich zu den anderen beiden Experimenten eine Besonderheit auf. Die Vergrößerung des Anfangsbereiches (Abb. 3.39) zeigte eine Zunahme der Absorption bei 333 nm bis ca. 0.25 s, anschließend nahm die Absorption wie bei den anderen Progresskurven ab. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen ist das Tautomerengleichgewicht des ThDP während der E1-Katalyse. In Kapitel 3.1.1.4. wird beschrieben, dass ThDP (AP-Form) während der Bindung von Pyruvat

zunächst in seine 1',4'-iminotautomere Form (IP-Form) überführt wird (LThDP). Anschließend wird durch die Decarboxylierung des LThDP das Intermediat HETHDP gebildet. In der *hsPDH-E1* scheint ThDP auf dieser Reaktionsstufe in der APH^+ -Form vorzuliegen. Durch die Übertragung des Acetylrestes auf den Lipoamidarm der *hsPDH-E2LII* wird ThDP wieder in seine Ausgangsform (AP-Form) überführt. Die AP-Form zeigt ein Absorptionssignal im Bereich von 330 nm (Kap. 3.1.1.5.). Im Präinkubationstest wird die Reaktion ausgehend von HETHDP gestartet. Die Zunahme des Absorptionssignals bei 333 nm im Anfangsbereich der Progresskurve könnte demnach die Veränderung des tautomeren Zustands des ThDP bei der Übertragung des Acetylrestes von HETHDP auf den Lipoamidarm widerspiegeln [HETHDP – APH^+ (kein Signal bei 330 nm) zu ThDP – AP (Signal bei 330 nm)].

o Konventionelle UV/Vis-Spektroskopie

Der Absorptions-*assay* zur Analyse der reduktiven Acetylierung der *hsPDH-E2LII* bei 333 nm wurde auch mit konventioneller UV/Vis-Spektroskopie durchgeführt. Um den Verlauf der Reaktion gut dokumentieren zu können, wurden neben den Progresskurven auch Absorptionsspektren vor und nach der Reaktion aufgenommen (Abb. 3.40). Die Korrektur der Spektren erfolgte wie in Material und Methoden beschrieben.

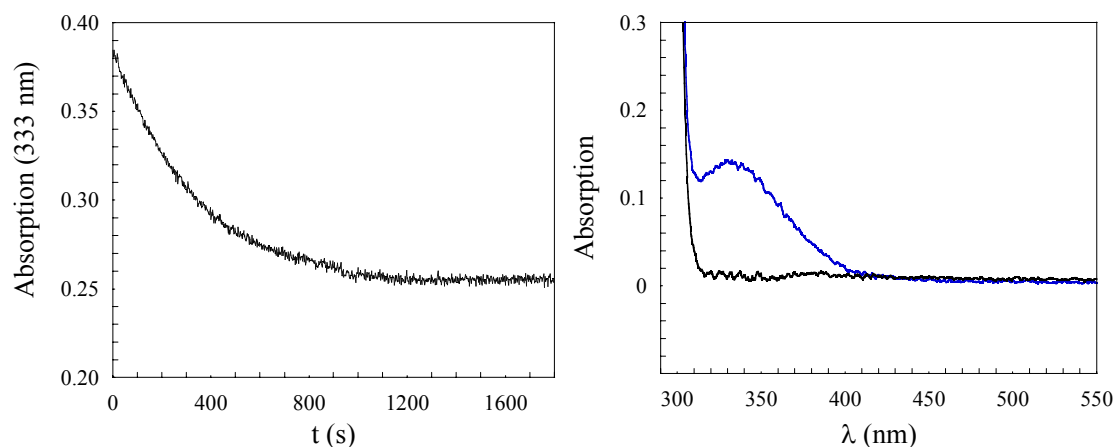


Abb. 3.40. Links: Progresskurve der reduktiven Acetylierung von *hsPDH-E2LII* durch *hsPDH-E1*. Rechts: Korrigierte Absorptionsspektren vor (—) und nach der Reaktion (—). Bedingungen: 0.1 mg/ml (1.3 μM aktive Zentren) *hsPDH-E1*, 13.56 mg/ml (1.0875 mM) *hsPDH-E2LII*, 0.25 mM ThDP, 0.5 mM MgSO_4 , 10 mM Pyruvat, 0.1 M KPP, 0.3 M KCl, pH 7.6, T = 30 °C.

Der Aktivitätstest wurde unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt. Der Ansatz entsprach jedoch in allen Fällen dem oben beschriebenen Postinkubationstest. Die ermittelten Parameter sind in Tabelle 3.4 zusammengefasst.

Tabelle 3.4. Kinetische Parameter für die Reaktion der *hsPDH-E1* bei verschiedenen Reaktionsbedingungen und konstanter *hsPDH-E2LII*-Konzentration von 1.0875 mM.

Parameter	0.1 mg/ml <i>hsPDH-E1</i> , 1 mM Pyruvat	0.1 mg/ml <i>hsPDH-E1</i> , 10 mM Pyruvat	1 mg/ml <i>hsPDH-E1</i> , 1 mM Pyruvat	1 mg/ml <i>hsPDH-E1</i> , 10 mM Pyruvat
A_{spez} (U/mg)	1.36 ± 0.07	1.52 ± 0.13	0.82 ± 0.03	1.38 ± 0.28
k_{obs} (s^{-1})	1.75 ± 0.08	1.95 ± 0.16	1.05 ± 0.04	1.77 ± 0.36

Die Daten zeigen, dass die katalytischen Konstanten für die Reaktion der *hsPDH-E1* unter den gewählten Bedingungen nicht von der E1-Konzentration abhängig sind. Die Pyruvatkonzentrationen wurden, ausgehend von einem K_M -Wert zwischen 10 μM und 50 μM (bestimmt im DCPIP-*assay* und PDHc-*assay*), in Sättigung gewählt, sodass keine Abhängigkeit erwartet wurde. Die Daten bestätigen diese Annahme. Der etwas niedrigere Wert bei 1 mg/ml *hsPDH-E1* und 1 mM Pyruvat wird auf Messungenauigkeit zu Beginn der Reaktion zurückgeführt. Bis zum Detektionsstart verging eine Totzeit von 5-8 s durch manuelle Mischung. Das Konzentrationsverhältnis von Enzym zum ersten Substrat Pyruvat ist hier am kleinsten und damit wird der Substratverbrauch des Pyruvats am schnellsten erreicht. Die hohe Steilheit im Anfangsbereich der Progresskurve verhindert in diesem Falle die Bestimmung des tatsächlichen Anfangsanstiegs. Es werden systematisch zu niedrige Werte erhalten. Dennoch liegt auch für diesen Fall der k_{obs} -Wert in derselben Größenordnung. Die aufgeführten Werte der katalytischen Konstanten entsprechen zudem auch den Werten aus den Experimenten der *stopped-flow*-Messungen (in diesem Kapitel). Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Reaktion bleibt trotz leichter Beschleunigung der ersten Halbreaktion der *hsPDH-E1*-Katalyse unter den gewählten Bedingungen die Bindung und Decarboxylierung von Pyruvat.

Die Experimente wurden insgesamt bei vier verschiedenen *hsPDH-E1*-Konzentrationen durchgeführt: 0.1, 0.5 (siehe unten) 1 und 7.5 mg/ml. Die katalytischen Konstanten zeigten in den ersten drei Fällen nahezu identische Werte (zwischen 1.7 und 2 s^{-1}). Für die Reaktion bei 7.5 mg/ml *hsPDH-E1* wurden nur leicht erhöhte Werte um 2.8 s^{-1} bestimmt. Dieses Ergebnis wirft unter Berücksichtigung der analytischen Ultrazentrifugation (Kap. 3.1.1.2.) eine Frage auf. Obwohl man für das Dimer-Tetramer-Gleichgewicht des Enzyms einen Wert von 1.3 μM (0.2 mg/ml Tetramer) findet, zeigte sich keine signifikante Abhängigkeit der Aktivität von der Enzymkonzentration. Dafür gibt es prinzipiell zwei mögliche Erklärungen. Eine Möglichkeit ist, dass sich das Dimer-Tetramer-Gleichgewicht unter Katalysebedingungen in Richtung des tetrameren Zustands ($\alpha_2\beta_2$) verschiebt. Eine zweite Erklärung wäre, dass auch ein mögliches Dimer ($\alpha\beta^3$) katalytisch aktiv ist. Dies wäre im Fall der *hsPDH-E1* denkbar, da je ein Dimer ein katalytisches Zentrum bilden kann (Ciszak et al. 2003). Zieht man jedoch die Hypothese der Halbseitenreaktivität in Betracht, wird folgendes deutlich: Die Kommunikation der aktiven Zentren kann nur auftreten, wenn die E1-Komponente als Tetramer (ein aktives und ein ruhendes Zentrum) vorliegt. Setzt man nun voraus, dass ein Dimer eine autonome Aktivität aufweist, würde man die doppelte katalytische Aktivität bezogen auf die Dimerkonzentration erwarten. Die Ergebnisse für die Experimente mit einer

Enzymkonzentration von 0.1 mg/ml (laut K_D -Wert entspricht dies mehr als der Hälfte der Moleküle im dimeren Zustand) zeigten jedoch ähnliche Werte wie bei 1 und 7.5 mg/ml. In Betracht zu ziehen wäre außerdem die Möglichkeit, dass ein Dimer eine geringere katalytische Aktivität als das Tetramer hat. Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass das Dimer-Tetramer-Gemisch bei dieser Konzentration genau die gleiche katalytische Aktivität hat wie das Tetramer. Dieser Sachverhalt könnte in zukünftigen Experimenten beispielsweise mit dynamischer Lichtstreuung aufgeklärt werden. Ein weiterer Einwand gegen die Aktivität des Dimers besteht darin, dass die strukturellen Daten nahelegen, dass das Tetramer vorrangig in Dimere ($\alpha\beta$) zerfällt, die keine aktiven Zentren besitzen. Der Zusammenhalt dieser Spezies ($\alpha\beta$) wird durch zwei hydrophobe Helices in deren Kontaktregion gewährleistet. Die Wechselwirkung eines Dimers ($\alpha\beta'$) mit dem aktivem Zentrum würde hauptsächlich durch Cofaktorbinding stabilisiert werden (Ciszak et al. 2003). Die experimentellen Daten der analytischen Ultrazentrifugation (Kap. 3.1.1.2.) zeigten jedoch, dass die Anwesenheit des Cofaktors keinen Einfluss auf die Tetramerisierung hat. Die im Zuge dieser Arbeit erhaltenen Daten weisen demnach auf eine Verschiebung des Dimer-Tetramer-Gleichgewichts durch die Katalyse (Bindung und Decarboxylierung von Pyruvat und reduktive Acetylierung der *hsPDH-E2LII*) zum E1-Tetramer. Dieses Argument würde die Übereinstimmung der katalytischen Konstanten bei verschiedenen Enzymkonzentrationen hinreichend erklären.

Unter physiologischen Bedingungen ist die Frage nach dem Dimer-Tetramer-Gleichgewicht und der konzentrationsabhängigen Enzymaktivität der *hsPDH-E1* wahrscheinlich nicht relevant. Die lokale Konzentration der E1-Komponente im PDH-Komplex wird auf ca. 100 mg/ml geschätzt (Zhou et al. 2001b). Außerdem wurde gezeigt, dass die Bindung der *hsPDH-E1* an die E1-Bindedomäne der E2-Komponente über die C-terminalen Bereiche beider β -Untereinheiten vermittelt wird und demnach von der tetrameren Struktur der E1-Komponente abhängig ist (Frank et al. 2005; Korotchikina und Patel 2008).

Der Verbrauch von *hsPDH-E2LII* als Substrat durch die humane E1-Komponente in den Aktivitäts-*assays* ist sehr hoch. Eine Konzentration der Lipoyldomäne von 1 mM entspricht einer Massenkonzentration von 12.469 mg/ml. Dennoch sollten die bereits ermittelten Konstanten durch die Erstellung von echten *v-S*-Charakteristiken bestätigt werden. Die Lipoyldomäne fungiert in diesen Untersuchungen als Substrat und unterliegt einem makroskopischen Umsatz. Es wurden die Geschwindigkeiten der E1-Katalyse in Abhängigkeit von der Konzentration der *hsPDHE2LII* sowie von der Konzentration des Cofaktors ThDP gemessen.

Die Konzentration der *hsPDH-E1* wurde für alle Experimente auf 0.5 mg/ml festgelegt, um ein gutes optisches Signal für die gewählten Bedingungen zu erhalten. Die Abbildung 3.41 links zeigt ausgewählte Progresskurven für die Bestimmung der kinetischen Konstanten in Abhängigkeit von der Konzentration der Lipoyldomäne. Die Auftragung der aus den initialen Anstiegen ermittelten spezifischen Aktivitäten gegen die *hsPDH-E2LII*-Konzentration zeigt einen hyperbolischen Verlauf (Abb. 3.41 Mitte).

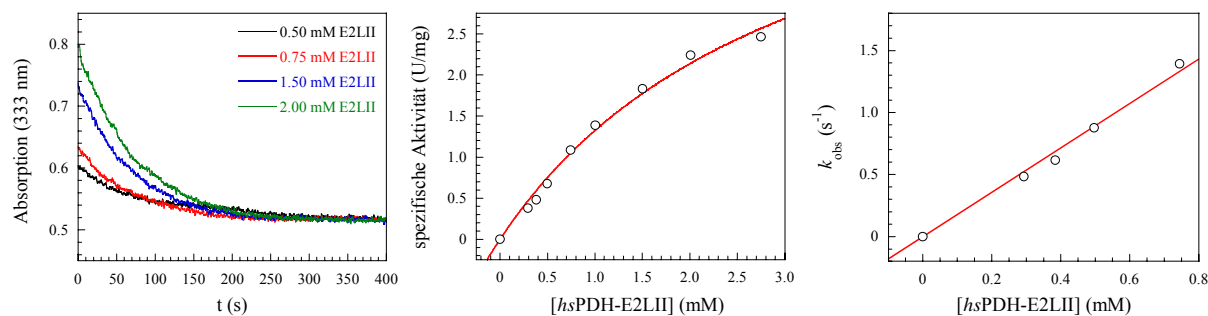


Abb. 3.41. Links: Progresskurven der reduktiven Acetylierung bei verschiedenen *hsPDH-E2LII*-Konzentrationen (in Abb. E2LII). Mitte: Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der *hsPDH-E1* von der *hsPDH-E2LII*-Konzentration nach Anpassung an Gl. 3.22 (—○—). Rechts: Abhängigkeit der k_{obs} -Werte der *hsPDH-E1* von der *hsPDH-E2LII*-Konzentration mit linearer Anpassung (—○—). Bedingungen: 0.5 mg/ml (6.5 μM aktive Zentren) *hsPDH-E1*, 0.25 mM ThDP, 1 mM MgSO_4 , 10 mM Pyruvat, 0.1 M KPP, 0.3 M KCl, pH 7.6, $T = 30^\circ\text{C}$.

Es zeigte sich, dass die Sättigung mit *hsPDH-E2LII* noch nicht erreicht ist. Höhere Konzentrationen an *hsPDH-E2LII* konnten auf Grund der Viskosität der Lösung (höchste gewählte Konzentration 34.3 mg/ml) und der Verfügbarkeit an Protein nicht eingesetzt werden. Die Daten wurden mit der Hilfe von zwei Auswerteverfahren analysiert, durch eine Anpassung an die Michealis-Menten-Gleichung (Gl. 3.22) und die Betrachtung unter Bedingungen 1. Ordnung. Letztere ermöglicht unter der Annahme, dass die Substratkonzentration deutlich kleiner als der K_M -Wert ist, die Bestimmung der katalytischen Effizienz k_{cat}/K_M (Abb. 3.41 rechts). Diese Auswertung ist möglich, da bei niedrigen Substratkonzentrationen die Reaktionsgeschwindigkeit proportional zur Substratkonzentration zunimmt (Gl. 3.26). In der Tabelle 3.5 sind die ermittelten Parameter aufgeführt.

$$\text{für } [S] \ll K_M \text{ gilt } v = \frac{V_{\text{max}} \cdot [S_0]}{K_M}, \text{ mit } V_{\text{max}} = k_{\text{cat}} \cdot [E_0] \quad \text{Gl. 3.26}$$

v – Reaktionsgeschwindigkeit, V_{max} – Maximalgeschwindigkeit der Reaktion, $[S_0]$ – Substratkonzentration, K_M – Michaelis-Konstante, k_{cat} – Katalysekonstante, $[E_0]$ – Gesamtkonzentration der aktiven Zentren des Enzyms.

Tabelle 3.5. Kinetische Parameter für die Reaktion der *hsPDH-E1* bei variierender *hsPDH-E2LII*-Konzentration.

Parameter	Michelis-Menten-Anpassung	Bedingungen nach Reaktion 1. Ordnung
V_{max} (U/mg)	5.54 ± 0.71	-
k_{cat} (s^{-1})	7.08 ± 0.89	-
K_M (mM)	3.16 ± 0.61	-
k_{cat}/K_M ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	2.24×10^3	1.83×10^3

Die bestimmten Werte für die katalytische Effizienz stimmen für beide Auswerteverfahren gut überein. Dadurch wird die Anpassung der Daten nach der Michaelis-Menten-Gleichung gerechtfertigt, obwohl die höchste messbare Konzentration an *hsPDH-E2LII* unter dem ermittelten K_M -Wert liegt. Der ermittelte K_M -Wert von 3.2 mM passt gut zu den in den *stopped-flow*-Experimenten mittels integrierter Michaeli-Menten-Gleichung bestimmten Konstanten (z.B. Postinkubationstest $K_M = 4.06$ mM). Die Daten unterstützen die bisher diskutierten Ergebnisse. Sie deuten darauf hin, dass es keine stabile Wechselwirkung zwischen den beiden Proteinen *hsPDH-E1* und *hsPDH-E2LII* gibt, sondern die Lipoyldomäne ein Substrat der *hsPDH-E1* darstellt. Anzumerken ist, dass der k_{cat} -Wert von 7.1 s^{-1} der *hsPDH-E1*-Reaktion, der sich aus der geschätzten Maximalgeschwindigkeit ergibt, ca. drei- bis viermal größer ist, und somit die Ergebnisse der *stopped-flow*-Experimente bestätigt. Die E1-Reaktion kann offensichtlich durch die E2-Komponente bzw. durch die zweite Halbreaktion leicht beschleunigt werden. Durch die feste Bindung zwischen E1- und E2-Komponente über die E1-Bindedomäne verlieren die Lipoyldomänen ihren Substratcharakter. Die Reaktion wird dadurch unabhängig von der Konzentration der Lipoyldomäne. Demzufolge beschleunigt die Bindung der E1-Komponente an den PDH-Komplex die Katalyse der E1-Komponente. Der molekulare Mechanismus dieser Beschleunigung ist gegenwärtig noch unbekannt.

Durch die Experimente zur ThDP-Abhängigkeit sollten die bisher beschriebenen fluorimetrisch bestimmten K_D -Werte und im DCPIP-*assay* bestimmten K_M -Werte für die humane E1-Komponente bestätigt werden. Die fluorimetrisch bestimmten K_D -Werte liegen in einem Bereich zwischen 0.11 und $0.47 \mu\text{M}$ (Seifert et al. 2006; Kato et al. 2008). Der in dieser Arbeit bestimmte apparente K_M beträgt $10 \mu\text{M}$ (Daten nicht gezeigt) und ist mit dem aus der Literatur vergleichbar (Korotchkina und Patel 1995). Unter dem K_M -Wert für ThDP ist die apparente Dissoziationskonstante des Cofaktors unter den gewählten Umsatzbedingungen zu verstehen. Mit der Verwendung dieses Ausdrucks wird jedoch nicht die Abspaltung von ThDP-Derivaten vom Enzym impliziert. Der apparente K_M -Wert von ThDP für den PDH-Komplex beträgt 96.6 nM (Korotchkina et al. 2006). Dieser Wert spricht für die Effizienz der Reaktivität des mit dem Gesamtkomplex assoziierten Enzyms im Vergleich zur isolierten *hsPDH-E1*.

Die Bedingungen für das Experiment wurden so gewählt, dass für die Auswertung die gesamte Progresskurve genutzt werden konnte (siehe Vorbetrachtung zur Michaelis-Menten-Kinetik in diesem Kapitel). Die Konzentration der *hsPDH-E2LII* wurde auf 0.35 mM festgelegt. Diese Konzentration liegt eine Größenordnung unter dem K_M -Wert für die Lipoyldomäne (3.2 mM , siehe Tab. 3.4). Daher folgt der Verbrauch der Lipoyldomäne einer Reaktion pseudo 1. Ordnung. Diese Voraussetzung ($S \ll K_M$) erlaubt die Anpassung der Progresskurven einer einfach exponentiellen Gleichung (Gl. 2.17). Die Simulation in Abbildung 3.38 bestätigt die Anwendbarkeit des beschriebenen Verfahrens. Der Vorteil der Anpassung der gesamten Progresskurve ist die Minimierung des Fehlers. Die ermittelten k_{obs} -Werte wurden gegen die ThDP-Konzentration aufgetragen (Abb. 3.42). Die Auswertung nach Michaelis-Menten ergab einen apparenten K_M -Wert des ThDP für die Bindung an *hsPDH-E1* von $2.03 \pm 0.32 \mu\text{M}$. Der Vergleich des Wertes mit den bisher bekannten Werten für die Bindung des Cofaktors zeigt, dass dieser in der gleichen Größenordnung wie der isolierten

*hs*PDH-E1 liegt und nicht im nanomolaren Bereich, wie für den Gesamtkomplex bestimmt. Die sequentielle Reaktion der *hs*PDH-E1 im PDH-Komplex kann demzufolge nicht durch die Reaktion der isolierten E1-Komponente mit der Lipoyldomäne simuliert werden.

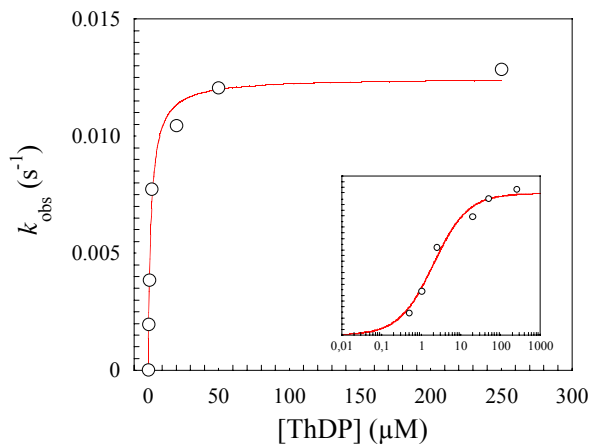


Abb. 3.42. Abhängigkeit der beobachteten Geschwindigkeitskonstante (k_{obs}) der *hs*PDH-E1 während der reduktiven Acetylierung von der ThDP-Konzentration mit Anpassung an Gl. 3.19 (—○—). Der ermittelte K_M -Wert betrug $2.03 \pm 0.32 \mu\text{M}$. *Inset*: halblogarithmische Auftragung. Bedingungen: 0.5 mg/ml (6.5 μM aktive Zentren) *hs*PDH-E1, 4.36 mg/ml (0.35 mM) *hs*PDH-E2LII, 1 mM MgSO_4 , 10 mM Pyruvat, 0.1 M KPP, 0.3 M KCl, pH 7.6, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$.

○ **stopped-flow-Experiment mit Photodioden-array**

Bei der Einführung der reduktiven Acetylierungsreaktion in Kapitel 3.1 werden zwei mögliche Reaktionswege diskutiert (Abb. 3.5). Dabei wurde erwähnt, dass der schrittweise Redox/Acyl-Transfermechanismus auch auf einem radikalischen Übergang basieren könnte. Bisher wurde zwar ein HEThDP-Radikal vom π -Typ mittels EPR detektiert (Tittmann 2009), aber ein Thiylradikal konnte bisher nicht nachgewiesen werden. HOFFMAN und HAYON veröffentlichten 1972 eine Arbeit über Thiylradikale, in der unter anderem die Absorptionseigenschaften dieser Radikale beschrieben werden. Die Radikale der Liponsäure verfügen über zwei Absorptionmaxima. Ein Absorptionsmaximum liegt bei 410 nm und ist dem geschlossenen Dithiolanring zuzuordnen. Bei 385 nm liegt das Absorptionsmaximum der partiell reduzierten Spezies (Hoffman und Hayon 1972). Auf Grundlage dieser Information wurde ein *stopped-flow*-Experiment mit Photodioden-array nach Präinkubationsbedingungen (siehe oben) für die Reaktion der *hsPDH-E1* mit Pyruvat und *hsPDH-E2LII* durchgeführt. Die Abbildung 3.43 links zeigt ausgewählte Spektren des Experiments.

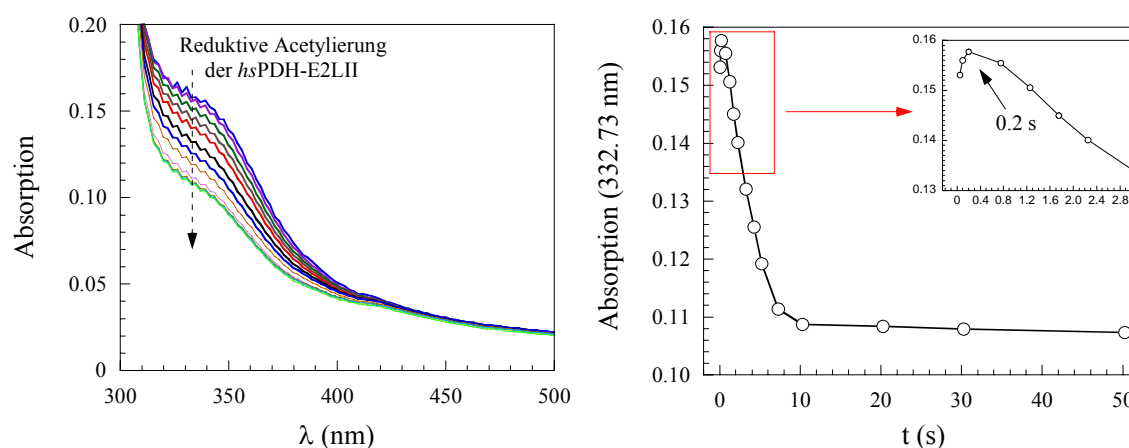


Abb. 3.43. Links: Zeitaufgelöste Spektren der Reaktion der *hsPDH-E1* mit Pyruvat und *hsPDH-E2LII*. Rechts: Zeitliche Abhängigkeit der Absorption bei 332.73 nm, *inset* mit Ausschnitt des Anfangsbereiches der Progresskurve (rotes Kästchen). Bedingungen nach 1+1-Mischung: 7.5 mg/ml (97.4 μ M aktive Zentren), *hsPDH-E1*, 6.235 mg/ml (0.5 mM) *hsPDH-E2LII*, 0.25 mM ThDP, 1 mM $MgSO_4$, 1 mM Pyruvat, 0.1 M KPP, 0.3 M KCl, pH 7.6, $T = 30^\circ C$.

Wie erwartet, konnte der Umsatz der *hsPDH-E2LII* durch Abnahme der Absorption bei 333 nm spektroskopisch verfolgt werden. Die Auftragung der Absorption gegen die Zeit zeigte bei einer Wellenlänge von 333 nm das für den Präinkubationsansatz charakteristische Maximum der Progresskurve (Abb. 3.43 rechts, siehe auch in diesem Kapitel unter *stopped-flow*). Im Bereich um 380-420 nm, in dem die Absorptionssignale für die Thiylradikale der Liponsäure zu erwarten sind, zeigte sich keine signifikante Signaländerung. Es kann demnach davon ausgegangen werden, dass unter den gewählten Bedingungen während der reduktiven Acetylierung der humanen Lipoyldomäne durch die *hsPDH-E1* keine nachweisbare Menge des Radikals gebildet wird. Der radikalische Übergang ist dennoch nicht auszuschließen, es kommt jedoch nicht zu einer nachweisbaren Akkumulation eines Thiylradikals.

- **Diskontinuierlicher Test (Massenspektrometrie)**

Der Massenunterschied zwischen oxidiertem und reduktiv acetylierter Liponsäure, der durch die reduktive Acetylierung des Dithiolanrings des Lipoamidarms der *hsPDH-E2LII* durch die humane E1-Komponente resultiert, beträgt 44 Da. Dieser Massenunterschied ermöglicht die massenspektrometrische Detektion der einzelnen Spezies der *hsPDH-E2LII* und deren Analyse in einem diskontinuierlichen Test. Die Abbildung 3.44 zeigt die drei durch MALDI-TOF trennbaren Spezies der *hsPDH-E2LII*.

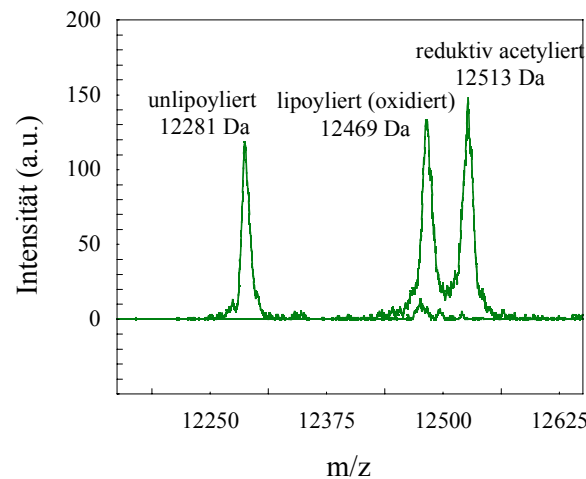


Abb. 3.44. Darstellung der Massenspektren der drei Spezies der *hsPDH-E2LII* (AS 121-233).

In vorangegangenen Studien, in denen diese Methode für die kinetische Analyse der reduktiven Acetylierungsreaktion angewandt wurde, erfolgte das Abstoppen der Reaktion mit der Lipoyldomäne durch Entsalzen der Proben (Nemeria et al. 2002; Wei et al. 2003). Diese Form der Probenbehandlung erlaubt jedoch kein präzises und schnelles Beenden der Reaktion. Der MS-assay wurde im Rahmen dieser Arbeit verfeinert, indem zum Abstoppen der Reaktion 85 %-ige Ameisensäure eingesetzt wurde. Durch das Säure-*quenching* sinkt der pH-Wert der Lösung sofort unter pH 2 und die Reaktion wird gestoppt. Der Vorteil der Verwendung von Ameisensäure im Vergleich zu der für die NMR-Experimente genutzten Trichloressigsäure besteht darin, dass die Proteine in Lösung bleiben. Dadurch kann die gesamte Probe im Anschluss entsalzt und die intakte Lipoyldomäne durch MALDI-MS analysiert werden. Dieses neue Verfahren ermöglicht die Erweiterung der analysierbaren Zeitskala. Somit kann die Reaktion an einer *rapid-quench-flow*-Apparatur auch im Millisekundenbereich untersucht werden (Daten nicht gezeigt).

Die MALDI-MS-Experimente dienen vor allem zur Verifizierung der UV/Vis-spektroskopischen Progresskurven der reduktiven Acetylierung der *hsPDH-E2LII* durch die humane E1-Komponente. Die Abbildung 3.45 zeigt eine Folge von MALDI-MS-Experimenten zur Charakterisierung der Acetylierungsreaktion. Das Abstoppen der Reaktionen durch Säure-*quenching* erfolgte für die hier dargestellten Progresskurven manuell. Alle MS-Experimente wurden als Postinkubationstests (Vorinkubation von Lipoyldomäne und E1-Komponente) durchgeführt.

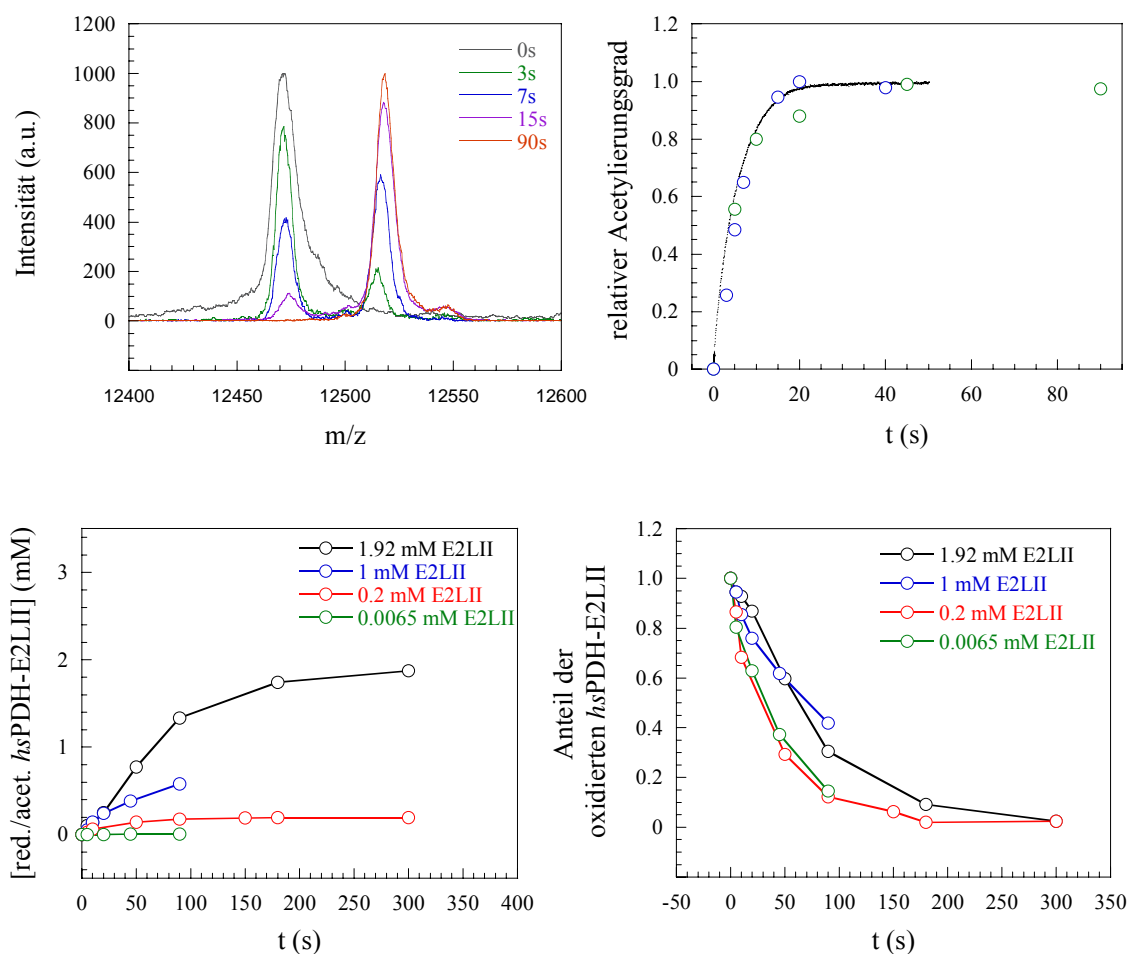


Abb. 3.45. Oben links: Normierte MS-Spektren zu verschiedenen Zeitpunkten der Acetylierungsreaktion von *hsPDH-E2LII* durch *hsPDH-E1*. Oben rechts: Vergleich der massenspektrometrisch generierten Daten (zwei unabhängige Messreihen (○/○)) mit der normierten *stopped-flow*-Progresskurve des Postinkubationsexperiments. Bedingungen: 7.5 mg/ml (97.4 μ M aktive Zentren) *hsPDH-E1*, 13.056 mg/ml (1.0875 mM) *hsPDH-E2LII*, 0.25 mM ThDP, 0.5 mM MgSO_4 , 1 mM Pyruvat, 0.1 M KPP, 0.3 M KCl, pH 7.6, $T = 30^\circ\text{C}$. Unten links: Produktbildungskurven der reaktiv acetylierten *hsPDH-E2LII* bei verschiedenen Ausgangskonzentrationen. Unten rechts: normierte Darstellung des Substratverbrauchs (oxidierte *hsPDH-E2LII*) bei verschiedenen Ausgangskonzentrationen. Bedingungen: 0.5 mg/ml (6.5 μ M aktive Zentren) *hsPDH-E1*, 0.25 mM ThDP, 0.5 mM MgSO_4 , 10 mM Pyruvat, 0.1 M KPP, 0.3 M KCl, pH 7.6, $T = 30^\circ\text{C}$.

Die experimentellen Daten veranschaulichen, dass sich der massenspektrometrische *assay* für die semi-quantitative Analyse der reduktiven Acetylierung der *hsPDH-E2LII* gut eignet. Der Vergleich der MS-Daten mit der normierten Progresskurve des *stopped-flow*-Experiments unter Bedingungen der Postinkubation zeigte eine gute Übereinstimmung der Resultate beider Methoden. Damit wird außerdem bestätigt, dass die Absorptionsexperimente tatsächlich die reduktive Acetylierungsreaktion widerspiegeln (Abb. 3.45 oben rechts).

Die beiden unteren Graphen der Abbildung 3.45 zeigen diskontinuierliche Progresskurven bei verschiedenen Konzentrationen an *hsPDH-E2LII*. Die normierten Daten des Substratverbrauchs (Abb. 3.45 unten rechts) verhalten sich in einer für Michaelis-Menten

Verhältnisse typischen Weise. Die entsprechende Simulation findet sich unter der Vorbetrachtung zur Michaelis-Menten-Kinetik (Abb. 3.37). Die Halbwertszeiten des Substratverbrauchs nehmen mit der Substratkonzentration zu. Die Werte des Experiments mit einer Substratkonzentration von 1.92 mM *hsPDH-E2LII* konnten nach der integrierten Michaelis-Menten-Gleichung (Gl. 3.23) ausgewertet werden. Der massenspektrometrisch ermittelte K_M -Wert beträgt 3.5 ± 1.9 mM. Dieser Wert entspricht dem K_M -Wert von 3.16 mM, der für die *hsPDH-E2LII* im UV/Vis-spektroskopischen Test bestimmt werden konnte. Die anderen Progresskurven ließen sich aufgrund relativ hoher Fehler nicht mit diesem Verfahren auswerten. Der MALDI-MS-Test dient demnach eher der qualitativen Charakterisierung der Reaktion und zum semi-quantitativen Vergleich des Wildtyps der *hsPDH-E1* mit verschiedenen Varianten (Kap. 3.2.). Sind qualitative Aussagen ausreichend, so bietet sich dieser Aktivitätstest an, da weitaus weniger Protein für die Reaktionsansätze benötigt wird als in den UV/Vis-spektroskopischen Aktivitätsmessungen.

3.1.2.5. Untersuchung der Reaktion unter *steady-state*- und Gleichgewichtsbedingungen mittels $^1\text{H-NMR}$

Gegenstand der Beschreibung der Reaktion der reduktiven Acetylierung der Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexe ist unter anderem die Frage, nach welchem Mechanismus die Übertragung des Acetylrestes auf das S8-Atom des Dithiolanrings erfolgt (Kap. 3.1.) Zwei unterschiedliche Reaktionsmechanismen wurden vorgeschlagen. Die reduktive Acetylierung könnte zum einen über den Carbanion/Enamin-Weg unter Bildung eines kovalenten Intermediats zwischen HThDP und dem S8-Atom ablaufen (Reaktionsweg A, Abb. 3.5). Eine zweite Möglichkeit wäre die Übertragung durch einen sequentiellen Mechanismus mit Redox/Acyl-Transfer (Reaktionsweg B, Abb. 3.5). Der Reaktionsweg B könnte sowohl durch direkten Elektronenübergang oder aber durch einen radikalischen Übergang realisiert werden (Kluger und Tittmann 2008). Für beide Reaktionswege (A und B) gibt es Indizien (Kap. 3.1.). Ein wichtiges Merkmal des schrittweisen Mechanismus ist die Bildung des Reaktionsintermediats Acetyl-ThDP (AcThDP). Die Methode der $^1\text{H-NMR}$ -Intermediatanalyse eignet sich zur zeitaufgelösten Detektion von ThDP-Intermediaten (Tittmann et al. 2003). Diese Methode wurde auch für die Analyse der gesamten *hsPDH-E1*-Reaktion genutzt. Diese Experimente sollten zeigen, ob während der Reaktion das Intermediat AcThDP in der *hsPDH-E1* akkumuliert. Dieses Intermediat wurde bereits in einem ähnlichen Experiment für den PDHc aus *E. coli* detektiert (Abb. 3.46) (Tittmann unveröffentlichte Daten; Tittmann 2009).

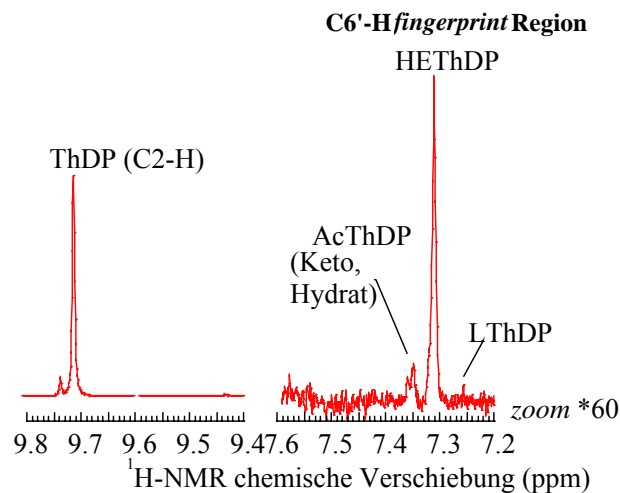


Abb. 3.46. ¹H-NMR-Spektrum der Intermediatverteilung der *E. coli*-PDHc-Katalyse im C6'-H *fingerprint*-Bereich. Bedingungen: 40 mg/ml *E. coli*-PDHc, 1.5 mM ThDP, 5 mM MgSO₄, 10 mM Pyruvat, 10 mM CoA, t = 1 min, 0.1 M KPP, pH 7.6, T = 30 °C. (Tittmann unveröffentlichte Daten).

Dieses Experiment wurde bei sehr hohen Proteinkonzentrationen (40 mg/ml PDHc) durchgeführt. Außerdem wurden ThDP und Coenzym A in hohem Überschuss zugesetzt, damit zu jeder Zeit von einer Sättigung des PDHc ausgegangen werden konnte. Die Reaktion wurde nach 1 min mittels Säure-*quenching* beendet. Demnach spiegelt das ¹H-NMR-Spektrum die Verteilung der ThDP-Intermediate im Gleichgewicht wider. Neben dem markanten Signal für HThDP (7.33 ppm), sind auch Signale für AcThDP (Doppelsignal bei 7.36 und 7.37 ppm durch die Keto- und Hydratform) und LThDP (7.26 ppm) sichtbar. Den größten Anteil hat auf Grund der gewählten Bedingungen das Signal des unsubstituierten ThDP. Die Intermediatverteilung der Reaktion des *E. coli*-Komplexes deutet durch das Auftreten des AcThDP auf einen schrittweisen Mechanismus. Für die Reaktion der *hsPDH-E1* mit Pyruvat und *hsPDH-E2LII* wurden zwei experimentelle Ansätze gewählt: Zur Analyse der Intermediatverteilung im *steady-state* wurde die Reaktion nach 2 s durch Säure-*quenching* beendet (Abb. 3.47 links). Die Verteilung der ThDP-Intermediate im Gleichgewicht wurde nach einer Reaktionszeit von 5 min untersucht (Abb. 3.47 rechts).

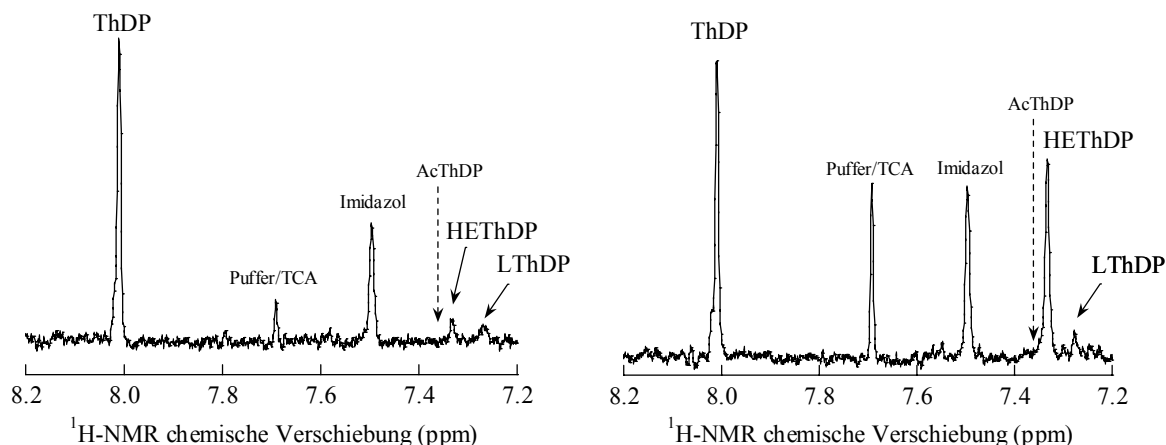


Abb. 3.47. Analyse der Intermediatverteilung während der *hsPDH-E1*-Katalyse mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie. Links: Intermediatverteilung im *steady-state* nach einer Reaktionszeit von 2 s. Rechts: Intermediatverteilung im Gleichgewicht nach einer Reaktionszeit von 5 min. Bedingungen nach 1+1-Mischung: 7.5 mg/ml (97.4 μM aktive Zentren) *hsPDH-E1*, 13.54 mg/ml (1.0875 mM) *hsPDH-E2LII*, 97.4 μM ThDP, 0.5 mM MgSO_4 , 10 mM Pyruvat, 0.1 M KPP, 0.3 M KCl, pH 7.6, $T = 30^\circ\text{C}$.

Das Intermediat AcThDP konnte in diesem Experiment nicht detektiert werden. Dies schließt jedoch nicht aus, dass dieses Intermediat transient gebildet wird. Es war unter den gewählten Bedingungen jedoch nicht detektierbar. In einem Experiment mit dem rekonstituierten *hsPDHc* kann diese Frage möglicherweise beantwortet werden.

Die Intermediatverteilungen der gewählten Reaktionszustände erlauben folgende Interpretationen: Im *steady-state* liegt der größte Anteil des ThDP unsubstituiert vor (86.2 %). HEThDP hat einen Anteil von 7 % und LThDP von 6.8 % (Abb. 3.48 links). Der prozentuale Anteil eines Intermediats ergibt sich aus dem Verhältnis der Peakfläche gegebenen Intermediats zur Summe der Peakfläche aller Intermediate. Es muss also davon ausgegangen werden, dass die reduktive Acetylierung sehr schnell abläuft. Sobald Pyruvat gebunden (LThDP-Bildung) und unter Bildung von HEThDP decarboxyliert wurde, kommt es zur Übertragung des Acetylrestes auf das Lipoamid der *hsPDH-E2LII*. Diese Beobachtung stimmt mit der zuvor gemachten Aussage überein, dass unter den gewählten Reaktionsbedingungen, d. h. Verwendung der *hsPDH-E2LII*, hauptsächlich die erste Halbreaktion der E1-Komponente der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist. Wäre dies nicht der Fall, würde es zu einer Akkumulation des Intermediats HEThDP kommen.

Im Gleichgewicht (Reaktion nach 5 min) zeigt sich dagegen folgendes Bild: Der Anteil an unsubstituiertem ThDP beträgt 52.7 %, der Anteil an HEThDP 42.6 % und LThDP hat einen Anteil von 4.7 %. Dieses Ergebnis ist als unerwartet einzustufen. Die $^1\text{H-NMR}$ -Intermediatanalyse der Reaktion der isolierten *hsPDH-E1* mit Pyruvat zeigte, dass nach 60 s ausschließlich HEThDP vorliegt. HEThDP kann in diesem Fall auch als Produkt der isolierten E1-Komponente betrachtet werden (Kap. 3.1.1.3.). Dieses Ergebnis lässt auch für das oben beschriebene Gleichgewichtsexperiment erwarten, dass nach der gewählten Reaktionszeit nur HEThDP vorliegt. Das Experiment liefert jedoch ein anderes Resultat. Erklärbar wäre die Detektion von unsubstituiertem ThDP durch das Auftreten von Nebenreaktionen unter

Bildung der Nebenprodukte Acetoin, Acetolaktat oder Acetat. Durch diese Reaktionen wird HETHDP verbraucht und unsubstituiertes ThDP entsteht. Im relevanten Bereich des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums ist der Anteil dieser Substanzen jedoch so gering, dass diese Theorie den hohen Anteil an ThDP von ca. 50 % nicht erklären kann (Daten nicht gezeigt).

Die spezifische Intermediatverteilung im Gleichgewicht könnte mit Hilfe der Theorie der Halbseitenreaktivität interpretiert werden. Stellt man sich vor, dass auch die reduktive Acetylierungsreaktion der *hsPDH*-E1 dem Mechanismus der alternierenden Zentren unterliegt, so könnte das erste aktive Zentrum solange durch eine bereits acetylierte Lipoyldomäne blockiert werden, bis im zweiten aktiven Zentrum ein nicht-acetyliertes Molekül der *hsPDH*-E2LII für die Reaktion zur Verfügung steht. Nach einer Reaktionszeit von 5 min sind jedoch alle Lipoyldomänen reduktiv acetyliert (siehe *stopped-flow*-Experimente Kap. 3.1.2.4.). Etwa 50 % aller aktiven Zentren ist durch eine Lipoyldomäne sterisch blockiert, Pyruvat kann nicht in das aktive Zentrum vordringen. In diesen Zentren liegt unsubstituiertes ThDP vor. In der anderen Hälfte der aktiven Zentren hat sich HETHDP akkumuliert. Die Theorie des Flip-Flop-Mechanismus, der von der PATEL-Gruppe 2003 vorgeschlagen wurde und mit einer Konformationsänderung erklärt wird, könnte durch diese Ergebnisse unterstützt werden.

Diese Hypothese müsste strukturelle Studien des Subkomplexes zwischen E1-Komponente und Lipoyldomäne belegt werden. Dabei wäre der Einsatz von Cofaktor- und Substratanaloga von großem Interesse. Trotz vieler Bemühungen ist die Kristallisation dieses Subkomplexes des PDHc noch nicht gelungen. Bisher konnten nur Modelle zur Bindung des Lipoamidarms der Lipoyldomäne in den Substratkanal des E1-Komponente vorgeschlagen werden (Pei et al. 2008). Dennoch könnten die vorgestellten Ergebnisse der $^1\text{H-NMR}$ -Experimente ein weiterer Hinweis für die Theorie der Halbseitenreaktivität sein.

3.1.2.6. Untersuchung der reduktiven Acetylierungsreaktion unter niedrigen KCl-Bedingungen

Die bisher vorgestellten Daten zur reduktiven Acetylierung der humanen Lipoyldomäne 2 durch die E1-Komponente des *hsPDHc* ergeben unter den gewählten Bedingungen ein einheitliches Bild: Die Wechselwirkung zwischen den beiden Proteinen ist schwach, was aus den Bindungsexperimenten und aus dem hohen K_M -Wert für die *hsPDH*-E2LII hervorgeht. Für die Gesamtreaktion bleiben die Bindung und der Umsatz von Pyruvat die geschwindigkeitsbestimmenden Schritte.

Die kinetischen Daten in der Literatur für die Reaktion zwischen der E1-Komponente und den Lipoyldomänen sind anders als die in der vorliegenden Arbeit bisher beschriebenen Daten. Für verschiedene Organismen wurden K_M -Werte der Lipoyldomänen im Bereich zwischen 30 und 100 μM bestimmt (Bleile et al. 1981; Graham et al. 1989; Gong et al. 2000; Liu et al. 2001). Der Test, der bei all diesen Experimenten verwendet wurde, war ein diskontinuierlicher Radioaktivitäts-*assay*. Der Vergleich der Bedingungen zeigt zwei signifikante Unterschiede. Es wurde in allen Experimenten BSA in Konzentrationen von 1-3 mg/ml als Trägerprotein eingesetzt und die verwendeten Puffer enthielten kein oder deutlich

niedrigere Konzentrationen an KCl. Die KCl-Konzentration von 0.3 M wurde als Standardbedingung gewählt, um die thermodynamische Stabilisierung der humanen E1-Komponente zu gewährleisten. Die humane E1-Komponente ist aggregationsanfällig (siehe Ergebnisse der Röntgenkleinwinkelstreuung, Kap. 3.1.2.2.). Diese Aggregationsanfälligkeit kann durch hohe KCl-Konzentrationen reduziert werden (Kreß 2003). Die kinetischen Konsequenzen der Gegenwart von BSA und KCl sollten zunächst in Vergleichsexperimenten mittels UV/Vis-Spektroskopie untersucht werden. Zunächst wurde die Progresskurve eines normalen Reaktionsansatzes (0.3 M KCl) zur reduktiven Acetylierung mit und ohne Zusatz von 2 mg/ml BSA verglichen. Anschließend wurde die Reaktion in Gegenwart niedrigerer KCl-Konzentrationen untersucht. Die Abbildung 3.48 zeigt, dass der Zusatz von BSA offenbar keinen signifikanten Einfluss auf den Verlauf der Progresskurve der Reaktion hat. Die erhöhte Startabsorption bei 333 nm ist auf den erhöhten Proteingehalt der Lösung durch das BSA zu erklären. Ein deutlicher Unterschied zwischen den Reaktionskinetiken tritt jedoch durch die Reduktion des KCl-Gehaltes auf. Der Anfangsanstieg der Progresskurve mit niedrigem KCl-Gehalt (0.09 mM) ist um den Faktor 2.5 steiler. Die Reaktion ist demnach um den gleichen Faktor schneller.

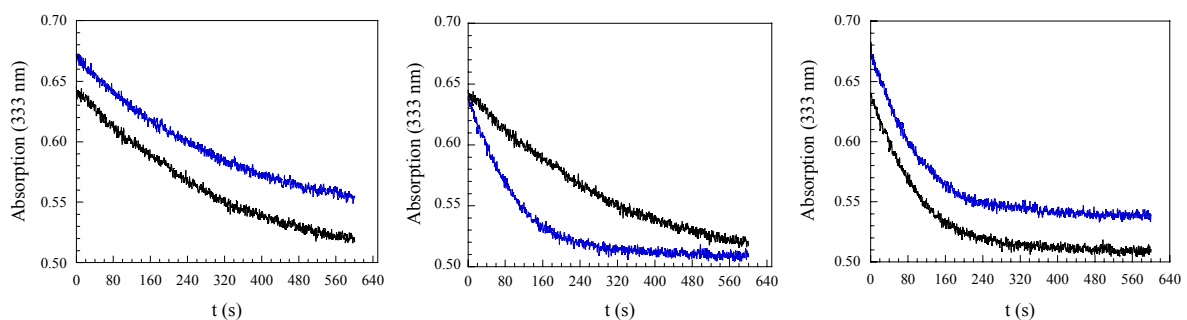


Abb. 3.48. Progresskurven der reduktiven Acetylierungsreaktion der *hsPDH-E1* bei verschiedenen Bedingungen. Links: 0.1 M KPP, 0.3 M KCl, ohne BSA (—), mit 2 mg/ml BSA (—). Mitte: 0.1 M KPP, 0.3 M KCl (—), 0.045 M KPP, 0.09 M KCl (—). Rechts: 0.045 M KPP, 0.09 M KCl, ohne BSA (—), mit 2 mg/ml BSA (—) bei jeweils 0.1 mg/ml (1.3 μ M aktive Zentren) *hsPDH-E1*, 12.469 mg/ml (1 mM) *hsPDH-E2LII*, 0.25 mM ThDP, 1 mM MgSO_4 , 10 mM Pyruvat, pH 7.6, $T = 30^\circ\text{C}$.

Da die KCl-Konzentration des Puffers einen deutlichen Einfluss auf die reduktive Acetylierung der *hsPDH-E2LII* durch die *hsPDH-E1* zeigte, wurde dieser Effekt in zwei weiteren Experimenten analysiert. Zunächst wurde eine ν -S-Charakteristik für diese Reaktion bei 1.25 mM KCl aufgenommen. Zur Verifizierung der Resultate wurden zwei Progresskurven bei zwei verschiedenen *hsPDH-E2LII*-Konzentrationen durch den diskontinuierlichen, massenspektrometrischen Test erstellt (Abb. 3.49).

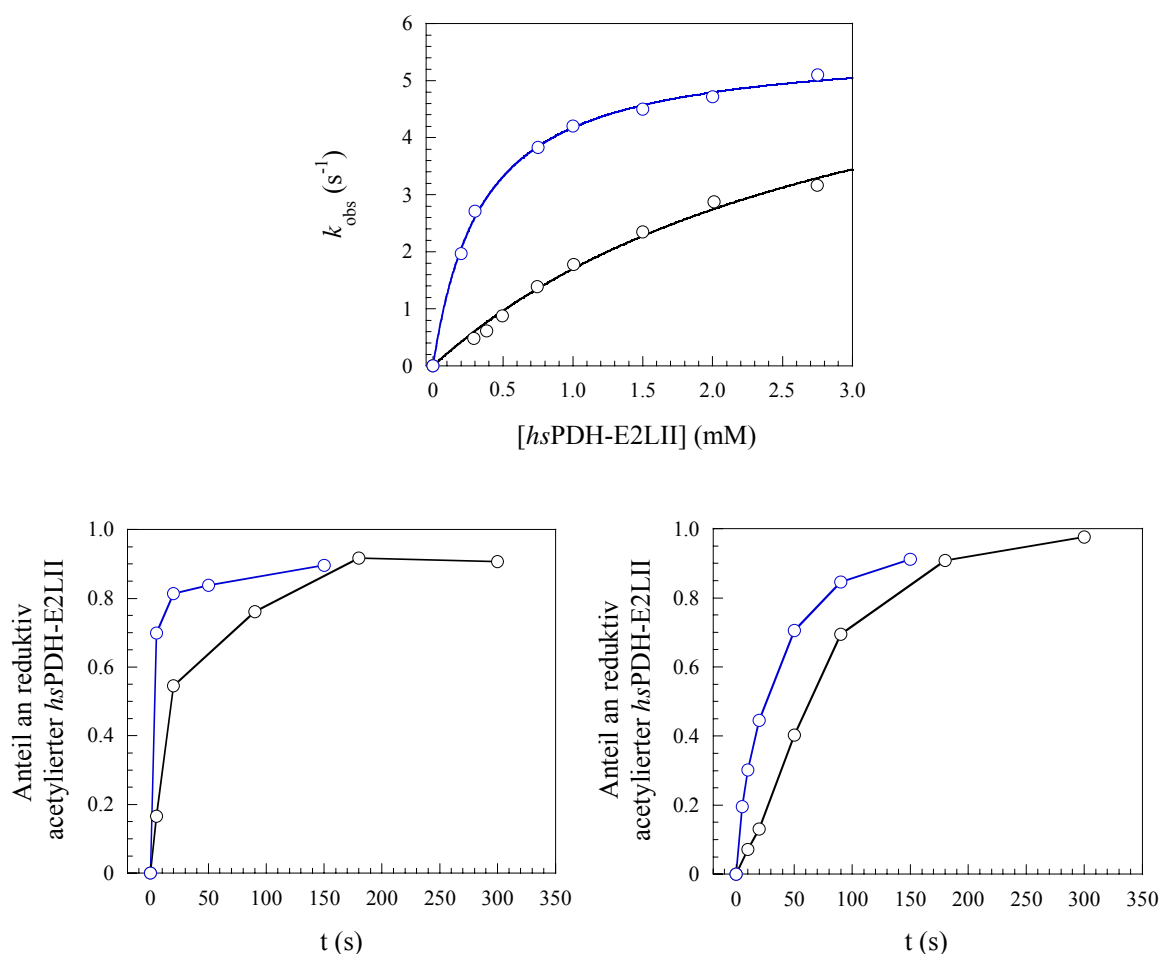


Abb. 3.49. Oben: Vergleich der Abhängigkeit der k_{obs} -Werte von der *hsPDH-E2LII*-Konzentration und deren Michaelis-Menten-Anpassung bei hoher (—○—, 0.1 M KPP, 0.3 M KCl) und niedriger KCl-Konzentration (—○—, 0.05 M KPP, 1.25 mM KCl). Bedingungen: 0.1 mg/ml (1.3 μM aktive Zentren) *hsPDH-E1*, 0.25 mM ThDP, 1 mM MgSO_4 , 10 mM Pyruvat, pH 7.6, $T = 30^\circ\text{C}$. Unten: Progresskurven der reduktiven Acetylierung bestimmt MALDI-MS. Bedingungen: 0.5 mg/ml (6.5 μM aktive Zentren) *hsPDH-E1*, 0.5 mM ThDP, 1 mM MgSO_4 , 10 mM Pyruvat, pH 7.6, $T = 30^\circ\text{C}$, 0.05 mM (links) und 1.92 mM (rechts) *hsPDH-E2LII* in 0.1 M KPP, 0.3 M KCl (—○—) und 0.045 M KPP, 4.8 mM KCl (—○—).

Die Resultate der Michaelis-Menten-Anpassung (Gl. 3.22) sind in Tabelle 3.6 gegenübergestellt. Es zeigt sich, dass der K_M -Wert für die *hsPDH-E2LII* bei der niedrigen KCl-Konzentration mit 349 μM um den Faktor 10 kleiner ist als der bei einem hohen KCl-Gehalt. Dieser Wert nähert sich denen der Literatur an. Die verbleibende Abweichung kann auf andere, unterschiedlich gewählte Bedingungen zurückgeführt werden (BSA-Konzentration, EDTA-Konzentration). Die k_{cat} -Werte beider v - S -Charakteristiken sind näherungsweise gleich. Die Reaktionsgeschwindigkeit der E1-Komponente wird durch die KCl-Konzentration kaum beeinflusst. Der Wert von 6-7 s^{-1} ist dem Literaturwert von etwa 5 s^{-1} vergleichbar (Liu et al. 2001). Die für die kinetischen Messungen dieser Arbeit gewählten Standardbedingungen von 0.1 M KPP, 0.3 M KCl und pH 7.6 sind für die Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen *hsPDH-E1* und *hsPDH-E2LII* nicht optimal. Die Oberfläche der Lipoyldomäne ist durch acht exponierte saure Reste sehr hydrophil (Gong et

al. 2000). Damit lässt sich die Störung der Wechselwirkung durch hohe Salzkonzentrationen leicht erklären. Dennoch zeigen die Daten, dass sich die Katalysekonstante der *hsPDH-E1* kaum von der KCl-Konzentration abhängt. Die Grundaussage bleibt daher erhalten: Die reduktive Acetylierung führt noch nicht zu der im Gesamtkomplex erreichten Beschleunigung der E1-Katalyse.

Tabelle 3.6. Kinetische Parameter für die Reaktion der *hsPDH-E1* bei variierender *hsPDH-E2LII*-Konzentration bei hoher und niedriger KCl-Konzentration.

Parameter	0.3 M KCl	0.00125 M KCl
V_{\max} (U/mg)	5.54 ± 0.71	4.39 ± 0.07
k_{cat} (s^{-1})	7.08 ± 0.89	5.63 ± 0.09
K_M (mM)	3.16 ± 0.61	0.35 ± 0.02
k_{cat}/K_M ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	2.24×10^3	1.61×10^4

3.1.3. Zusammenfassende Diskussion des Kapitels 3.1.

Das Kapitel 3.1 beschäftigt sich mit der Analyse der Gesamtreaktion der ThDP-abhängigen humanen E1-Komponente. Dazu dienten sowohl Experimente mit der isolierten *hsPDH-E1* zur Charakterisierung der ersten Halbreaktion (Cofaktoraktivierung, Bindung und Decarboxylierung von Pyruvat) (Abb. 3.3 und 3.4) als auch Studien zur Analyse beider Halbreaktionen, Umsatz von Pyruvat und reduktive Acetylierung des Lipoamidarms, unter Verwendung der humanen Lipoyldomäne 2 (*hsPDH-E2LII*, Abb. 3.5). Im folgenden Abschnitt sollen die erhobenen Daten in einem gemeinsamen Kontext dargestellt und diskutiert werden.

Eine Zielstellung der Dissertation war die kinetische Untersuchung der Halbseitenreaktivität der ThDP-abhängigen humanen E1-Komponente. Dieser Mechanismus wird für thiamindiphosphatabhängige Enzyme seit langer Zeit diskutiert (Jordan et al. 2005). Bisher belegen vor allem strukturelle Daten die strukturelle Nichtäquivalenz der beiden katalytischen Zentren (Frank et al. 2007). Im Fokus der Forschung steht seit 2004 die Theorie der Kommunikation der aktiven Zentren, vermittelt durch einen Protonenkanal zwischen den beiden ThDP-Molekülen (Abb. 3.8). Aminosäurereste wie z.B. Aspartate und Glutamate sowie Wassermoleküle bilden einen sauren Kanal und erlauben einen Protonentransfer zwischen beiden Zentren. Es wird angenommen, dass im aktiven Zentrum das N1'-Atom des Aminopyrimidinrestes protoniert vorliegt und somit die Cofaktoraktivierung auslöst. In der ruhenden Seite würde das N1'-Atom deprotoniert vorliegen. Im Verlauf der Katalyse soll das Proton vom N1'-Atom der aktiven Seite über das konservierte Glutamat und den Protonenkanal zum ruhenden Zentrum transferiert werden und so die Cofaktoraktivierung ausgelöst. Proteinvarianten der E1-Komponente des PDHc aus *Bacillus stearothermophilus* mit Aminosäureaustauschen in dem postulierten Protonentunnel lieferten erste Hinweise auf das mögliche Vorliegen dieser Theorie (Frank et al. 2004). Der charakteristische Protonenkanal findet sich, wie in vielen anderen ThDP-Enzymen, auch in der *hsPDH-E1*-Struktur (Abb. 3.50).

Neben dieser Hypothese existiert die Theorie des Flip-Flop-Mechanismus. Dieser basiert auf möglichen Konformationsänderungen der *hsPDH-E1*-Struktur während der LThDP-Bildung in einem aktiven Zentrum. Diese strukturelle Änderung soll durch Optimierung der Glu-N1'-Wechselwirkung zur Aktivierung des Cofaktors führen (Ciszak et al. 2003) (Abb. 3.7).

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten ¹H-NMR-Experimente konnten erstmals für ein ThDP-abhängiges Enzym chemische Nichtäquivalenz der beiden aktiven Zentren auf mikroskopischer Ebene nachweisen. Sowohl die Cofaktoraktivierung (H/D-Austausch) als auch Substratbindung und Umsatz (Intermediatanalyse mit Pyruvat und Methylacetylphosphonat) ergaben, dass 50 % der aktiven Zentren schnell, die anderen 50 % hingegen sehr langsam arbeiten. Die Cofaktoraktivierung in der aktiven Seite ist um den Faktor 3000 schneller als in der ruhenden Seite (Tab. 3.7). Diese Seite ist auch im Vergleich zum freien Cofaktor ThDP um den Faktor 10 langsamer, was für eine Abschirmung des aktiven Zentrums vom Lösungsmittel spricht. Ein solches Verhalten der Cofaktoraktivierung in Abwesenheit von Substraten wurde bisher für kein anderes ThDP-abhängiges Enzym gezeigt (Kern et al. 1997; Hübner et al. 1998). Dieses Ergebnis ist auch im Hinblick auf die

Kristallstruktur der Holoform der *hsPDH-E1* interessant. Die Daten zeigen absolute Übereinstimmung der beiden aktiven Zentren. Somit unterstützen die erhobenen Daten zur C2-Ionisierung die Theorie des Protonenkanals, denn diese setzt keine großen strukturellen Unterschiede zwischen den Untereinheiten im Ausgangszustand voraus.

Die Untersuchung der Substratbindung und Decarboxylierung erfolgte mittels $^1\text{H-NMR}$ -Intermediatanalyse und erbrachte weitere Indizien für die Halbseitenreaktivität auf. In einem Experiment mit Methylacetylphosphonat als nicht decarboxylierbares Substratanalogon konnten auch nach langer Reaktionszeit maximal 50 % des Cofaktors in Form von 2-Phosphonolaktyl-ThDP detektiert werden.

Auch bei den Experimenten zum Umsatz des physiologischen Substrats Pyruvat konnten, wie bereits erwähnt, zwei kinetisch nicht-äquivalente Enzymfraktionen unterschieden werden, die jeweils ca. 50 % der eingesetzten aktiven Zentren ausmachten. In diesem Fall arbeitete das aktive Zentrum um den Faktor 80 schneller als das ruhende Zentrum. Der Vergleich der Geschwindigkeitskonstanten der C2-Ionisierung ($k_{\text{obs}}^{\text{ThDP}2} = 0.02 \text{ s}^{-1}$) und C-C-Bindungsbildung ($k_{1B}' = 0.03 \text{ s}^{-1}$) des langsamen aktiven Zentrums zeigt, dass die Cofaktoraktivierung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt für dieses Zentrum ist. Für den Umsatz Pyruvat konnte, im Gegensatz zu der Bindung von MAP, ein kovalentes Intermediat (HETHDP) in der langsamen Seite detektiert werden. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass die Bindung von MAP in der ruhenden Seite sehr viel langsamer als der Zerfall des Michaelis-Komplexes ist. Zudem führt die Decarboxylierung von LThDP nach der Theorie des Protonenkanals zur Aktivierung des zweiten aktiven Zentrums, wodurch die Detektion der Intermediate in beiden katalytischen Zentren zu erklären ist. Deshalb spricht die Detektion von 50 % PLThDP für die Hypothese des Protonentransfers.

Die symmetrische Verteilung der Intermediate konnte bisher für kein weiteres ThDP-Enzym gezeigt werden. Weder Pyruvatdecarboxylase aus *Zymomonas mobilis*, Transketolase aus Hefe noch Indolpyruvatdecarboxylase aus *Enterobacter cloacae* zeigen ein vergleichbares Verhalten (Tittmann et al. 2003; Tittmann et al. 2005; Schütz et al. 2005). Für die Transketolase aus *Saccharomyces cerevisiae* konnten zudem strukturelle Daten die Theorie des Protonenkanals ausschließen. In den Kristallstrukturen wurden sowohl Substrate als auch Substratanaloga in beiden aktiven Seiten mit fast vollständigem Besetzungsgrad gefunden (Fiedler et al. 2002). Man kann demnach davon ausgehen, dass diese Enzyme keine Halbseitenreaktivität zeigen.

Ein weiteres Indiz für die Halbseitenreaktivität der humanen E1-Komponente lieferten die $^1\text{H-NMR}$ -Experimente in Anwesenheit der Lipoyldomäne *hsPDH-E2LII*. Nach Einstellung des Gleichgewichts wurden sowohl unsubstituiertes ThDP als auch HETHDP in einem äquimolaren Verhältnis detektiert. Basierend auf den Ergebnissen der Intermediatanalyse der isolierten *hsPDH-E1* mit Pyruvat wurde ein vollständiger Umsatz zu HETHDP erwartet. Das Resultat lässt sich wie folgt interpretieren: Nicht nur die Bindung und der Umsatz von Pyruvat sondern auch die reduktive Acetylierung des Lipoamidarms der E2-Komponente unterliegt einer Halbseitenreaktivität. Dabei könnte das Eintreten eines oxidierten Lipoamidarms in ein aktives Zentrum, das sich auf der Reaktionsstufe des HETHDP befindet, die Freisetzung des Produkts in Form des reduktiv acetylierten Lipoamidarms in dem korrespondierenden aktiven Zentrum auslösen. Im Gleichgewicht (nach 5 minütiger Reaktion)

liegen bereits alle Lipoyldomänen reaktiv acetyliert vor. Demnach steht kein oxidiertes Lipoamidarm zur Verfügung, um die Freisetzung reaktiv acetylierter Lipoyldomänen auszulösen. Diese aktiven Zentren sind blockiert, so dass deren ThDP kein Pyruvat zu HEThDP umsetzen kann (Fraktion an unsubstituiertem ThDP). In den anderen 50 % der aktiven Zentren bleibt die Reaktion ebenfalls aufgrund fehlender oxidiertes Lipoyldomänen auf der Reaktionsstufe des HEThDP stehen. Voraussetzung dieser Hypothese ist eine strukturelle Änderung während der Reaktion, die mit der jeweiligen Stufe des katalytischen Umsatzes korreliert. Diese könnte durch den Flip-Flop-Mechanismus erklärt werden. Ein weiteres Indiz für konformationelle Änderungen während der Katalyse der *hs*PDH-E1 liefern die in dieser Arbeit ermittelten Resultate der Röntgenkleinwinkelstreuung. So zeigte sich, dass die E1-Komponente im Komplex mit ThDP einen deutlich größeren Gyrationradius hat als das Enzym im Komplex mit Thiaminthiazolondiphosphat. Dieses Cofaktoranalogon ist ein Surrogat für die Enaminform des HEThDP-Intermediats. Die Differenz im Gyrationradius bei gleichbleibendem Molekulargewicht deutet auf konformationelle Unterschiede der beiden Enzymspezies hin.

Die Untersuchung des kinetischen Verhaltens der humanen E1-Komponente belegte eindeutig eine Halbseitenreaktivität. Es konnten sowohl Indizien für das Vorhandensein des Protonenkanals als auch für den Flip-Flop-Mechanismus gefunden werden. Es ist demnach denkbar, dass sowohl Protonentransfer als auch konformationelle Änderungen die Grundlage für den alternierenden Mechanismus der E1-Reaktion darstellen. Diese Form der Aktiven-Zentren-Kommunikation in den E1-Komponenten von α -Ketosäure-Dehydrogenase-Komplexen trägt möglicherweise zur optimalen Reaktionsfolge der Gesamtkomplexe bei. Ein wichtiges Beispiel dafür ist die Inaktivierung des PDH-Komplexes durch Phosphorylierung. Die Phosphorylierung eines Serinrestes bzw. einer α -Untereinheit reicht aus, um den Gesamtkomplex zu inaktivieren (Yeaman et al. 1978; Sugden und Randle 1978). Dadurch wird energetisch betrachtet nur ein ATP-Molekül verbraucht. Dies ist für den Organismus eine höchst effektive und energiesparende Möglichkeit der Regulation. Dieser Mechanismus ist nur durch die Halbseitenreaktivität realisierbar. Dass die Kommunikation der aktiven Zentren in E1-Komponenten von α -Ketosäure-Dehydrogenase-Komplexen für die Reaktion der isolierten E1 nicht zwingend notwendig ist, zeigte eine Studie der Arbeitsgruppe um CHUANG. Zum einen wurde gezeigt, dass die Aminosäuren, die sich im Protonenkanal der humanen E1-Komponente des BCKDC befinden vor allem strukturell stabilisierende Funktionen haben. Zum anderen zeigte ein künstlich generiertes Hybrid-Heterotetramer aus einer inaktiven (S293Q, Imitation der Phosphorylierung) und einer aktiven (Wildtyp) α -Untereinheit bestehend 40 % Restaktivität im Gesamtkomplex (Li et al. 2007). Diese Daten widerlegen im Grunde nicht, dass sich die E1-Komponenten der α -Ketosäure-Dehydrogenase-Komplexe nach dem Mechanismus der Halbseitenreaktivität verhalten. Sie bestätigen vielmehr die Komplexität der Reaktivität der E1-Komponente, eingebettet in den Multienzymkomplex.

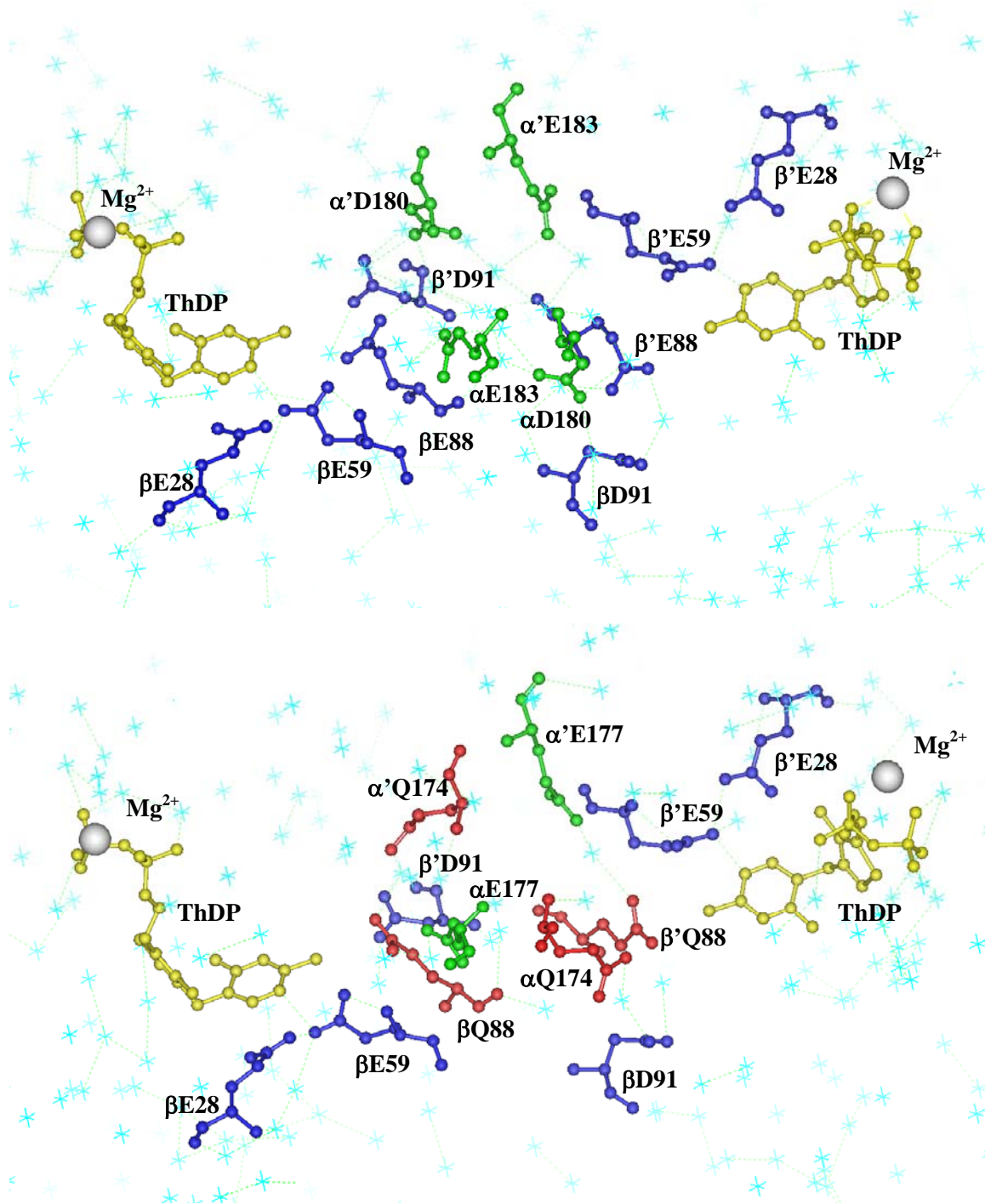


Abb. 3.51. Vergleich der Aminosäurereste des Protonenkanals für die E1-Komponente des PDHc aus *Bacillus stearothermophilus* (oben) und der humanen E1-Komponente (unten). Zwölf negative geladene Reste, die wahrscheinlich in den Protonentransfer involviert sind, sind in der *Bacillus stearothermophilus* E1-Struktur gezeigt. Die korrespondierenden Reste in der humanen E1-Struktur sind dargestellt. Die konservierten Reste beider Strukturen in den α- und α'-Untereinheiten sind grün und in den β- und β'-Untereinheiten dunkelblau dargestellt. Vier der zwölf Reste sind in der humanen Struktur durch nicht geladene Reste ersetzt. Diese sind rot dargestellt (in α, α', β, und β'). ThDP ist gelb und die Magnesiumionen sind als weiße Kugeln abgebildet. Wasserstoffbrücken sind ebenfalls angezeigt. (Entnommen aus Seifert et al. 2006, basierend auf den PDB-Dateien 1NI4 and 1W85).

Ein weiteres interessantes Thema der ThDP-Forschung ist die Untersuchung des tautomeren Zustandes des Cofaktors auf den verschiedenen Reaktionsstufen (Abb. 3.3). Für verschiedene ThDP-Enzyme konnten Absorptions- und CD-spektroskopische Banden in Abhängigkeit vom Reaktionszustand des Cofaktors detektiert werden (Nemeria et al. 2009). Charakteristisch für die 4'-aminotautomere Form (AP) des ThDP ist eine CD-Bande bei ca. 330 nm, für die 1',4'-iminotautomere Form (IP) eine Bande bei 290-305 nm. Die protonierte 4'-aminotautomere Form (APH^+) zeigt kein detektierbares charakteristisches CD-Signal im Bereich von 280-370 nm. Die entsprechenden Nah-UV-CD-Experimente mit der *hsPDH-E1* ergaben folgendes Bild: Die charakteristische Bande der AP-Form konnte durch Vergleich der Spektren von Apo- und Holoform des Enzym detektiert werden. Nach der Reaktion mit Pyruvat konnte keine charakteristische Bande im CD-Spektrum nachgewiesen werden. Da HETHDP das Endprodukt der isolierten E1-Reaktion ist, spricht dieses Ergebnis dafür, dass sich der Cofaktor auf der Stufe des HETHDP in seiner APH^+ -Form befindet. Die Arbeitsgruppe um JORDAN schlägt ebenfalls vor, dass der Cofaktor auf dieser Reaktionsstufe entweder in der AP- oder in der APH^+ -Form vorliegt (Nemeria et al. 2009).

Die Bandenstruktur für die Reaktion der isolierten *hsPDH-E1* mit Pyruvat wurde in einem *stopped-flow*-Experiment mit Photodioden-array untersucht. Zum einen wurde das Verschwinden der charakteristischen Bande für die AP-Form des Holoenzym bei einer Wellenlänge von 330 nm gezeigt. Zum anderen bildete sich mit Verlauf der Reaktion ein neues Absorptionssignal bei 373 nm, das der Bildung des HETHDP zugeordnet werden kann. Die apparenten Geschwindigkeitskonstanten des Signalabnahme bei 330 nm ($k_{\text{obs}} = 2.02 \text{ s}^{-1}$) und der Signalbildung bei 373 nm ($k_{\text{obs}} = 3.33 \text{ s}^{-1}$) sind nahezu identisch mit der Geschwindigkeitskonstante für die C-C-Bindungsbildung von 2.3 s^{-1} bestimmt durch ^1H -NMR-Intermediatanalyse. Es ist folglich davon auszugehen, dass es sich um den gleichen chemischen Prozess handelt. Diese für HETHDP charakteristische Absorptionsbande konnte auch für die Variante E473Q der PDC aus *Zymomonas mobilis* gezeigt werden (Meyer 2009). Der Nachweis der 1',4'-iminotautomeren Form des ThDP gelang durch die Verwendung des Pyruvatanalogs Methylacetylphosphonat (Jordan et al. 2003). Durch die nichtspaltbare C_α -P-Bindung bleibt die Reaktion auf der Stufe des 2-Phosphonolaktyl-ThDP (PLThDP) stehen (Abb. 3.4). Dass die *hsPDH-E1* in der Lage ist MAP zu binden, konnte durch die ^1H -NMR-Intermediatanalyse bestätigt werden. In Nah-UV-CD-Experimenten wurde MAP zur Holoform der *hsPDH-E1* titriert. Die AP-Bande bei 330 nm verschwand und es bildete sich die charakteristische IP-Bande im Wellenlängenbereich von 290 nm. Durch die Titration konnte die thermodynamische Dissoziationskonstante des Substratanalogs bestimmt werden. Der K_{app} -Wert von $46 \mu\text{M}$ stimmt mit den apparenten K_{M} -Werten für die Bindung von Pyruvat überein (Tab. 3.7). Zusätzlich wurde die Bindung von MAP in *stopped-flow*-Experimenten bei einer Wellenlänge von 295 nm charakterisiert. Es zeigte sich eine lineare Abhängigkeit der apparenten Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten von der MAP-Konzentration. Das bedeutet, dass die verwendeten MAP-Konzentrationen für die Bildung des Michaelis-Komplexes noch nicht sättigend sind. Dennoch stellt MAP ein gutes Substratanalogon dar, um die Bindungsreaktion von Pyruvat zu verstehen.

Die Gesamtreaktion der *hsPDH-E1* setzt sich aus der Bindung und Decarboxylierung von Pyruvat sowie der reduktiven Acetylierung des Lipoamidarms der humanen E2-Komponente zusammen. Die anschließenden Schritte der PDHc-Reaktion setzen sich aus der Bildung von Acetyl-CoA (E2) und der oxidativen Regeneration der E2-Komponente (E3) zusammen. Für den Gesamtkomplex des humanen Organismus konnten *in vitro* Katalysekonstanten von 50-70 s⁻¹ bestimmt werden. Im Gegensatz dazu zeigte sich, dass die Katalysekonstante der isolierten humanen E1-Reaktion immer um ein bis zwei Größenordnungen kleiner ist als die des gesamten humanen PDHc (Liu et al. 2001; Korotchikina und Patel 2001a).

Auch die in dieser Arbeit mit ¹H-NMR-Intermediatanalyse ermittelten Daten bestätigen dieses Phänomen. Wichtig ist in diesem Zusammenhang, dass die Cofaktoaktivierung ($k_{\text{obs}}^{\text{ThDP1}} = 51 \text{ s}^{-1}$) in der *hsPDH-E1* die Geschwindigkeitskonstante der Gesamtreaktion realisieren könnte. Die Bindung und Decarboxylierung von Pyruvat hingegen verläuft mit 2.3 s⁻¹ bzw. 5.1 s⁻¹ deutlich langsamer (Tab. 3.7). Die E1-Komponente katalysiert jedoch die ersten Schritte der Gesamtreaktion und ist somit die geschwindigkeitsbestimmende Komponente. Die Betrachtung dieser Verhältnismäßigkeit wirft demnach die Frage auf, wie die Beschleunigung der E1-Reaktion im Gesamtkomplex realisiert wird.

Als geeignetes Modellsystem diente in vielen verschiedenen Studien die Verwendung der Lipoyldomänen der E2-Komponente (Bleile et al. 1981; Graham et al. 1989; Liu et al. 2001). Zu den Zielstellungen dieser Arbeit gehörten die Produktion der humanen Lipoyldomäne 2 (*hsPDH-E2LII*, AS 121-233) mit Hilfe des SUMO-Expressionssystems, die biochemische Charakterisierung der Domäne und die Charakterisierung der reduktiven Acetylierungsreaktion der *hsPDH-E1* durch Entwicklung neuer Aktivitätstests. Desweiteren sollte ein Beitrag zum Verständnis des molekularen Mechanismus der reduktiven Acetylierungsreaktion geleistet werden.

Der Vorteil der SUMO-*tags* im Vergleich zu bisher genutzten Systemen, wie His-*tag* oder GST-*tag* (Liu et al. 1995a) ist die Generierung der nativen Aminosäuresequenz mit authentischem N-Terminus (Marblestone et al. 2006). Die *hsPDH-E2LII* wurde zur Homogenität präpariert. Die korrekte Proteinsequenz, das Molekulargewicht, die Sekundärstruktur, die korrekte Faltung und der Lipoylierungsgrad konnten durch Anwendung verschiedener biochemischer Methoden bestätigt werden.

Die absorptive Eigenschaft des oxidierten Dithiolanrings (Barltrop et al. 1954) wurde als Sonde für die Entwicklung eines Aktivitätstests für die reduktive Acetylierung genutzt. Bei einer Wellenlänge von 333 nm konnte die reduktive Acetylierung der *hsPDH-E2LII* durch die humane E1-Komponente direkt und kontinuierlich verfolgt werden. In verschiedenen experimentellen Ansätzen wurde die Reaktion UV/Vis-spektroskopisch analysiert. In allen Fällen wurde ein relativ hoher K_M -Wert von 3-4 mM für die Lipoyldomäne bestimmt. Auch die Untersuchung der Protein-Protein-Wechselwirkung der *hsPDH-E1* und der humanen Lipoyldomäne 2 mittels isothermaler Titrationskalorimetrie zeigten keine Wechselwirkungen zwischen diesen Proteinen. Diese Resultate waren überraschend, da in früheren Studien für die Wechselwirkung zwischen Lipoyldomänen und E1-Komponenten verschiedener Organismen K_M -Werte zwischen 30 und 100 μM bestimmt werden konnten (Packman et al. 1984; Graham et al. 1989; Liu et al. 2001). Als Aktivitätstest wurde in diesen Studien ein diskontinuierlicher Radioaktivitäts-*assay* eingesetzt. Ein interessanter Unterschied, der in

diesen Arbeiten beschrieben wurde, ist, dass die Wechselwirkung zwischen E1-Komponente und Lipoyldomäne unter *turnover*-Bedingungen deutlich stärker war als im nicht-reaktiven Zustand. Die Dissoziationskonstante der Protein-Protein-Interaktion war entweder um den Faktor 10 größer als die ermittelten K_M -Werte (Graham und Perham 1990) oder nicht detektierbar (Liu et al. 2001). Die Interpretation beruht zum einen darauf, dass die Geschwindigkeitskonstante für die reduktive Acetylierung der Lipoyldomäne, ausgehend vom HETHDP (Carbanion/Enamin) und dessen Freisetzung, einen Einfluss auf den apparenten K_M -Wert der Lipoyldomänen hat. Zum anderen wird vorgeschlagen, dass die Katalyse durch intrinsische Wechselwirkungsenergien getrieben wird. Die Ursache für die Diskrepanz zwischen den Literaturdaten und den in dieser Arbeit erhobenen Daten lag in der Auswahl der Reaktionsbedingungen. Es zeigte sich, dass in den veröffentlichten Experimenten die KCl-Konzentration deutlich unter der in dieser Arbeit eingesetzten Konzentration lag. In Kontrollexperimenten wurde die KCl-Konzentration reduziert. Der so bestimmte K_M -Wert der *hsPDH-E2LII* näherte sich mit einem Wert von ca. 350 μM den Werten der Literatur deutlich an (Tab. 3.6). In Anschlussexperimenten könnten die Bedingungen verfeinert werden, um die Literaturdaten mit dem kontinuierlichen Absorptions-*assay* zu reproduzieren. Der Einfluss der KCl-Konzentration wurde durch die Experimente zur Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen *hsPDH-E1* und *hsPDH-E2LII* bestätigt. Die bei niedriger KCl-Konzentration ermittelten Resultate der Experimente mit Röntgenkleinwinkelstreuung deuten auf eine Assoziation der Proteine hin. Die Reduktion der KCl-Konzentration führt jedoch zu einer höheren Aggregationsanfälligkeit der *hsPDH-E1*.

Ein wichtiges Ergebnis zum Verständnis der Reaktivität der *hsPDH-E1* sind die bestimmten apparenten Geschwindigkeitskonstanten für die reduktive Acetylierungsreaktion. Mit maximalen Werten von 5-7 s^{-1} liegen sie in der Größenordnung der Geschwindigkeitskonstanten (2,3 s^{-1}) der C-C-Bindungsbildung zwischen dem reaktiven C2 des ThDP und dem Carbonylkohlenstoff des Pyruvats (Tab. 3.7). Es kommt zwar zu einer leichten Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit, die Beschleunigung um den Faktor 30, die notwendig wäre, um die *hsPDHc*-Geschwindigkeitskonstante von 50-70 s^{-1} zu realisieren, wird jedoch nicht erreicht. Diese Ergebnisse stimmen gut mit den Beobachtungen der Gruppe um ROCHE zum humanen PDHc überein (Liu et al. 2001). Mechanistisch bedeuten diese Ergebnisse, dass die Bindung und Decarboxylierung von Pyruvat die geschwindigkeitsbestimmenden Schritte der Gesamtkatalyse der *hsPDH-E1* sind. Bestätigt wurde das Resultat zusätzlich durch die ^1H -Intermediatanalyse der *hsPDH-E1*-Reaktion in Anwesenheit von Pyruvat und *hsPDH-E2LII* unter *steady-state*-Bedingungen (Reaktionszeit 2 s). Unsubstituiertes ThDP stellt den größten Anteil der Intermediatverteilung. LThDP und HETHDP machen nur einige Prozent aus. Das spricht dafür, dass sobald HETHDP entsteht, die C2-Einheit in Form eines Acetylrestes auf den Lipoamidarm der Lipoyldomäne übertragen wird.

Die Verifizierung des neu etablierten Aktivitätstests für die reduktive Acetylierung erfolgte mit Hilfe eines diskontinuierlichen massenspektroskopischen *assays* bestätigt. Dieser *assay* beruht auf dem durch MALDI-MS detektierbaren Massenunterschied von 44 Da zwischen der oxidierten und reduktiv acetylierten Lipoyldomäne (Wei et al. 2003). Durch Anwendung der Methode des Säure-*quenching* mit Ameisensäure konnte der Aktivitätstest im Rahmen dieser

Arbeit etabliert werden. Die Aussagen der MALDI-MS-Ergebnisse sind jedoch eher qualitativ und nicht für die Bestimmung verlässlicher kinetischer Konstanten geeignet.

Für die reduktive Acetylierung werden zwei Reaktionswege vorgeschlagen (Kluger und Tittmann 2008; Tittmann 2009) (Abb 3.5): ein Carbanion/Enamin-Mechanismus und ein schrittweiser Redox/Acyl-Transfer.

Die Frage zum molekularen Reaktionsweg der reduktiven Acetylierung wurde in zwei experimentellen Ansätzen untersucht. Von Interesse war, ob das Reaktionsintermediat AcThDP während der Reaktion zwischen *hsPDH-E1*, Pyruvat und *hsPDH-E2LII* gebildet wird. Dieses Intermediat wurde bereits für den PDH-Komplex aus *E. coli* detektiert und wird als Indiz für den schrittweisen Mechanismus angesehen (Flournoy und Frey 1986; Kluger und Tittmann 2008). Das AcThDP konnte unter den gewählten Bedingungen für die beschriebene Reaktion nicht detektiert werden. Dieser Befund schließt jedoch nicht ultimativ aus, dass dieses Intermediat nicht durchlaufen wird. Vergleichbare Experimente mit dem vollständigen *hsPDHc* könnten Aufschluss über diese Fragestellung geben.

Der schrittweise Redox/Acyl-Transfer könnte durch einen radikalischen Übergang realisiert werden (Tittmann 2009). Für das Thiylradikal der Liponsäure wurden 1972 Absorptionseigenschaften (Signal bei 385/410 nm) beschrieben (Hoffman und Hayon 1972). In einem *stopped-flow*-Experiment mit Photodioden-*array* konnte gezeigt werden, dass in den relevanten Wellenlängenbereichen keine Absorptionsänderung detektierbar war. Daher ist ein radikalischer Übergang nicht nachweisbar.

Im Rahmen dieser Arbeit gelang es nicht, das E2-Konstrukt der Lipoyldomäne 2 und der E1-Bindedomäne zu generieren. Die Bindung der E1-Komponente an den PDH-Komplex wird im humanen System durch die E1-Bindedomäne vermittelt (Korotchkina und Patel 2008). Die Untersuchungen der Reaktion zwischen der *hsPDH-E1* und diesem aus den zwei inneren Domänen der humanen E2-Komponente bestehenden Protein mit den in dieser Arbeit verwendeten und neu entwickelten Experimenten würde in Zukunft einen weiteren Beitrag zu dem Verständnis der Gesamtreaktion der *hsPDH-E1* leisten und möglicherweise die Frage nach der Beschleunigung der E1-Katalyse beantworten.

Tabelle 3.7. Übersicht der kinetischen und thermodynamischen Konstanten der *hsPDH-E1*-Reaktion.

Kinetische und thermodynamische Konstanten der Reaktion		<i>hsPDH-E1</i>
ThDP-Bindung	K_D (μM) ^a	0.47
	K_M (μM) (E1 isoliert) ^b	10
	K_M (μM) (E1 und E2LII) ^c	2.03
	K_M (μM) (E1 im PDHc) ^d	0.08
C2-Ionisierung	aktive Seite, $k_{\text{obs}}^{\text{ThDP1}}$ (s^{-1}) ^e	51
	ruhende Seite, $k_{\text{obs}}^{\text{ThDP2}}$ (s^{-1}) ^e	0.018
Substratbindung	K_M Pyruvat (μM) (E1 isoliert) ^b	10
	K_M Pyruvat (μM) (E1 im PDHc) ^d	52
	k_{eff} MAP ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) ^f	60
	k_{-1} MAP (s^{-1}) ^f	0.0027
	K_D MAP (μM) (kinetisch)	45
	K_{app} MAP (μM) (thermodynamisch) ^g	46
C-C-Bindungsbildung (LThDP-Bildung)	aktive Seite, k_{1A}' (s^{-1}) ^e	2.3
	ruhende Seite, k_{1B}' (s^{-1}) ^e	0.029
Decarboxylierung (HThDP-Bildung)	aktive Seite, k_{2A}' (s^{-1}) ^e	5.1
	ruhende Seite, k_{2B}' (s^{-1}) ^e	$\gg k_{1B}$
reduktive Acetylierung der <i>hsPDH-E2LII</i>	k_{cat} (s^{-1}) (0.3 M KCl) ^c	7.08
	k_{cat} (s^{-1}) (0.00125 M KCl) ^c	5.36
	K_M E2LII (mM) (0.3 M KCl) ^c	3.16
	K_M E2LII (mM) (0.00125 M KCl) ^c	0.35
reduktive Acetylierung im <i>hsPDHc</i>	k_{cat} (s^{-1}) ^d	68

Die Daten wurden mittels ^a Fluoreszenz-assay (Kreß 2003), ^b DCPIP-assay, ^c UV/Vis-assay für die reduktive Acetylierung, ^d PDHc-assay durch NADH-Verbrauch (Korotchkina und Patel 2001a), ^e rapid-quench-flow-¹H-NMR, ^f stopped-flow-assay, ^g CD-Titration bestimmt. Die *hsPDH-E2LII* wird in der Tabelle mit E2LII abgekürzt.

3.2. Untersuchung der Regulation der *hsPDH-E1* durch Phosphorylierung mit Hilfe von Pseudophosphorylierungs-Varianten – Einleitung

Der Abschnitt zur Regulation des PDH-Komplexes in der Einführung der vorliegenden Arbeit befasst sich unter anderem mit der Regulation der *hsPDH-E1* durch Phosphorylierung (Kap. 1.1.2.). Die Phosphorylierung von Proteinen ist eine post-translationale Modifikation, die in eukaryotischen Zellen eine effektive Regulation ermöglicht. Proteinkinasen können die Hydroxylgruppen der Aminosäuren Serin, Tyrosin und Threonin durch Veresterung mit einem Phosphatrest unter physiologischen Bedingungen phosphorylieren. Eine Phosphatase katalysiert die Dephosphorylierung durch Hydrolyse. Nach der Einführung eines Phosphatrestes wird sowohl die Größe, als auch die Ladung an der Phosphorylierungsstelle verändert. Dadurch können die strukturellen und kinetischen Eigenschaften von Enzymen verändert und somit Stoffwechselwege gezielt reguliert werden. Das Auftreten mehrere Phosphorylierungsstellen in einem Protein ist ein allgemeines Prinzip. Es ermöglicht der Zelle eine vielschichtige Regulation. Zudem bieten proteinspezifische Kinasen und Phosphatasen weitere *targets* einer in Signalkaskaden strukturierten, hierarchischen Regulation (Roach 1991; Stryer 1996). Der Austausch eines phosphorylierbaren Restes durch einen Glutamatrest kann die Phosphorylierung an dieser Position imitieren. Sowohl die Größe des Restes als auch die negative Ladung werden durch einen Glutamatrest gewährleistet (Golbik et al. 2001; Korotchkina und Patel 2001a). Der Vorteil der sogenannten Pseudophosphorylierung besteht darin, dass die Einführung der Modifikation bereits während der Proteinexpression erfolgt. Die nachträgliche positionsspezifische Phosphorylierung durch eine entsprechende Kinase und deren Abtrennung kann somit umgangen werden.

Die α -Untereinheit der humanen E1-Komponente besitzt drei phosphorylierbare Serinreste (Abb. 3.51). Die Phosphorylierung jedes Restes führt zur Inaktivierung des *hsPDHc*. Initiale Forschungsarbeiten mit der E1-Komponente aus Rinderherz und -niere zeigten, dass die Geschwindigkeitskonstanten der Kinasen für die individuellen Phosphorylierungspositionen differieren. Die vollständige funktionelle Inaktivierung des PDHc geht mit der Phosphorylierung des Serinrestes, der sich im humanen System an Position 264 befindet, einher (Yeaman et al. 1978). Für die humane E1-Komponente konnte folgende Hierarchie der Phosphorylierungspositionen aufgestellt werden $S264 > S271 > S203$. S264 wird als Phosphorylierungsposition 1, S271 als Position 2 und S203 als Position 3 bezeichnet (Korotchkina und Patel 1995). In der Studie mit der humanen E1-Komponente konnte entsprechend den vorherigen Experimenten gezeigt werden, dass die Geschwindigkeit der Inaktivierung des *hsPDHc* durch Phosphorylierung davon abhängig ist, welches Serin phosphoryliert wird. Während die Phosphorylierung an Position 1 innerhalb von 10 min zur vollständigen Inaktivierung führte, hatte der *hsPDHc* unter gleichen Reaktionsbedingungen noch eine Restaktivität von 50 % bzw. 70 %, wenn ausschließlich Position 2 bzw. 3 phosphoryliert werden konnten (Anmerkung: Es wurde mit Doppel-Alanin-Varianten an den jeweils anderen Positionen gearbeitet) (Korotchkina und Patel 1995).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der molekulare Mechanismus der Inhibierung durch Phosphorylierung der drei regulatorischen Serinreste S264, S271 und S203 mittels

verschiedener thermodynamischer und kinetischer Experimente durch Verwendung der entsprechenden Glutamatvarianten weiterführend charakterisiert werden.

Die Plasmide, die die Gene für die einzelnen Pseudophosphorylierungs-Varianten (S264E, S264Q, S271E und S203E) tragen, wurden freundlicherweise von Professor M.S. PATEL zur Verfügung gestellt. Die Expression und Reinigung der Varianten erfolgte analog zum Wildtyp der *hsPDH-E1* mit vergleichbaren Ausbeuten (Kap. 2.2.3.). Zu allen vier Pseudophosphorylierungs-Varianten (S264E, S264Q, S271E und S203E) wurden Experimente zum Oligomergleichgewicht mittels analytischer Ultrazentrifugation und Röntgenkleinwinkelstreuung durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Studien entsprachen denen des Wildtyps der *hsPDH-E1*. Aus diesem Grund gehen diese Resultate nicht in den Ergebnis- und Diskussionsteil ein. Die entsprechenden Abbildungen befinden sich im Anhang (Abb. A2 und A3).

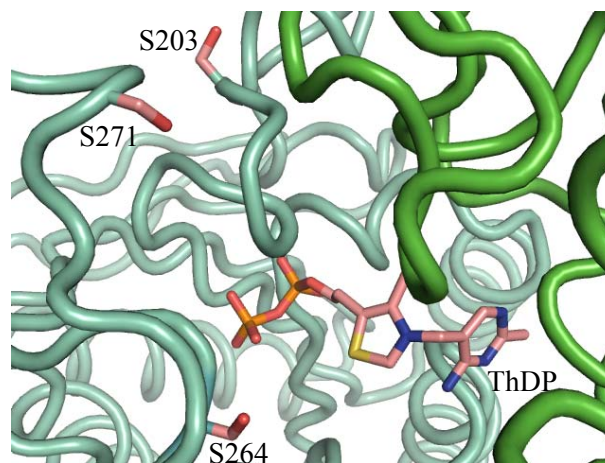


Abb. 3.51. Position der drei regulatorischen Serinreste (*sticks*) in der Struktur der *hsPDH-E1* (*cartoon tubes*). Die α -Untereinheit ist hellblau und die β' -Untereinheit ist grün dargestellt (PDB-Datei 1NI4, erstellt mit dem Computerprogramm *pymol*).

3.2.1. Pseudophosphorylierungs-Varianten S264E und S264Q

Detaillierte Einblicke in den Mechanismus der Regulation durch Phosphorylierung an Position 264 sollten durch Untersuchungen mit den beiden entsprechenden Pseudophosphorylierungs-Varianten S264E und S264Q erhalten werden. Die Verwendung der Glutamat- und der Glutaminvariante ermöglichte neben der Charakterisierung der Größe des Restes an Position 264 auch die Untersuchung des Einflusses der Ladung (E – geladen, Q – ungeladen). Wie bereits beschrieben führt die Phosphorylierung an Position 264 zur schnellen und vollständigen Inaktivierung des humanen PDH-Komplexes. Im Vergleich zur Phosphorylierung der beiden anderen regulatorischen Serinreste ist die Modifikation am Serin 264 am effektivsten und wird daher als Position 1 bezeichnet (s.o.).

Erste Studien mit den Varianten S264E und S264Q zeigten, dass sie gute Surrogate für die an Position 1 phosphorylierte *hsPDH-E1* darstellen (Korotchkina und Patel 2001a). Während die Mutation S264E im humanen PDHc zum vollständigen Aktivitätsverlust führt, konnte für die Variante S264Q eine Restaktivität von 3 % bestimmt werden. Die Variante S264E verhält

sich funktionell entsprechend dem phosphorylierten Enzym. Im artifiziellen DCPIP-Test, der als Aktivitäts-*assay* für die Decarboxylierungsreaktion verwendet wird (Kap. 2.2.5.5.), zeigten die Varianten hingegen beachtliche Restaktivitäten (S264E – 90 %, S264Q – 60 %). Der apparente K_M -Wert für Pyruvat im DCPIP-Test war bei den Varianten leicht erhöht (S264E – Faktor 4.5, S264Q – Faktor 2.6), die apparenten K_M -Werte für ThDP waren kaum beeinflusst. Aus diesen Ergebnissen schlussfolgerten die Autoren, dass hauptsächlich die reduktive Acetylierungsreaktion durch die Modifikation an Position 264 beeinträchtigt ist. Die Interpretation der Resultate des DCPIP-Tests ist im Hinblick auf die E1-Komponente jedoch sehr kritisch zu beurteilen. In den $^1\text{H-NMR}$ -Experimenten zur Katalyse des Wildtyps der *hsPDH-E1* wurde für die Geschwindigkeitskonstante der C-C-Bindungsbildung ein Wert von 2.3 s^{-1} und für die Decarboxylierung des LThDP eine Geschwindigkeitskonstante von 5.1 s^{-1} bestimmt (Kap. 3.1.1.3.). Im Test für die reduktive Acetylierung konnte ein k_{cat} von etwa 7 s^{-1} bestimmt werden. Diese Werte wurden im DCPIP-Test mit den entsprechenden Enzymfraktionen nicht annähernd erreicht ($k_{\text{cat}} = 0.08 \text{ s}^{-1}$ (Seifert 2005; Seifert et al. 2006)). Demzufolge scheint nicht die Bildung des HETHDP, sondern vielmehr der Elektronentransfer vom HETHDP auf den Elektronenakzeptor DCPIP und/oder die Hydrolyse des dabei gebildeten AcThDP die geschwindigkeitsbestimmenden Schritte des Tests zu sein. Die intrinsische Katalysegeschwindigkeit ist demzufolge kinetisch maskiert. In DCPIP-Experimenten mit den beiden Pseudophosphorylierungs-Varianten S264E und S264Q wurden ähnliche Konstanten bestimmt, wie in der Literatur beschrieben (Korotchkina und Patel 2001a; Seifert 2005). Serin 264 liegt am Eingang 14 Angström langen Substratkanal in der *hsPDH-E1* (Abb. 3.52). Daraus ergibt sich die Hypothese, dass die Phosphorylierung den Substratkanal blockiert und somit bereits die erste Halbreaktion der *hsPDH-E1*-Katalyse, die Bindung des Substrats Pyruvat, gestört wird (Abb. 3.4). Die Untersuchung der Pseudophosphorylierungs-Varianten S264E und S264Q unter Verwendung kinetischer und thermodynamischer Methoden zur Charakterisierung der *hsPDH-E1* (Kap. 3.1.) und der entsprechende Vergleich mit den Resultaten des Wildtyps sollte die Frage nach dem Mechanismus der Regulation durch eine Phosphorylierung an Position 264 klären.

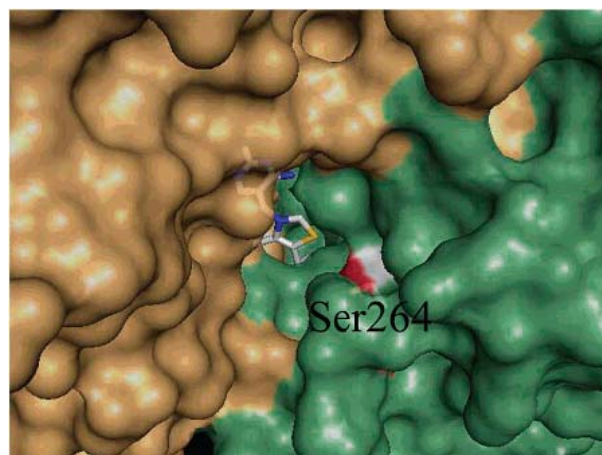


Abb. 3.52. Blick in den Substratkanal der *hsPDH-E1*. Transparente Darstellung der Oberfläche der E1-Struktur mit Markierung von ThDP (*sticks*) und Serin 264. Die α -Untereinheit ist grün und die β' -Untereinheit beige dargestellt. Entnommen aus Seifert et al. 2007.

3.2.1.1. ThDP-Bindung

Der erste Schritt zu einem funktionellen Enzym *in vitro* ist im Fall der *hsPDH-E1* die Bindung des Cofaktors ThDP. Für die *hsPDH-E1*-Varianten S264E und S264Q wurde die Bindung von ThDP zum einen durch einen fluorimetrischen *assay* und zum anderen durch die Bestimmung des apparenten K_M -Wertes im artifiziellen DCPIP-Test charakterisiert. Obwohl der DCPIP-Test keine verlässlichen mechanistischen Aussagen der nativen Reaktion erlaubt (Kap. 3.2.1.), so ist doch unter Bedingungen der Substratsättigung die Aktivität im DCPIP-Test proportional zur Anzahl der rekombinierten aktiven Zentren. Daher eignet sich dieser Test zur Bestimmung des apparenten K_M -Wertes von ThDP an die humane E1-Komponente und deren Varianten (Abb. 3.53 links). Der fluoreszenzspektroskopische *assay* beruht auf der Fluoreszenzlöschung der Tryptophanfluoreszenz durch die Bindung von ThDP (Ali et al. 1995). Er ermöglicht die Bestimmung der Dissoziationskonstante des Cofaktors im nicht-reaktiven Zustand. In einem dritten experimentellen Ansatz sollte die ThDP-Bindung im UV/Vis-Aktivitätstest der reduktiven Acetylierung (Kap. 3.1.2.4.) für die Variante S264Q untersucht werden. Die Restaktivität dieser Variante lag im Vergleich zum Wildtyp bei ca. 1-2 % (siehe unten Kap. 3.2.1.4.). Aufgrund der geringen maximalen Aktivität war die Auswertung der Progresskurven, bei denen die ThDP-Konzentration kleiner als 100 μM gewählt wurde, nicht möglich. Die k_{obs} -Werte der einfach exponentiellen Anpassung der Progresskurven sind im Konzentrationsbereich von 100-750 μM ThDP nahezu konstant (Abb. 3.53 rechts). Es kann demzufolge davon ausgegangen werden, dass die Variante S264Q bereits mit ThDP gesättigt war und der apparente K_M -Wert für ThDP und die Variante S264Q deutlich unter 100 μM liegt. Die ThDP-Bindung der Variante S264E konnte in diesem *assay* nicht analysiert werden, da sie keine reduktive Acetylierungsaktivität mit der humanen Lipoyldomäne 2 zeigte (siehe unten Kap. 3.2.1.4.). Der Vergleich aller Daten zur Bindung von ThDP an den Wildtyp und an die Varianten S264E und S264Q der *hsPDH-E1* deutet darauf hin, dass die Varianten ThDP sowohl im nicht-reaktiven Zustand als auch unter *turnover*-Bedingungen ähnlich fest wie das Wildtyp-Protein binden.

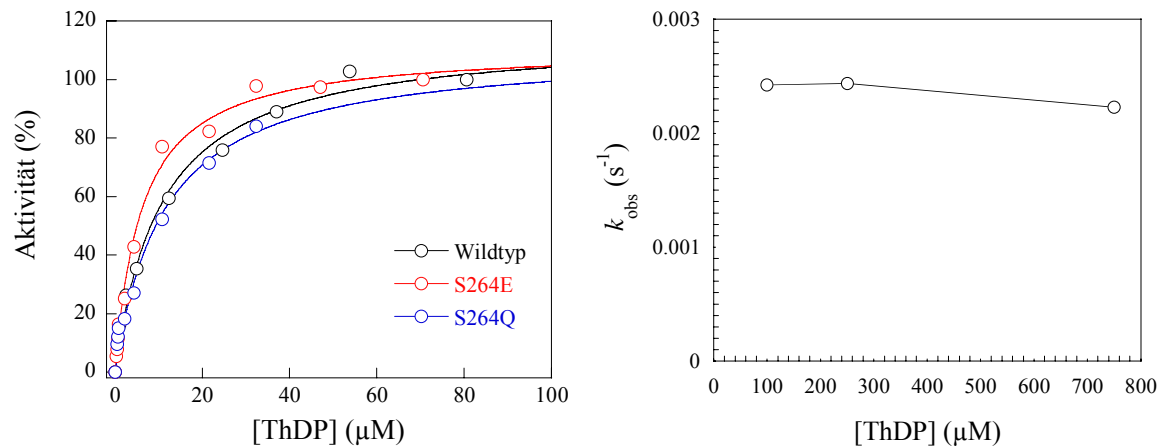


Abb. 3.53. Links: Vergleich der Abhängigkeit der Aktivität von der ThDP-Konzentration im DCPIP-Test, 100 % entspricht der spezifischen Aktivität von 59 U/g für den Wildtyp, 47 U/g für die Variante S264E und 51 U/g für die Variante S264Q. Bedingungen: 0.2 mg/ml (2.6 μM aktive Zentren) *hsPDH-E1* Wildtyp/S264E/S264Q, 1 mM MgSO₄, 5 mM Pyruvat, 0.1 M KPP, 0.3 M KCl, pH 7.6, T = 30 °C. Rechts: Abhängigkeit des k_{obs} -Wertes von der ThDP-Konzentration im UV/Vis-Test für die reduktive Acetylierung der Variante S264Q. Bedingungen: 2 mg/ml (6.25.9 μM aktive Zentren) *hsPDH-E1* S264Q, 0.35 mM *hsPDH-E2LII*, 1 mM MgSO₄, 10 mM Pyruvat, 0.1 M KPP, 0.3 M KCl, pH 7.6, T = 30 °C.

Tabelle 3.8. Dissoziationskonstanten der ThDP-Bindung für *hsPDH-E1*-Varianten.

Konstante	Wildtyp	S264E	S264Q
K_D (μM) ^a	0.47 ¹	0.92 ¹	0.74 ²
K_M (μM) ^b	10.61 ± 1.57	6.07 ± 0.62	11.22 ± 2.61
K_M (μM) ^c	2.02 ± 0.32	nicht bestimmbar	<< 100

^a Fluoreszenz-assay, ^b DCPIP-Test, ^c UV/Vis-assay für die reduktive Acetylierung.

¹ aus (Kreß 2003), ² aus (Seifert 2005).

3.2.1.2. C2-Ionisierung

Die Voraussetzung für die Pyruvatbindung ist die Aktivierung des Cofaktors ThDP in der *hsPDH-E1* (Abb. 3.3). In einem entsprechenden H/D-Austauschexperiment wurde untersucht, ob die C2-Ionisierung in den Varianten S264E und S264Q im Vergleich zum Wildtyp beeinflusst ist (Abb. 3.54).

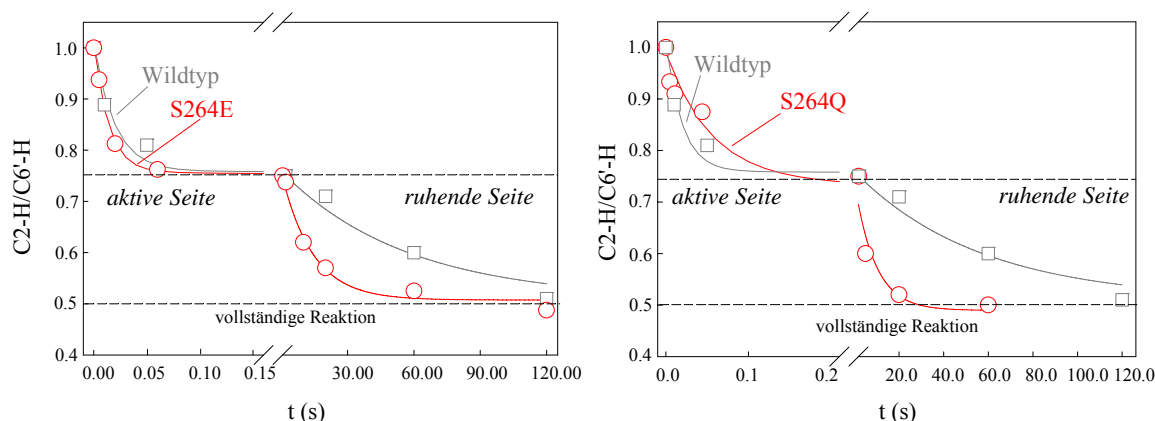


Abb. 3.54. Zeitliche Abhängigkeit der integralen Intensität des C2-H-Signals von ThDP gebunden an die Varianten S264E (links, $-\circ-$) und S264Q (rechts, $-\circ-$) im Vergleich zum Wildtyp der *hsPDH-E1* ($-\square-$). Bedingungen nach 1+1-Mischung mit 99.9 % D_2O : 7.75 mg/ml/7.06 mg/ml/6.06 mg/ml (100.65/91.64/78.68 μM aktive Zentren) *hsPDH-E1* Wildtyp/S264E/S264Q, äquimolare Konzentration an ThDP, 1 mM $MgSO_4$, Puffer der Lösung vor 1+1-Mischung: 0.1 M KPP, 0.3 M KCl, pH 7.6, $T = 30^\circ C$.

Der kinetische Verlauf des H/D-Austauschs beider Varianten verhält sich entsprechend einer Halbseitenreaktivität. Aus diesem Grund konnte die Auswertung der Experimente nach Gl. 3.9 (Kap. 3.1.1.3) erfolgen. Die Geschwindigkeitskonstante der C2-Ionisierung ist im Falle der Variante S264E gegenüber dem Wildtyp leicht erhöht und im Falle der Variante S264Q etwas verringert (Tab. 3.9). Die Ionisierungsgeschwindigkeit ist durch den Aminosäureaustausch an Position 264 nicht wesentlich beeinträchtigt.

Tabelle 3.9. Mikroskopische Geschwindigkeitskonstanten der C2-Ionisierung der *hsPDH-E1*-Varianten.

Geschwindigkeitskonstante der C2-Ionisierung	Wildtyp	S264E	S264Q
aktive Seite, $k_{obs}^{E-ThDP1}$ (s^{-1})	51 ± 15	71 ± 10	18 ± 9
ruhende Seite, $k_{obs}^{E-ThDP2}$ (s^{-1})	0.018 ± 0.005	0.071 ± 0.009	0.11 ± 0.056

3.2.1.3. Substratbindung und Decarboxylierung

Nachdem gezeigt werden konnte, dass weder die ThDP-Bindung noch die Aktivierung des Cofaktors durch die Pseudophosphorylierung an Position 264 beeinträchtigt sind, wurden die Carbonyladdition und die Decarboxylierung des LThDP untersucht. Zur Analyse dieses Sachverhaltes standen verschiedene Methoden zur Verfügung.

- **¹H-NMR-Intermediatanalyse**

Zunächst wurde die Bildung und Decarboxylierung von LThDP in beiden Varianten mit Hilfe der *chemical-quenched-flow*/¹H-NMR-Intermediatanalyse untersucht (Tittmann et al. 2003) (Abb. 3.55). Die Bildung der Intermediate ist durch eine charakteristische Zweiphasigkeit geprägt. Die relativen Amplituden beider Phasen für die HEThDP-Bildung betragen ca. 50 %. Die Pyruvatbindung und der Umsatz verlaufen demzufolge entsprechend der für die *hsPDH-E1* charakteristischen Halbseitenreaktivität. Weder für die *hsPDH-E1 S264E* noch für die Variante *S264Q* konnte das Intermediat LThDP detektiert werden. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass die Decarboxylierungsreaktion während der Bildung von HEThDP deutlich schneller als die C-C-Bindungsbildung (Bildung von LThDP) verläuft (Tab. 3.10). Die Auswertung für die Verteilung von HEThDP erfolgte nach Gl. 3.12. Für beide Pseudophosphorylierungs-Varianten wurden Geschwindigkeitskonstanten für die C-C-Bindungsbildung bestimmt, die um den Faktor 70-100 kleiner sind als der entsprechende Wert des Wildtypenzym. Die Daten sind in Tabelle 3.10 zusammengefasst.

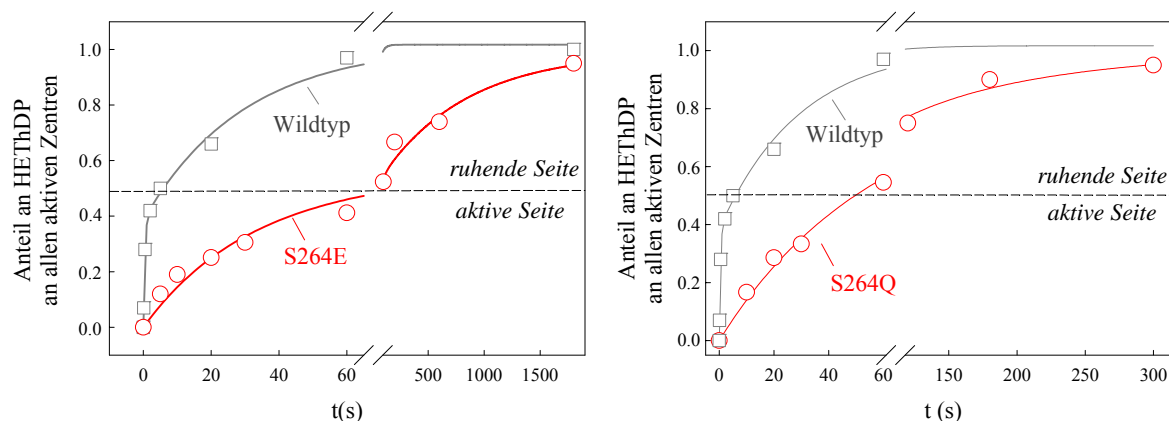


Abb. 3.55. Zeitliche Abhängigkeit der HETHDP-Bildung der Varianten S264E (links, $\text{--}\circ\text{--}$) und S264Q (rechts, $\text{--}\circ\text{--}$) im Vergleich mit dem Wildtyp der *hsPDH-E1* ($\text{--}\square\text{--}$). Bedingungen: 7.75 mg/ml/7.06 mg/ml/6.06 mg/ml (100.65/91.64/78.68 μM aktive Zentren) *hsPDH-E1* Wildtyp/S264E/S264Q, äquimolare Konzentration an ThDP, 1 mM MgSO_4 , 25 mM/30 mM Pyruvat (Wildtyp/Varianten), 0.1 M KPP, 0.3 M KCl, pH 7.6, $T = 30^\circ\text{C}$.

Tabelle 3.10. Mikroskopische Geschwindigkeitskonstanten des Pyruvatumsatzes der *hsPDH-E1*-Varianten.

Mikroskopische Geschwindigkeitskonstante		Wildtyp	S264E	S264Q
LThDP-Bildung (C-C-Bindungsbildung),	aktive Seite, k_{1A}' (s^{-1})	2.3 ± 0.5	0.033 ± 0.009	0.023 ± 0.002
	ruhende Seite, k_{1B}' (s^{-1})	0.029 ± 0.005	0.0013 ± 0.0009	0.008 ± 0.0008
LThDP-Decarboxylierung (HETHDP-Bildung),	aktive Seite, k_{2A}' (s^{-1})	5.1 ± 1.3	$\gg k_{1A}'$	$\gg k_{1A}'$
	ruhende Seite, k_{2B}' (s^{-1})	$\gg k_{1B}$	$\gg k_{1B}'$	$\gg k_{1B}'$

Die Ergebnisse der ^1H -NMR-Intermediatanalyse bestätigen die Hypothese, dass die Pseudophosphorylierung der *hsPDH-E1* an Position 264 die Bindung des Substrats behindert. Eine Aussage über den Einfluss auf die Decarboxylierungsreaktion kann anhand dieser Ergebnisse nicht getroffen werden. Aus diesem Grund wurde ein ^1H -NMR-Experiment angeschlossen, bei dem die HETHDP-Bildung in Abhängigkeit von der Pyruvatkonzentration für die Variante S264E analysiert wurde (Abb. 3.56). Die Daten zeigten, dass die berechnete Geschwindigkeitskonstante auch bei hohen Pyruvatkonzentrationen von dieser linear abhängig blieb. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt im isolierten Wildtyp ist die C-C-Bindungsbildung. In den Varianten S264E und S264Q ist dieser Schritt deutlich (Faktor von ca. 100) verlangsamt.

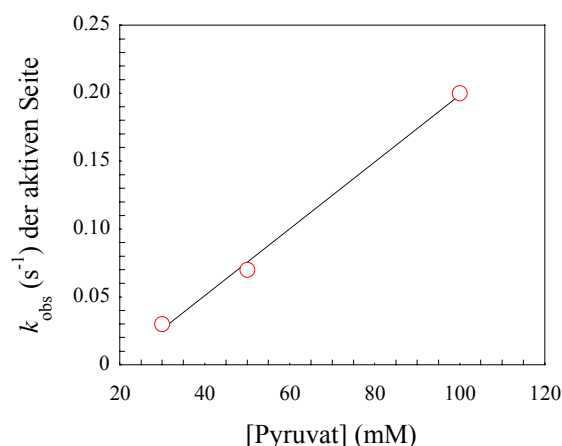
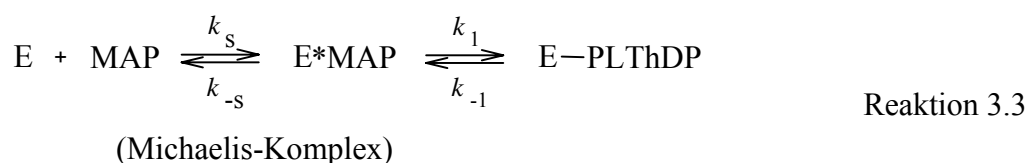


Abb. 3.56. Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten der schnellen Seite für die HETHDP-Bildung der *hsPDH-E1*-Variante S264E (—○—) von der Pyruvatkonzentration. Bedingungen: 7.06 mg/ml (91.64 μM aktive Zentren) *hsPDH-E1* S264E, äquimolare Konzentration an ThDP, 1 mM MgSO_4 , 0.1 M KPP, 0.3 M KCl, pH 7.6, $T = 30^\circ\text{C}$.

- **Thermodynamische und kinetische Untersuchungen mit dem Substratanalogon Methylacetylphosphonat**

In Kapitel 3.1.1.6. wird beschrieben, dass das Pyruvatanalogon Methylacetylphosphonat eingesetzt werden kann, um Rückschlüsse auf die Bindung des nativen Substrats an die *hsPDH-E1* zu ziehen. Durch die nichtspaltbare $\text{C}_\alpha\text{-P}$ -Bindung bleibt die Reaktion nach der kovalenten Bindung auf der Reaktionsstufe des PLThDP (ein Analogon des LThDP) stehen (Abb. 3.4). Die Bildung dieser ThDP-Spezies geht mit der Entstehung der 1',4'-iminotautomeren Form des ThDP einher (Abb. 3.20). Dieses Tautomer zeigt in *hsPDH-E1* sowohl ein Nah-UV-CD-Signal, als auch eine Absorptionsbande zwischen 290 und 305 nm (Seifert et al. 2006).

Zur genauen Charakterisierung der Substratbindung in den Pseudophosphorylierungsvarianten S264E und S264Q wurden die für den Wildtyp in Kapitel 3.1.1.6. beschriebenen Methoden genutzt. Um das Verständnis der Auswertung zu erleichtern, wird an dieser Stelle die Reaktion der *hsPDH-E1* mit MAP durch noch einmal durch das Minimalmodell dargestellt:



(mit $K_s = \frac{k_{-s}}{k_s}$ und $K_1 = \frac{k_{-1}}{k_1}$, siehe auch Mathematischer Appendix A1 im Anhang)

○ CD-Spektroskopie

In einem Titrationsexperiment wurde das Substratanalogon MAP zu der jeweiligen Enzymvariante in Anwesenheit (Daten nicht gezeigt) und Abwesenheit der *hsPDH-E2LII* titriert und die Bildung des PLThDP-Signals (IP-Form des ThDP) im Nah-UV-CD verfolgt. Anschließend wurde das Signal gegen die MAP-Konzentration aufgetragen und die Daten nach einer hyperbolischen Funktion angepasst (Abb. 3.57).

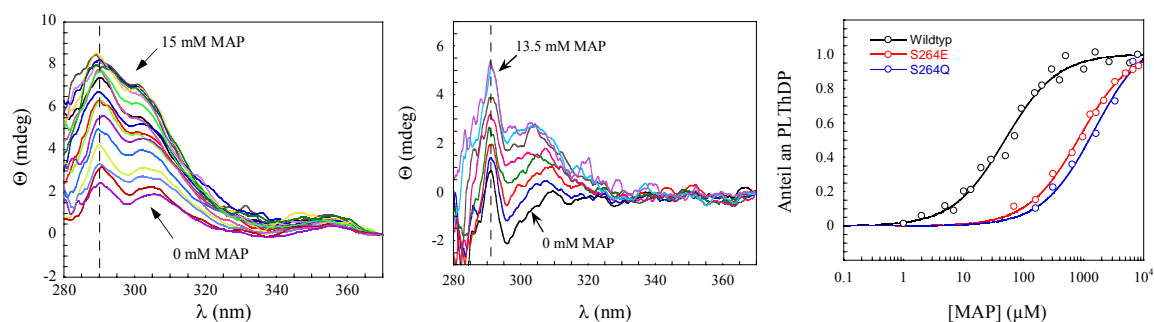


Abb. 3.57. Bindung von MAP an die *hsPDH-E1*-Varianten S264E und S264Q. Links: CD-Spektren der Titration der Variante S264E. Mitte: CD-Spektren der Titration der Variante S264Q. Rechts: Normierte MAP-Bindungskurven für den Wildtyp, S264E und S264Q. Bedingungen: 2 mg/ml (26 μ M aktive Zentren) *hsPDH-E1* Wildtyp und Varianten, 0.1 mM ThDP, 5 mM $MgSO_4$, 0.1 M KPP, 0.3 M KCl, pH 7.6, T = 20 °C.

Tabelle 3.11. Dissoziationskonstanten der MAP-Bindung der *hsPDH-E1*-Varianten.

Konstante	Wildtyp	S264E	S264Q
K_{app} (μ M)	46 ± 4	941 ± 70	1513 ± 181
K_{app} (μ M) in Anwesenheit der <i>hsPDH-E2LII</i> *	72 ± 13	2617 ± 316	1294 ± 189

*Die Konzentration der *hsPDH-E2LII* wurde äquimolar zur Konzentration der aktiven Zentren der *hsPDH-E1* gewählt.

Der Vergleich der thermodynamisch bestimmten Dissoziationskonstanten der Varianten mit dem Wildtyp zeigt, dass die Bindung von MAP in *hsPDH-E1* S264E und S264Q stark beeinträchtigt ist. Dies ist mit der Annahme im Einklang, dass die Pseudophosphorylierung die Bindung von Substraten und Substratanaloga behindert. Auch hierfür könnte die verminderte Zugänglichkeit des aktiven Zentrums ausschlaggebend sein. In Gegenwart der *hsPDH-E2-LII* nimmt der K_{app} -Wert von MAP für den Wildtyp und die Variante S264E zu. Dies kann in geringfügiger Inhibition durch Konkurrenz um den Eintritt in den Substratkanal begründet sein. Der K_{app} -Wert für MAP der Variante S264Q scheint durch die Anwesenheit der Lipoyldomäne nicht beeinflusst zu sein.

○ Absorptionsspektroskopie

Für beide Pseudophosphorylierungs-Varianten konnte in Analogie zum Wildtyp im Bereich von 280-320 nm eine Absorptionsbande detektiert werden, die mit dem CD-Signal korrespondiert (Abb. 3.58). Diese Absorptionsbande eignet sich, wie für den Wildtyp beschrieben, als Signal für kinetische Studien

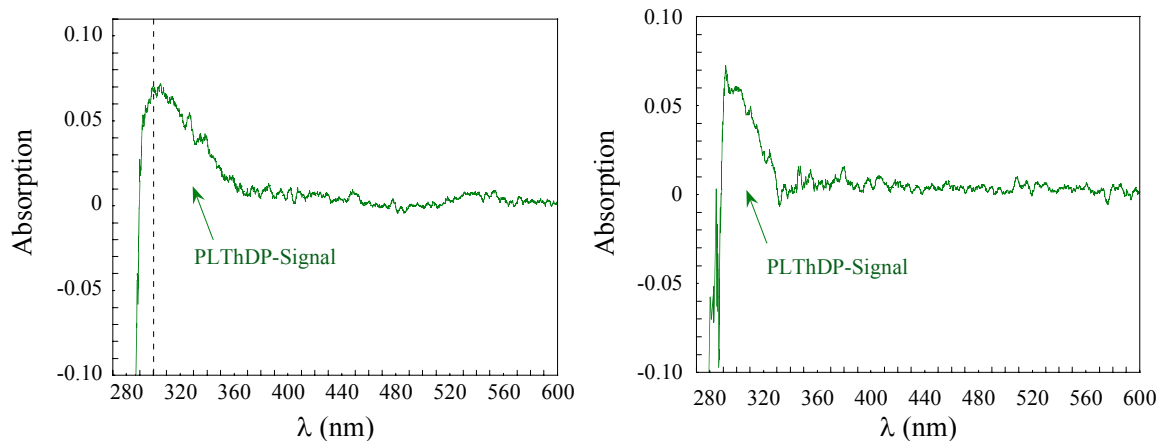


Abb. 3.58. Differenzspektren der *hsPDH-E1*-Varianten S264E (links) und S264Q (rechts) nach Bindung von MAP (—). Bedingungen: 4 mg/ml (52 μ M aktive Zentren) *hsPDH-E1*-Varianten, 0.5 mM ThDP, 1 mM $MgSO_4$, 10 mM MAP, $t = 15$ min, 0.1 M KPP, 0.3 M KCl, pH 7.6, $T = 30$ °C.

○ *stopped-flow*

Bei einer Wellenlänge von 295 nm wurden für die Pseudophosphorylierungs-Varianten S264E und S264Q analog zum Wildtyp der *hsPDH-E1* *stopped-flow*-Kinetiken für die Bildung des PLThDP-Signals (IP-Form des ThDP) bei verschiedenen MAP-Konzentrationen aufgenommen (Abb. 3.59).

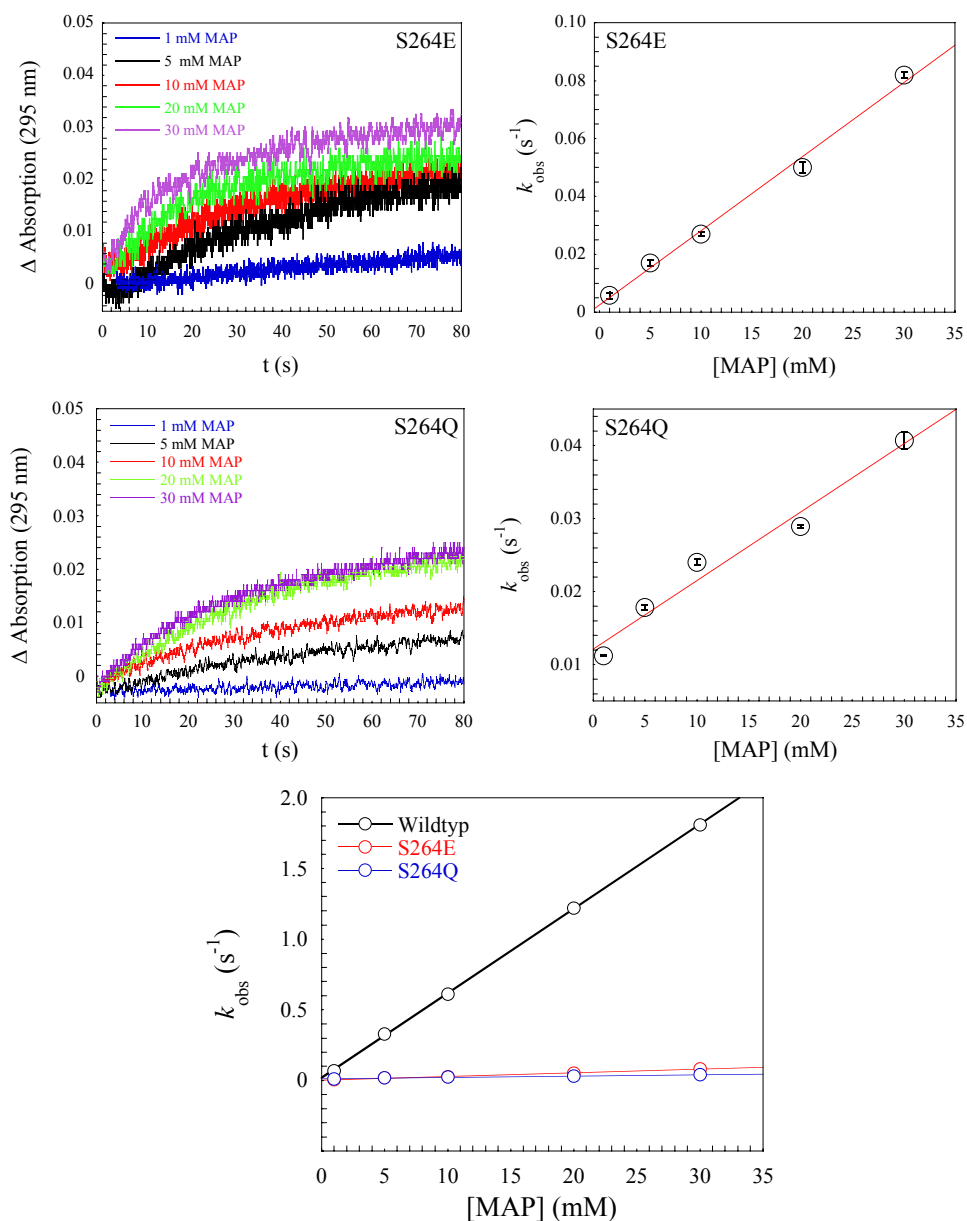


Abb. 3.59. Links: *stopped-flow*-Kinetiken der Bindung von MAP an *hsPDH-E1* S264E (oben) und S264Q (Mitte) unter Bildung des stabilen Intermediatanalogons PLThDP (auf Startabsorption 0 normiert). Rechts: Abhängigkeit der k_{obs} -Werte von der MAP-Konzentration ($-\circ-$) für die Variante S264E (oben) und die Variante S264Q (Mitte), Fehlerbalken beziehen sich jeweils auf drei Messungen. Unten: Vergleich der Abhängigkeiten der k_{obs} -Werte von [MAP] für den Wildtyp und die Varianten. Bedingungen: 2 mg/ml (26 μM aktive Zentren) *hsPDH-E1* und Varianten, 0.25 mM ThDP, 0.5 mM MgSO_4 , 0.1 M KPP, 0.3 M KCl, pH 7.6, $T = 30^\circ\text{C}$.

Aus den Experimenten zur Reaktivität der *hsPDH-E1* war bekannt, dass nur eines der beiden aktiven Zentren in der Lage ist, MAP unter der Bildung von PLThDP zu binden (Kap. 3.1.1.3.). Die erhaltenen Kinetiken spiegeln demnach das Bindungsereignis in einem aktiven Zentrum wider. Basierend auf dieser Tatsache erfolgte die Auswertung der Daten mit einer einfach-exponentiellen Funktion. Anschließend wurden die bestimmten Geschwindigkeitskonstanten (k_{obs} -Werte) gegen die MAP-Konzentration aufgetragen (Gl. 3.17). Die Varianten zeigten in Analogie zum Wildtyp der *hsPDH-E1* eine lineare Abhängigkeit der k_{obs} -Werte von der MAP-Konzentration. Dieses Verhalten ermöglicht die Bestimmung der Konstanten k_{eff} und von k_{-1} (Gl. 3.19, siehe auch Mathematischer Appendix App2 im Anhang). Die kinetischen Konstanten sind im Vergleich mit dem Wildtyp-Enzym in Tabelle 3.12 zusammengefasst.

Tabelle 3.12. Kinetische Konstanten der Reaktion der *hsPDH-E1*-Varianten mit MAP.

Konstante	Wildtyp	S264E	S264Q
$k_{\text{eff}} (\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$	60 ± 1	2.5 ± 0.1	0.9 ± 0.1
$k_{-1} (\text{s}^{-1})$	0.0027 ± 0.0001	0.0025 ± 0.00001	0.012 ± 0.001
$K_{\text{D}} (\mu\text{M})$	45	1020	13300

Die Geschwindigkeitskonstanten für die MAP-Bindung der Pseudophosphorylierungs-Varianten sind um den Faktor 24 (S264E) bzw. 65 (S264Q) kleiner als die des Wildtyps. Die Glutamatvariante und der Wildtyp zeigen einen ähnlichen k_{-1} -Wert für die C-C-Bindungsspaltung. Für die Glutaminvariante ist dieser Wert vierfach erhöht. Die Daten deuten daraufhin, dass durch die Einführung einer Pseudophosphorylierung an Position 264 in der *hsPDH-E1* die Substratbindung stark beeinträchtigt ist. Dieses Ergebnis bekräftigt die Ergebnisse der ^1H -Intermediatanalyse mit dem nativen Substrat Pyruvat.

Die kinetisch bestimmten K_{D} -Werte (Gl. 3.18) des Wildtyps und der Variante S264E zeigen eine gute Übereinstimmung mit den thermodynamisch bestimmten Dissoziationskonstanten (K_{app} , Tab. 3.11). Im Fall der Variante S264Q ist die Abweichung aufgrund des erhöhten k_{-1} -Wertes etwas größer. Die Tendenz ist jedoch auch für diese Variante vergleichbar.

Die isolierten humanen E1-Varianten S264E (größerer und negativ geladener Rest) und S264Q (größerer Rest) zeigen ein ähnliches katalytisches Verhalten. Das lässt den Schluss zu, dass die Pyruvatbindung hauptsächlich sterisch und weniger durch die negative Ladung an Position 264 beeinträchtigt ist.

3.2.1.4. Untersuchung der reduktiven Acetylierung der Lipoyldomäne *hsPDH-E2LII*

- **Kontinuierlicher Test (UV/Vis-Absorptionsspektroskopie)**

Sowohl die phosphorylierte *hsPDH-E1* als auch Pseudophosphorylierungs-Variante S264E zeigen nach Rekombination mit dem humanen PDHc keine Aktivität. Die Variante S264Q hat eine Restaktivität von ca. 3 % (Korotchkina und Patel 2001a). Mit diesem Hintergrundwissen sollte das Verhalten der beiden Pseudophosphorylierungs-Varianten in der Reaktion mit der humanen Lipoyldomäne 2 untersucht werden. Zunächst wurde der im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Aktivitätstest für die reduktive Acetylierung angewandt.

Die Abbildung 3.60 zeigt die Progresskurve für die *hsPDH-E1*-Variante S264E im Test für die reduktive Acetylierung.

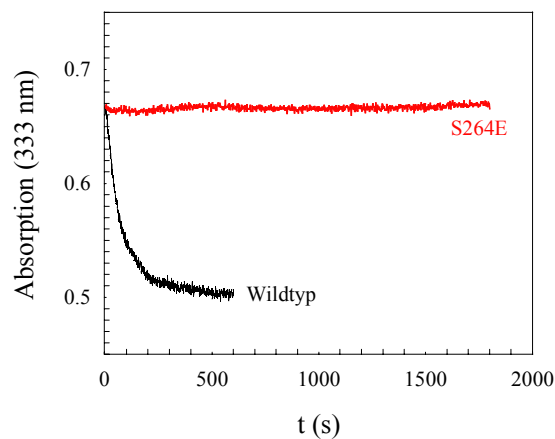


Abb. 3.60. Kinetik des Reaktionsverlaufs der Variante S264E im Vergleich zum Wildtyp im Aktivitätstest für die reduktive Acetylierung. Bedingungen: 1 mg/ml/0.5 mg/ml (13/6.5 μ M aktive Zentren) *hsPDH-E1* S264E/Wildtyp, 12.469 mg/ml (1 mM) *hsPDH-E2LII*, 0.25 mM ThDP, 1 mM $MgSO_4$, 10 mM Pyruvat, 0.1 M KPP, 0.3 M KCl, pH 7.6, T = 30 °C.

Diese Pseudophosphorylierungs-Variante weist keine Aktivität mit der *hsPDH-E2LII* als Substrat auf. Dieses Experiment bestätigt die Daten der Literatur und lässt die Schlussfolgerung zu, dass die reduktive Acetylierung durch die Phosphorylierung der *hsPDH-E1* an Position 264 vollständig unterbunden wird.

Für die Variante S264Q konnte für die reduktive Acetylierung der *hsPDH-E2LII* eine Restaktivität von 1 % im Vergleich zum Wildtypprotein bestimmt werden. Trotz dieser geringen spezifischen Aktivität im reduktiven Acetylierungs-*assay* wird ein grundlegender Unterschied zwischen den beiden Varianten deutlich. Analog zum Wildtypprotein wurde eine ν -S-Charakteristik der Lipoyldomäne als Substrat aufgenommen (Abb. 3.61). Die Auswertung erfolgte zum einen durch hyperbole Anpassung der Aktivitäten (Abb. 3.61 Mitte), zum anderen durch die Analyse der k_{obs} -Werte im linearen Bereich der ν -S-Charakteristik (Abb. 3.61 rechts).

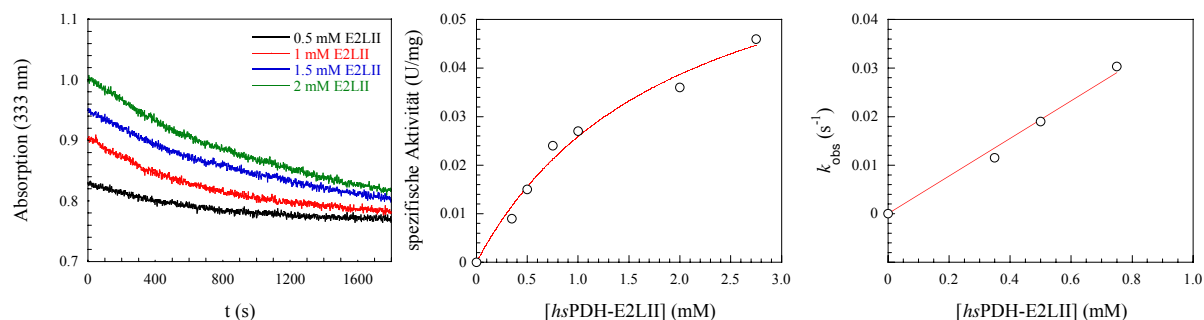


Abb. 3.61. Links: Progresskurven der reduktiven Acetylierung bei verschiedenen *hsPDH-E2LII*-Konzentrationen (in Abb. E2LII). Mitte: Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der Variante S264Q von der *hsPDH-E2LII*-Konzentration mit Anpassung an Gl. 3.22 (—○—). rechts: Abhängigkeit der k_{obs} -Werte der Variante S264Q von der *hsPDH-E2LII*-Konzentration mit linearer Anpassung (—○—); 2.0 mg/ml (26 μM aktive Zentren) *hsPDH-E1* S264Q, 0.25 mM ThDP, 1 mM MgSO_4 , 10 mM Pyruvat, 0.1 M KPP, 0.3 M KCl, pH 7.6, $T = 30^\circ\text{C}$.

Tabelle 3.13. Kinetische Parameter für die reduktive Acetylierung der Varianten der *hsPDH-E1* bei variierender *hsPDH-E2LII*-Konzentration.

Parameter	Wildtyp	S264Q
V_{max} (U/mg)	5.54 ± 0.71	0.076 ± 0.010
k_{cat} (s^{-1})	7.08 ± 0.89	0.098 ± 0.012
K_{M} (mM)	3.16 ± 0.61	1.95 ± 0.46
$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	2.24×10^3	0.05×10^3
$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) aus Bedingungen nach Reaktion 1. Ordnung	1.83×10^3	0.04×10^3

Betrachtet man die ermittelten Daten der Variante S264Q wird deutlich, dass der apparente K_{M} -Wert für die Bindung der *hsPDH-E2LII* mit dem Wildtyp vergleichbar ist. Die Wechselwirkung mit der Lipoyldomäne ist durch die Pseudophosphorylierung scheinbar nicht beeinträchtigt. Der k_{cat} -Wert hingegen ist um den Faktor 72 kleiner. Die Reaktionsgeschwindigkeit scheint, wie auch im Fall des Wildtyps, durch die Pyruvatbindung bestimmt zu sein. Dennoch ist bemerkenswert, dass die Glutaminvariante zur reduktiven Acetylierung befähigt ist. Während die gestörte Pyruvatbindung hauptsächlich durch die Größe des Restes an Position 264 hervorgerufen ist, wird der Acetyltransfer vom HEThDP der phosphorylierten E1-Komponente bzw. der Variante S264E auf das Lipoamid der E2-Komponente bzw. *hsPDH-E2LII* außer durch die sterische Behinderung auch durch elektrostatische Abstoßung blockiert. Als Wechselwirkungspartner für diese elektrostatische Abstoßung kommt das für die Wechselwirkung von E1-Komponente und Lipoyldomäne essentielle Aspartat 172 (Gong et al. 2000), das in der Lipoyldomäne N-terminal von dem lipoylierten Lysinrest liegt, in Frage.

- **Diskontinuierlicher Test (Massenspektrometrie)**

Zur Verifizierung der mittels UV/Vis-Absorptions-*assays* erhaltenen Daten für die reduktive Acetylierung wurde auch für die Varianten S264E und S264Q der diskontinuierliche massenspektroskopische Test durchgeführt (Abb. 3.62). Die Daten bestätigen, dass die Variante S264Q im Gegensatz zur Variante S264E in der Lage ist, die *hsPDH-E2LII* reduktiv zu acetylieren.

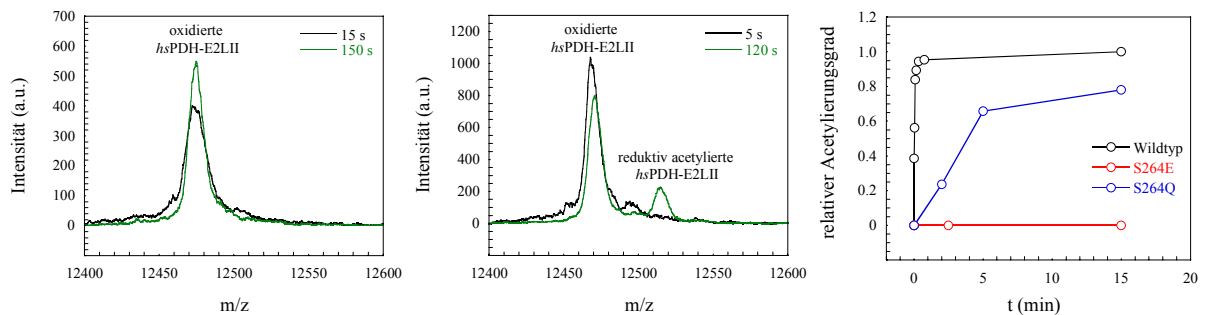


Abb. 3.62. Links: MALDI-Spektren bei 15 und 150 s der Acetylierungsreaktion der Variante S264E. Mitte: MS-Spektren bei 5 und 120 s der Acetylierungsreaktion der Variante S264Q. Rechts: Vergleich der zeitlichen Abhängigkeit des reduktiven Acetylierungsgrades der *hsPDH-E2LII* der Varianten S264E und S264Q mit dem Wildtyp der *hsPDH-E1*. Bedingungen: 7.5 mg/ml (97.4 μ M aktive Zentren) *hsPDH-E1*-Varianten, 1.214 mg/ml (97.4 μ M) *hsPDH-E2LII*, 0.25 mM ThDP, 0.5 mM MgSO_4 , 10 mM Pyruvat, 0.1 M KPP, 0.3 M KCl, pH 7.6, T = 30 °C.

3.2.1.5. Röntgenkristallstruktur der *hsPDH-E1*-Variante S264E und zusammenfassende Diskussion des Regulationsmechanismus der *hsPDH-E1* durch Phosphorylierung an Position 264

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit gelang der Arbeitsgruppe um Professor M.S. PATEL die Kristallisation und Strukturanalyse der Pseudophosphorylierungs-Variante S264E (Holoform, PDB-Datei 2OZL). Die Bedingungen zur Kristallisation und Strukturaufklärung sowie die entsprechenden kristallographischen Statistiken zur Datensammlung wurden in der gemeinsamen Publikation dokumentiert (Seifert et al. 2007).

In diesem Kapitel soll, basierend auf der strukturellen Analyse und den thermodynamischen und kinetischen Daten der Pseudophosphorylierungs-Varianten, ein möglicher Regulationsmechanismus vorgeschlagen werden.

Die Superposition der Strukturen von Wildtyp und Variante S264E der humanen E1-Komponente zeigt, dass es nahezu keine Unterschiede zwischen den beiden Enzymen hinsichtlich ihrer Tertiärstruktur gibt. Die 1380 C_α -Atome des Polypeptidrückgrats der vier Untereinheiten befinden sich in den Strukturen an äquivalenten Positionen. Die Variante weist insbesondere keine Veränderung der ThDP-Bindetasche bzw. des aktiven Zentrums gegenüber dem Wildtyp auf (Abb. 3.63). Die mittlere Abweichung (*root-mean-square-*

deviation) der C_{α} -Atome beträgt lediglich 0.57 Angström, was auf eine leichte Verschiebung der Domänen zueinander zurückzuführen ist.

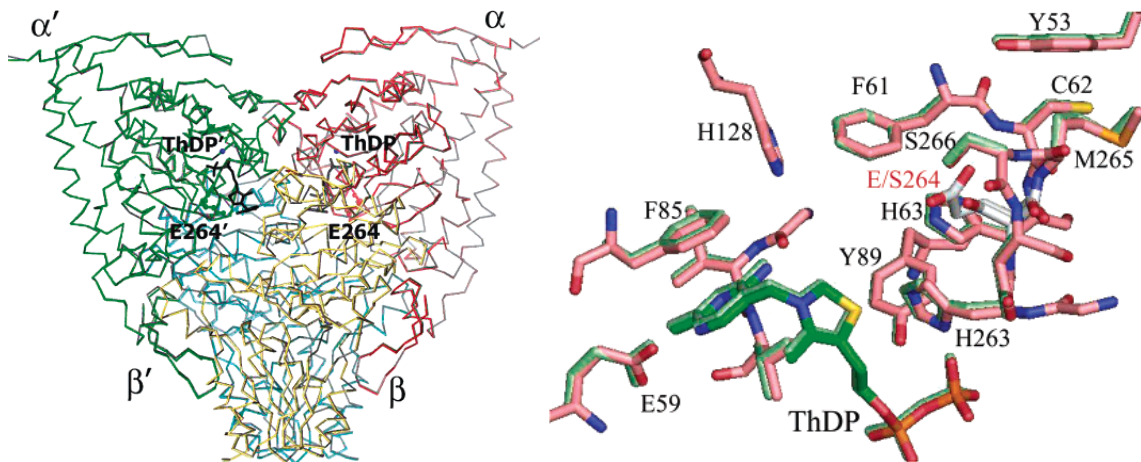


Abb. 3.63. Links: Superposition der Strukturen des Wildtyps (PDB-Datei 1NI4) und der Variante S264E (PDB-Datei 2OZL) der humanen E1-Komponente. Die C_{α} -Bindungen des Wildtyps sind schwarz dargestellt. Die Untereinheiten der Variante sind in verschiedenen Farben abgebildet. Die ThDP-Moleküle sind als *sticks*, die Mg^{2+} -Ionen und die Aminosäurereste E264 als *spheres* dargestellt. Rechts: Superposition der aktiven Zentren des Wildtyps (rosa) und der Variante S264E (grün). Sowohl ThDP als auch wichtige Aminosäurereste sind gezeigt. Der Rest an Position 264 ist weiß hervorgehoben. Entnommen aus Seifert et al. 2007.

Der Glutamatrest an Position 264 liegt auf einem α -helikalen *loop*, der die Aminosäurereste S246 bis T274 umfasst. Sowohl dieser *loop* als auch der Glutamatrest sind in der Struktur der S264E-Variante gut definiert. E264 geht Wasserstoffbrückenbindungen mit S266 und zwei benachbarten Wassermolekülen ein (Seifert et al. 2007). Durch die Einführung des Glutamatrestes in Position 264 wird der Substratkanal der *hsPDH-E1* deutlich enger und verändert das Ladungspotential in der Umgebung dieser Position, das negativer wird (Seifert et al. 2007). In Abbildung 3.64 werden der Substratkanal des Wildtyps und der Variante S264E der *hsPDH-E1* dargestellt.

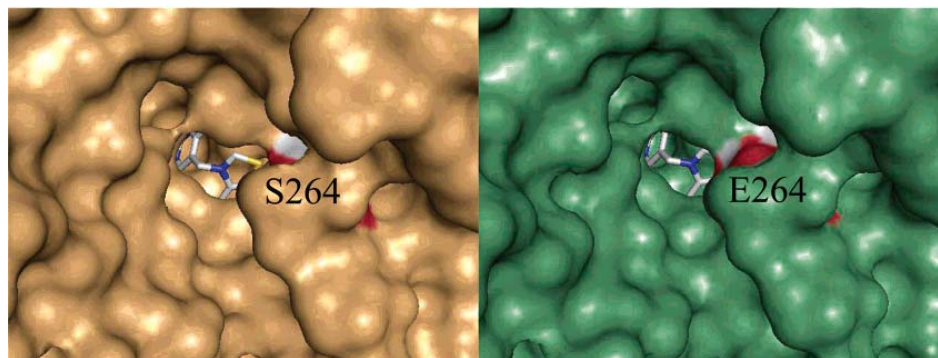


Abb. 3.64. Vergleich der Oberflächendarstellung der Substratkanäle des Wildtyps (links) und der Variante S264E (rechts). ThDP-Moleküle sind als *sticks* abgebildet. Der jeweilige Rest an Position 264 ist markiert. Entnommen aus Seifert et al. 2007.

Das Ergebnis der Strukturanalyse der Pseudophosphorylierungs-Variante S264E unterstützt die Ergebnisse aus den thermodynamischen und kinetischen Experimenten mit den *hsPDH*-E1-Varianten S264E und S264Q. Sowohl die Daten zur Bindung des Substratanalogons MAP als auch die Resultate mit dem nativen Substrat Pyruvat zeigen, dass hauptsächlich die Bindung des Substrats durch die Einführung der Pseudophosphorylierung an Position 264 beeinträchtigt ist. Die reduktive Acetylierungsreaktion wird durch die Einführung der negativen Ladung an Position 264 vollständig blockiert. Der Regulationsmechanismus durch die Phosphorylierung an Position 264 auf Basis der Ergebnisse mit Pseudophosphorylierungs-Varianten lässt sich durch das folgende Modell darstellen (Abb. 3.65):

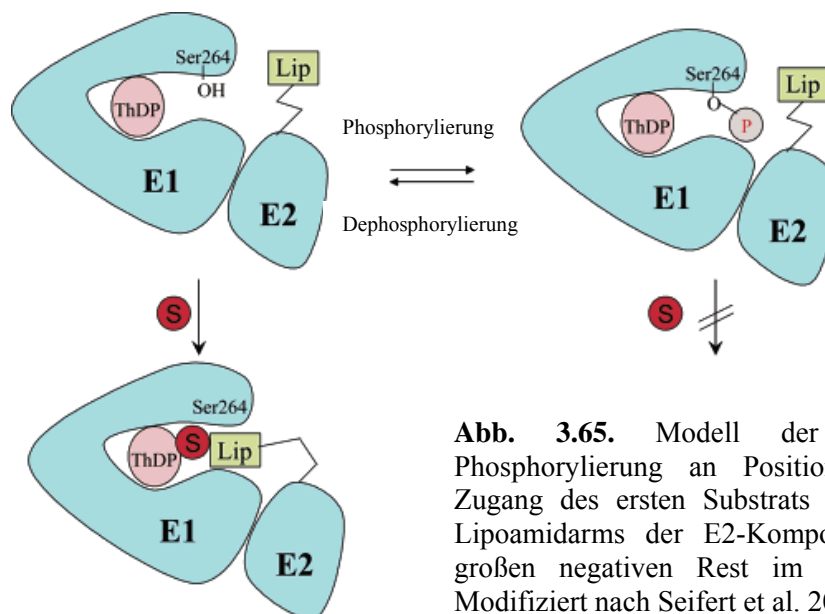


Abb. 3.65. Modell der Regulation durch Phosphorylierung an Position 264. Sowohl der Zugang des ersten Substrats Pyruvat als auch des Lipoamidarms der E2-Komponente ist durch den großen negativen Rest im Substratkanal gestört. Modifiziert nach Seifert et al. 2007.

2008 veröffentlichte die Arbeitsgruppe um CHUANG eine Arbeit, in der ein alternativer Mechanismus zur Regulation der humanen E1-Komponente durch Phosphorylierung des Serin 264 beschrieben wird (Kato et al. 2008). In dieser Arbeit wird eine Enzymvariante mit Alaninaustauschen an den Positionen 271 und 203 untersucht. Es wird gezeigt, dass sich diese als S1-E1p bezeichnete Variante funktionell wie der Wildtyp verhält. Den Autoren zufolge gelingt die vollständige Phosphorylierung der Variante durch die isolierte Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase 4 (PDK4). Bisher wurde die Phosphorylierung von E1-Komponenten in Anwesenheit der E2-Komponente durchgeführt, da die Aktivität der PDKs durch diese stimuliert wird. Dieses Vorgehen hatte jedoch stets zur Folge, dass nur eine α -Untereinheit phosphoryliert wird (Korotchkina und Patel 2001b). Die Gruppe um CHUANG hatte jedoch zuvor in einer anderen Veröffentlichung die E2-unabhängige Aktivität der PDK4 gezeigt (Wynn et al. 2008). In der Publikation zum Regulationsmechanismus gehen die Autoren demnach davon aus, dass beide α -Untereinheiten am S264 der S1-E1p-Variante durch die PDK4 phosphoryliert werden (Phospho-S1-E1p). Durch ein Experiment mit radioaktiv markiertem Phosphat wird dies bestätigt. Mit Hilfe verschiedener Experimente wurde gezeigt, dass in der Variante Phospho-S1-E1p hauptsächlich die ThDP-Bindung und die

Wechselwirkung mit einer Lipoyldomäne (AS 128-265) beeinträchtigt sind. Dies wird darauf zurückgeführt, dass sich zwei *loop*-Strukturen in den α -Untereinheiten, bezeichnet als Phosphorylierungs-*loop* A (AS 259-282) und Phosphorylierungs-*loop* B (AS 198-205) auf Grund der Phosphorylierung an Position 264 nicht ausbilden können und somit das aktive Zentrum nicht vollständig strukturiert vorliegt. Auf die Tatsache, dass auch die katalytische Effizienz der Variante Phospho-S1-E1p für den Umsatz von Pyruvat im Vergleich zum Wildtyp um den Faktor 50 schlechter ist, gehen die Autoren in Bezug auf die Regulation nicht ein.

Ein besonderes Gewicht wird in dieser Arbeit auf die Lösung der Kristallstruktur der Variante Phospho-S1-E1p gelegt. Trotz Anwesenheit von ThDP und Mg^{2+} -Ionen wurde in den aktiven Zentren der Variante kein ThDP gefunden. Die Variante lag im Kristall als Apoenzym vor. In Kristallen der mit Mn-ThDP rekombinierten Phospho-S1-E1p liegt dagegen Holoenzym vor. In der Einheitszelle wurden zwei Heterotetramere gefunden. In jedem Heterotetramer sind in einem der beiden aktiven Zentren die *loop*-Strukturen A und B und das Phosphoserin definiert. In der jeweils korrespondierenden α -Untereinheit sind die *loop*-Strukturen nicht bzw. in einer anderen Anordnung definiert. Nur in einem der beiden Heterotetramere der Einheitszelle ist der Serinrest an Position 264 in dem alternativ strukturierten *loop* A gut definiert, trägt jedoch keinen Phosphatrest. Die Autoren legen für ihre Interpretation die α -Untereinheit mit der nicht definierten *loop*-Struktur zugrunde und nehmen für die definierten *loops* einen Artefaktcharakter an. Als Ursache für die Ausbildung der *loop*-Strukturen wird die Kristallpackung angegeben (*crystal stacking*). Es wird für den Wildtyp der *hsPDH-E1* davon ausgegangen, dass ein definiertes Wasserstoffbrückennetzwerk (β 'Y33 – α S264 – α S266 und zwei Wassermoleküle) zur Ausbildung der *loops* A und B in den aktiven Zentren führt. Der Mechanismus der Inaktivierung durch Phosphorylierung an Ser264 wird durch eine Perturbation dieses Wasserstoffbrückennetzwerks vermutet und erklärt. Infolgedessen kann sich der Phosphorylierungs-*loop* B bedingt durch das Fehlen des Phosphorylierungs-*loops* A nicht ausbilden. Ein ähnlicher Regulationsmechanismus wurde durch die Gruppe von CHUANG bereits für die humane E1-Komponente des BCKDC vorgeschlagen (Wynn et al. 2004).

Auf Grundlage der kinetischen und thermodynamischen Ergebnisse und den Strukturdaten wird ein alternativer Mechanismus der Regulation vorgeschlagen (Abb. 3.66).

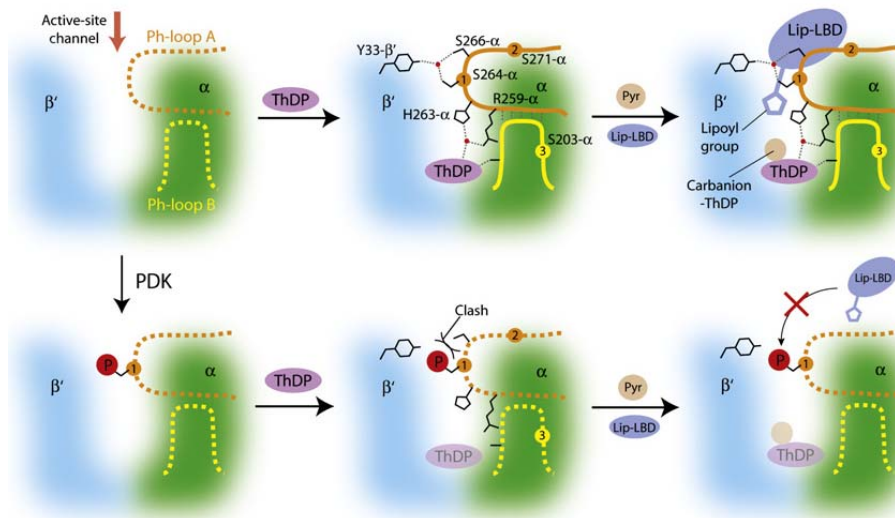


Abb. 3.66. Mechanismus der Inaktivierung der humanen E1-Komponente durch Phosphorylierung an Position 264 nach KATO und Mitarbeitern (Kato et al. 2008).

Die Studien der Gruppe um CHUANG (Kato et al. 2008) steht im Gegensatz zu den Ergebnissen der hier vorgelegten Arbeit und dem vorgeschlagenen Regulationsmechanismus. Der Austausch des S264 gegen Glutamat kann vermutlich nicht alle Eigenschaften eines Phosphatrestes an dieser Position ausüben. Die Vergrößerung und negative Ladung durch Einführung des Glutamats führt zwar zu den in dieser Arbeit beschriebenen kinetischen und thermodynamischen Unterschiede zum Wildtyp der *hsPDH-E1*, jedoch spiegelt diese Modifikation möglicherweise nicht komplett das Verhalten der phosphorylierten humanen E1-Komponente wider. Das kinetische Verhalten der Variante S264E und der an Position 1 phosphorylierten *hsPDH-E1* sowohl isoliert, als auch rekombiniert im Gesamtkomplex, ließen vermuten, dass der Aminosäureaustausch ein optimales Surrogat für die phosphorylierte *hsPDH-E1* ist (Korotchkina und Patel 2001a).

Eine kritische Fragestellung ist jedoch im Hinblick auf den vorgeschlagenen Regulationsmechanismus von KATO und Mitarbeitern von Bedeutung: Liegt die humane E1-Komponente im *hsPDHc* unter physiologischen Bedingungen als Apoenzym vor? Dies ist eher unwahrscheinlich. In der Literatur findet man, dass die intrazelluläre Konzentration von ThDP im humanen System bei etwa 30 μM liegt. Davon sind jedoch nur 2-3 μM verfügbar, da der Großteil des ThDP enzymgebunden vorliegt (Song und Singleton 2002). Wie in der Einführung zur Regulation des PDH-Komplexes beschrieben, basiert die Regulation durch Phosphorylierung auf dem Stoffwechselzustand der Zelle. Dieser ist wiederum von der Aktivität des PDHc abhängig. Es ist demnach kaum vorstellbar, dass die *hsPDH-E1* als Apoenzym im Gesamtkomplex gebunden vorliegt. Dieser Umstand findet im vorgeschlagenen Regulationsmechanismus von KATO und Mitarbeitern keine Berücksichtigung. Auf Basis dieser Überlegung und dem Ergebnis der Phospho-S1-E1p-Struktur mit definierten Phosphorylierungs-loops (Erläuterungen in Abb. 3.67) kann die Blockierung des Substratkanals durch die Phosphorylierung als alternativer Inaktivierungsmechanismus betrachtet werden. Kommt es zur Phosphorylierung der Holoform der *hsPDH-E1* am Serin 264, bleibt die Struktur grundsätzlich erhalten, durch die

Blockierung des Substratkanals wird der *hsPDHc* dennoch inaktiviert. Die Diskussion zeigt, dass die bisherigen Ansätze zur Analyse des Regulationsmechanismus der humanen E1-Komponente nicht zu einem umfassenden Verständnis der zugrundeliegenden Prozesse geführt haben. Hierzu wären vertiefende physikochemische Untersuchungen (H/D-Austausch, Intermediatanalyse, *assay* zur reduktiven Acetylierung) an der Variante Phospho-S1-E1p erforderlich.

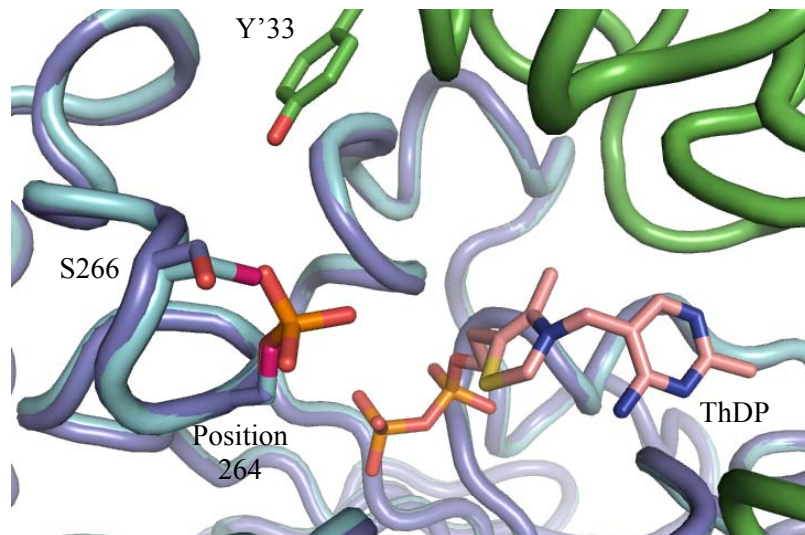


Abb. 3.67. Superposition der α -Untereinheiten des Wildtyps der *hsPDH-E1* (PDB-Datei 1NI4, blau) und der Variante Phospho-S1-E1p (PDB-Datei 3EXH, violett) im Bereich des aktiven Zentrums. Die β' -Untereinheit ist grün dargestellt. Die Einführung des Phosphatrestes an Position 264 führt zur Veränderung der Orientierung des Serin 266 im Vergleich zum Wildtyp. Im Wildtyp bilden das S266 und das S264 über zwei Wassermoleküle (nicht gezeigt) fünf Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Y'33 der β' -Untereinheit aus. In der Glutamatvariante (Daten nicht gezeigt) bleibt das Wasserstoffbrückennetzwerk ebenfalls erhalten. Die entsprechenden Wassermoleküle wurden von KATO und Mitarbeitern in der Variante Phospho-S1-E1p nicht gefunden. Das Sauerstoffatom des S266 und das am nächsten positionierte Sauerstoffatom der Phosphatgruppe sind 3.13 Å voneinander entfernt. Der Van-der-Waals-Radius eines an Kohlenstoff gebundenen Sauerstoffatoms beträgt 1.54 Å (Müller 1992). Dass diese Struktur trotz der fehlenden Wasserstoffbrücken ausgebildet werden kann, ist demnach nicht völlig auszuschließen.

3.2.2. Pseudophosphorylierungs-Varianten S271E und S203E

Neben der Phosphorylierung des Serin 264 stehen im humanen Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex zwei weitere phosphorylierbare Serinseitenketten zur Verfügung. Frühere Untersuchungen führten zu der Annahme, dass die Phosphorylierungen an Position 2 und 3 keinen oder nur einen synergistischen Einfluss auf die Aktivität des Säuger-PDHc haben (Sale und Randle 1982). Auch erste Mutagenesestudien, bei denen die entsprechenden Serinreste gegen Alanin ausgetauscht wurden, zeigten keinen Einfluss auf die *steady-state*-Parameter des *hsPDHc*. In der zugehörigen Studie konnte jedoch gezeigt werden, dass die Phosphorylierung an S271 und S203 auch zur Inaktivierung des *hsPDHc* führt. Dazu wurden Doppel-Alanin-Varianten verwendet, bei denen jeweils zwei der drei Phosphorylierungspositionen durch Alanine ausgetauscht wurden (Korotchkina und Patel 1995).

In einer weiterführenden Studie der Arbeitsgruppe um PATEL wurden dann erstmals die Glutamatvarianten S271E und S203E der humanen E1-Komponente charakterisiert (Korotchkina und Patel 2001a). Die Varianten zeigten im PDHc-*assay* eine um etwa 50 % reduzierte Aktivität. Weiterhin wurde eine schwächere Bindung des Cofaktors ThDP und des Substrats Pyruvat im Vergleich zum Wildtyp festgestellt. Da die Varianten im Vergleich zu der an der jeweiligen Position phosphorylierten E1-Komponente nicht die gleiche Reduktion der katalytischen Aktivität des gesamten Komplexes aufwiesen, sondern aktiver waren, wurde geschlossen, dass die Glutamataustausche an den Positionen 271 und 203 die Phosphorylierung nicht optimal imitieren. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass die an Position 2 bzw. 3 phosphorylierten Varianten an Position 1 je einer weiteren Position (entweder 2 oder 3) Alanin trugen. Für die Variante S264A wurde jedoch in der Studie gezeigt, dass sie sich nicht wie der Wildtyp verhält (65 % Restaktivität im PDHc-*assay*, festere ThDP- und Pyruvatbindung). Demnach ist davon auszugehen, dass die Katalyse der einfach phosphorylierten Doppel-Alanin-Varianten sowohl durch die Phosphorylierung als auch durch den Serin-Alanin-Austausch an Position 264 beeinflusst war.

Trotz dieser Einschränkungen sollten die katalytischen Eigenschaften der *hsPDH*-E1-Varianten S271E und S203E mit Hilfe neuer Methoden detailliert untersucht werden, um einen tieferen Einblick in den molekularen Mechanismus der Regulation durch diese beiden Phosphorylierungspositionen zu gewinnen. Die Abbildung 3.51 zeigt S271 und S203 in der Struktur der humanen E1-Komponente.

3.2.2.1. ThDP-Bindung

Die ThDP-Bindung der Varianten S271E und S203E wurde bereits in früheren Arbeiten sowohl im nicht-reaktiven Zustand im Fluoreszenz-*assay* (Kreß 2003) als auch unter *turnover*-Bedingungen im PDHc-*assay* (Korotchkina und Patel 2001a) untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die ThDP-Bindung der beiden Varianten in DCPIP-Experimenten untersucht (Daten nicht gezeigt, Konstanten in Tab. 3.14). Zudem wurde der neu entwickelte Absorptions-*assay* für die reduktive Acetylierung eingesetzt, um die

apparenten Dissoziationskonstanten für ThDP und die *hsPDH-E1*-Varianten unter diesen Reaktionsbedingungen zu ermitteln (Abb. 3.68). Die Auswertung erfolgte wie in Kapitel 3.1.2.4. für den Wildtyp beschrieben.

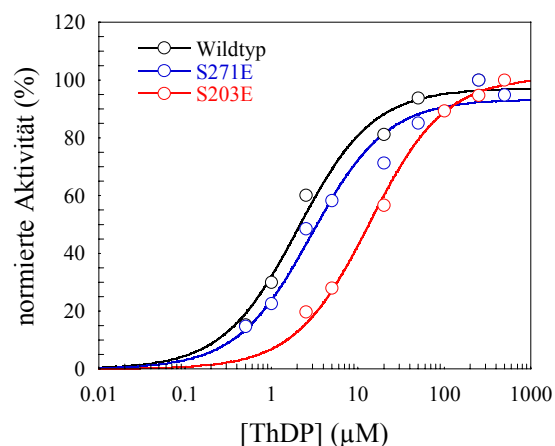


Abb. 3.68. Halblogarithmische Darstellung der Abhängigkeit der Katalyse der Varianten S271E und S203E von der ThDP-Konzentration im Vergleich zum Wildtyp im Aktivitätstest für die reduktive Acetylierung. Bedingungen: 0,5 mg/ml (6,5 μM aktive Zentren) *hsPDH-E1* S264E/Wildtyp, 4,36 mg/ml (0,35 mM) *hsPDH-E2LII*, 0,25 mM ThDP, 1 mM MgSO₄, 10 mM Pyruvat, 0,1 M KPP, 0,3 M KCl, pH 7,6, T = 30 °C.

Tabelle 3.14. Dissoziationskonstanten für ThDP und den *hsPDH-E1*-Varianten

Konstante	Wildtyp	S271E	S203E
K_D (μM) ^a	0,47 ¹	0,24 ¹	1,53 ¹
K_M (μM) ^b	10,61 ± 1,57	36,39 ± 3,37	53,55 ± 7,18
K_M (μM) ^c	2,02 ± 0,32	2,92 ± 0,48	13,67 ± 1,21

^a Fluoreszenz-assay, ^b DCPIP-Test, ^c UV/Vis-assay für die reduktive Acetylierung.

¹ aus (Kreß 2003).

Für die Variante S203E konnte der Literaturbefund einer beeinträchtigten ThDP-Bindung durch die hier vorgestellten Experimente bestätigt werden. Im PDHc-assay für die Gesamtreaktion ist die ThDP-Bindung in dieser Variante um den Faktor 27 schwächer als für den Wildtyp (Korotchkina und Patel 2001a). S203 ist auf einem *loop*, der an der ThDP-Bindung beteiligt ist, lokalisiert (Kato et al. 2008). Es ist daher möglich, dass die Einführung eines großen, geladenen Restes eine Störung der Ausbildung der ThDP-Bindetasche bewirkt. Die Interpretation der Ergebnisse zur ThDP-Bindung in der Variante S271E gestaltet sich im Zusammenhang mit den Literaturdaten etwas schwieriger. Für diese Variante wurde ein um den Faktor 10 größerer K_M -Wert für ThDP im PDHc-assay bestimmt. Tendenziell stimmt dieser Befund mit dem im DCPIP-Test bestimmten K_M -Wert (Faktor 3) überein. Jedoch bleibt eine quantitative Diskrepanz bestehen. Weder im nicht-reaktiven Zustand noch während der reduktiven Acetylierungsreaktion scheint die ThDP-Bindung beeinträchtigt zu sein. Da sich S271 der *hsPDH-E1* ebenfalls auf einem an der ThDP-Bindung beteiligten *loop* befindet (Kato et al. 2008), wäre die Annahme, dass auch die Phosphorylierung an Position 271 einen negativen Einfluss auf die Cofaktorbindung hat, naheliegend. Möglicherweise werden, wie schon in der Einleitung zu diesem Kapitel angemerkt, nicht alle Eigenschaften des Phosphoserins an Position 271 durch den Glutamatrest adäquat imitiert.

3.2.2.2. C2-Ionisierung

Die Cofaktoraktivierung der Varianten S271E und S203E wurde analog zu den bisher vorgestellten *hsPDH-E1*-Varianten durch H/D-Austauschexperimente mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie untersucht (Abb. 3.69).

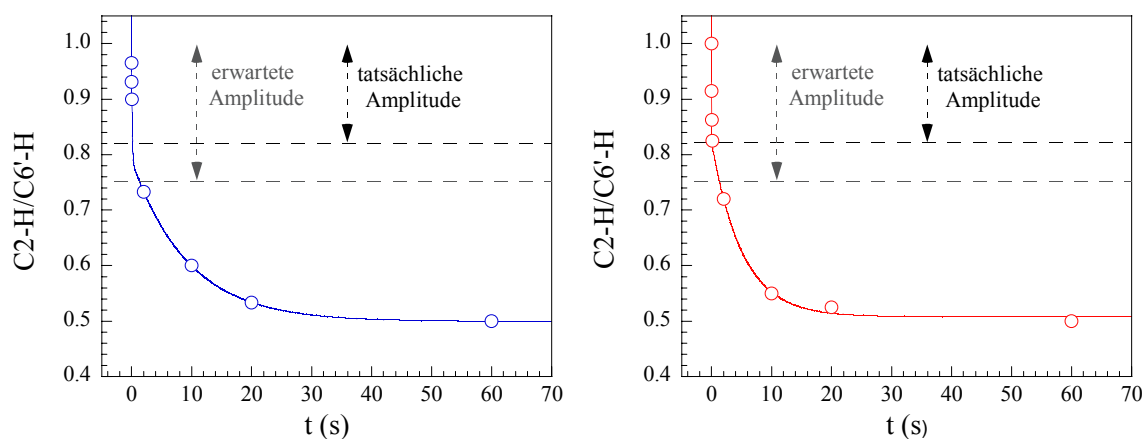


Abb. 3.69. Zeitliche Abhängigkeit der integralen Intensität C2- $^1\text{H-NMR}$ -Signals ThDP gebunden an die Varianten S271E (links, $-\circ-$) und S203E (rechts, $-\circ-$) der *hsPDH-E1*.

Bedingungen nach 1+1-Mischung mit 99.9 % D_2O : 5.89 mg/ml/ 8.12 mg/ml (76.43/ 105.45 μM aktive Zentren) *hsPDH-E1* S271E/ S203E, äquimolare Konzentration an ThDP, 1 mM MgSO_4 , Puffer der Lösung vor 1+1-Mischung: 0.1 M KPP, 0.3 M KCl, pH 7.6, $T = 30^\circ\text{C}$.

Tabelle 3.15. Mikroskopische Geschwindigkeitskonstanten der C2-Ionisierung der *hsPDH-E1*-Varianten.

Geschwindigkeitskonstante der C2-Ionisierung	Wildtyp	S271E	S203E
aktive Seite, $k_{\text{obs}}^{\text{E-ThDP1}}$ (s^{-1})	51 ± 15	11 ± 3	66 ± 11
ruhende Seite, $k_{\text{obs}}^{\text{E-ThDP2}}$ (s^{-1})	0.018 ± 0.005	0.11 ± 0.018	0.19 ± 0.023
relative Amplitude – aktive Seite	0.25	0.175	0.18
relative Amplitude – ruhende Seite	0.25	0.325	0.32

Die Geschwindigkeitskonstante der C2-Ionisierung der Variante S271E ist etwas langsamer als die des Wildtyp-Enzyms. Dies könnte durch eine leichte Perturbation der Anordnung der Aminosäurereste im aktiven Zentrum hervorgerufen werden. Die Abstraktion des C2-Protons könnte dadurch leicht beeinträchtigt sein. In der Variante S203E ist die Cofaktoraktivierung nicht gestört (Tab. 3.15).

Die beiden Pseudophosphorylierungs-Varianten unterliegen einer Halbseitenreaktivität. Es fällt jedoch auf, dass die theoretisch erwartete Amplitude von 0.25 pro aktive Seite nicht erreicht wird (Tab. 3.15). Dieses Phänomen ist wie folgt zu erklären: In Kapitel 3.1.1.3. wird beschrieben, dass die $^1\text{H-NMR}$ -Experimente optimal auszuwerten sind, wenn ThDP in äquimolarer Konzentration zu den aktiven Zentren eingesetzt wird. Eine Voraussetzung ist

jedoch eine feste ThDP-Bindung. Die fluorimetrisch bestimmten K_D -Werte für die Varianten S271E und S203E (Kreß 2003) liegen zwar unter dem als kritisch angegebenen Wert von 15 μM (Tittmann 2000), dennoch deuten die vorgestellten NMR-Experimente darauf hin, dass die ThDP-Bindung in den untersuchten Varianten der *hsPDH-E1* beeinträchtigt ist.

3.2.2.3. Substratbindung und Decarboxylierung

Die Analyse der Substratbindung und der Decarboxylierungsreaktion erfolgte mit den bereits vorgestellten Methoden unter Verwendung des nativen Substrats Pyruvat und dem nicht-decarboxylierbaren Substratanalogon Methylacetylphosphonat (Abb. 3.4).

- **$^1\text{H-NMR-Intermediatanalyse}$**

Die Bindung und der Umsatz von Pyruvat durch die *hsPDH-E1*-Varianten S271E und S203E wurden mittels $^1\text{H-NMR}$ -basierte die Intermediatanalyse charakterisiert (Abb. 3.70, Tab. 3.16).

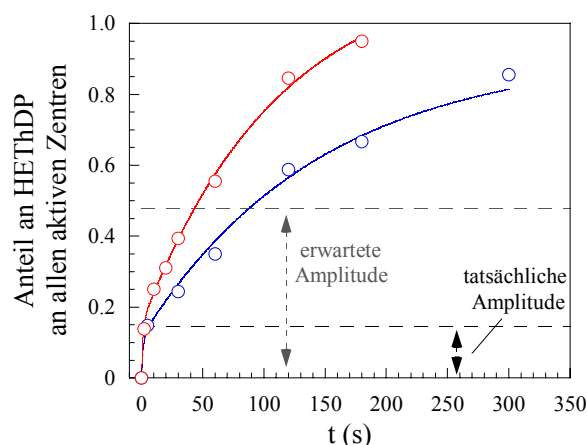


Abb. 3.70. Zeitliche Abhängigkeit der HEThDP-Bildung der Varianten S271E (—○—) und S203E (—○—) der *hsPDH-E1*.

Bedingungen: 6.29 mg/ml/8.12 mg/ml (81.69/105.45 μM aktive Zentren) *hsPDH-E1* S271E/S203E, äquimolare Konzentration an ThDP, 1 mM MgSO_4 , 30 mM Pyruvat, 0.1 M KPP, 0.3 M KCl, pH 7.6, T = 30 °C.

Tabelle 3.16. Mikroskopische Geschwindigkeitskonstanten des Pyruvatumsatzes der *hsPDH-E1*-Varianten.

Mikroskopische Geschwindigkeitskonstante		Wildtyp	S271E	S203E
LThDP-Bildung (C-C-Bindung),	aktive Seite, k_{1A}' (s^{-1})	2.3 ± 0.5	~ 0.7	0.79 ± 0.39
	ruhende Seite, k_{1B}' (s^{-1})	0.029 ± 0.005	~ 0.003	0.009 ± 0.001
LThDP-Decarboxylierung (HEThDP-Bildung),	aktive Seite, k_{2A}' (s^{-1})	5.1 ± 1.3	$\gg k_{1A}'$	$\gg k_{1A}'$
	ruhende Seite, k_{2B}' (s^{-1})	$\gg k_{1B}'$	$\gg k_{1B}'$	$\gg k_{1B}'$
relative Amplitude – aktive Seite		0.45	0.11	0.15
relative Amplitude – ruhende Seite		0.55	0.8	1

Die Auswertung der $^1\text{H-NMR}$ -Intermediatanalyse für die Varianten erfolgte analog zum Wildtyp. Es fällt jedoch auf, dass die relativen Amplituden der Anpassung der Datenpunkte nicht wie erwartet jeweils etwa 0.5 entsprechen. Tatsächlich beträgt der Anteil des schnell arbeitenden Zentrums nur 0.11 (S271E) bzw. 0.15 (S203E). Während im Fall der Variante S203E die Anpassung der Daten an Gl. 3.12 ohne Einschränkungen möglich war, mussten für die Variante S271E Schätzwerte vorgegeben werden, um die Anpassung durchzuführen. Aus diesem Grund sind für die Geschwindigkeitskonstanten keine Fehler angegeben (Tab. 3.16). Die kleineren Amplituden für das schnelle aktive Zentrum beider Varianten deuten, wie auch die Ergebnisse des H/D-Austauschs, auf eine beeinträchtigte ThDP-Bindung hin. Das bedeutet, dass die äquimolare Konzentration des Cofaktors nicht ausreicht, um mehr als 90 % der aktiven Zentren zu besetzen. Die Ergebnisse für die Geschwindigkeitskonstanten des schnellen aktiven Zentrums sind durch die geringe Punktdichte (jeweils nur ein Messpunkt im relevanten Zeitraum) stark fehlerbehaftet. Beide Varianten zeigen einen um den Faktor ca. 3 verlangsamten Pyruvatumsatz gegenüber dem Wildtyp. Diese Werte stimmen hinreichend mit den Literaturangaben überein. Im Gesamtkomplex haben beide Varianten eine Restaktivität von ca. 50 % (Faktor 2 langsamer). Die Daten der NMR-Experimente deuten darauf hin, dass sowohl die ThDP-Bindung als auch die Bindung und der Umsatz von Pyruvat in gewissem Maße durch die Modifikation an Position 271 und 203 in der *hsPDH-E1* moderat beeinträchtigt sind.

- **Thermodynamische und kinetische Untersuchungen mit dem Substratanalogon Methylacetylphosphonat**
 - **CD-Spektroskopie**

Durch die Titration der Varianten S271E und S203E mit dem Substratanalogon MAP und die CD-spektroskopische Analyse des PLThDP-Signals (IP-Form des ThDP) bei 292 nm wurden die entsprechenden thermodynamischen Dissoziationskonstanten bestimmt. Das Experiment wurde sowohl für die isolierten Varianten (Abb. A4, Konstanten siehe Tab. 3.17) als auch in Anwesenheit der humanen Lipoyldomäne 2 durchgeführt (Daten nicht gezeigt, Konstanten siehe Tab. 3.17).

Tabelle 3.17. Thermodynamische Dissoziationskonstanten der MAP-Bindung der *hsPDH-E1*-Varianten.

Konstante	Wildtyp	S271E	S203E
K_{app} (μM)	46 ± 4	181 ± 23	84 ± 8
K_{app} (μM) in Anwesenheit der <i>hsPDH-E2LII</i> *	72 ± 13	318 ± 58	300 ± 49

*Die Konzentration der *hsPDH-E2LII* wurde äquimolar zur Konzentration der aktiven Zentren der *hsPDH-E1* gewählt.

Im Vergleich zum Wildtyp wurde für die Variante S203E eine Dissoziationskonstante für MAP bestimmt, die lediglich um den Faktor 2 erhöht ist. Die MAP-Bindung scheint geringfügig beeinflusst zu sein. Die MAP-Bindung der Variante S271E ist um den Faktor 4 schwächer als im Wildtyp-Protein. Auch hier lässt sich eine leichte Beeinträchtigung der Substratbindung erkennen. Die erhöhten Dissoziationskonstanten in Anwesenheit der *hsPDH-E2LII* deuten, wie bereits erläutert, auf schwache Konkurrenz der Bindung der beiden Substrate hin. Da das CD-Signal eine Absorptionsbande voraussetzt, wurde auch für die Varianten S271E und S203E die Aufnahme von Differenzspektren zur Dokumentation der Absorptionsbande des PLThDP (IP-Form des ThDP) durchgeführt (Anhang Abb. A5).

○ *stopped-flow*

Die MAP-Bindungskinetiken der *hsPDH-E1*-Varianten S271E und S203E wurden analog dem Wildtyp-Enzym durch *stopped-flow*-Experimente aufgenommen. Die Auswertung erfolgte wie in Kapitel 3.1.1.6. beschrieben (Abb. 3.71, Tab. 3.18).

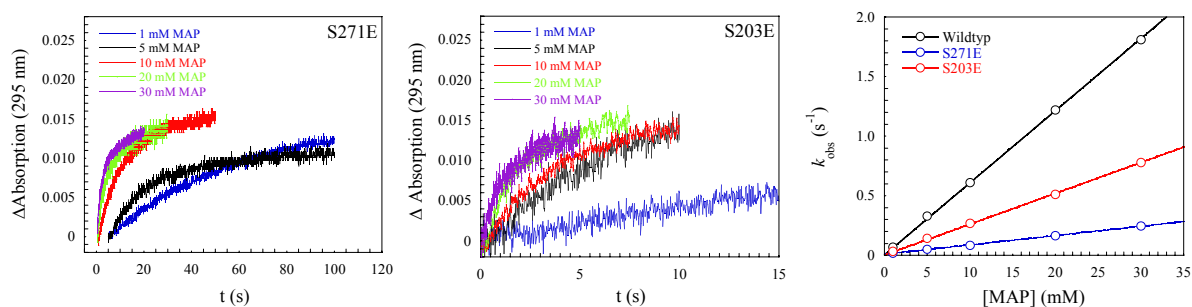


Abb. 3.71. *stopped-flow*-Kinetiken der Bindung von MAP an *hsPDH-E1* S271E (links) und S203E (Mitte) unter Bildung des stabilen Intermediat analogons PLThDP (auf Startabsorption 0 normiert). Rechts: Abhängigkeit der k_{obs} -Werte von der MAP-Konzentration für die S271E und S203E im Vergleich zum Wildtyp. Bedingungen: 2 mg/ml (26 μ M aktive Zentren) *hsPDH-E1* und Varianten, 0.25 mM ThDP, 0.5 mM MgSO₄, 0.1 M KPP, 0.3 M KCl, pH 7.6, T = 30 °C.

Tabelle 3.18. Kinetische Parameter der Reaktion der *hsPDH-E1*-Varianten mit MAP.

Parameter	Wildtyp	S271E	S203E
k_{eff} (M ⁻¹ s ⁻¹)	60 ± 1	7.8 ± 0.15	25.5 ± 0.29
k_{-1} (s ⁻¹)	0.0027 ± 0.0001	0.0099 ± 0.002	0.0023 ± 0.0002
K_D (μ M)	45	1269	90

Die Daten der kinetischen Untersuchung mit der Variante S203E bestätigen die CD-spektroskopischen Ergebnisse und deuten darauf hin, dass die MAP-Bindung nur leicht beeinträchtigt ist. Der Vergleich der k_{eff} -Werte (Variante S203E 42.5 % des Wildtyps) mit den Konstanten der C-C-Bindungsbildung (siehe ¹H-NMR-Intermediatanalyse, Variante S203E 35 % des Wildtyps) zeigten, bezogen auf die prozentualen Anteile, eine gute Übereinstimmung.

Das Verhalten der Variante S271E kann wie folgt interpretiert werden: Zu berücksichtigen ist, dass die Progresskurven der MAP-Bindung *lag*-Phasen aufwiesen. Die Dauer dieser *lag*-Phasen war abhängig von der MAP-Konzentration (siehe Anhang Abb. A6, entsprechender Bereich in Abb. 3.71 nicht dargestellt). Das Auftreten entsprechender Phasen kann dahingehend erklärt werden, dass für die Variante S271E die initiale Fixierung des MAP im Michaelis-Komplex nicht wie im Falle des Wildtyps sehr viel schneller erfolgt als die anschließende C-C-Bindungsbildung. Eine langsame primäre Assoziation des MAP steht prinzipiell im Einklang mit dem beobachteten hohen K_{app} -Wert. Dieser Sachverhalt wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch nicht weiterführend untersucht.

Die kinetischen Konstanten der Variante S271E zeigen, dass MAP deutlich schwächer gebunden wird als im Wildtyp der *hsPDH-E1*. Die Geschwindigkeitskonstante der C-C-Bindungsbildung von Pyruvat hat einen Wert von 30 % im Vergleich zum Wildtyp. Der k_{eff} -Wert der MAP-Bindung entspricht einem Anteil von 13 % des Wildtyps. Diese Werte sind hinreichend vergleichbar, vor allem unter der Berücksichtigung des großen Fehlers der Auswertung der $^1\text{H-NMR}$ -Intermediatanalyse für diese Variante. Es ist zudem möglich, dass sich in der Variante S271E die Pyruvatbindung und die MAP-Bindung etwas stärker voneinander unterscheiden als dies im Wildtyp der Fall ist.

3.2.2.4. Untersuchung der reduktiven Acetylierung der Lipoyldomäne *hsPDH-E2LII*

- **Kontinuierlicher Test (UV/Vis-Absorptionsspektroskopie)**

In diesen Experimenten sollte der Einfluss der Aminosäureaustausche in Position 271 und 203 auf die Wechselwirkung der humanen E1-Komponente mit der *hsPDH-E2LII* untersucht werden (Abb. 3.72, Tab. 3.19).

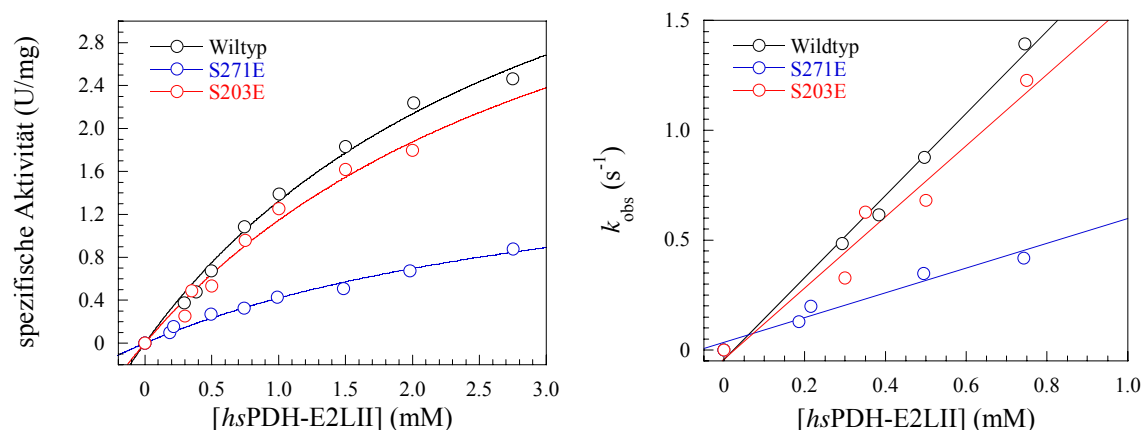


Abb. 3.72. Links: Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der Variante S271E und S203E im Vergleich zum Wildtyp von der *hsPDH-E2LII*-Konzentration mit Anpassung an Gl. 3.22. Rechts: Abhängigkeit der k_{obs} -Werte von der *hsPDH-E2LII*-Konzentration mit linearer Anpassung (Gl. 3.23). Bedingungen: 0.5 mg/ml (6.5 μM aktive Zentren) *hsPDH-E1* und Varianten, 0.25 mM ThDP, 1 mM MgSO_4 , 10 mM Pyruvat, 0.1 M KPP, 0.3 M KCl, pH 7.6, $T = 30^\circ\text{C}$.

Tabelle 3.19. Kinetische Parameter für die reduktive Acetylierung der Varianten der *hsPDH-E1* bei variierender *hsPDH-E2LII*-Konzentration.

Parameter	Wildtyp	S271E	S203E
V_{\max} (U/mg)	5.54 ± 0.71	2.01 ± 0.36	5.33 ± 1.28
k_{cat} (s^{-1})	7.08 ± 0.89	2.58 ± 0.46	6.84 ± 1.64
K_M (mM)	3.16 ± 0.61	3.78 ± 1.01	3.51 ± 1.41
k_{cat}/K_M ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	2.24×10^3	0.68×10^3	1.87×10^3
k_{cat}/K_M ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) aus Bedingungen nach Reaktion 1. Ordnung	1.83×10^3	0.59×10^3	1.62×10^3

Die Ergebnisse der reduktiven Acetylierung der *hsPDH-E1* durch die Varianten stellen sich wie folgt dar: Die Einführung des Glutamatrests an Position 271 bzw. 203 hat keinen Einfluss auf die Bindung der Lipoyldomäne. Das katalytische Verhalten der Variante S203E im Acetylierungstest entspricht dem der Wildtyp-Spezies. Im Fall der Variante S271E ist die katalytische Effizienz um 70 % reduziert.

Vergleicht man diese Resultate mit denen der Varianten der *hsPDH-E1* in Abwesenheit der humanen Lipoyldomäne 2 ergibt sich, dass die Variante S271E hinsichtlich Pyruvatbindung und -umsatz beeinflusst ist. Dieser Schritt bleibt geschwindigkeits-bestimmend. Für beide Varianten zeigt sich, dass die erste Halbreaktion, wie im Falle des Wildtyps, durch die Gegenwart der *hsPDH-E2LII* leicht beschleunigt wird.

- **Diskontinuierlicher Test (Massenspektrometrie)**

Als zweiter Test zur qualitativen Charakterisierung der reduktiven Acetylierungsreaktion der *hsPDH-E1*-Varianten S271E und S203E diene die Analyse des Acetylierungsgrades der *hsPDH-E2LII* durch Massenspektrometrie.

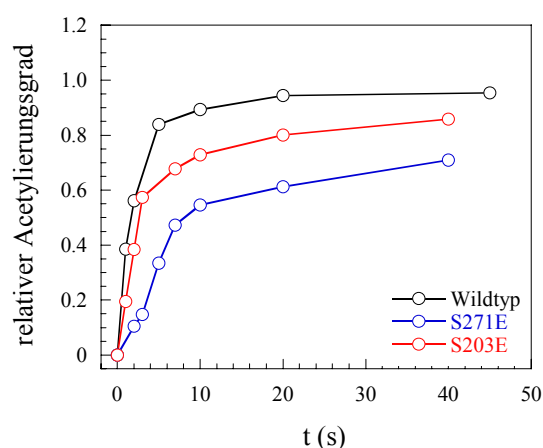


Abb. 3.73. Progresskurven der reduktiven Acetylierung der *hsPDH-E2LII* durch die Varianten S271E und S203E und den Wildtyp der *hsPDH-E1* (normierte Darstellung) bestimmt mittels MALDI-MS. Bedingungen: 7.5 mg/ml (97.4 μM aktive Zentren) *hsPDH-E1* und Varianten, 1.214 mg/ml (97.4 μM) *hsPDH-E2LII*, 0.25 mM ThDP, 0.5 mM MgSO_4 , 10 mM Pyruvat, 0.1 M KPP, 0.3 M KCl, pH 7.6, T = 30 °C.

Die Resultate der massenspektrometrischen Experimente bestätigen die Ergebnisse des Absorptions-*assays* für die reduktive Acetylierung (Abb. 3.73). Die Variante S203E verhält sich bei ThDP-Sättigung nahezu wie das Wildtyp-Enzym, die Variante S271E hingegen ist in ihrer Gesamtreaktion langsamer als die native *hsPDH-E1*.

3.2.2.5. Zusammenfassende Diskussion des Regulationsmechanismus der *hsPDH-E1* durch Phosphorylierung an den Positionen 271 und 203

Die Inaktivierung des humanen PDH-Komplexes *in vivo* erfolgt hauptsächlich durch die Phosphorylierung der E1-Komponente an Serin 264. Die Modifikation führt zur schnellen und vollständigen Inaktivierung des Komplexes. Die beiden anderen Positionen erlauben ebenfalls die Inaktivierung des PDHc, die Inaktivierungsgeschwindigkeit und das Ausmaß der Inaktivierung ist jedoch deutlich schwächer (Kap. 3.2.2.). Es bleibt eine Restaktivität des Komplexes erhalten (Korotchkina und Patel 2001a). Dennoch ist der molekulare Mechanismus, der zur jeweiligen Inaktivierung führt, von Interesse.

Zur Aufklärung des Regulationsmechanismus standen die Pseudophosphorylierungs-Varianten S271E und S203E der humanen E1-Komponente zur Verfügung. Die Ergebnisse der kinetischen und thermodynamischen Untersuchungen mit den vorgestellten Methoden unterstützen die bisherigen Vermutungen über den molekularen Mechanismus der Inaktivierung an diesen Positionen. Die Variante S203E zeigte eine verminderte Fähigkeit zur ThDP-Bindung. Die Bindung und Decarboxylierung von Pyruvat scheinen kaum beeinflusst zu sein. Diese Resultate bestätigen die in früheren Arbeiten vorgeschlagene Funktion des Phosphatrestes an dieser Position (Korotchkina und Patel 2001a).

Die Ergebnisse zur Variante S271E sind nicht eindeutig zu interpretieren. Es gibt sowohl Resultate, die auf eine schlechtere ThDP-Bindung hindeuten (NMR-Experimente und Ergebnisse aus der Literatur (Korotchkina und Patel 2001a)) als auch Daten, die diese Eigenschaft nicht bestätigen (K_D - und K_M -Wert). In der vorgelegten Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass diese Variante das Substrat Pyruvat schlechter umsetzen kann, was auf eine beeinträchtigte Substratbindung zurückzuführen ist. In der Literatur wurde bisher keine eindeutige Aussage zur Funktion der Modifikation an Position 271 getroffen (Korotchkina und Patel 2001a).

Beide Phosphorylierungspositionen liegen nicht in unmittelbarer Nähe des aktiven Zentrums (Abb. 3.51). Es ist demnach kein direkter Einfluss des Phosphatrestes auf den Ablauf der Katalyse zu erwarten. Es ist vielmehr anzunehmen, dass die Phosphorylierung an den jeweiligen Serinresten zu lokalen Konformationsänderungen im Protein führen, die in ihrer Gesamtheit einen Signaltransfer vom Phosphorylierungsort zum aktiven Zentrum bedingen. Die optimale Architektur des Substratkanals und des aktiven Zentrum würde gestört und könnte somit die ermittelten kinetischen und thermodynamischen Eigenschaften erklären. Kristallstrukturen der Pseudophosphorylierungs-Varianten bzw. von Varianten, die am entsprechenden Serin phosphoryliert sind, könnten Aufschluss über diese Hypothese geben.

Im Kontext der Regulation des gesamten humanen PDH-Komplexes vermitteln die Phosphorylierungspositionen 2 und 3 eine Art „Fein-*tuning*“ und „Rückversicherung“. Alle vier Isoenzyme der Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase sind in der Lage das Serin 264 zu phosphorylieren (Kolobova et al. 2001; Korotchkina und Patel 2001b) und dadurch den *hsPDHc* vollständig zu inaktivieren. Durch die zusätzliche Phosphorylierung der Positionen 2 und 3 (Hyperphosphorylierung) kann die Reaktivierung des Komplexes durch Dephosphorylierung (PDPs 1 und 2) verzögert werden. Die Anpassung an bestimmte Stoffwechselzustände wird durch die multiple Phosphorylierbarkeit der *hsPDH-E1* verfeinert (Roach 1991; Holness und Sugden 2003; Patel und Korotchkina 2006). Zudem stellt der Organismus durch die alternativen Regulationspositionen sicher, dass die Regulierbarkeit des für den Stoffwechsel essentiellen Multienzymkomplexes durch mögliche Mutationen an Position 264 nicht vollständig verloren geht (Patel und Korotchkina 2006).

4. Ausblick

Ein Schwerpunkt der vorgelegten Arbeit war die Charakterisierung der katalytischen Eigenschaften der *hsPDH-E1* im Hinblick auf die Theorie alternierend arbeitender Zentren. Es konnten erstmals direkte kinetische Beweise für die Halbseitenreaktivität erbracht werden. Der zugrundeliegende molekulare Mechanismus konnte jedoch nicht in allen Einzelheiten aufgeklärt werden. Ob die Halbseitenreaktivität durch einen Protonenkanal (Frank et al. 2004), Konformationsänderungen (Flip-Flop-Mechanismus nach Ciszak et al. 2003) oder durch eine Kombination beider Mechanismen realisiert wird, bleibt offen. Um für die humane E1-Komponente Aufschluss über diese Fragestellung zu erhalten, sollten biochemische und strukturbiologische Untersuchungen mit Varianten durchgeführt werden, die zweckmäßig gewählte Aminosäureaustausche im Protonenkanal tragen. Des Weiteren wäre es von großer Bedeutung, wenn die Lösung einer Proteinstruktur gelänge, die die Bindung des Lipoamidarms der E2-Komponente oder einer Lipoyldomäne in den Substratkanal der *hsPDH-E1* zeigt. Dadurch würde die Frage geklärt, ob es während der reduktiven Acetylierung zu konformationellen Änderungen in der E1-Struktur kommt. In diesem Zusammenhang könnten Strukturen mit Substratanaloga (z.B. MAP) und Cofaktoranaloga (z.B. Thiaminthiazolon-DP) weitere Einblicke in die Katalyse geben. Zur Vertiefung des Verständnisses des Substrat-*channelings* im Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex bzw. der α -Ketosäure-Dehydrogenase-Komplexe könnten neu etablierte Einzelmolekül-basierte elektronenmikroskopische Techniken genutzt werden. Den Weg des Lipoamidarms vom aktiven Zentrum der E1-Komponente an der Oberfläche des Komplexes bis zum aktiven Zentrum der E2-Komponente im Kern des Komplexes sichtbar nachvollziehen zu können, wäre eine bahnbrechende Erkenntnis.

Die Regulation des humanen Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes durch Phosphorylierung der E1-Komponente wurde durch langjährige Forschung mit verschiedenen Methoden umfangreich charakterisiert. Die Lösung der Kristallstruktur der Pseudophosphorylierungs-Varianten bzw. der phosphorylierten Varianten an Positionen 2 und 3 würden das Verständnis des molekularen Mechanismus vertiefen. Eine besonders interessante Struktur wäre die dreifach phosphorylierte humane E1-Komponente. Des Weiteren wären strukturelle Erkenntnisse zu den Subkomplexen zwischen der humanen E1-Komponente und den regulatorischen Enzymen, den Pyruvat-Dehydrogenase-Kinasen und den Pyruvat-Dehydrogenase-Phosphatasen von Bedeutung.

5. Literaturverzeichnis

- Agmon-Levin, N., Katz, B. S. & Shoenfeld, Y.** (2009): Infection and primary biliary cirrhosis. *Isr. Med. Assoc. J.*, 11 [2], 112-115.
- Ali, M. S., Shenoy, B. C., Eswaran, D., Andersson, L. A., Roche, T. E. & Patel, M. S.** (1995): Identification of the tryptophan residue in the thiamin pyrophosphate binding site of mammalian pyruvate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, 270 [9], 4570-4574.
- Arjunan, P., Sax, M., Brunskill, A., Chandrasekhar, K., Nemeria, N., Zhang, S., Jordan, F. & Furey, W.** (2006): A thiamin-bound, pre-decarboxylation reaction intermediate analogue in the pyruvate dehydrogenase E1 subunit induces large scale disorder-to-order transformations in the enzyme and reveals novel structural features in the covalently bound adduct. *J. Biol. Chem.*, 281 [22], 15296-15303.
- Asztalos, P.** (2008): Untersuchungen zu molekularen und biokatalytischen Aspekten des Vitamin B1-abhängigen Enzyms Transketolase A aus *Escherichia coli*. *Dissertation, Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg*.
- Baker, J. C., Yan, X., Peng, T., Kasten, S. & Roche, T. E.** (2000): Marked differences between two isoforms of human pyruvate dehydrogenase kinase. *J. Biol. Chem.*, 275 [21], 15773-15781.
- Barltrop, J. A., Hayes, P. M. & Calvin, M.** (1954): The Chemistry of 1,2-Dithiolane (Trimethylene Disulfide) as a Model for the Primary Quantum Conversion Act in Photosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.*, 76, 4348-4367.
- Barrera, C. R., Namihira, G., Hamilton, L., Munk, P., Eley, M. H., Linn, T. C. & Reed, L. J.** (1972): α -Keto acid dehydrogenase complexes. XVI. Studies on the subunit structure of the pyruvate dehydrogenase complexes from bovine kidney and heart. *Arch. Biochem. Biophys.*, 148 [2], 343-358.
- Baykal, A. T., Kakalis, L. & Jordan, F.** (2006): Electronic and nuclear magnetic resonance spectroscopic features of the 1',4'-iminopyrimidine tautomeric form of thiamin diphosphate, a novel intermediate on enzymes requiring this coenzyme. *Biochemistry*, 45 [24], 7522-7528.
- Bleile, D. M., Hackert, M. L., Pettit, F. H. & Reed, L. J.** (1981): Subunit structure of dihydrolipoyl transacetylase component of pyruvate dehydrogenase complex from bovine heart. *J. Biol. Chem.*, 256 [1], 514-519.
- Bosse-Doenecke, E., Weininger, U., Gopalswamy, M., Balbach, J., Knudsen, S. M. & Rudolph, R.** (2008): High yield production of recombinant native and modified peptides exemplified by ligands for G-protein coupled receptors. *Protein Expr. Purif.*, 58 [1], 114-121.
- Bowker-Kinley, M. M., Davis, W. I., Wu, P., Harris, R. A. & Popov, K. M.** (1998): Evidence for existence of tissue-specific regulation of the mammalian pyruvate dehydrogenase complex. *Biochem. J.*, 329 (Pt 1), 191-196.
- Brautigam, C. A., Wynn, R. M., Chuang, J. L. & Chuang, D.** (2009): Subunit and catalytic-component stoichiometries of an in vitro reconstituted human pyruvate dehydrogenase complex. *J. Biol. Chem.*

- Breslow, R.** (1957): Rapid deuterium exchange in thiazolium salts. *J. Am. Chem. Soc.*, 79, 1762-1763.
- Breslow, R.** (1958): On the Mechanism of Thiamin Action. IV. Evidence from Studies on Model Systems. *J. Am. Chem. Soc.*, 80, 3719-3726.
- Breslow, R.** (1962): The mechanism of thiamine action: predictions from model experiments. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 98, 445-452.
- Brown, R. M., Head, R. A., Boubriak, I. I., Leonard, J. V., Thomas, N. H. & Brown, G. K.** (2004): Mutations in the gene for the E1beta subunit: a novel cause of pyruvate dehydrogenase deficiency. *Hum. Genet.*, 115 [2], 123-127.
- Bubber, P., Haroutunian, V., Fisch, G., Blass, J. P. & Gibson, G. E.** (2005): Mitochondrial abnormalities in Alzheimer brain: mechanistic implications. *Ann. Neurol.*, 57 [5], 695-703.
- Caruso, M., Maitan, M. A., Bifulco, G., Miele, C., Vigliotta, G., Oriente, F., Formisano, P. & Beguinot, F.** (2001): Activation and mitochondrial translocation of protein kinase Cdelta are necessary for insulin stimulation of pyruvate dehydrogenase complex activity in muscle and liver cells. *J. Biol. Chem.*, 276 [48], 45088-45097.
- Casley, C. S., Canevari, L., Land, J. M., Clark, J. B. & Sharpe, M. A.** (2002): Beta-amyloid inhibits integrated mitochondrial respiration and key enzyme activities. *J. Neurochem.*, 80 [1], 91-100.
- Cate, R. L. & Roche, T. E.** (1978): A unifying mechanism for stimulation of mammalian pyruvate dehydrogenase(a) kinase by reduced nicotinamide adenine dinucleotide, dihydrolipoamide, acetyl coenzyme A, or pyruvate. *J. Biol. Chem.*, 253 [2], 496-503.
- Chandrasekhar, K., Arjunan, P., Sax, M., Nemeria, N., Jordan, F. & Furey, W.** (2006): Active-site changes in the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex E1 apoenzyme component from *Escherichia coli* observed at 2.32 Å resolution. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, 62 [Pt 11], 1382-1386.
- Chen, G., Wang, L., Liu, S., Chuang, C. & Roche, T. E.** (1996): Activated function of the pyruvate dehydrogenase phosphatase through Ca²⁺-facilitated binding to the inner lipoyl domain of the dihydrolipoyl acetyltransferase. *J. Biol. Chem.*, 271 [45], 28064-28070.
- 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 [23], 21240-21246.
- Ciszak, E. M., Makal, A., Hong, Y. S., Vettaikorumakankauy, A. K., Korotchkina, L. G. & Patel, M. S.** (2006): How dihydrolipoamide dehydrogenase-binding protein binds dihydrolipoamide dehydrogenase in the human pyruvate dehydrogenase complex. *J. Biol. Chem.*, 281 [1], 648-655.
- Dardel, F., Davis, A. L., Laue, E. D. & Perham, R. N.** (1993): Three-dimensional structure of the lipoyl domain from *Bacillus stearothermophilus* pyruvate dehydrogenase multienzyme complex. *J. Mol. Biol.*, 229 [4], 1037-1048.

- De Marcucci, O. G., Gibb, G. M., Dick, J. & Lindsay, J. G.** (1988): Biosynthesis, import and processing of precursor polypeptides of mammalian mitochondrial pyruvate dehydrogenase complex. *Biochem. J.*, 251 [3], 817-823.
- Devedjiev, Y., Steussy, C. N. & Vassilyev, D. G.** (2007): Crystal Structure of an Asymmetric Complex of Pyruvate Dehydrogenase Kinase 3 with Lipoyl Domain 2 and its Biological Implications. *J. Mol. Biol.*, 370 [3], 407-416.
- Eigen, M. & Hammes, G. G.** (1963): Elementary Steps in Enzyme Reactions (as Studied by Relaxation Spectrometry). *Adv. Enzymology*, XV, 1-38.
- Fiedler, E., Thorell, S., Sandalova, T., Golbik, R., König, S. & Schneider, G.** (2002): Snapshot of a key intermediate in enzymatic thiamin catalysis: crystal structure of the alpha-carbanion of (alpha,beta-dihydroxyethyl)-thiamin diphosphate in the active site of transketolase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 99 [2], 591-595.
- Flournoy, D. S. & Frey, P. A.** (1986): Pyruvate dehydrogenase and 3-fluoropyruvate: chemical competence of 2-acetylthiamin pyrophosphate as an acetyl group donor to dihydrolipoamide. *Biochemistry*, 25 [20], 6036-6043.
- Frank, R. A., Kay, C. W., Hirst, J. & Luisi, B. F.** (2008): Off-pathway, oxygen-dependent thiamine radical in the Krebs cycle. *J. Am. Chem. Soc.*, 130 [5], 1662-1668.
- Frank, R. A., Leeper, F. J. & Luisi, B. F.** (2007): Structure, mechanism and catalytic duality of thiamine-dependent enzymes. *Cell Mol. Life Sci.*, 64 [7-8], 892-905.
- Frank, R. A., Pratap, J. V., Pei, X. Y., Perham, R. N. & Luisi, B. F.** (2005): The molecular origins of specificity in the assembly of a multienzyme complex. *Structure.*, 13 [8], 1119-1130.
- Frank, R. A., Titman, C. M., Pratap, J. V., Luisi, B. F. & Perham, R. N.** (2004): A molecular switch and proton wire synchronize the active sites in thiamine enzymes. *Science*, 306 [5697], 872-876.
- Gey, U., Czupalla, C., Hoflack, B., Rodel, G. & Krause-Buchholz, U.** (2008): Yeast pyruvate dehydrogenase complex is regulated by a concerted activity of two kinases and two phosphatases. *J. Biol. Chem.*, 283 [15], 9759-9767.
- Gill, S. C. & von Hippel, P. H.** (1989): Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.*, 182 [2], 319-326.
- Golbik, R., Naumann, M., Otto, A., Müller, E., Behlke, J., Reuter, R., Hübner, G. & Kriegel, T. M.** (2001): Regulation of phosphotransferase activity of hexokinase 2 from *Saccharomyces cerevisiae* by modification at serine-14. *Biochemistry*, 40 [4], 1083-1090.
- Gong, X., Peng, T., Yakhnin, A., Zolkiewski, M., Quinn, J., Yeaman, S. J. & Roche, T. E.** (2000): Specificity determinants for the pyruvate dehydrogenase component reaction mapped with mutated and prosthetic group modified lipoyl domains. *J. Biol. Chem.*, 275 [18], 13645-13653.
- Gopalakrishnan, S., Rahmatullah, M., Radke, G. A., Powers-Greenwood, S. & Roche, T. E.** (1989): Role of protein X in the function of the mammalian pyruvate dehydrogenase complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 160 [2], 715-721.

- Graham, L. D., Packman, L. C. & Perham, R. N.** (1989): Kinetics and specificity of reductive acylation of lipoyl domains from 2-oxo acid dehydrogenase multienzyme complexes. *Biochemistry*, 28 [4], 1574-1581.
- Graham, L. D. & Perham, R. N.** (1990): Interactions of lipoyl domains with the E1p subunits of the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex from *Escherichia coli*. *FEBS Lett.*, 262 [2], 241-244.
- Green, T., Grigorian, A., Klyuyeva, A., Tuganova, A., Luo, M. & Popov, K. M.** (2008): Structural and functional insights into the molecular mechanisms responsible for the regulation of pyruvate dehydrogenase kinase 2. *J. Biol. Chem.*, 283 [23], 15789-15798.
- Gu, Y., Zhou, Z. H., McCarthy, D. B., Reed, L. J. & Stoops, J. K.** (2003): 3D electron microscopy reveals the variable deposition and protein dynamics of the peripheral pyruvate dehydrogenase component about the core. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 100 [12], 7015-7020.
- Gudi, R., Bowker-Kinley, M. M., Kedishvili, N. Y., Zhao, Y. & Popov, K. M.** (1995): Diversity of the pyruvate dehydrogenase kinase gene family in humans. *J. Biol. Chem.*, 270 [48], 28989-28994.
- Güttler, B.** (2008): Untersuchungen zum Mechanismus der reduktiven Acetylierung des humanen Pyruvat-Dehydrogenase Multienzymkomplexes. *Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg*.
- Harris, R. A., Bowker-Kinley, M. M., Wu, P., Jeng, J. & Popov, K. M.** (1997): Dihydrolipoamide dehydrogenase-binding protein of the human pyruvate dehydrogenase complex. DNA-derived amino acid sequence, expression, and reconstitution of the pyruvate dehydrogenase complex. *J. Biol. Chem.*, 272 [32], 19746-19751.
- Harris, T. K. & Washabaugh, M. W.** (1995): Solvent-derived protons in catalysis by brewers' yeast pyruvate decarboxylase. *Biochemistry*, 34 [43], 14001-14011.
- Hawkins, C. F., Borges, A. & Perham, R. N.** (1989): A common structural motif in thiamin pyrophosphate-binding enzymes. *FEBS Lett.*, 255 [1], 77-82.
- Head, R. A., Brown, R. M., Zolkipli, Z., Shahdadpuri, R., King, M. D., Clayton, P. T. & Brown, G. K.** (2005): Clinical and genetic spectrum of pyruvate dehydrogenase deficiency: dihydrolipoamide acetyltransferase (E2) deficiency. *Ann. Neurol.*, 58 [2], 234-241.
- Hengeveld, A. F. & De Kok, A.** (2002): Structural basis of the dysfunctioning of human 2-oxo acid dehydrogenase complexes. *Curr. Med. Chem.*, 9 [4], 499-520.
- Hiromasa, Y., Fujisawa, T., Aso, Y. & Roche, T. E.** (2004): Organization of the cores of the mammalian pyruvate dehydrogenase complex formed by E2 and E2 plus the E3-binding protein and their capacities to bind the E1 and E3 components. *J. Biol. Chem.*, 279 [8], 6921-6933.
- Hoffman, M. Z. & Hayon, E.** (1972): One-Electron Reduction of the Disulfide Linkage in Aqueous Solution. Formation, Protonation, and Decay Kinetics of the RSSR⁻ Radical. *J. Am. Chem. Soc.*, 94 [23], 7950-7957.

- Holness, M. J. & Sugden, M. C.** (2003): Regulation of pyruvate dehydrogenase complex activity by reversible phosphorylation. *Biochem. Soc. Trans.*, 31 [Pt 6], 1143-1151.
- Hong, Y. S., Kerr, D. S., Craigen, W. J., Tan, J., Pan, Y., Lusk, M. & Patel, M. S.** (1996): Identification of two mutations in a compound heterozygous child with dihydrolipoamide dehydrogenase deficiency. *Hum. Mol. Genet.*, 5 [12], 1925-1930.
- Howard, M. J., Fuller, C., Broadhurst, R. W., Perham, R. N., Tang, J. G., Quinn, J., Diamond, A. G. & Yeaman, S. J.** (1998): Three-dimensional structure of the major autoantigen in primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology*, 115 [1], 139-146.
- Huang, B., Gudi, R., Wu, P., Harris, R. A., Hamilton, J. & Popov, K. M.** (1998a): Isoenzymes of pyruvate dehydrogenase phosphatase. DNA-derived amino acid sequences, expression, and regulation. *J. Biol. Chem.*, 273 [28], 17680-17688.
- Huang, B., Wu, P., Popov, K. M. & Harris, R. A.** (2003): Starvation and diabetes reduce the amount of pyruvate dehydrogenase phosphatase in rat heart and kidney. *Diabetes*, 52 [6], 1371-1376.
- Huang, Y. J., Walker, D., Chen, W., Klingbeil, M. & Komuniecki, R.** (1998b): Expression of pyruvate dehydrogenase isoforms during the aerobic/anaerobic transition in the development of the parasitic nematode *Ascaris suum*: altered stoichiometry of phosphorylation/inactivation. *Arch. Biochem. Biophys.*, 352 [2], 263-270.
- Hübner, G., Atanassova, M. & Schellenberger, A.** (1986): Investigations on the pyruvate decarboxylase catalysed oxidative decarboxylation of 2-oxoacids by 2,6-dichlorophenolindophenol. *Biomed. Biochim. Acta*, 45 [7], 823-832.
- Hübner, G., Tittmann, K., Killenberg-Jabs, M., Schaffner, J., Spinka, M., Neef, H., Kern, D., Kern, G., Schneider, G., Wikner, C. & Ghisla, S.** (1998): Activation of thiamin diphosphate in enzymes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1385 [2], 221-228.
- Ishikawa, E., Oliver, R. M. & Reed, L. J.** (1966): Alpha-Keto acid dehydrogenase complexes, V. Macromolecular organization of pyruvate and alpha-ketoglutarate dehydrogenase complexes isolated from beef kidney mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 56 [2], 534-541.
- Izard, T., AEvarsson, A., Allen, M. D., Westphal, A. H., Perham, R. N., De Kok, A. & Hol, W. G.** (1999): Principles of quasi-equivalence and Euclidean geometry govern the assembly of cubic and dodecahedral cores of pyruvate dehydrogenase complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 96 [4], 1240-1245.
- Jilka, J. M., Rahmatullah, M., Kazemi, M. & Roche, T. E.** (1986): Properties of a newly characterized protein of the bovine kidney pyruvate dehydrogenase complex. *J. Biol. Chem.*, 261 [4], 1858-1867.
- Jones, D. D., Stott, K. M., Howard, M. J. & Perham, R. N.** (2000): Restricted motion of the lipoyl-lysine swinging arm in the pyruvate dehydrogenase complex of *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 39 [29], 8448-8459.
- Jones, D. D., Stott, K. M., Reche, P. A. & Perham, R. N.** (2001): Recognition of the lipoyl domain is the ultimate determinant of substrate channelling in the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex. *J. Mol. Biol.*, 305 [1], 49-60.

- Jordan, F. & Nemeria, N. S.** (2005): Experimental observation of thiamin diphosphate-bound intermediates on enzymes and mechanistic information derived from these observations. *Bioorg. Chem.*, 33 [3], 190-215.
- Jordan, F., Nemeria, N. S. & Sergienko, E.** (2005): Multiple modes of active center communication in thiamin diphosphate-dependent enzymes. *Acc. Chem. Res.*, 38 [9], 755-763.
- Jordan, F., Nemeria, N. S., Zhang, S., Yan, Y., Arjunan, P. & Furey, W.** (2003): Dual catalytic apparatus of the thiamin diphosphate coenzyme: acid-base via the 1',4'-iminopyrimidine tautomer along with its electrophilic role. *J. Am. Chem. Soc.*, 125 [42], 12732-12738.
- Jordan, F., Zhang, Z. & Sergienko, E.** (2002): Spectroscopic evidence for participation of the 1',4'-imino tautomer of thiamin diphosphate in catalysis by yeast pyruvate decarboxylase. *Bioorg. Chem.*, 30 [3], 188-198.
- Kale, S., Arjunan, P., Furey, W. & Jordan, F.** (2007): A dynamic loop at the active center of the Escherichia coli pyruvate dehydrogenase complex E1 component modulates substrate utilization and chemical communication with the E2 component. *J. Biol. Chem.*, 282 [38], 28106-28116.
- Karpova, T., Danchuk, S., Kolobova, E. & Popov, K. M.** (2003): Characterization of the isozymes of pyruvate dehydrogenase phosphatase: implications for the regulation of pyruvate dehydrogenase activity. *Biochim. Biophys. Acta*, 1652 [2], 126-135.
- Kato, M., Chuang, J. L., Tso, S. C., Wynn, R. M. & Chuang, D. T.** (2005): Crystal structure of pyruvate dehydrogenase kinase 3 bound to lipoyl domain 2 of human pyruvate dehydrogenase complex. *EMBO J.*, 24 [10], 1763-1774.
- Kato, M., Wynn, R. M., Chuang, J. L., Brautigam, C. A., Custorio, M. & Chuang, D. T.** (2006): A synchronized substrate-gating mechanism revealed by cubic-core structure of the bovine branched-chain alpha-ketoacid dehydrogenase complex. *EMBO J.*, 25 [24], 5983-5994.
- Kato, M., Wynn, R. M., Chuang, J. L., Tso, S. C., Machius, M., Li, J. & Chuang, D. T.** (2008): Structural basis for inactivation of the human pyruvate dehydrogenase complex by phosphorylation: role of disordered phosphorylation loops. *Structure.*, 16 [12], 1849-1859.
- 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 [5296], 67-70.
- Khailova, L. & Korotchkina, L.** (1985): Half-of-the-site reactivity of the decarboxylating component of the pyruvate dehydrogenase complex from pigeon breast muscle with respect to 2-hydroxyethyl thiamine pyrophosphate. *Biochem. Int.*, 11 [4], 509-516.
- Khailova, L. S. & Korochkina, L. G.** (1985): Half-of-the-site reactivity of the decarboxylating component of the pyruvate dehydrogenase complex from pigeon breast muscle with respect to 2-hydroxyethyl thiamine pyrophosphate. *Biochem. Int.*, 11 [4], 509-516.

- Kluger, R.** (1987): Thiamin Diphosphate: A Mechanistic Update on Enzymic and Nonenzymic Catalysis of Decarboxylation. *Chem. Rev.*, 87, 863-876.
- Kluger, R. & Tittmann, K.** (2008): Thiamin diphosphate catalysis: enzymic and nonenzymic covalent intermediates. *Chem. Rev.*, 108 [6], 1797-1833.
- Knoechel, T. R., Tucker, A. D., Robinson, C. M., Phillips, C., Taylor, W., Bungay, P. J., Kasten, S. A., Roche, T. E. & Brown, D. G.** (2006): Regulatory roles of the N-terminal domain based on crystal structures of human pyruvate dehydrogenase kinase 2 containing physiological and synthetic ligands. *Biochemistry*, 45 [2], 402-415.
- Koike, M., Reed, L. J. & Carroll, W. R.** (1960): alpha-Keto acid dehydrogenation complexes. I. Purification and properties of pyruvate and alpha-ketoglutarate dehydrogenation complexes of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 235, 1924-1930.
- Kolobova, E., Tuganova, A., Boulatnikov, I. & Popov, K. M.** (2001): Regulation of pyruvate dehydrogenase activity through phosphorylation at multiple sites. *Biochem. J.*, 358 [Pt 1], 69-77.
- Konarev, P. V., Volkov, V. V., Sokolova, A. V., Koch, M. H. J. & Svergun, D. I.** (2003): PRIMUS: a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis. *J. Appl. Cryst.*, 36, 1277-1282.
- Korotchkina, L. G. & Patel, M. S.** (1995): Mutagenesis studies of the phosphorylation sites of recombinant human pyruvate dehydrogenase. Site-specific regulation. *J. Biol. Chem.*, 270 [24], 14297-14304.
- Korotchkina, L. G. & Patel, M. S.** (2001a): Probing the mechanism of inactivation of human pyruvate dehydrogenase by phosphorylation of three sites. *J. Biol. Chem.*, 276 [8], 5731-5738.
- Korotchkina, L. G. & Patel, M. S.** (2001b): Site specificity of four pyruvate dehydrogenase kinase isoenzymes toward the three phosphorylation sites of human pyruvate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, 276 [40], 37223-37229.
- Korotchkina, L. G. & Patel, M. S.** (2008): Binding of pyruvate dehydrogenase to the core of the human pyruvate dehydrogenase complex. *FEBS Lett.*, 582 [3], 468-472.
- Korotchkina, L. G., Sidhu, S. & Patel, M. S.** (2006): Characterization of testis-specific isoenzyme of human pyruvate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, 281 [14], 9688-9696.
- Korotchkina, L. G., Tucker, M. M., Thekkumkara, T. J., Madhusudhan, K. T., Pons, G., Kim, H. & Patel, M. S.** (1995): Overexpression and characterization of human tetrameric pyruvate dehydrogenase and its individual subunits. *Protein Expr. Purif.*, 6 [1], 79-90.
- Krause-Buchholz, U., Gey, U., Wunschmann, J., Becker, S. & Rodel, G.** (2006): YIL042c and YOR090c encode the kinase and phosphatase of the *Saccharomyces cerevisiae* pyruvate dehydrogenase complex. *FEBS Lett.*, 580 [11], 2553-2560.
- Kreß, W.** (2003): Untersuchungen an drei Enzymvarianten der E1-Komponente des humanen Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes.

- Kwon, H. S., Huang, B., Unterman, T. G. & Harris, R. A.** (2004): Protein kinase B-alpha inhibits human pyruvate dehydrogenase kinase-4 gene induction by dexamethasone through inactivation of FOXO transcription factors. *Diabetes*, 53 [4], 899-910.
- Laemmli, U. K.** (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 [5259], 680-685.
- Lengyel, J. S., Stott, K. M., Wu, X., Brooks, B. R., Balbo, A., Schuck, P., Perham, R. N., Subramaniam, S. & Milne, J. L.** (2008): Extended polypeptide linkers establish the spatial architecture of a pyruvate dehydrogenase multienzyme complex. *Structure*, 16 [1], 93-103.
- Li, J., Machius, M., Chuang, J. L., Wynn, R. M. & Chuang, D. T.** (2007): The two active sites in human branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase operate independently without an obligatory alternating-site mechanism. *J. Biol. Chem.*, 282 [16], 11904-11913.
- Li, J., Wynn, R. M., Machius, M., Chuang, J. L., Karthikeyan, S., Tomchick, D. R. & Chuang, D. T.** (2004): Cross-talk between thiamin diphosphate binding and phosphorylation loop conformation in human branched-chain alpha-keto acid decarboxylase/dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, 279 [31], 32968-32978.
- Lindqvist, Y., Schneider, G., Ermler, U. & Sundstrom, M.** (1992): Three-dimensional structure of transketolase, a thiamine diphosphate dependent enzyme, at 2.5 Å resolution. *EMBO J.*, 11 [7], 2373-2379.
- Linn, T. C., Pettit, F. H., Hucho, F. & Reed, L. J.** (1969a): Alpha-keto acid dehydrogenase complexes. XI. Comparative studies of regulatory properties of the pyruvate dehydrogenase complexes from kidney, heart, and liver mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 64 [1], 227-234.
- Linn, T. C., Pettit, F. H. & Reed, L. J.** (1969b): Alpha-keto acid dehydrogenase complexes. X. Regulation of the activity of the pyruvate dehydrogenase complex from beef kidney mitochondria by phosphorylation and dephosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 62 [1], 234-241.
- Lissens, W., De Meirleir, L., Seneca, S., Liebaers, I., Brown, G. K., Brown, R. M., Ito, M., Naito, E., Kuroda, Y., Kerr, D. S., Wexler, I. D., Patel, M. S., Robinson, B. H. & Seyda, A.** (2000): Mutations in the X-linked pyruvate dehydrogenase (E1) alpha subunit gene (PDHA1) in patients with a pyruvate dehydrogenase complex deficiency. *Hum. Mutat.*, 15 [3], 209-219.
- Liu, S., Baker, J. C., Andrews, P. C. & Roche, T. E.** (1995a): Recombinant expression and evaluation of the lipoyl domains of the dihydrolipoyl acetyltransferase component of the human pyruvate dehydrogenase complex. *Arch. Biochem. Biophys.*, 316 [2], 926-940.
- Liu, S., Baker, J. C. & Roche, T. E.** (1995b): Binding of the pyruvate dehydrogenase kinase to recombinant constructs containing the inner lipoyl domain of the dihydrolipoyl acetyltransferase component. *J. Biol. Chem.*, 270 [2], 793-800.
- Liu, S., Gong, X., Yan, X., Peng, T., Baker, J. C., Li, L., Robben, P. M., Ravindran, S., Andersson, L. A., Cole, A. B. & Roche, T. E.** (2001): Reaction mechanism for mammalian pyruvate dehydrogenase using natural lipoyl domain substrates. *Arch. Biochem. Biophys.*, 386 [2], 123-135.

Lottspeich, F. & Engels, J. W. (2006): Bioanalytik.

Malakhov, M. P., Mattern, M. R., Malakhova, O. A., Drinker, M., Weeks, S. D. & Butt, T. R. (2004): SUMO fusions and SUMO-specific protease for efficient expression and purification of proteins. *J. Struct. Funct. Genomics*, 5 [1-2], 75-86.

Marblestone, J. G., Edavettal, S. C., Lim, Y., Lim, P., Zuo, X. & Butt, T. R. (2006): Comparison of SUMO fusion technology with traditional gene fusion systems: enhanced expression and solubility with SUMO. *Protein Sci.*, 15 [1], 182-189.

Marcus, R. A. & Sutin, N. (1985): Electron transfer in chemistry and biology. *Biochim. Biophys. Acta*, 811, 265-322.

Martin, E., Rosenthal, R. E. & Fiskum, G. (2005): Pyruvate dehydrogenase complex: metabolic link to ischemic brain injury and target of oxidative stress. *J. Neurosci. Res.*, 79 [1-2], 240-247.

Mattevi, A., Obmolova, G., Schulze, E., Kalk, K. H., Westphal, A. H., De Kok, A. & Hol, W. G. (1992): Atomic structure of the cubic core of the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex. *Science*, 255 [5051], 1544-1550.

McClendon, S., Zhadin, N. & Callender, R. (2005): The Approach to the Michaelis Complex in Lactate Dehydrogenase: The Substrate Binding Pathway. *Biophys. J.*, 89, 2024-2032.

McRorie, D. K. & Voelker, P. J. (1993): Self-Associating Systems in the Analytical Ultracentrifuge. 2.

Meyer, D. (2009): Kinetische und strukturelle Untersuchung der Katalysemechanismen ausgewählter Kofaktor-abhängiger Enzyme - Implikationen für die Decarboxylierung von alpha-Ketosäuren durch Thiamindiphosphat-abhängige Enzyme. *Dissertation, Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg.*

Milne, J. L., Shi, D., Rosenthal, P. B., Sunshine, J. S., Domingo, G. J., Wu, X., Brooks, B. R., Perham, R. N., Henderson, R. & Subramaniam, S. (2002): Molecular architecture and mechanism of an icosahedral pyruvate dehydrogenase complex: a multifunctional catalytic machine. *EMBO J.*, 21 [21], 5587-5598.

Milne, J. L., Wu, X., Borgnia, M. J., Lengyel, J. S., Brooks, B. R., Shi, D., Perham, R. N. & Subramaniam, S. (2006): Molecular structure of a 9-MDa icosahedral pyruvate dehydrogenase subcomplex containing the E2 and E3 enzymes using cryoelectron microscopy. *J. Biol. Chem.*, 281 [7], 4364-4370.

Mooney, B. P., Miernyk, J. A. & Randall, D. D. (2002): The complex fate of alpha-ketoacids. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 53, 357-375.

Mülhardt, C. (2000): Der Experimentator: Molekularbiologie. 2.

Müller, U. (1992): Anorganische Strukturchemie. 2.

- Nemeria, N., Arjunan, P., Brunskill, A., Sheibani, F., Wei, W., Yan, Y., Zhang, S., Jordan, F. & Furey, W.** (2002): Histidine 407, a phantom residue in the E1 subunit of the Escherichia coli pyruvate dehydrogenase complex, activates reductive acetylation of lipoamide on the E2 subunit. An explanation for conservation of active sites between the E1 subunit and transketolase. *Biochemistry*, 41 [52], 15459-15467.
- Nemeria, N., Baykal, A., Joseph, E., Zhang, S., Yan, Y., Furey, W. & Jordan, F.** (2004): Tetrahedral intermediates in thiamin diphosphate-dependent decarboxylations exist as a 1',4'-imino tautomeric form of the coenzyme, unlike the michaelis complex or the free coenzyme. *Biochemistry*, 43 [21], 6565-6575.
- Nemeria, N., Chakraborty, S., Baykal, A., Korotchkina, L. G., Patel, M. S. & Jordan, F.** (2007a): The 1',4'-iminopyrimidine tautomer of thiamin diphosphate is poised for catalysis in asymmetric active centers on enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 104 [1], 78-82.
- Nemeria, N., Korotchkina, L., McLeish, M. J., Kenyon, G. L., Patel, M. S. & Jordan, F.** (2007b): Elucidation of the chemistry of enzyme-bound thiamin diphosphate prior to substrate binding: defining internal equilibria among tautomeric and ionization states. *Biochemistry*, 46 [37], 10739-10744.
- Nemeria, N. S., Chakraborty, S., Balakrishnan, A. & Jordan, F.** (2009): Reaction mechanisms of thiamin diphosphate enzymes: defining states of ionization and tautomerization of the cofactor at individual steps. *FEBS J.*, 276 [9], 2432-3446.
- Nemeria, N. S., Korotchkina, L. G., Chakraborty, S., Patel, M. S. & Jordan, F.** (2006): Acetylphosphinate is the most potent mechanism-based substrate-like inhibitor of both the human and Escherichia coli pyruvate dehydrogenase components of the pyruvate dehydrogenase complex. *Bioorg. Chem.*, 34 [6], 362-379.
- Nikkola, M., Lindqvist, Y. & Schneider, G.** (1994): Refined structure of transketolase from Saccharomyces cerevisiae at 2.0 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, 238 [3], 387-404.
- O'Brien, T. A., Kluger, R., Pike, D. C. & Gennis, R. B.** (1980): Phosphonate analogues of pyruvate. Probes of substrate binding to pyruvate oxidase and other thiamin pyrophosphate-dependent decarboxylases. *Biochim. Biophys. Acta*, 613 [1], 10-17.
- Ostergaard, E., Moller, L. B., Kalkanoglu-Sivri, H. S., Dursun, A., Kibaek, M., Thelle, T., Christensen, E., Duno, M. & Wibrand, F.** (2009): Four novel PDHA1 mutations in pyruvate dehydrogenase deficiency. *J. Inherit. Metab. Dis.*
- Packman, L. C., Hale, G. & Perham, R. N.** (1984): Repeating functional domains in the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex of Escherichia coli. *EMBO J.*, 3 [6], 1315-1319.
- Pan, K. & Jordan, F.** (1998): D,L-S-methylipoic acid methyl ester, a kinetically viable model for S-protonated lipoic acid as the oxidizing agent in reductive acyl transfers catalyzed by the 2-oxoacid dehydrogenase multienzyme complexes. *Biochemistry*, 37 [5], 1357-1364.
- Patel, M. S. & Korochkina, L. G.** (2003): The Biochemistry of the Pyruvate Dehydrogenase Complex. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 31 [1], 5-15.

Patel, M. S. & Korotchkina, L. G. (2001): Regulation of mammalian pyruvate dehydrogenase complex by phosphorylation: complexity of multiple phosphorylation sites and kinases. *Exp. Mol. Med.*, 33 [4], 191-197.

Patel, M. S. & Korotchkina, L. G. (2006): Regulation of the pyruvate dehydrogenase complex. *Biochem. Soc. Trans.*, 34 [Pt 2], 217-222.

Patel, M. S., Naik, S., Wexler, I. D. & Kerr, D. S. (1995): Gene regulation and genetic defects in the pyruvate dehydrogenase complex. *J. Nutr.*, 125 [6 Suppl], 1753S-1757S.

Patel, M. S. & Roche, T. E. (1990): Molecular biology and biochemistry of pyruvate dehydrogenase complexes. *FASEB J.*, 4 [14], 3224-3233.

Pei, X. Y., Titman, C. M., Frank, R. A., Leeper, F. J. & Luisi, B. F. (2008): Snapshots of catalysis in the E1 subunit of the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex. *Structure.*, 16 [12], 1860-1872.

Pessen, H., Kumosinski, T. F. & Timasheff, S. N. (1973): Small-Angle X-Ray Scattering. *Methods Enzymol.*, XXVII, 151-209.

Rahmatullah, M., Gopalakrishnan, S., Andrews, P. C., Chang, C. L., Radke, G. A. & Roche, T. E. (1989a): Subunit associations in the mammalian pyruvate dehydrogenase complex. Structure and role of protein X and the pyruvate dehydrogenase component binding domain of the dihydrolipoyl transacetylase component. *J. Biol. Chem.*, 264 [4], 2221-2227.

Rahmatullah, M., Gopalakrishnan, S., Radke, G. A. & Roche, T. E. (1989b): Domain structures of the dihydrolipoyl transacetylase and the protein X components of mammalian pyruvate dehydrogenase complex. Selective cleavage by protease Arg C. *J. Biol. Chem.*, 264 [2], 1245-1251.

Ralston, G. (1993): Introduction to Analytical Ultracentrifugation. 1.

Randall, D. D. & Rubin, P. M. (1977): Plant Pyruvate Dehydrogenase Complex: II. ATP-Dependent Inactivation and Phosphorylation. *Plant Physiol.*, 59 [1], 1-3.

Rardin, M. J., Wiley, S. E., Naviaux, R. K., Murphy, A. N. & Dixon, J. E. (2009): Monitoring phosphorylation of the pyruvate dehydrogenase complex. *Anal. Biochem.*

Reed, L. J. (2001): A trail of research from lipoic acid to alpha-keto acid dehydrogenase complexes. *J. Biol. Chem.*, 276 [42], 38329-38336.

Reed, L. J., Koike, M., Levitch, M. E. & Leach, F. R. (1958): Studies on the nature and reactions of protein-bound lipoic acid. *J. Biol. Chem.*, 232 [1], 143-158.

Roach, P. J. (1991): Multisite and Hierarchical Protein Phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, 266 [22], 14139-14142.

Roche, T. E. & Hiromasa, Y. (2007): Pyruvate dehydrogenase kinase regulatory mechanisms and inhibition in treating diabetes, heart ischemia, and cancer. *Cell Mol. Life Sci.*, 64 [7-8], 830-849.

- Roche, T. E., Hiromasa, Y., Turkan, A., Gong, X., Peng, T., Yan, X., Kasten, S. A., Bao, H. & Dong, J.** (2003): Essential roles of lipoyl domains in the activated function and control of pyruvate dehydrogenase kinases and phosphatase isoform 1. *Eur. J. Biochem.*, 270 [6], 1050-1056.
- Roche, T. E., Rahmatullah, M., Powers-Greenwood, S. L., Radke, G. A., Gopalakrishnan, S. & Chang, C. L.** (1989): The lipoyl-containing components of the mammalian pyruvate dehydrogenase complex: structural comparison and subdomain roles. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 573, 66-75.
- Rowles, J., Scherer, S. W., Xi, T., Majer, M., Nickle, D. C., Rommens, J. M., Popov, K. M., Harris, R. A., Riebow, N. L., Xia, J., Tsui, L. C., Bogardus, C. & Prochazka, M.** (1996): Cloning and characterization of PDK4 on 7q21.3 encoding a fourth pyruvate dehydrogenase kinase isoenzyme in human. *J. Biol. Chem.*, 271 [37], 22376-22382.
- Sale, G. J. & Randle, P. J.** (1982): Role of individual phosphorylation sites in inactivation of pyruvate dehydrogenase complex in rat heart mitochondria. *Biochem. J.*, 203 [1], 99-108.
- Sanderson, S. J., Miller, C. & Lindsay, J. G.** (1996): Stoichiometry, organisation and catalytic function of protein X of the pyruvate dehydrogenase complex from bovine heart. *Eur. J. Biochem.*, 236 [1], 68-77.
- Schellenberger, A.** (1967): Structure and mechanism of action of the active center of yeast pyruvate decarboxylase. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.*, 6, 1024-1035.
- Schellenberger, A.** (1989): Enzymkatalyse. 1.
- Schellenberger, A.** (1998): Sixty years of thiamin diphosphate biochemistry. *Biochim. Biophys. Acta*, 1385 [2], 177-186.
- Schiff, M., Mine, M., Brivet, M., Marsac, C., Elmaleh-Berges, M., Evrard, P. & Ogier, d. B.** (2006): Leigh's disease due to a new mutation in the PDHX gene. *Ann. Neurol.*, 59 [4], 709-714.
- Schütz, A., Golbik, R., König, S., Hübner, G. & Tittmann, K.** (2005): Intermediates and transition states in thiamin diphosphate-dependent decarboxylases. A kinetic and NMR study on wild-type indolepyruvate decarboxylase and variants using indolepyruvate, benzoylformate, and pyruvate as substrates. *Biochemistry*, 44 [16], 6164-6179.
- Schweet, R. S., Katchman, B., Bock, R. M. & Jagannathan, V.** (1952): Pyruvic oxidase of pigeon breast muscle. II. Physiocochemical studies. *J. Biol. Chem.*, 196 [2], 563-567.
- Seifert, F.** (2005): Mechanistische Untersuchungen an zwei Proteinvarianten und dem Wildtyp der E1-Komponente des humanen Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes. *Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg.*
- Seifert, F., Ciszak, E., Korotchkina, L., Golbik, R., Spinka, M., Dominiak, P., Sidhu, S., Brauer, J., Patel, M. S. & Tittmann, K.** (2007): Phosphorylation of serine 264 impedes active site accessibility in the E1 component of the human pyruvate dehydrogenase multienzyme complex. *Biochemistry*, 46 [21], 6277-6287.

- Seifert, F., Golbik, R., Brauer, J., Lilie, H., Schroder-Tittmann, K., Hinze, E., Korotchkina, L. G., Patel, M. S. & Tittmann, K.** (2006): Direct kinetic evidence for half-of-the-sites reactivity in the E1 component of the human pyruvate dehydrogenase multienzyme complex through alternating sites cofactor activation. *Biochemistry*, 45 [42], 12775-12785.
- Sheline, C. T. & Wei, L.** (2006): Free radical-mediated neurotoxicity may be caused by inhibition of mitochondrial dehydrogenases in vitro and in vivo. *Neuroscience*, 140 [1], 235-246.
- Smolle, M., Prior, A. E., Brown, A. E., Cooper, A., Byron, O. & Lindsay, J. G.** (2006): A new level of architectural complexity in the human pyruvate dehydrogenase complex. *J. Biol. Chem.*, 281 [28], 19772-19780.
- Song, Q. & Singleton, C. K.** (2002): Mitochondria from cultured cells derived from normal and thiamine-responsive megaloblastic anemia individuals efficiently import thiamine diphosphate. *BMC. Biochem.*, 3, 8.
- Steussy, C. N., Popov, K. M., Bowker-Kinley, M. M., Sloan, R. B., Jr., Harris, R. A. & Hamilton, J. A.** (2001): Structure of pyruvate dehydrogenase kinase. Novel folding pattern for a serine protein kinase. *J. Biol. Chem.*, 276 [40], 37443-37450.
- Stoops, J. K., Cheng, R. H., Yazdi, M. A., Maeng, C. Y., Schroeter, J. P., Klueppelberg, U., Kolodziej, S. J., Baker, T. S. & Reed, L. J.** (1997): On the unique structural organization of the *Saccharomyces cerevisiae* pyruvate dehydrogenase complex. *J. Biol. Chem.*, 272 [9], 5757-5764.
- Strumilo, S.** (2005): Short-term regulation of the mammalian pyruvate dehydrogenase complex. *Acta Biochim. Pol.*, 52 [4], 759-764.
- Stryer, L.** (1996): Biochemie. 4.
- Sugden, P. H. & Randle, P. J.** (1978): Regulation of Pig Heart Pyruvate Dehydrogenase by Phosphorylation Studies on the Subunit and Phosphorylation Stoichiometries. *Biochem. J.*, 173, 659-668.
- Svergun, D., Barberato, C. & Koch, M. H. J.** (1995): *CRY SOL-a* Program to Evaluate X-ray Solution Scattering of Biological Macromolecules from Atomic Coordinates. *J. Appl. Cryst.*, 28.
- Svergun, D. I.** (1992): Determination of the Regularization Parameter in Indirect-Transform Methods Using Perceptual Criteria. *J. Appl. Cryst.*, 25, 495-503.
- Tan, J., Yang, H. S. & Patel, M. S.** (1998): Regulation of mammalian pyruvate dehydrogenase alpha subunit gene expression by glucose in HepG2 cells. *Biochem. J.*, 336 (Pt 1), 49-56.
- Teague, W. M., Pettit, F. H., Wu, T. L., Silberman, S. R. & Reed, L. J.** (1982): Purification and properties of pyruvate dehydrogenase phosphatase from bovine heart and kidney. *Biochemistry*, 21 [22], 5585-5592.

- Tittmann, K.** (2000): Untersuchungen zu Katalysemechanismen von Flavin- und Thiamindiphosphat-abhängigen Enzymen. Katalysemechanismus der Pyruvatoxidase aus *Lactobacillus plantarum*. *Dissertation, Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg*.
- Tittmann, K.** (2009): Reaction mechanisms of thiamin diphosphate enzymes: redox reactions. *FEBS J.*, 276 [9], 2454-2468.
- Tittmann, K., Golbik, R., Uhlemann, K., Khailova, L., Schneider, G., Patel, M., Jordan, F., Chipman, D. M., Duggleby, R. G. & Hübner, G.** (2003): NMR analysis of covalent intermediates in thiamin diphosphate enzymes. *Biochemistry*, 42 [26], 7885-7891.
- Tittmann, K., Wille, G., Golbik, R., Weidner, A., Ghisla, S. & Hübner, G.** (2005): Radical phosphate transfer mechanism for the thiamin diphosphate- and FAD-dependent pyruvate oxidase from *Lactobacillus plantarum*. Kinetic coupling of intercofactor electron transfer with phosphate transfer to acetyl-thiamin diphosphate via a transient FAD semiquinone/hydroxyethyl-ThDP radical pair. *Biochemistry*, 44 [40], 13291-13303.
- Tovar-Mendez, A., Miernyk, J. A. & Randall, D. D.** (2003): Regulation of pyruvate dehydrogenase complex activity in plant cells. *Eur. J. Biochem.*, 270 [6], 1043-1049.
- Tulinus, M., Darin, N., Wiklund, L. M., Holmberg, E., Eriksson, J. E., Lissens, W., De Meirleir, L. & Holme, E.** (2005): A family with pyruvate dehydrogenase complex deficiency due to a novel C>T substitution at nucleotide position 407 in exon 4 of the X-linked Epsilon1alpha gene. *Eur. J. Pediatr.*, 164 [2], 99-103.
- Uhlinger, D. J., Yang, C. Y. & Reed, L. J.** (1986): Phosphorylation-dephosphorylation of pyruvate dehydrogenase from bakers' yeast. *Biochemistry*, 25 [19], 5673-5677.
- Vassilyev, D. G. & Symersky, J.** (2007): Crystal structure of pyruvate dehydrogenase phosphatase 1 and its functional implications. *J. Mol. Biol.*, 370 [3], 417-426.
- Viscontini, M. & Karrer, P.** (1949): Zur Herstellung der Cocarboxylase und des Aneurin-triphosphorsäure-esters. *Helvetica Chimica Acta*, XXXII, 1478-1484.
- Washabaugh, M. W. & Jencks, W. P.** (1988): Thiazolium C(2)-proton exchange: structure-reactivity correlations and the pKa of thiamin C(2)-H revisited. *Biochemistry*, 27 [14], 5044-5053.
- Wei, W., Li, H., Nemeria, N. & Jordan, F.** (2003): Expression and purification of the dihydrolipoamide acetyltransferase and dihydrolipoamide dehydrogenase subunits of the *Escherichia coli* pyruvate dehydrogenase multienzyme complex: a mass spectrometric assay for reductive acetylation of dihydrolipoamide acetyltransferase. *Protein Expr. Purif.*, 28 [1], 140-150.
- Wieland, O. H.** (1983): The mammalian pyruvate dehydrogenase complex: structure and regulation. *Rev. Physiol Biochem. Pharmacol.*, 96, 123-170.
- Wieland, O. H., Hartmann, U. & Siess, E. A.** (1972): *Neurospora crassa* pyruvate dehydrogenase: interconversion by phosphorylation and dephosphorylation. *FEBS Lett.*, 27 [2], 240-244.
- Wieland, O. H. & Jagow-Estermann, B. v.** (1969): ATP-dependent inactivation of heart muscle pyruvate dehydrogenase and reactivation by Mg^{++} . *FEBS Lett.*, 3 [4], 271-274.

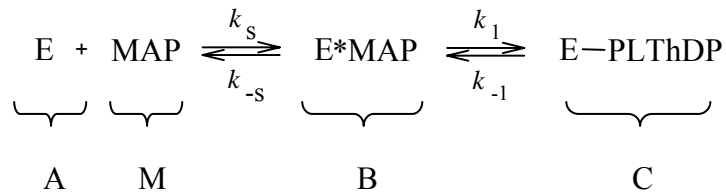
- Williams, R. R.** (1936): Structure of Vitamin B₁. *J. Am. Chem. Soc.*, 58 [6], 1063-1064.
- Wynn, R. M., Kato, M., Chuang, J. L., Tso, S. C., Li, J. & Chuang, D. T.** (2008): Pyruvate dehydrogenase kinase-4 structures reveal a metastable open conformation fostering robust core-free basal activity. *J. Biol. Chem.*, 283 [37], 25305-25315.
- Wynn, R. M., Kato, M., Machius, M., Chuang, J. L., Li, J., Tomchick, D. R. & Chuang, D. T.** (2004): Molecular mechanism for regulation of the human mitochondrial branched-chain alpha-ketoacid dehydrogenase complex by phosphorylation. *Structure.*, 12 [12], 2185-2196.
- Wynn, R. M., Machius, M., Chuang, J. L., Li, J., Tomchick, D. R. & Chuang, D. T.** (2003): Roles of His291-alpha and His146-beta' in the reductive acylation reaction catalyzed by human branched-chain alpha-ketoacid dehydrogenase: refined phosphorylation loop structure in the active site. *J. Biol. Chem.*, 278 [44], 43402-43410.
- Yan, J., Lawson, J. E. & Reed, L. J.** (1996): Role of the regulatory subunit of bovine pyruvate dehydrogenase phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 93 [10], 4953-4956.
- Yang, D., Song, J., Wagenknecht, T. & Roche, T. E.** (1997): Assembly and full functionality of recombinantly expressed dihydrolipoyl acetyltransferase component of the human pyruvate dehydrogenase complex. *J. Biol. Chem.*, 272 [10], 6361-6369.
- Yang, Y. S. & Frey, P. A.** (1986): Dihydrolipoyl transacetylase of *Escherichia coli*. Formation of 8-S-acetyldihydrolipoamide. *Biochemistry*, 25 [25], 8173-8178.
- Yeaman, S. J., Hutcheson, E. T., Roche, T. E., Pettit, F. H., Brown, J. R., Reed, L. J., Watson, D. C. & Dixon, G. H.** (1978): Sites of phosphorylation on pyruvate dehydrogenase from bovine kidney and heart. *Biochemistry*, 17 [12], 2364-2370.
- Yu, X., Hiromasa, Y., Tsen, H., Stoops, J. K., Roche, T. E. & Zhou, Z. H.** (2008): Structures of the human pyruvate dehydrogenase complex cores: a highly conserved catalytic center with flexible N-terminal domains. *Structure.*, 16 [1], 104-114.
- Zhou, Z. H., Liao, W., Cheng, R. H., Lawson, J. E., McCarthy, D. B., Reed, L. J. & Stoops, J. K.** (2001a): Direct evidence for the size and conformational variability of the pyruvate dehydrogenase complex revealed by three-dimensional electron microscopy. The "breathing" core and its functional relationship to protein dynamics. *J. Biol. Chem.*, 276 [24], 21704-21713.
- Zhou, Z. H., McCarthy, D. B., O'Connor, C. M., Reed, L. J. & Stoops, J. K.** (2001b): The remarkable structural and functional organization of the eukaryotic pyruvate dehydrogenase complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 98 [26], 14802-14807.
- Zuo, X., Li, S., Hall, J., Mattern, M. R., Tran, H., Shoo, J., Tan, R., Weiss, S. R. & Butt, T. R.** (2005): Enhanced expression and purification of membrane proteins by SUMO fusion in *Escherichia coli*. *J. Struct. Funct. Genomics*, 6 [2-3], 103-111.

6. Anhang

Mathematischer Appendix

App1 – Die Bindung des Substratanalogons MAP im Gleichgewicht

Für die Bindung des Substratanalogons MAP an die *hsPDH-E1* gilt folgendes Minimalmodell (entspricht Reaktion 3.3):



Es gelten $K_S = \frac{k_{-s}}{k_s}$ und $K_1 = \frac{k_{-1}}{k_1}$.

Im Gleichgewicht gilt für jede Spezies das Massenwirkungsgesetz:

$$K_S = \frac{(A)_{\text{eq}} \cdot (M)_{\text{eq}}}{(B)_{\text{eq}}}$$

$$K_1 = \frac{(B)_{\text{eq}}}{(C)_{\text{eq}}}$$

Die $(X)_{\text{eq}}$ stellen Gleichgewichtskonzentrationen dar.

Die *all-over*-Konstante für die Bildung von C aus A und M ergibt sich zu:

$$K_D \equiv K_S \cdot K_1 = \frac{(A)_{\text{eq}} \cdot (M)_{\text{eq}}}{(C)_{\text{eq}}}$$

Unter der Voraussetzung $(M_0) \gg (A_0)$ gilt $(M)_{\text{eq}} \approx (M_0)$.

Die Bilanzgleichung für die Enzymspezies lautet:

$$\begin{aligned}
 (A_0) &= (A)_{\text{eq}} + (B)_{\text{eq}} + (C)_{\text{eq}} \\
 &= (A)_{\text{eq}} \cdot \left(1 + \frac{(M_0)}{K_S} + \frac{(M_0)}{K_S \cdot K_1} \right) = (A)_{\text{eq}} \cdot \left(1 + (M_0) \cdot \left[\frac{1 + K_S}{K_S \cdot K_1} \right] \right) = (A)_{\text{eq}} \cdot \left(1 + \frac{(M_0)}{K_S} \cdot \left[1 + \frac{1}{K_1} \right] \right)
 \end{aligned}$$

Der Term $\left(\frac{K_1 \cdot K_S}{1 + K_1} \right)$ wird im Folgenden durch K_{app} ausgedrückt.

Daher gelten für die Konzentrationen der Enzymspezies im Gleichgewicht:

$$(A)_{\text{eq}} = \frac{K_{\text{app}} \cdot (A_0)}{K_{\text{app}} + (M_0)}$$

$$(B)_{\text{eq}} = \frac{\left(\frac{K_1}{1 + K_1} \right) \cdot (A_0) \cdot (M_0)}{K_{\text{app}} + (M_0)}$$

$$(C)_{\text{eq}} = \frac{\left(\frac{1}{1 + K_1} \right) \cdot (A_0) \cdot (M_0)}{K_{\text{app}} + (M_0)}$$

mit $K_{\text{app}} = \frac{K_S \cdot K_1}{(1 + K_1)}$ Gl. 3.16

In den CD-Titrationsexperimenten mit MAP wird E-PLThDP beobachtet. In der Kurvatur der Titrationskurve kommt die komplexe Dissoziationskonstante K_{app} zum Ausdruck. Für die Auswertung bietet sich die Normierung auf (A_0) an.

$$\frac{(C)}{(A_0)} = \frac{\alpha \cdot (M_0)}{K_{\text{app}} + (M_0)}$$

mit $\alpha = \left(\frac{1}{1 + K_1} \right)$.

App2 – Kinetik der Bindung des Substratanalogs MAP an die *hs*PDH-E1

Zur Analyse wird erneut das Minimalmodell aus A1 zugrunde gelegt. Es wird dabei wieder $(M_0) \gg (A_0)$ vorausgesetzt, so dass der Umsatz von M im Zuge der Gleichgewichtseinstellung vernachlässigt werden kann. Es gilt $(M) \approx (M_0)$. Die relevanten Differentialgleichungen lauten:

$$\frac{d(A)}{dt} = -k_S \cdot (A) \cdot (M_0) + k_{-S} \cdot (B)$$

$$\frac{d(B)}{dt} = k_S \cdot (A) \cdot (M_0) - k_{-S} \cdot (B) - k_1 \cdot (B) + k_{-1} \cdot (C)$$

$$\frac{d(C)}{dt} = k_1 \cdot (B) - k_{-1} \cdot (C)$$

Unter der naheliegenden Annahme der schnellen Equilibrierung des initialen zum Michaelis-Komplex B führenden Schrittes gilt für (B):

$$(B) = \frac{(A) \cdot (M_0)}{K_S}$$

Dies ermöglicht eine einfache Lösung des Gleichungssystems. Die Bilanzgleichung lässt sich unter Berücksichtigung des Massenwirkungsgesetzes für (B) daher wie folgt darstellen:

$$(A_0) = (A) \cdot \left(1 + \frac{(M_0)}{K_S} \right) + (C)$$

Daraus folgt für (A):

$$(A) = \left(\frac{(A_0) - (C)}{\gamma} \right) \quad \text{mit} \quad \gamma = \left(1 + \frac{(M_0)}{K_S} \right) = \frac{K_S + (M_0)}{K_S}$$

$$(A) = \left(\frac{K_S}{K_S + (M_0)} \right) \cdot ((A_0) - (C))$$

Da C die in den *stopped-flow*-Experimenten beobachtete Spezies ist, wird die Analyse auf (C) beschränkt. Substituiert man den Ausdruck für (A) in die Differentialgleichung für (C), erhält man:

$$\frac{d(C)}{dt} = k_1 \cdot \underbrace{\frac{(A_0) \cdot (M_0)}{K_S + (M_0)}}_Q - \underbrace{\left(\frac{k_1 (M_0)}{K_S + (M_0)} + k_{-1} \right)}_{-k_{\text{obs}}} \cdot (C)$$

bzw. $\frac{d(C)}{dt} = Q - k_{\text{obs}} \cdot (C)$

Diese Differentialgleichung hat die Lösung:

$$(C) = \left(\frac{Q}{k_{\text{obs}}} \right) \cdot (1 - e^{-k_{\text{obs}} \cdot t})$$

Die in den Progresskurven für C zum Ausdruck kommende beobachtbare Geschwindigkeitskonstante k_{obs} lautet daher:

$$k_{\text{obs}} = \frac{k_1(M_0)}{K_S + (M_0)} + k_{-1}$$

Prinzipiell erlaubt die Auftragung der k_{obs} -Werte gegen (M_0) die Bestimmung von k_1 , k_{-1} und K_S . Im Falle von $K_S \gg (M_0)$ wird ein linearer Zusammenhang zwischen k_{obs} und (M_0) beobachtet:

$$k_{\text{obs}} = \frac{k_1}{K_S} \cdot (M_0) + k_{-1} = k_{\text{eff}} \cdot (M_0) + k_{-1}$$

k_{eff} ist eine effektive Geschwindigkeitskonstante 2. Ordnung. Unter den Bedingungen $K_S \gg (M_0)$ lassen sich demzufolge k_1 und K_S nicht individuell bestimmen, was die Aussagekraft der entsprechenden kinetischen Experimente im Detail einschränkt. Die Größe (Q/k_{obs}) drückt die Konzentration von C im Gleichgewicht aus und stimmt mit der in App1 erhaltenen Beziehung

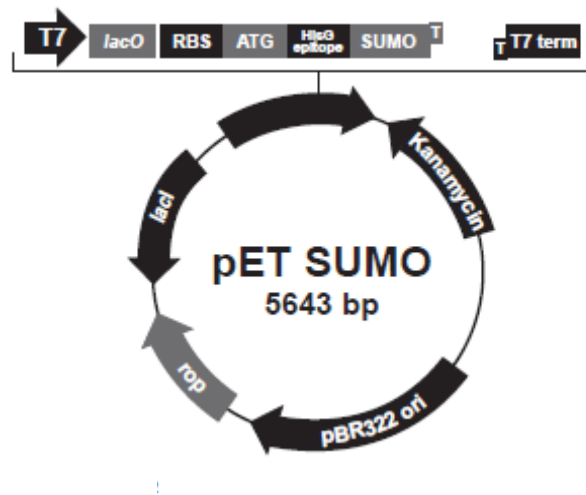
$$\frac{Q}{k_{\text{obs}}} = (C)_{\text{eq}} = \frac{(A_0) \cdot (M_0)}{(M_0) + K_{\text{app}}}$$

überein.

App3 – Gleichung zur Auswertung der Sedimentationsgleichgewichts-Läufe

$$A(x) = A_0 \exp\left(\frac{(1 - v \cdot \rho) \cdot \omega^2 \cdot (x^2 - x_0^2) \cdot M}{2 \cdot R \cdot T}\right)$$

$A(x)$ – Absorption bei 280 nm am Ort x , A_0 – Absorption bei 280 nm am Ort x_0 , v – partielles spezifisches Volumen, ρ – Dichte der Lösung, ω – Winkelgeschwindigkeit, x – Abstand zur Rotationsachse, M – Molekulargewicht, T – Temperatur, R – Gaskonstante.



Gly Gly	BamHI	HindIII	NotI	Eag	XhoI	HindIII
GGTGGT	AGAGACC	TCAGGATCCAAGCTT	GCGGCCGCTCGAGA	GACAAGCTT		
CCACC	ATCTCTGG	AGTCCTAGGTT	CGAACGCCGGGAGCTC	TCTGTTCGAA		
	BsaI					

Abb. A1. Oben: Vektorkarte des Originalplasmids pETSUMO der Firma Invitrogen. Unten: *multiple cloning site* des pETSUMOadapt nach Dr. Eva Bosse-Doenecke. Dieser Vektor wurde durch Einfügen einer DNA Sequenz aus zwei synthetischen Oligonukleotiden in den Vektor pETSUMO der Firma Invitrogen hergestellt (Bosse-Doenecke et al. 2008).

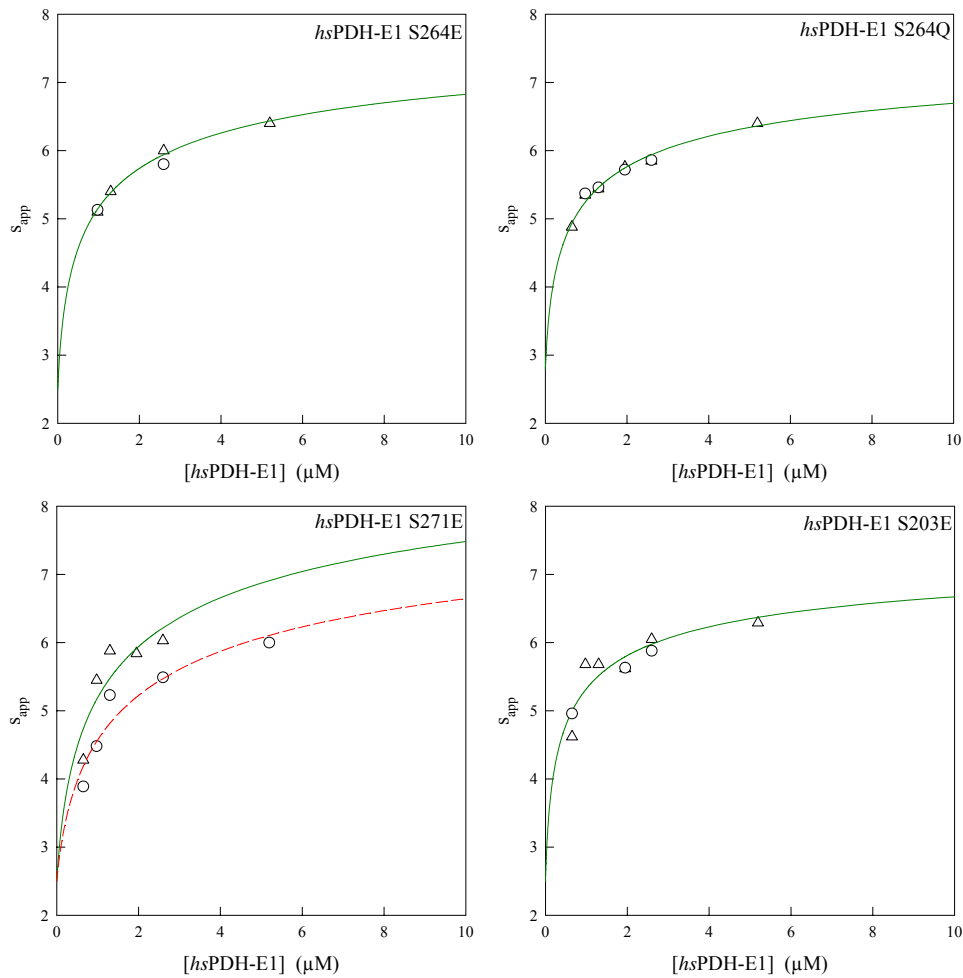


Abb. A2. Abhängigkeit des apparenten Sedimentationskoeffizienten von der molaren Konzentration der *hsPDH-E1*-Varianten bezogen auf die aktiven Zentren, Apoenzym ($-\Delta-$), Holoenzym ($-\circ-$) mit 0.1 mM ThDP, 1 mM MgSO_4 , Puffer: 0.1 M KPP, 0.3 M KCl, pH 7.6, $T = 20^\circ\text{C}$.

Tabelle A1. Dissoziationskonstanten des Dimer-Tetramergleichgewichts der *hsPDH-E1*-Varianten.

Konstante	S264E	S264Q	S271E	S203E
K_D (μM) Apoenzym	0.4	0.35	0.73	0.24
K_D (μM) Holoenzym	n.b.	n.b.	1.01	n.b.

n.b. – anhand der geringen Datendichte nicht bestimmbar. Die Daten werden jedoch gut durch die Anpassung der Daten für das Apoenzym repräsentiert.

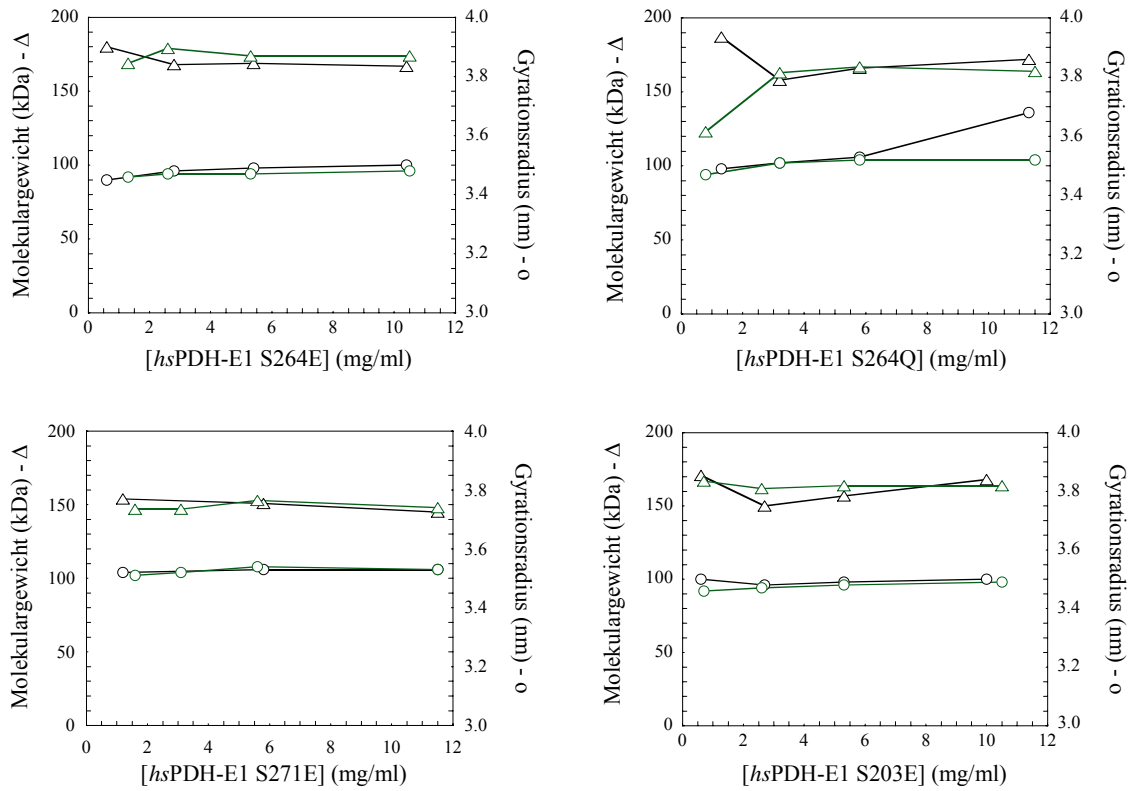


Abb. A3. Darstellung des aus den SAXS-Messungen bestimmten Molekulargewichts (Δ) und des Gyrationradius (\circ) in Abhängigkeit von der Konzentration der *hsPDH-E1*-Varianten ohne Zusatz (schwarz) und mit 10 mM Pyruvat (grün). Bedingungen: 0.1 mM ThDP, 1 mM MgSO_4 , 50 mM KPP, 50 mM KCl, pH 7.6, $T = 20^\circ\text{C}$.

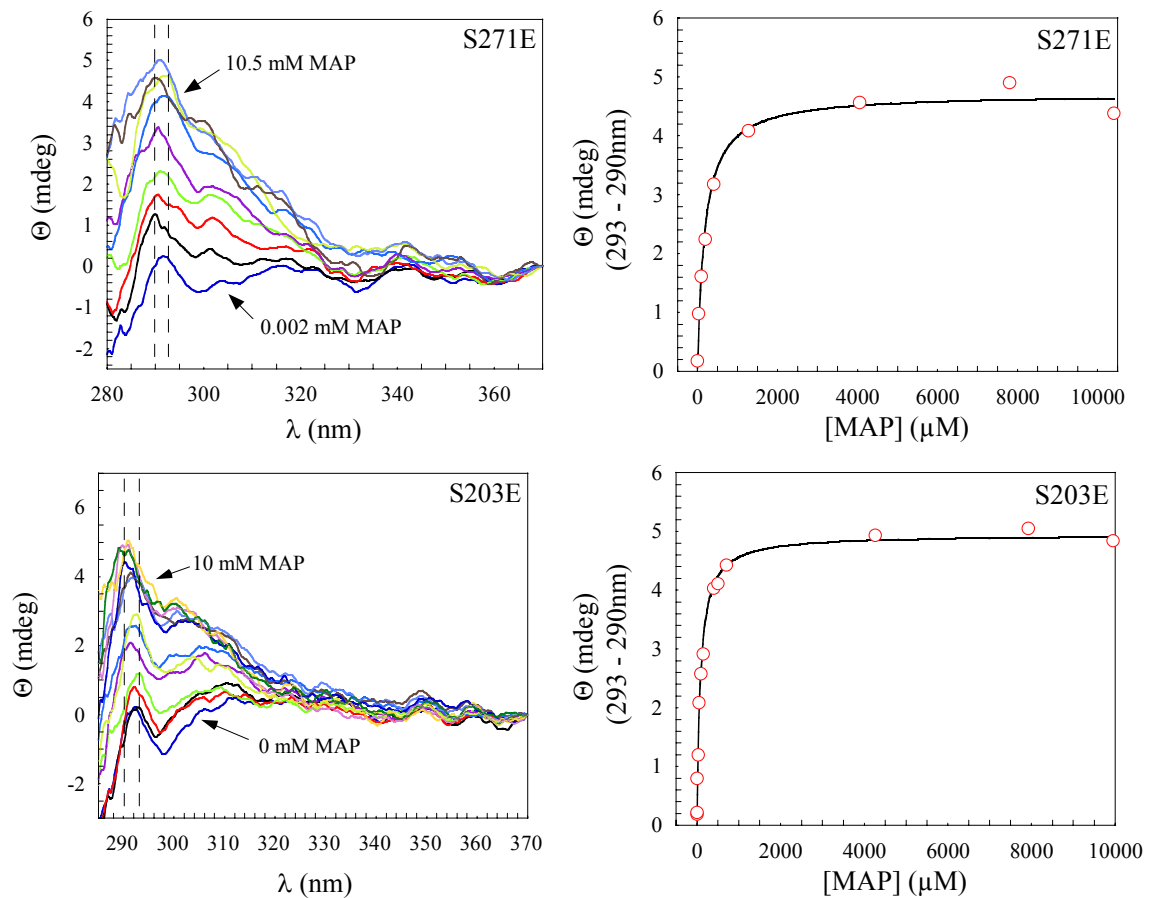


Abb. A4. Bindung von MAP an die *hsPDH-E1*-Varianten S271E (oben) und S203E (unten). links: CD-Spektren der Titration. rechts: entsprechende MAP-Bindungskurven. Bedingungen: 1.8 mg/ml (23.4 μM aktive Zentren) *hsPDH-E1* Varianten, 0.1 mM ThDP, 1 mM MgSO_4 , 0.1 M KPP, 0.3 M KCl, pH 7.6, $T = 20^\circ\text{C}$.

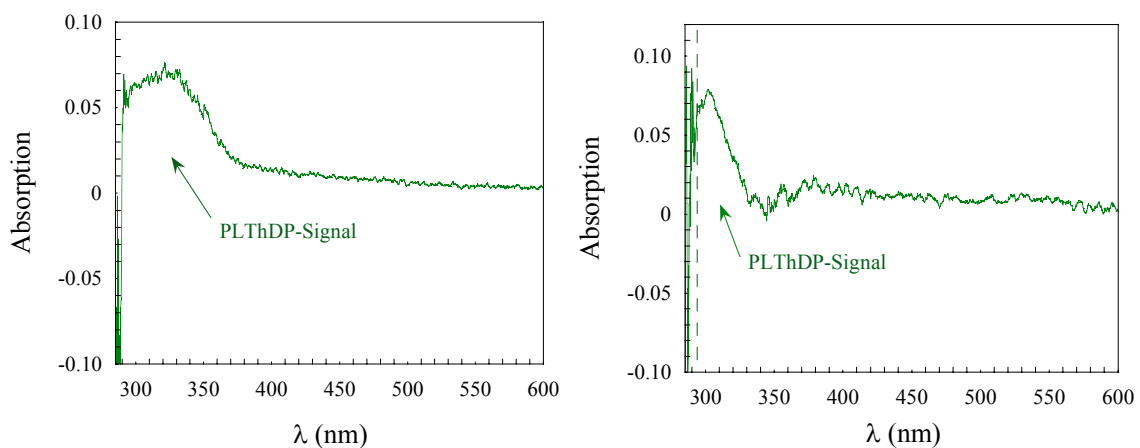


Abb. A5. Differenzspektren der *hsPDH-E1*-Varianten S271E (links) und S203E (rechts) nach Bindung von MAP (—). Bedingungen: 4 mg/ml (52 μM aktive Zentren) *hsPDH-E1*-Varianten, 0.5 mM ThDP, 1 mM MgSO_4 , 10 mM MAP, $t = 15$ min, 0.1 M KPP, 0.3 M KCl, pH 7.6, $T = 30^\circ\text{C}$.

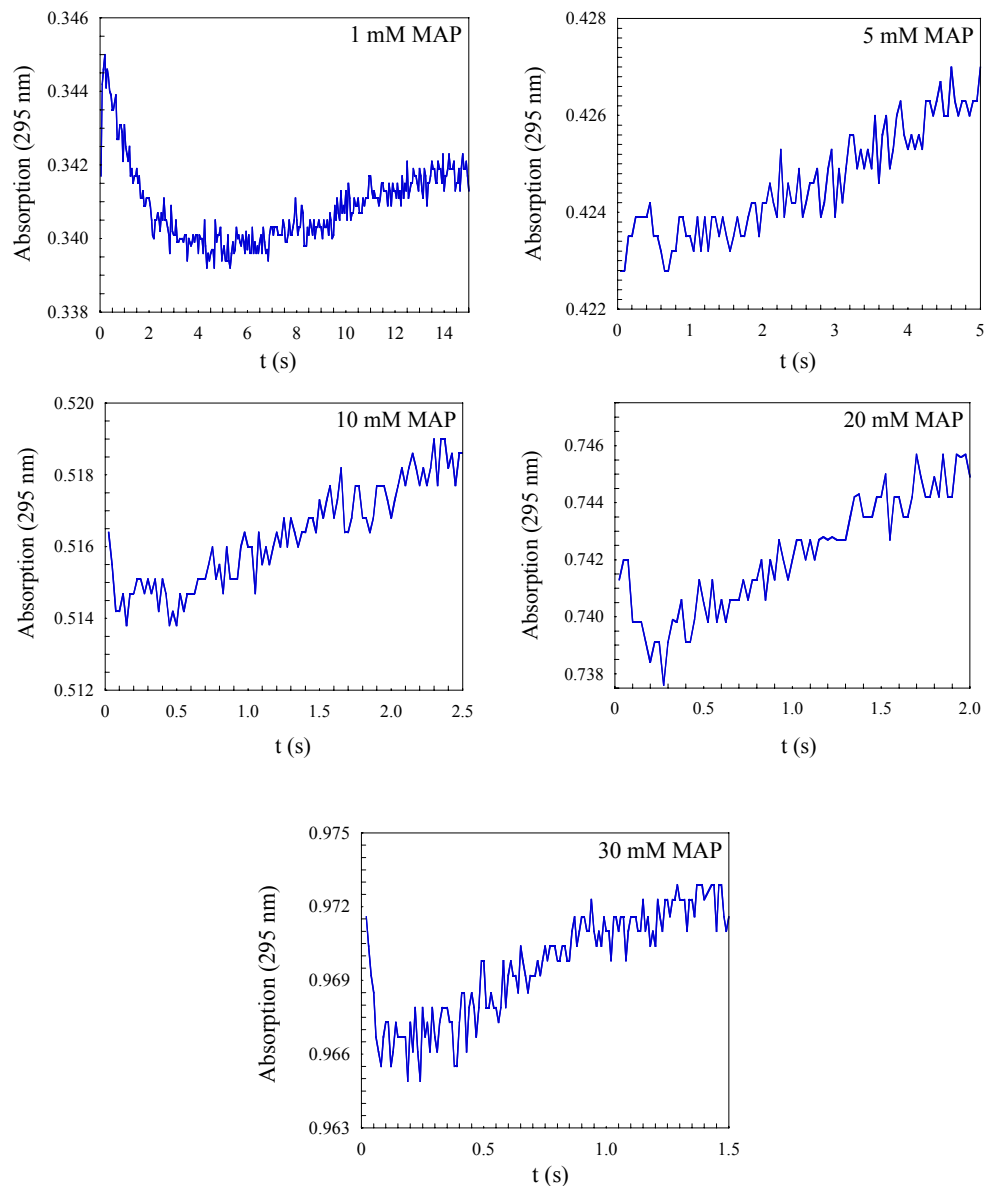


Abb. A6. lag-Phasen der *stopped-flow*-Progresskurven (Abb. 3.71 links) für die Bindung von MAP an die *hsPDH-E1 S271E* unter Bildung des stabilen PLThDP (Zunahme der Startabsorption bedingt durch Eigenabsorption von MAP). Bedingungen: 2 mg/ml (26 μ M aktive Zentren) *hsPDH-E1* und Varianten, 0.25 mM ThDP, 0.5 mM MgSO₄, 0.1 M KPP, 0.3 M KCl, pH 7.6, T = 30 °C.

Danksagung

Das Gelingen dieser Arbeit beruht auf der Mitarbeit vieler Personen, bei denen ich mich an dieser Stelle herzlich bedanken möchte.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Kai Tittmann für die Möglichkeit, die Arbeit unter seiner Leitung anzufertigen. Die Diskussionen praktischer und theoretischer Natur haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Des Weiteren danke ich Prof. Dr. Kai Tittmann für die Durchführung und Auswertung der NMR-Experimente.

PD. Dr. Ralph Golbik möchte ich für seine ständige Diskussionsbereitschaft, die Ermutigungen und die Lebensweisheiten, die er mir mit auf den Weg gegeben hat, ganz herzlich danken. Zudem stellte PD Dr. Ralph Golbik die Substrat- und Cofaktoranaloga zur Verfügung.

Prof. Dr. Mulchand Patel und seiner Arbeitsgruppe danke ich für die zur Verfügung gestellten Plasmide und die ertragreiche Zusammenarbeit während meiner Promotionszeit.

Prof. em. Dr. Gerhard Hübner und Prof. em. Dr. Alfred Schellenberger danke ich für die hilfreichen Diskussionen in den Arbeitsgruppenbesprechungen.

Für die Aufnahme der SAXS-Daten und deren Auswertung, sowie die Diskussion der Ergebnisse, möchte ich mich bei PD Dr. Stephan König bedanken.

Bei PD Dr. Hauke Lilie bedanke ich mich zum einen für die Durchführung und Auswertung der Experimente mit analytischer Ultrazentrifugation, zum anderen für seine Diskussionsbereitschaft und das Interesse an meiner gesamten Arbeit.

Ein herzlicher Dank gilt Frau Dr. Angelika Schierhorn und Frau Christina Gersching für die Aufnahme der zahlreichen Massenspektren.

Frau Dipl.-Biochemikerin Kathrin Schröder-Tittmann und Dr. Eva Bosse-Doennecke danke ich für die Einführung in die molekularbiologische Handhabung des SUMO-Systems und die

praktische Unterstützung. Zudem danke ich Kathrin und Frau Uta Best für die Einführung in die Technik der Fermentation. In diesem Zusammenhang danke ich ebenfalls Prof. Dr. Rainer Rudolph für die zur Verfügung gestellten Arbeitsmöglichkeiten in der Abteilung Biotechnologie.

Dr. Martin Kleinschmidt danke ich für die Durchführung der ITC-Experimente.

Ein besonderer Dank gilt Dipl.-Biochemiker Michael Spinka für die Hilfe bei der Erstellung des Mathematischen Appendix, die hilfreichen Diskussionen meiner Ergebnisse und für die Erweiterung meines theoretischen Horizonts durch zahlreiche Gespräche.

Neben den vielen StudentInnen, die während meiner Arbeit an der Thematik mitgearbeitet haben, gilt mein herzlicher Dank Dipl.-Biochemiker Bert Hans-Otto Güttler bedanken. Mit viel Fleiß, Geduld und Optimismus hat er Ergebnisse erzielt, die einen wichtigen Beitrag zum Gelingen der vorliegenden Arbeit darstellen.

Bei den Mitarbeitern der AG Enzymologie bedanke ich mich für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die diskussionsreichen und bisweilen sehr lustigen Teerunden und die Arbeitsgruppenausflüge. Dipl.-Biochemikerin Annett Weidner möchte ich zudem für die Hilfe bei der Anfertigung von Strukturbildern meinen Dank aussprechen.

Ohne die finanzielle Unterstützung durch die Graduiertenförderung des Landes-Sachsen-Anhalt wäre die Anfertigung dieser Arbeit nicht möglich gewesen. Insbesondere danke ich in diesem Zusammenhang Frau Eiser für die Betreuung während meiner Zeit als Stipendiatin.

Ein besonderer Dank gilt meiner Freundin Kathrin Schröder-Tittmann, die mich während der gesamten Arbeit nicht nur fachlich sondern in allen Lebenslagen unterstützt hat.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Freunden und meiner gesamten Familie für den Rückhalt in meinem Leben bedanken. Im Besonderen danke ich meinen Eltern, meinem lieben Mann Raiko und unserer Tochter Maia Alma für ihre grenzenlose Unterstützung, ihre Liebe, ihre Ermutigungen und ihr Verständnis.

Erklärung

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

Halle, den 03.11.2009

Franziska Seifert

Lebenslauf

Angaben zur Person

Name: Franziska Seifert (geborene Demuth)
 Anschrift: Hegelstraße 14, 06114 Halle (Saale)
 Geburtsdatum: 28.12.1981
 Geburtsort: Halle (Saale)
 Nationalität: deutsch
 Familienstand: verheiratet, 1 Kind
 Email: franzi_seifert@t-online.de

schulische und universitäre Ausbildung

1988-1990	Grundschule OS Konrad Wolf, Halle
1990-1992	Grundschule Albrecht-Dürer, Halle
1992-1997	Gymnasium „Thomas-Müntzer“, Halle
1997-2000	Sportgymnasium Halle
2000-2005	Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Abschlussnote 1.0)
seit Oktober 2005	Promotionsstudium in der Arbeitsgruppe Molekulare Enzymologie der Abteilung Enzymologie am Institut für Biochemie und Biotechnologie, Naturwissenschaftliche Fakultät I der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

weitere Tätigkeiten

06/2003-08/2003	Auslandsaufenthalt an der <i>University of British Columbia (Department of Physiology)</i> , Vancouver, Kanada
10-11/2002, 11-12/2003	wissenschaftliche Hilfskraft in der Abteilung Biotechnologie des Institutes Biochemie/Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
05-09/2005	wissenschaftliches Praktikum bei der probiodrug AG in Halle (Saale)

Förderungen und Auszeichnungen

02/2003-05/2005	Stipendium der „Studienstiftung des Deutschen Volkes“
09/2006	Kurt-Mothes-Preis auf dem Gebiet der Molekularen Biowissenschaften
10/2005-07/2009	Promotionsstipendium der Graduiertenförderung des Landes Sachsen-Anhalt

Lehrtätigkeiten

Betreuung der Praktika „Enzymkinetik I“ und „Enzymkinetik II“, Betreuung eines Forschungsgruppenpraktikums, Betreuung einer Diplomarbeit

Publikationen

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

Seifert, F., Ciszak, E., Korotchkina, L., Golbik, R., Spinka, M., Dominiak, P., Sidhu, S., Brauer, J., Patel, M. S. & Tittmann, K. (2007): Phosphorylation of serine 264 impedes active site accessibility in the E1 component of the human pyruvate dehydrogenase multienzyme complex. *Biochemistry*, 46, 6277-6287.

Vorträge

„Mechanism and regulation of the human pyruvate dehydrogenase multienzyme complex“, ThDP-Symposium, Frankfurt a.M., September 2006

Poster

Franziska Seifert, Ewa Ciszak, Ralph Golbik, Bert Güttler, Johanna Brauer, Liubov G. Korotchkina, Mulchand Patel & Kai Tittmann.: Human PDHc E1 component: Evidence for half-of-the-sites reactivity and new insights into the mode of regulation by phosphorylation-dephosphorylation of Ser264. Chemical Biology of Thiamine, 7th international conference on mechanism and physiology of thiamine, Wittenberg, Mai 2008.