

**Biochemische, kinetische und strukturelle
Untersuchungen der Transaldolase aus
*Thermoplasma acidophilum***

D i s s e r t a t i o n

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

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



von **Anja Lehweiß-Litzmann**
geboren am 23.02.1980 in Leipzig

Gutachter:

1. Prof. Dr. Kai Tittmann
2. PD Dr. Ralph Golbik
3. Prof. Dr. Markus Wahl

Halle (Saale), den 05.07.2011

"If in the first act you have hung a pistol on the wall,
then in the following one it should be fired.
Otherwise don't put it there."

Anton Pavlovitch Chekhov

From Gurlyand's *Reminiscences of A. P. Chekhov*,
in *Teatr i iskusstvo* 1904, No. 28, 11 July, p. 521

Inhaltsverzeichnis

<u>INHALTSVERZEICHNIS.....</u>	<u>I</u>
<u>TABELLENVERZEICHNIS</u>	<u>V</u>
<u>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</u>	<u>VI</u>
<u>ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE.....</u>	<u>VIII</u>
<u>1 EINLEITUNG.....</u>	<u>1</u>
1.1.1 TRANSALDOLASE IM STOFFWECHSEL.....	1
1.1.2 DER REAKTIONSMECHANISMUS VON TRANSALDOLASE	3
1.1.3 DIE STRUKTUR DER TRANSALDOLASE	5
1.1.4 DAS AKTIVE ZENTRUM VON TRANSALDOLASE	6
1.1.5 ZIELSTELLUNG DER ARBEIT	7
<u>2 MATERIAL UND METHODEN</u>	<u>9</u>
2.1 MATERIALIEN	9
2.1.1 CHEMIKALIEN	9
2.1.2 GERÄTE UND SONSTIGE MATERIALIEN	10
2.2 METHODEN.....	11
2.2.1 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	11
2.2.1.1 Generierung von Proteinvarianten	11
2.2.2 PRÄPARATION VON TRANSALDOLASE.....	12
2.2.2.1 Zellanzucht und Expression	12
2.2.2.2 Proteinreinigung.....	13
2.2.3 ANALYTISCHE ULTRAZENTRIFUGATION	14
2.2.4 UV-VIS-SPEKTROSKOPIE.....	16
2.2.4.1 Konzentrationsbestimmung von DNA und Proteinen.....	16

2.2.4.2	Aktivitätstest – <i>steady-state</i> -Messungen.....	16
2.2.4.3	Untersuchung von inhibitorischen Effekten.....	17
2.2.4.4	Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit vom pH-Wert.....	17
2.2.4.5	Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Temperatur	17
2.2.4.6	Bestimmung der thermodynamischen Parameter der Denaturierung der TA	18
2.2.4.7	Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Ionenstärke	19
2.2.4.8	Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Proteinkonzentration.....	20
2.2.5	<i>PRE-STEADY-STATE</i> -MESSUNGEN MIT <i>STOPPED-FLOW</i> -TECHNIK.....	21
2.2.6	UNTERSUCHUNG DES KINETISCHEN LÖSUNGSMITTELISOTOPIEEFFEKTS.....	22
2.2.7	CD-SPEKTROSKOPIE	24
2.2.8	MASSENSPEKTROMETRIE ZUR INTERMEDIATANALYSE	26
2.2.8.1	Direkte Messung.....	26
2.2.8.2	Diskontinuierliche Messung durch Säure- <i>quench</i>	27
2.2.8.3	Test der Proteinstabilität für <i>quench</i> -MS.....	28
2.2.8.4	Auswertung der Spektren.....	28
2.2.8.5	Untersuchung von E4P-Lösung mittels nano-ESI-Massenspektrometrie	29
2.2.9	KRISTALLOGRAPHISCHE ARBEITEN.....	29
2.2.9.1	Kristallisation	29
2.2.9.2	Datenaufnahme und -prozessierung.....	31
2.2.9.3	Modellierung und kristallographische Verfeinerung	32
2.2.9.4	Graphische Darstellung	32
2.2.9.5	Analyse der Strukturen.....	32
3	<u>ERGEBNISSE UND DISKUSSION</u>	33
3.1	MOLEKULARBIOLOGISCHE ARBEITEN	33
3.1.1	GENERIERUNG VON PROTEINVARIANTEN	33
3.1.2	FINDEN EINES EXPRESSIONSSTAMMS	35
3.2	EXPRESSION UND ENZYMPRÄPARATION	35
3.3	BIOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG	36
3.3.1	STRUKTURELLE INTEGRITÄT VON TRANSALDOLASE UND VARIANTEN	36
3.3.2	ABHÄNGIGKEIT DER REAKTIONSGESCHWINDIGKEIT VOM PH-WERT.....	37
3.3.2.1	Vorhersage von pK _a -Werten mit PROPKA	38
3.3.3	ABHÄNGIGKEIT DER REAKTIONSGESCHWINDIGKEIT VON DER IONENSTÄRKE	39

3.3.4	ABHÄNGIGKEIT DER REAKTIONSGESCHWINDIGKEIT VON DER TEMPERATUR	40
3.3.5	THERMISCHE STABILITÄT.....	40
3.3.6	BESTIMMUNG DES OLIGOMERISIERUNGSGLEICHGEWICHTS.....	41
3.3.7	AKTIVITÄT DER OLIGOMERSPEZIES	43
3.4	DETEKTION VON REAKTIONSINTERMEDIATEN MITTELS MASSENSPEKTROMETRIE	44
3.4.1	DIREKTE MESSUNG	45
3.4.2	DISKONTINUIERLICHE MESSUNG.....	47
3.4.2.1	Proteinstabilität unter den Messbedingungen	47
3.4.2.2	Wildtyp-Transaldolase und Varianten.....	49
3.5	RÖNTGENKRISTALLSTRUKTURANALYSE.....	55
3.5.1	KRISTALLISATION.....	55
3.5.2	QUARTÄRSTRUKTUR DER TRANSALDOLASE AUS <i>THERMOPLASMA ACIDOPHILUM</i>	56
3.5.3	DAS AKTIVE ZENTRUM.....	60
3.5.4	SCHIFFBASEN MIT DONORSUBSTRATEN IN WT UND VARIANTE E60A.....	60
3.5.4.1	Molekülspannungen als mögliche Triebkraft der Reaktion	63
3.5.4.2	Wassermoleküle in Variante E60A	65
3.5.4.3	Auftreten eines nicht-natürlichen kovalenten C3-Addukts	65
3.5.5	MICHAELIS-KOMPLEXE.....	66
3.5.5.1	Struktur von Wildtyp-Transaldolase mit dem Akzeptorsubstrat Erythrose-4-phosphat	66
3.5.5.2	Struktur von Wildtyp-Transaldolase mit Xylulose-5-phosphat	68
3.5.5.3	Struktur von Wildtyp-Transaldolase mit Arabinose-5-phosphat	69
3.5.5.4	Struktur von Wildtyp-Transaldolase mit Sorbitol-6-phosphat	70
3.5.6	DAS AKTIVE ZENTRUM DER VARIANTE K86A	71
3.5.6.1	Bindung von Fruktose-6-phosphat in K86A.....	71
3.5.6.2	Bindung von Glycerin und Citrat in der Variante K86A.....	72
3.5.7	ASP6 ZUR PROTONIERUNG DER C2-KETOGRUPPE DES DONORSUBSTRATS.....	73
3.5.8	DIE STRUKTUREN DER VARIANTEN F132Y, T110V, E60Q UND D6N.....	74
3.5.8.1	Variante F132Y	74
3.5.8.2	Variante T110V.....	75
3.5.8.3	Varianten E60Q und D6N	77
3.5.9	BEWEGLICHKEIT DER RINGÄUßEREN HELICES – SUBSTRATBINDUNG NACH EINEM <i>CONFORMATIONAL-SELECTION-</i> MECHANISMUS	77
3.5.10	MODELL EINES CARBINOLAMINS – RELATIVE LAGE VON C2-OH ZU WASSER UND GLU60	79

3.5.11 ZUSAMMENFASSENDES ZUM SUBSTRATKANAL, PHOSPHATBINDEMOTIV SOWIE BINDUNG VON ZUCKERPHOSPHATEN UND BEZÜGE ZUR TRANSKETOLASE	79
3.6 V-S-CHARAKTERISTIK	82
3.6.1 <i>STEADY-STATE</i> -KINETIKEN	82
3.6.2 ALDOLASEAKTIVITÄT DER VARIANTE F132Y.....	85
3.6.3 <i>PRE-STEADY-STATE</i> -KINETIK.....	86
3.6.4 KOMPETITIVE HEMMUNG DURCH SORBITOL-6-PHOSPHAT UND XYLULOSE-5-PHOSPHAT	90
3.6.5 ANALYSE DES KATALYSEMECHANISMUS.....	91
3.6.6 LÖSUNGSMITTELISOTOPIEEFFEKT	93
4 <u>ZUSAMMENFASSUNG.....</u>	95
5 <u>AUSBLICK.....</u>	99
6 <u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	101
7 <u>ANHANG.....</u>	7-1
7.1 KATALYSEZYKLUS VON TRANSKETOLASE	7-1
7.2 ANHÄNGIGKEIT DER REAKTIONSGESCHWINDIGKEIT VON DER PROTEINKONZENTRATION	7-2
7.3 STATISTIKEN DER KRISTALLOGRAPHISCHEN ARBEITEN (AUF ENGLISCH)	7-3
7.4 ALTERNATIVE KONFORMATIONEN IN GRUNDSTRUKTUREN	7-9
7.5 AROMATISCH-AROMATISCHE INTERAKTION (π -STACKING) ALS KONTAKT ZWISCHEN MONOMEREN UND INNERHALB EINES MONOMERS	7-10
7.6 VERGLEICH DER BINDUNG VON S7P UND E4P IM AKTIVEN ZENTRUM VON WT-TACTA.....	7-11
7.7 MODELL EINES CARBINOLAMINS IN TACTA.....	7-12
7.8 ANALYSE VON E4P-LÖSUNG (SIGMA ALDRICH) MIT ESI-MS	7-13

Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1 Sequenzvergleich von Aldolasen	7
Tab. 2.1 Primer für die ortsgerichteten Mutagenesen	12
Tab. 2.2 Stufengradient zur Elution von <i>TacTA</i>	14
Tab. 2.3 Vergleich der Methoden zur Berechnung der Intensitäten und resultierende Verhältnisse der Peaks zueinander.....	29
Tab. 2.4 Endkonzentration von Substraten im Tropfen.	30
Tab. 3.1 Mit PROPKA berechnete pK_a -Werte für vermutlich an der Katalyse beteiligte Aminosäuren.....	38
Tab. 3.2 Erwartete Molekülmassen für Transaldolase und auftretende Intermediate.....	44
Tab. 3.3 Stabilität von unmodifizierter <i>TacTA</i> (E) und F6P-Schiffbase (C6I) in Acetonitril/1 % HCOOH (70/30). ...	49
Tab. 3.4 Übersicht über direkte Kontakte des Pentamers (Wt-Grundzustand) zu symmetrieverwandten Molekülen.....	59
Tab. 3.5 Zusammenfassung der im gekoppelten enzymatischen Test bestimmten enzymkinetischen Parameter für das Wildtypenzym <i>TacTA</i> und die Varianten.	83
Tab. 3.6 Zusammenfassung der im gekoppelten enzymatischen Test bestimmten enzymkinetischen Parameter für das Wildtypenzym <i>TacTA</i> und die Variante F132Y zur Untersuchung der Aldolaseaktivität.....	85
Tab. 3.7 Zusammenfassung der mittels <i>stopped-flow</i> -Technik bestimmten kinetischen Parameter der ersten Halbreaktion von <i>TacTA</i> bei einfachem Substratumsatz.	89
Tab. 3.8 Amplituden der beiden exponentiellen Phasen der Progresskurven der <i>pre-steady-state</i> -Kinetik nach doppelt exponentieller Anpassung erster Ordnung mit linearem Folgeanstieg.....	89

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1 Der Pentosephosphatweg.	2
Abb. 1.2 Schema der von Transaldolase katalysierten Reaktion.	3
Abb. 1.3 Vorgeschlagerener Reaktionsmechanismus der ersten Halbreaktion des Katalysezyklus von Transaldolase.	4
Abb. 1.4 Schematische Darstellung einer Transaldolaseuntereinheit aus <i>E. coli</i>	6
Abb. 1.5 Schematische Darstellung eines Dimers und Pentamers der Fruktose-6-phosphat-Aldolase aus <i>E. coli</i> . ..	6
Abb. 1.6 Schematische Ansicht der Interaktionen des mit NaBH ₄ reduzierten Schiffbasen-Intermediats.	7
Abb. 2.1 Reaktionssequenz des Aktivitätstests.	16
Abb. 2.2 Schematische Darstellung der ersten Halbreaktion der TA.	21
Abb. 3.1 Sequenzvergleich von <i>TacTA</i> mit Proteinen der Transaldolasefamilie.	34
Abb. 3.2 Expression des <i>Tac</i> -Operons.	35
Abb. 3.3 Elutionsprofil von <i>TacTA</i> und SDS-PAGE zur Illustration der Reinigungsprozedur.	36
Abb. 3.4 Fern- und Nah-UV-CD-Spektrum von <i>Wt-TacTA</i>	37
Abb. 3.5 pH-Optimumskurve und logarithmische Auftragung für <i>TacTA</i>	38
Abb. 3.6 Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von <i>TacTA</i> von der Ionenstärke.	39
Abb. 3.7 Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit von <i>TacTA</i> in Abhängigkeit von der Temperatur.	40
Abb. 3.8 Thermische Inaktivierung von <i>TacTA</i>	41
Abb. 3.9 Apparentes Molekulargewicht von <i>TacTA</i> in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration.	42
Abb. 3.10 Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der <i>TacTA</i> von der Proteinkonzentration.	43
Abb. 3.11 Skizze zur relativen Lage der bei der Reaktion von <i>TacTA</i> durch Intermediatbildung erwarteten Messsignale zueinander.	45
Abb. 3.12 Spektren der direkten Messung von <i>TacTA</i> nach <i>deconvolution</i>	45
Abb. 3.13 Vergrößerung des Spektrums von TA + F6P + E4P nach <i>deconvolution</i>	46
Abb. 3.14 Proteinstabilität von <i>TacTA</i> unter den Messbedingungen, Teil 1.	48
Abb. 3.15 Proteinstabilität von <i>TacTA</i> unter den Messbedingungen, Teil 2.	49
Abb. 3.16 Intermediatbildungskurven von TA und TA-Varianten.	50
Abb. 3.17 Ausschnitt aus dem Massenspektrum der <i>TacTA</i> -Variante E60Q.	52
Abb. 3.18 Einstellung des Gleichgewichts der kovalenten Intermediate bei <i>TacTA</i>	54
Abb. 3.19 Verschiedene Formen von <i>TacTA</i> -Kristallen.	55
Abb. 3.20 Zuckerphosphate, die für die Kristallisation mit TA eingesetzt wurden.	56
Abb. 3.21 Kristallstruktur eines Dekamers von <i>TacTA</i>	57
Abb. 3.22 Cartoon-Darstellung eines <i>TacTA</i> -Dimers.	58
Abb. 3.23 Optische Darstellung der B-Faktoren eines <i>TacTA</i> -Pentamers.	58
Abb. 3.24 Stereoansicht des aktiven Zentrums von <i>TacTA</i>	60
Abb. 3.25 Das aktive Zentrum mit als Schiffbase gebundenen Donorsubstraten bei <i>TacTA</i> als Stereoansicht.	61

Abb. 3.26 Schematische Darstellung der Bindung des Donorsubstrats F6P im aktiven Zentrum von <i>TacTA</i> als Schiffbase.....	62
Abb. 3.27 Detailansicht der Schiffbasen-Bindung.	64
Abb. 3.28 Ausschnitt aus dem aktiven Zentrum der Variante E60A.	65
Abb. 3.29 Glycerinaldehyd in <i>Wt-TacTA</i> als Carbinolamin gebunden.	66
Abb. 3.30 Das aktive Zentrum von <i>TacTA</i> mit dem Akzeptorsubstrat E4P.	67
Abb. 3.31 <i>Wt-TacTA</i> mit X5P.	68
Abb. 3.32 Vergrößerung auf das sp^2 -hybridisierte C2-Atom von in <i>TacTA</i> gebundenem X5P.	69
Abb. 3.33 <i>Wt-TacTA</i> mit A5P.	70
Abb. 3.34 <i>Wt-TacTA</i> mit S6P.....	71
Abb. 3.35 <i>TacTA</i> -Variante K86A mit F6P.....	72
Abb. 3.36 <i>TacTA</i> -Variante K86A mit Glycerin und Citrat als Michaeliskomplex.	72
Abb. 3.37 Asp in Wechselwirkung mit O2 von S6P und F6P im Michaeliskomplex bei <i>TacTA</i>	73
Abb. 3.38 Superposition der aktiven Zentren von <i>Wt-TacTA</i> +F6P und <i>TacTA</i> -Variante F132Y.	75
Abb. 3.39 Stereodarstellung der Superposition der aktiven Zentren von <i>Wt-TacTA</i> +F6P und <i>TacTA</i> -Variante T110V+DHA.	76
Abb. 3.40 Alternative Konformationen bei <i>TacTA</i>	77
Abb. 3.41 Offene und geschlossene Konformation von <i>TacTA</i>	78
Abb. 3.42 Progresskurven durch Umsatz von F6P und E4P durch <i>Wt-TacTA</i> und Michaelis-Menten-Auftragung.	82
Abb. 3.43 Progresskurven der <i>pre-steady state</i> Messungen von <i>Wt-TacTA</i> und Variante F132Y.	86
Abb. 3.44 Progresskurven des einmaligen Umsatzes von F6P durch <i>Wt-TacTA</i>	87
Abb. 3.45 Progresskurve und Michaelis-Menten-Kinetik des einmaligen Umsatzes von F6P durch <i>Wt-TacTA</i>	88
Abb. 3.46 Inhibitorischer Effekt von S6P und X5P auf die Aktivität von <i>TacTA</i>	91
Abb. 3.47 Lineweaver-Burk-Auftragung der Zweisubstratreaktion von <i>TacTA</i>	92
Abb. 3.48 <i>stopped flow</i> -Progresskurven von <i>TacTA</i> bei Umsatz von unterschiedlichen Konzentrationen von F6P und E4P.	92
Abb. 3.49 Inverser kinetischer Lösungsmittelisotopieeffekt bei <i>TacTA</i>	94
Abb. 4.1 Schema zur Reaktion der Transaldolase.	97
Abb. 7.1 Katalysezyklus der Transketolase.	7-1
Abb. 7.2 Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der <i>TacTA</i> von der Proteinkonzentration.	7-2
Abb. 7.3 2 F_o-F_c <i>simulated annealing omit maps</i> des Bereichs von Rest 6 – 55 in <i>Wt-TacTA</i> im Grundzustand. ..	7-9
Abb. 7.4 π - <i>stacking</i> zwischen aromatischen Aminosäureseitenketten an den Randbereichen des bei <i>conformational sampling</i> mobilen Bereichs von <i>TacTA</i>	7-10
Abb. 7.5 Superposition der aktiven Zentren von <i>TacTA</i> mit E4P als Michaeliskomplex und der S7P-Schiffbase.	7-11
Abb. 7.6 Superposition des experimentell bestimmten F6P-Schiffbasen-Addukts mit einem modellierten Carbinolamin.	7-12
Abb. 7.7 Massenspektrum von E4P-Lösung.	7-13

Abkürzungen und Symbole

<i>a.u.</i>	<i>arbitrary units</i> , relative Einheiten
BisTris	Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan
C6C	als Carbinolamin gebundenes F6P, Intermediat in der Transaldolasereaktion
C7C	als Carbinolamin gebundenes S7P, Intermediat in der Transaldolasereaktion
C6I	als Schiffbase (Immonium) gebundenes F6P, Intermediat in der Transaldolasereaktion
C3I	als Schiffbase gebundenes DHA, Intermediat in der Transaldolasereaktion
C7I	als Schiffbase gebundenes S7P, Intermediat in der Transaldolasereaktion
DERA	D-2-Deoxyribose-5-phosphat-Aldolase
DFT	Dichtefunktionaltheorie
DHA	Dihydroxyaceton
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
DHFR	Dehydrofolatreduktase
E	Enzym, bezeichnet Transaldolase im Grundzustand
E4P	D-Erythrose-4-phosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ESI-MS	Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie
F6P	D-Fruktose-6-phosphat
FBP	D-Fruktose-1,6-bisphosphat
FBPA	Fruktose-1,6-bisphosphat-Aldolase
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
GAP	D-Glycerinaldehyd-3-phosphat
GDH-TPI	α -Glycerinphosphatdehydrogenase-Triosephosphatisomerase aus Kaninchenmuskel, Typ III
GlyGly	Glycylglycin-Puffer
H-Brücke	Wasserstoffbrücke
KDPG-Aldolase	2-Keto-3-deoxy-6-phosphogluconat-Aldolase
LB-Kana-Medium	LB-Medium mit 20 $\mu\text{g/ml}$ Kanamycin

MS	Massenspektrometer
NaCitrat	Natriumcitrat
NAD ⁺	oxidiertes Nicotinsäureamidadenindinukleotid
NADH	reduziertes Nicotinsäureamidadenindinukleotid
PPW	Pentosephosphatweg
R5P	Ribose-5-phosphat
Ru5P	Ribulose-5-phosphat
Ru5PE	Ribulose-5-phosphat epimerase
R5PI	Ribose-5-phosphatisomerase
<i>SA-omit map</i>	<i>simulated annealing omit map</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
S6P	D-Sorbitol-6-phosphat
S7P	D-Sedoheptulose-7-phosphat
TA	Transaldolase
<i>TacTA</i>	Transaldolase aus <i>Thermoplasma acidophilum</i>
ThDP	Thiamindiphosphat
TK	Transketolase
TLS	<i>translation/libration/screw</i>
TMAE	Trimethylaminoethyl
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
D-[UL- ¹³ C ₆]-F6P	<i>uniformly labelled</i> ¹³ C-D- Fruktose-6-phosphat
M (u)	Molekülmasse als <i>unified atomic mass</i>
Wt	Wildtyp
X5P	D-Xylulose-5-phosphat

In dieser Arbeit wird die Bezeichnung „Schiffbase“ alleinstehend und in der zusammengesetzten Form „Schiffbasen-“ als Abkürzung des Begriffs „Schiff'sche Base“ verwendet.

1 Einleitung

In Präparationen aus Leber und Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) wurde 1953 eine Enzymaktivität gefunden, durch die Dihydroxyacetoneinheiten zwischen Fruktose-6-phosphat und Sedoheptulose-7-phosphat transferiert werden (HORECKER UND SMYRNIOTIS, 1953). Das Enzym wurde Transaldolase (TA im Folgenden) (EC 2.2.1.2) genannt. Seitdem wurden verschiedene Transaldolasen und verwandte Enzyme fast ubiquitär in Organismen aller drei Lebensdomänen entdeckt. Durch den gewonnenen Überblick über die Vielfalt der Transaldolasefamilie wurde eine Neukategorisierung in Unterfamilien notwendig (SAMLAND UND SPRENGER, 2009). Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der archaealen TA aus *Thermoplasma acidophilum*, einer Transaldolase der Unterfamilie 4. TAs dieser Unterfamilie unterscheiden sich von Unterfamilie 1, den klassischen TAs, auf den ersten Blick dadurch, dass sie mit durchschnittlich 220 Aminosäuren pro Monomer wesentlich kleiner sind als ihre klassischen Homologen (310-350 Aminosäuren).

Thermoplasma acidophilum (*T. ac.*), ein thermo- und acidophiles, heterotrophes Archaeon lebt bei Temperaturen von 55-60 °C und bei pH-Werten von 0,5 – 4 in Kohleabraumhalden und Schwefelfeldern. Trotz des Fehlens einer Zellwand kann *T. ac.*, nur mit einer Plasmamembran ausgestattet, in der sauren Umgebung einen nahezu neutralen zytosolischen pH aufrecht erhalten (HSUNG UND HAUG, 1975).

1.1.1 Transaldolase im Stoffwechsel

Die Transaldolase ist im Zusammenspiel mit der Transketolase (TK) eines der Hauptenzyme des Pentosephosphatwegs (PPW). In Eukaryonten und Bakterien hat der PPW eine zentrale Rolle. Über ihn werden z.B. NADPH für reduzierende Stoffwechselforgänge, Ribose-5-phosphat für die Nukleotidbiosynthese und Erythrose-4-phosphat als Vorläufer für die Synthese aromatischer Aminosäuren generiert. Der klassische PPW gliedert sich in einen nichtoxidativen und einen oxidativen Teil (Abb. 1.1). Im linearen, oxidativen Teil wird Glukose-6-phosphat unter Bildung von NADPH zu Ribulose-5-phosphat umgesetzt. Durch Epimerisierung (Ribulose-5-phosphat epimerase) und Isomerisierung (Ribose-5-phosphat isomerase) werden die Ketose Xylulose-5-phosphat (X5P) und die Aldose Ribose-5-phosphat (R5P) gebildet, welche Substrate für TK sind. TK katalysiert den Transfer von C2-Einheiten (Glykolaldehyd-Einheit) von einer Ketose auf eine Aldose. Bei TA werden C3-Einheiten transferiert. Für die grundsätzlich gleiche Reaktion beider Enzyme einer C-C-Bindungsspaltung und -knüpfung verwenden beide Enzyme verschiedene Mechanismen. So sind für die Katalyse der TK der Cofaktor Thiamindiphosphat (ThDP), die biologisch aktive Form des Vitamin B₁, und zweiwertige

Metallionen, die den Cofaktor über dessen Pyrophosphatrest im aktiven Zentrum fixieren, essentiell. Die Katalyse erfolgt über die Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen dem C2 des Thiazoliumrings und dem C2 α der Donorketose. Ein kurzes Reaktionsschema der TK mit den wesentlichen Schritten findet sich im Anhang (7.1). Die Reaktion der TA erfolgt ohne Cofaktor und wird im folgenden Kapitel ausführlicher dargestellt.

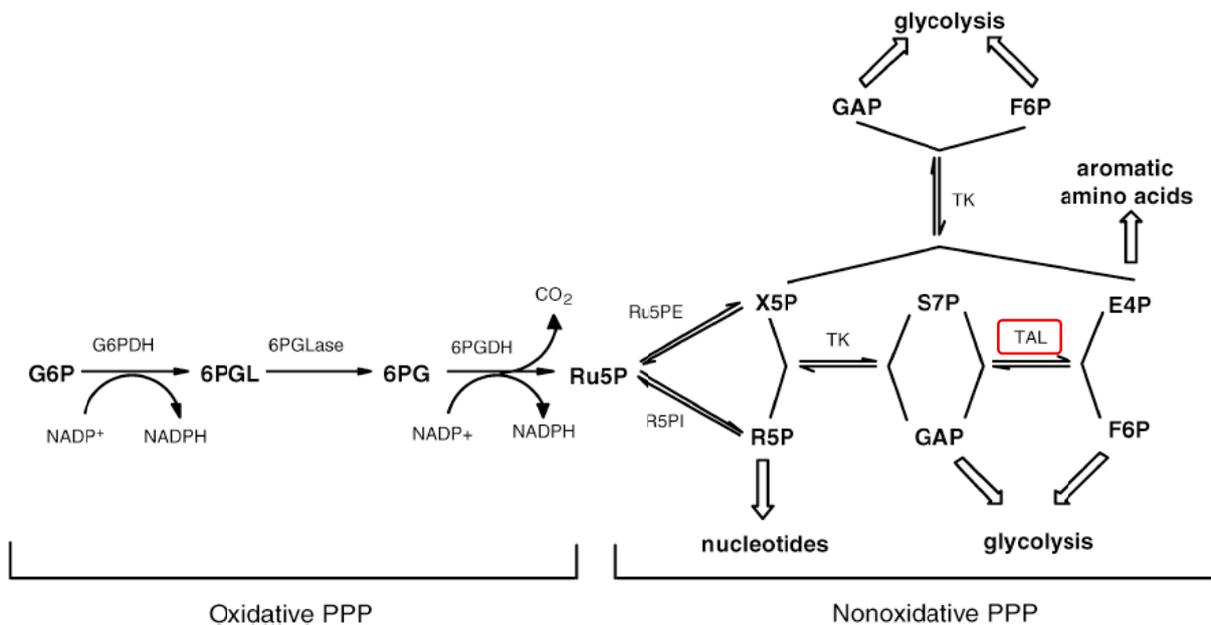


Abb. 1.1 Der Pentosephosphatweg.

Abbildung übernommen aus SODERBERG, 2005, Abkürzungen: G6P = Glukose-6-phosphat, G6PDH = Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase, 6PGL = 6-Phosphoglukono- δ -laktone, 6PGLase = 6-Phosphoglukono- δ -laktonease, 6PG = 6-Phospho-glukonat, 6PGDH = 6-Phosphoglukonatdehydrogenase, Ru5P = Ribulose-5-phosphat, Ru5PE = Ribulose-5-phosphat-3-Epimerase, R5PI = Ribose-5-phosphat-Isomerase, R5P = Ribose-5-phosphat; X5P = Xylulose-5-phosphat, TK = Transketolase, TAL = Transaldolase, S7P = Sedoheptulose-7-phosphat, GAP = Glycerinaldehyd-3-phosphat, E4P = Erythrose-4-phosphat, F6P = Fructose-6-phosphat

Das Genom von *T. ac.* wurde im Jahr 2000 vollständig sequenziert (RUEPP *et al.*, 2000). Dabei zeigte sich, dass der für viele Organismen im Stoffwechsel zentrale Pentosephosphatweg unvollständig ist und *T. ac.* nur über Enzyme des nichtoxidativen Teils verfügt. Auch bei anderen sequenzierten Archaeen fehlt der oxidative Teil und nur wenige der Archaeen haben wie *T. ac.* überhaupt einen kompletten Satz von Enzymen, die einen funktionellen nichtoxidativen Teil ermöglichen würden. Für *T. ac.* ist somit anzunehmen, dass der PPW durch die Zwischenprodukte der Glykolyse F6P und GAP gespeist wird und zur Gewinnung von R5P für die Nukleotidsynthese revers abläuft.

Nach verbreitetem Fehlen des oxidativen Teils des PPW in den Archaeen wurde als alternativer Stoffwechselweg zur Generierung von Pentosen die Produktion von Ribulose-5-phosphat über einen revers ablaufenden Ribulosemonophosphatweg vorgeschlagen (SODERBERG, 2005). Da *T. ac.* die dafür

benötigten Enzyme Hexulose-6-phosphat-Synthase und Hexulose-6-phosphat-Isomerase fehlen, sollte für *T. ac.* eine Substratzufuhr zum nichtoxidativen PPW über diesen Weg auszuschließen sein.

1.1.2 Der Reaktionsmechanismus von Transaldolase

Transaldolase überträgt Dihydroxyacetoneinheiten (C3, Einheit aus 3 Kohlenstoffatomen) von einer Ketose als C3-Donor auf eine Aldose als C3-Akzeptor. Natürliche Substrate sind dabei Sedoheptulose-7-phosphat (S7P) und Fruktose-6-phosphat als Donorsubstrate beziehungsweise Glycerinaldehyd-3-phosphat (GAP) und Erythrose-4-phosphat (E4P) als Akzeptorsubstrate. Das Grundschema der Reaktion ist in Abb. 1.2 dargestellt.

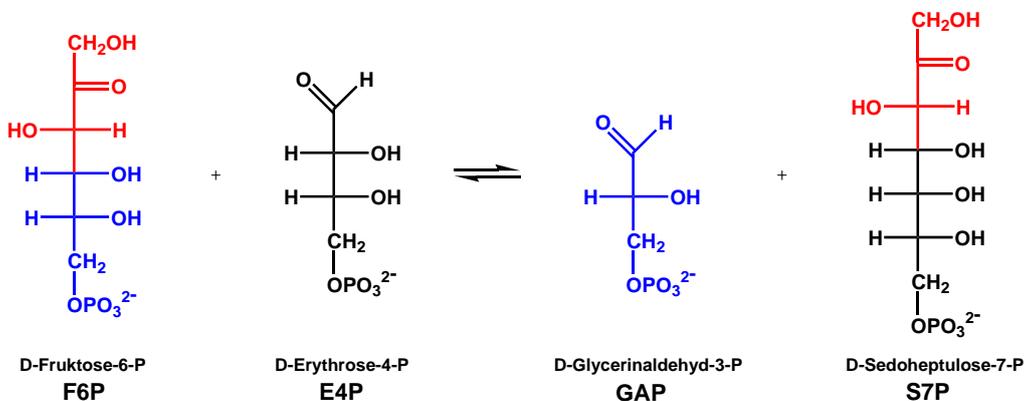


Abb. 1.2 Schema der von Transaldolase katalysierten Reaktion.

Abhängig von ihrem Reaktionsmechanismus wurden Aldolasen in 2 Klassen geordnet (RUTTER, 1964). Klasse I katalysiert die Reaktion über die Ausbildung einer Schiffbase, während bei Klasse II zweiwertige Metallionen, meist Zn^{2+} oder Fe^{2+} , als Elektrophil an der Katalyse beteiligt sind. Klasse I Aldolasen findet man überwiegend in Eukaryonten, Klasse II ist in Bakterien und Archaeen vorherrschend, aber in allen 3 Domänen kommen beide Klassen vor (MARSH UND LEBHERZ, 1992).

Zu den Aldolasen der Klasse I gehörig nutzt TA als katalytisches Hauptprinzip ein katalytisch aktives Lysin (Lys86 in *T. ac.*) zur Ausbildung eines kovalenten Intermediats, einer Schiffbase. Im aktuell von SCHÖRKEN *et al.*, 2001 und SAMLAND UND SPRENGER, 2009 vorgeschlagenen Reaktionsmechanismus (Abb. 1.3) wird das Schiffbasen bildende Lysin aktiviert, indem ein katalytisch aktives Wassermolekül die Deprotonierung der ϵ -Aminogruppe durch ein Glutamat (Glu60 in *T. ac.*) vermittelt. Die ϵ -Aminogruppe kann nun nukleophil das Carbonyl-Kohlenstoffatom von F6P angreifen, wobei über ein Zwitterion ein Carbinolamin gebildet wird.

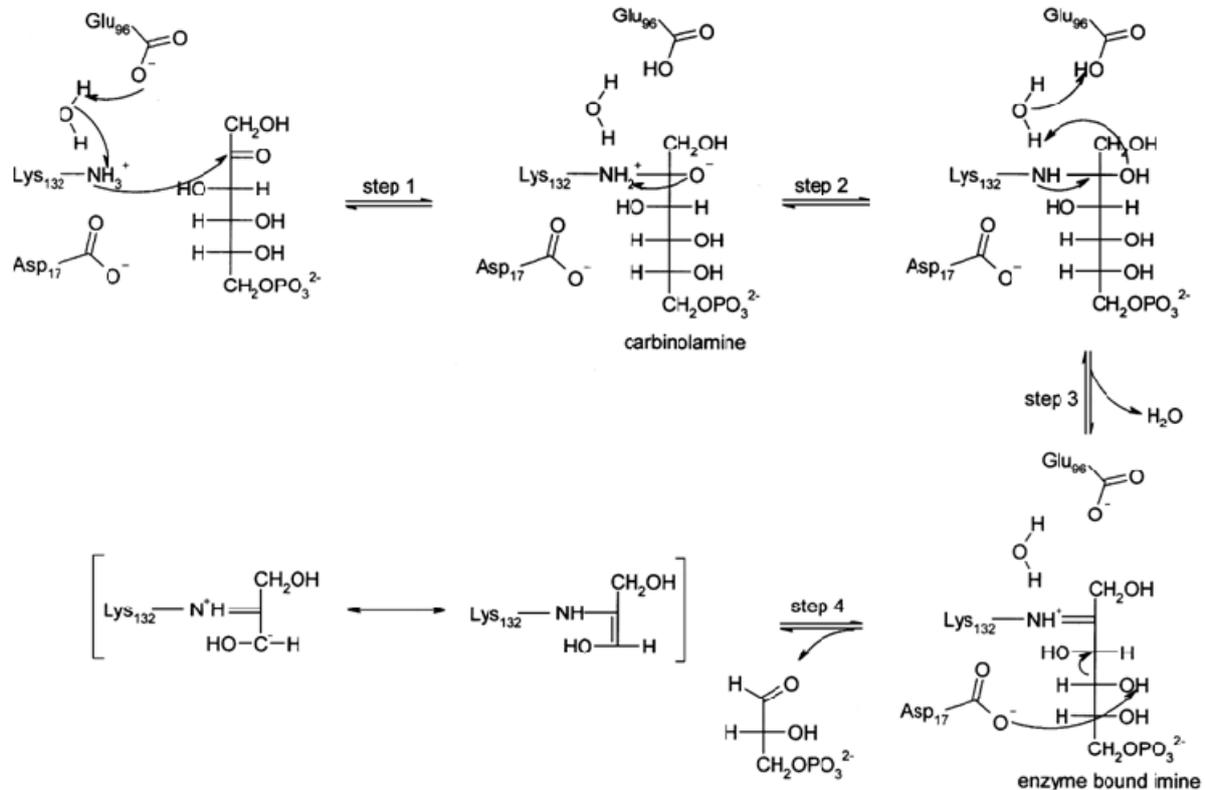


Abb. 1.3 Vorgeschlagerer Reaktionsmechanismus der ersten Halbreaktion des Katalysezyklus von Transaldolase. Die Beschriftung entspricht den Aminosäuren von Transaldolase B aus *E. coli*. Abbildung modifiziert von SAMLAND UND SPRENGER, 2009.

Im nächsten Schritt agiert Glutamat als Säure und protoniert über das Wasseratom die C2-OH-Gruppe des Carbinolamins. Diese wird als Wasser abgespalten und es kommt zur Bildung des Imminiums (Schiffbase). Anschließend abstrahiert eine Base (Asp6 in *T. ac.*) das Proton der C4-OH-Gruppe und die Bindungsspaltung wird eingeleitet. Glycerinaldehyd-3-phosphat wird als erstes Produkt freigesetzt und das zentrale Carbanion/Enamin-Intermediat verbleibt kovalent am Enzym. Das Carbanion kann das Aldehyd-C-Atom des Akzeptorsubstrats E4P angreifen. Die zweite Zyklushälfte schließt sich als Umkehrung der Reaktionen der ersten Hälfte an und Sedoheptulose-7-phosphat wird als zweites Produkt gebildet und freigesetzt. Austausch der Reste Glu, Asp und Thr im aktiven Zentrum führt zu erheblichen Aktivitätsverlusten, was die katalytische Bedeutung dieser Reste unterstreicht (SCHÖRKEN *et al.*, 2001).

Basierend auf der Röntgenkristallstruktur eines mittels Natriumborhydrid reduzierten Dihydroxyacetoinintermediats (N⁶-β-glyceryl-Lysin) von *E. coli* TA wurde einem Aspartatrest (Asp6 in *T. ac.*) die Deprotonierung von C4-OH und damit Hilfe bei der Bindungsspaltung zwischen C3 und C4 zugeschrieben (JIA *et al.*, 1997). Durch Überlagerung des verwandten Enzyms Fruktose-1,6-bisphosphat-

Aldolase (FBPA) aus Kaninchenmuskel mit TA entwickelten ST-JEAN *et al.*, 2005 Zweifel an dieser These und vermuteten den Glutamatrest in der Rolle als Protonen abstrahierende Base. Ein Anliegen der vorliegenden Arbeit war es, weitere Informationen über den Katalysemechanismus von TA zu sammeln und damit auch diesen Widerspruch zu klären.

1.1.3 Die Struktur der Transaldolase

Die Struktur der Transaldolase B aus *E. coli* wurde 1996 aufgeklärt (JIA *et al.*, 1996a). Seitdem wurden Strukturen verschiedener Varianten des *E. coli*-Enzyms und weiterer TAs der Unterfamilie 1 aus verschiedenen Organismen veröffentlicht [Mensch (PDB 1F05, THORELL *et al.*, 2000), Maus (PDB 2CWN), *Neisseria gonorrhoeae* (PDB 3CLM), *Saccharomyces cerevisiae* (PDB 3CQ0), *Francisella tularensis* (PDB 3IGX) und *Oleispira antarctica* (PDB 3M16)]. Diese ähneln sich stark im Aufbau, so dass hier stellvertretend das *E. coli*-Enzym vorgestellt wird. Weiterhin sind Transaldolasestrukturen der Unterfamilie 4 [*Thermotoga maritima* (PDB 1VPX), *Thermus thermophilus* (PDB 1WX0) und *Bacillus subtilis*] und die zur Unterfamilie 5 gehörige Fruktose-6-phosphat-Aldolase (FSA) aus *E. coli* veröffentlicht (PDB 1L6W, THORELL *et al.*, 2002). Letztere spaltet wie TA die Bindung zwischen C3 und C4 des Donorsubstrats, setzt aber wie Fruktose-1,6-bisphosphat-Aldolasen beide entstehenden Produkte sofort frei.

Ein Merkmal, das alle diese Enzyme teilen, ist das zentrale achtgliedrige α/β -barrel-Motiv der Monomere, wobei das katalytisch aktive Lysin mittig auf β -Strang 4 lokalisiert ist und in das Fassinnere ragt. Damit zeigt TA eine Permutation im α/β -barrel. Alle anderen Aldolasen der Klasse I haben das reaktive Lysin auf dem β -Strang 6. Bei einer Superposition von β 4 der TA mit β 6 der FBPA kommen weitere äquivalente Reste übereinander zu liegen, auch wenn sie sich an verschiedenen Positionen der barrel-Nomenklatur befinden. So finden Glu96, Ser176 und Asp17 von *E. coli* TA ihre Entsprechung in Glu187, Ser300 und Asp33 der FBPA (JIA *et al.*, 1996a). In das Motiv des α/β -barrels sind weitere Helices eingefügt (in Abb. 1.4 α A – α F bezeichnet). Die letzten beiden C-terminalen Helices α E und α F fehlen bei FBPA.

Die am häufigsten vorkommende Quartärstruktur von TA ist ein Homodimer, aber auch Monomere, Tetramere und Dekamere kommen vor. Eine Übersicht dazu findet sich im Review von SAMLAND UND SPRENGER, 2009. Alle bisher untersuchten TAs der Unterfamilie 4 und 5 haben eine dekamere Quartärstruktur.

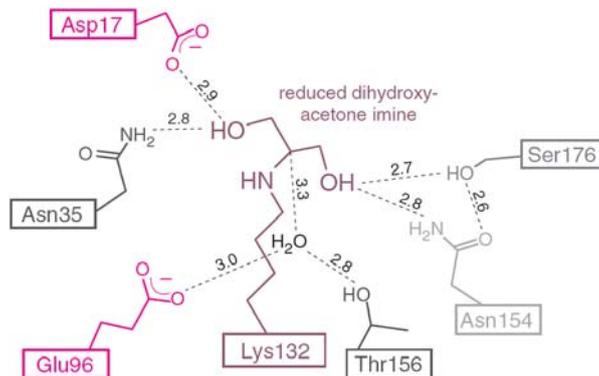


Abb. 1.6 Schematische Ansicht der Interaktionen des mit NaBH_4 reduzierten Schiffbasen-Intermediats mit den umliegenden Aminosäuren des aktiven Zentrums in *E. coli* TA. Bild von FREY UND HEGEMAN, 2007 (2,2 Å Auflösung, PDB 1UCW, JIA *et al.*, 1997).

In der Struktur wurde ein Wassermolekül gefunden, das von Glu96 und Thr156 koordiniert und als katalytisches Wasser an der Reaktion beteiligt zu sein scheint (Abb. 1.6). Der Eingang des Substratkanals von *E. coli* TA ist von 2 Argininen (R181 und R228) gesäumt, für die zusammen mit der Seitenkette von Ser226 eine Beteiligung an der Bindung der Phosphatgruppe der Substrate angenommen wurde (gleiche Quelle).

Ein auch FSAs umfassender Sequenzvergleich zeigte nicht nur konservierte Reste der Transaldolasefamilie, sondern machte auch Aminosäuren ausfindig, die bei sonst gleicher Proteinstruktur die Aktivität einer FSA oder TA kennzeichnen könnten (THORELL *et al.*, 2002). Diese sind nach Thorell *et al.* in Tab. 1.1 zusammengestellt.

Tab. 1.1 Sequenzvergleich von Aldolasen mit FSA-Aktivität (TalC und FSA aus *E. coli*) und Transaldolasen. Die Nummerierung der Aminosäuren von TA entspricht Transaldolase B aus *E. coli*, die Nummerierung bei FSA dem gleichnamigen Enzym aus *E. coli*.

TA	D17	T33	N35	S94	E96	K132	N154	T156	L157	F159	S176	F178	R181	R228
FSA	D6	T26	N28	F57	Q59	K85	L107	T109	A110	Y112	A129	Y131	R134	K168

1.1.5 Zielstellung der Arbeit

Trotz zahlreicher Vorarbeiten sind weiterhin elementare Schritte der Transaldolasereaktion unklar. Besonders wenige Informationen gibt es über Struktur, Reaktivität und Stabilität von Intermediaten. Somit liegt das Hauptaugenmerk dieser Arbeit auf der Untersuchung von Intermediaten sowie Teilreaktionen und stützt sich methodisch auf die drei Säulen Reaktionskinetik, Massenspektrometrie und Röntgenkristallstrukturaufklärung. Dabei war interessant, welche Aminosäurereste die Haupt-

akteure der Katalyse sind, wie es zur spezifischen Spaltung der C3-C4-Bindung kommt und wie die Reaktions- und Substratspezifität garantiert wird.

Das Gen für Transaldolase aus *Thermoplasma acidophilum* sollte heterolog in *E. coli* exprimiert, ein Reinigungsschema für das Protein entwickelt und das gereinigte Enzym biochemisch charakterisiert werden.

Bisher war keine Struktur einer TA mit natürlichen, unmodifizierten Intermediaten bekannt. Durch Kristallisation von *TacTA* mit Substraten sollten Momentaufnahmen von Reaktionsintermediaten gewonnen werden um Rückschlüsse auf den Katalysemechanismus und die beteiligten Reste zu erhalten. Hierfür hilfreich sollte die Verwendung eines thermophilen Proteins sein, da diese oft besser kristallisieren und die Katalyse bei der Kristallisationstemperatur stark verlangsamt ist.

Mithilfe der Massenspektrometrie sollten kovalente Intermediate nachgewiesen und die Intermediatverteilung zu bestimmten Zeiten beobachtet werden.

Durch die Analyse der v -S-Charakteristik der Reaktion im Gleichgewichtszustand (*steady state*) und Untersuchung der ersten Halbreaktion vor Einstellung des Gleichgewichts (*pre-steady state*) mit schnellen Kinetiken sollten kinetische Parameter und Geschwindigkeitskonstanten der Reaktion bestimmt werden.

Zum Vergleich mit dem Wildtyp-Enzym sollten diese Methoden auch auf neu generierte Proteinvarianten angewendet werden.

Eine entfernte Motivation für enzymologische Arbeiten dieser Art, die über den Rahmen der vorliegenden Arbeit hinaus geht, ist die Möglichkeit der zielgerichteten Modifikation von Resten des aktiven Zentrums und damit des Reaktionsmechanismus, um das Enzym maßgeschneiderten Anwendungen in der chemischen Katalyse zugänglich zu machen. Dafür ist es zunächst notwendig, die Grundlagen des Reaktionsmechanismus zu verstehen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Chemikalien	Firma
Acrylamid 4k Mix (30 %)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Agarose	AppliChem GmbH, Darmstadt
Agar-Agar	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Ameisensäure (98 %)	Sigma Aldrich
Ammoniumsulfat	Merck KGaA, Darmstadt
Ammoniumperoxodisulfat	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Bromphenolblau	Merck KGaA, Darmstadt
Coomassie-Brilliantblau G250	AppliChem GmbH, Darmstadt
D-Arabinose-5-phosphat	Sigma Aldrich
D-Erythrose-4-phosphat, Na ⁺ -Salz	Sigma Aldrich
D-[UL- ¹³ C ₆]-Fruktose-6-phosphat, Dinatriumsalz	Omicron Biochemicals, Inc. South Bend, USA
D-Fruktose-6-phosphat,	Sigma Aldrich
D-Sedoheptulose-7-phosphat	enzymatische Synthese durch Stefan Lüttke
D-Sorbitol-6-phosphat	Sigma Aldrich
D-Xylulose-5-phosphat	Sigma Aldrich
D ₂ O	Sigma Aldrich
EDTA	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ethanol	KMF Laborchemie Handels GmbH
Ethidiumbromid	ICN Pharmaceuticals Inc., USA
Glycerin (87 %)	Merck KGaA
Glycyl-glycin	AppliChem GmbH, Darmstadt
Hefeextrakt	AppliChem GmbH, Darmstadt
IPTG	AppliChem GmbH, Darmstadt / Fermentas
Kanamycinsulfat	AppliChem GmbH, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH + Co
NADH	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumchlorid	KMF Laborchemie Handels GmbH / AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumhydroxid	AppliChem GmbH, Darmstadt
PMSF	Boehringer Mannheim GmbH, Deutschland
SDS	SERVA Elektrophoresis GmbH / AppliChem GmbH, Darmstadt
TEMED	SERVA Feinbiochemica
Tris	AppliChem GmbH, Darmstadt
Trypton	AppliChem GmbH, Darmstadt

Enzyme

α -Glycerphosphatdehydrogenase- Triosephosphatisomerase aus Kaninchen- muskel, Typ III, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Suspension, fertige Lösung	Sigma Aldrich
Dpnl-Endonuklease	Fermentas
Pfu Turbo DNA Polymerase	Stratagene, USA

Stämme und Plasmid

	Hersteller/ erhalten von
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) Star	Invitrogen
<i>Escherichia coli</i> XL1 Blue	Stratagene
pET28a(+) mit <i>Tac</i> -Operon	von Dr. Martin Beck (EMBL, Heidelberg) zur Verfüg- ung gestellt

2.1.2 Geräte und sonstige Materialien*Geräte/ Materialien**Firma*

Zellaufschluss	<i>french press</i> (Gaulin) <i>fluidizer</i>	APV Homogeniser GmbH , Lübeck Microfluidics, Newton Massachu- setts, USA
Zentrifugen	RC 5B Plus L8-60M Ultrazentrifuge J2-HC Avanti HP-30I Biofuge pico Universal 320 R	Sorvall Beckman Instruments Beckman Instruments Beckman Coulter Heraeus, UK Hettich
FPLC-System	Pump P-500 Programmer GP-250 Plus Äkta Prime	Pharmacia LKB Pharmacia LKB GE Healthcare Bio-Sciences AB
HPLC-Anlagen	Äkta	GE Healthcare Bio-Sciences AB
Chromatographie-Säulen	Fractogel EMD TMAE 650 (S)	Merck KGaA, Darmstadt
UV/VIS-Spektrometer	Jasco J-560 und J-650 Uvikon 940	Jasco Kontron Instruments
<i>Stopped-flow</i> - Spektrometer	SX 18 MV und SX 20	Applied Photophysics
Spektropolarimeter	Jasco J-810 Cirscan	Jasco Applied Photophysics
Isothermale Titrationskalo- rimetrie	VP ITC und ITC 200	Microcal
Transformationsgerät	GenePulser II	Bio-Rad Laboratories, USA
Thermocycler	Whatman Biometra T	Gradient Biometra GmbH, Göttin- gen
X-ray	Generator: Micromax 007 Detektor: R-AXIS IV++ Mar345dtb	Rigaku Corp., Japan Rigaku Corp., Japan X-ray Research, Hamburg

	Cryo-Cooler: X-stream 2000	Rigaku Corp., Japan
Massenspektrometer	LTQ-Orbitrap-XL	ThermoElectron, Bremen
Probenvorbereitung	ZipTip C ₄ für <i>reversed phase</i>	Millipore™, Bedford USA
DNA-Kits	QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Standards	Protein-Standard SM0431	Fermentas
	Protein MWStds Lows	Gibco BRL
	1 kB-DNA-Marker	New England Biolabs, USA
Dialyseschlauch	VISKING® 36/32 (14000 MWCO)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
	VISKING 27/32 (14000 MWCO)	Carl Roth GmbH&CoKG, Karlsruhe
Konzentratoren	Vivaspin 20 (30000 MWCO)	Sartorius AG, Göttingen

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

Das freundlicherweise von Dr. Martin Beck bereit gestellte Plasmid enthielt das gesamte Operon mit den beiden Transketolasegenen *tkl* (Ta0618) und *tkII* (TA0617) sowie dem Transaldolasegen (*Ta0616*), eingefügt zwischen den Schnittstellen *NdeI* und *HindIII* in die *multi cloning site* eines pET28a(+)-Vektors. Um die Expression des C-terminalen His-tags zu verhindern, wurden vor der *HindIII*-Schnittstelle 2 Stopp-Codons eingefügt. Der N-terminale His-tag an *Tkl* blieb erhalten.

2.2.1.1 Generierung von Proteinvarianten

Die ortsgerichteten Mutagenesen erfolgten nach Herstellerangaben mit dem QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, Heidelberg, Deutschland). Alle Primer (Tab. 2.1) wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) bezogen. Das mit *DpnI* verdaute PCR-Produkt wurde in XL1-Blue-Zellen transformiert und die Zellen bei 37 °C auf LB-Platten auf Kanamycinresistenz selektiert. Ausgewählte Klone wurden in 4 ml LB-Kana-Medium kultiviert, anschließend zentrifugiert und die Plasmid-DNA mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerprotokoll isoliert. Die Konzentration des isolierten Plasmids wurde spektroskopisch bestimmt und der Erfolg der Mutagenese durch Sequenzierung überprüft. Dies erfolgte durch die Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) unter Verwendung des Standardprimers „T7 term“.

Tab. 2.1 Primer für die ortsgerichteten Mutagenesen zur Herstellung der *active site*-Varianten der *TacTA*. Ausgetauschte Nukleotide sind rot gedruckt.

Aminosäure-austausch	Primer	Nukleotidsequenz (5'-3')
F132Y	<i>forward</i>	C TAC GTA TCA CCA TAT GTT GGA AGA CTT GAC
	<i>reverse</i>	C AAG TCT TCC AAC ATA TGG TGA TAC GTA GG
D6N	<i>forward</i>	A ATA TTC CTT AAC ACT GCC AAC ATA GAT G
	<i>reverse</i>	C ATC TAT GTT GGC AGT GTT AAG GAA TAT T
E60Q	<i>forward</i>	GT CCG GTA AGC GTT CAG GTG GTT TCA ACA AAG
	<i>reverse</i>	GT TGA AAC CAC CTG AAC GCT TAC CGG ACC
K86A	<i>forward</i>	GAC AAT GCT GTT GTA GCG ATA CCG ATG ACT G
	<i>reverse</i>	C AGT CAT CGG TAT CGC TAC AAC AGC ATT GTC
T110V	<i>forward</i>	AAT ACA AAC TGT GTT CTT GTT TTC AAT C
	<i>reverse</i>	G ATT GAA AAC AAG AAC ACA GTT TGT ATT
D6A	<i>forward</i>	A ATA TTC CTT GCC ACT GCC AAC ATA GAT G
	<i>reverse</i>	C ATC TAT GTT GGC AGT GGC AAG GAA TAT T
E60A	<i>forward</i>	GT CCG GTA AGC GTT GCG GTG GTT TCA ACA AAG
	<i>reverse</i>	GT TGA AAC CAC CGC AAC GCT TAC CGG AC

2.2.2 Präparation von Transaldolase

2.2.2.1 Zellanzucht und Expression

Die Expression von TA und Varianten erfolgte im *E. coli* Stamm BL21 (DE3)Star. 100 ml LB-Kana-Medium (LB-Medium, 20 µg/ml Kanamycin) wurden mit einer Einzelkolonie inokuliert und 16 h bei 37 °C, 200 rpm inkubiert. Das Medium der Vorkultur wurde über Zentrifugation abgetrennt, die Zellen in 6 ml frischem Medium resuspendiert und mit je 1 ml Suspension 1 l LB-Kana-Medium in einem 2 l Erlenmeyerkolben inokuliert. Nach 4 – 5 h, bei einer OD₆₀₀ von 1 wurde mit 0,5 mM IPTG induziert und für 14-18 h bei 37 °C inkubiert. Die Zellernte erfolgte in einer Beckman J2-HC-Zentrifuge, Rotor GS3, bei 6000 rpm und 8°C für 15 min.

Alternativ wurde für die Gewinnung von Wt-*TacTA* eine Fermentation ausgeführt. Dazu wurden 6 l LB-Kana-Medium mit 400 ml Vorkultur inokuliert. Die Fermentation erfolgte in einem Biostat C-DCU-Bioreaktor (B. Braun Biotech International) nach dem Standardprotokoll für Vollmedien. Die Zellen

wurden bei einer Temperatur von 37 °C kultiviert. Für den Betrieb des Fermenters wurde ein unterer Sauerstoffsättigungswert von 30 % festgelegt, der automatisiert durch stärkeres Rühren konstant gehalten wurde. Die Glukosekonzentration wurde stündlich überprüft. Nach 5,5 h wurde aufgrund des niedrigen Glukosespiegels das Glukose-*feeding* gestartet. 1 h vor Induktion wurde die Temperatur auf 35 °C und 30 min vor Induktion auf 30 °C gesenkt. Bei einer OD₆₀₀ von 42 wurde mit 0,5 mM IPTG induziert. Die Expression erfolgte bei 30 °C für 10 h. Die Zellen wurden bei 4000 rpm und 4 °C für 30 min pelletiert (Avanti-20, Beckmann) und bei -70 °C eingefroren.

2.2.2.2 Proteinreinigung

Zum Zellaufschluss wurden die Zellen (50 g) in 100 mM Tris, pH 7,5, 5 mM MgCl₂, 0,5 mM PMSF, 1 mg/ml Lysozym aufgenommen (50 ml), nach 15 min Rühren bei 20 °C mit 5 µg/ml DNase I versetzt und für 45 min bei 20 °C inkubiert. Anschließend erfolgte der vollständige Aufschluss durch Hochdruck-Dispersion (Gaulin, APV, Frankreich) bei 1200 bar oder mit einem *fluidizer* (80 psi, 3 Durchgänge). Das Zelllysat wurde 45 min bei 30 000 rpm, Beckman Rotor JA30.50, 8°C zentrifugiert und das Sediment mit Zelldebris und *inclusion bodies* von TklI verworfen. Mit dem Überstand wurde eine fraktionierte Ammoniumsulfatfällung durchgeführt. In einem ersten Schritt wurden 25 % Sättigung an (NH₄)₂SO₄ zugegeben und das Sediment verworfen. In einem zweiten Fällschritt von 25 auf 50 % Sättigung wurde unter anderem TklI abgetrennt. Mit dem Überstand wurde weiter gearbeitet und in einem letzten Schritt von 50 auf 80 % Sättigung die TA ausgesalzt. Bei den Fällungen wurde das Salz langsam unter Rühren im Eisbad eingestreut. Nach vollständiger Salzzugabe wurde 30 min gewartet und die Probe danach für 20 min bei 94 833 g, 6 °C zentrifugiert. Bei Einsatz von fermentierten Zellen konnten etwa 9 g Sediment im letzten Fällungsschritt erhalten werden. Das Sediment wurde in wenig 20 mM Tris, pH 7,5 gelöst (3,5 g in 3 ml Puffer, Endvolumen 5,5 ml) und gegen 20 mM Tris, pH 7,5 bei 6 °C über Nacht dialysiert (Volumen nach der Dialyse 12 ml). Zum Abtrennen ungelöster Bestandteile wurde die Probe 10 min bei 7240 g zentrifugiert. Das Dialysat wurde auf einen Anionenaustauscher (Fractogel TMAE, 26×10 mm, 40 ml) mit 1,5 – 2 ml/min aufgetragen. Die Elution erfolgte über einen Stufengradienten. Als Niedrigsalzpuffer A wurde 20 mM Tris, pH 7,5 und als Hochsalzpuffer B 20 mM Tris, pH 7,5, 1 M NaCl verwendet. Die Stufen der Elution sind in Tab. 2.2 dargestellt. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden mittels 15 % SDS-PAGE analysiert und TA-enthaltende Fraktionen vereint. Letzte Verunreinigungen mit Proteinen des Wirtbakteriums wurden durch 20 min bei 60 °C und anschließende Zentrifugation bei 94 833 g und 8 °C abgetrennt.

Tab. 2.2 Stufengradient zur Elution von *TacTA* bei der TMAE-Anionenaustauschchromatographie.

Schritt	% B	Säulenvolumen
	0	0,4
1	19	3
2	21	1,25
3	21-23	0,6
4	23	1
5	23-35	0,6
6	35	0,6
7	35-100	0,4

Das Volumen der Probe wurde mittels Vivaspin-Konzentrator eingengt, auf 20 mM GlyGly, pH 7,5 umgepuffert und letztendlich auf eine Konzentration von etwa 20 mg/ml eingestellt. Da das Protein bei ungeschütztem Einfrieren irreversible Kältedenaturierung zeigt, wurden die Proben bei 6 °C aufbewahrt.

2.2.3 Analytische Ultrazentrifugation

Zur Untersuchung des Oligomergleichgewichts der TA wurde 1 ml Proteinlösung mit 25,4 mg/ml über Nacht bei 6 °C gegen 250 ml 20 mM Tris, pH 7,5 dialysiert. Danach wurde die Konzentration der Lösung bestimmt und durch Verdünnen mit dem Dialysepuffer eine Lösung mit 1 mg/ml hergestellt. Aus dieser Stammlösung wurde eine Konzentrationsreihe von 10 – 350 µg TA im Dialysepuffer hergestellt und analysiert. Die Messungen erfolgten in einer Beckman Optima XL-A Zentrifuge, Rotor An50Ti in einer Doppelsektorzelle bei 20 °C. Die Sedimentationsgeschwindigkeitsläufe erfolgten bei 40 000 rpm, der Sedimentationsgleichgewichtslauf bei 8 000 rpm. Es wurde die Absorption bei 280 nm aufgezeichnet. Die Auswertung der experimentellen Daten erfolgte mit Gerätesoftware von Beckman Instruments (Palo Alto, CA) und Kaleidagraph. Die Messung und Auswertung der Originaldaten erfolgte freundlicherweise durch PD Dr. Hauke Lilie.

Aus den ermittelten Sedimentationskoeffizienten konnte ein apparentes Molekulargewicht (M_{app}) berechnet werden (McRORIE UND VOELKER, 1993). Da sich der Sedimentationskoeffizient in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration änderte und unter Kenntnis des Molekulargewichts von TA konnte im gemessenen Konzentrationsbereich von einem Pentamer-Dekamer-Gleichgewicht ($2P \rightleftharpoons D$)

ausgegangen werden. Nach dem Massenwirkungsgesetz lässt sich die Gleichgewichtskonstante K durch Gleichung (2.1) beschreiben.

$$K = \frac{[P]^2}{[D]} \quad (2.1)$$

Der apparente Sedimentationskoeffizient s_{app} ist abhängig von den Konzentrationen der Pentamere (P) und Dekamere (D) sowie ihrem jeweiligen Sedimentationsverhalten (s_P und s_D):

$$s_{app} = \frac{s_P \cdot [P] + s_D \cdot [D]}{[P] + [D]} \quad (2.2)$$

Stellt man Gleichung (2.1) nach [D] um und setzt in Gleichung (2.2) ein, ergibt sich Gleichung (2.3).

$$s_{app} = \frac{s_P \cdot [P] + s_D \cdot \frac{[P]^2}{K}}{[P] + \frac{[P]^2}{K}} \quad (2.3)$$

Die Proteingesamtkonzentration [TA] ergibt sich aus:

$$[TA] = [P] + 2[D] \quad (2.4)$$

Stellt man Gleichung (2.1) nach $[P]^2$ und Gleichung (2.4) nach [D] um und setzt in die umgestellte (2.1) ein, erhält man:

$$[P]^2 = K \cdot \frac{[TA] - [P]}{2} = \frac{K \cdot [TA]}{2} - \frac{K \cdot [P]}{2} \quad (2.5)$$

$$0 = [P]^2 + \frac{K \cdot [P]}{2} - \frac{K \cdot [TA]}{2} \quad (2.6)$$

Als eine Lösung der quadratischen Gleichung (2.6) ergibt sich (2.7):

$$[P]_1 = -\frac{K}{4} + \sqrt{\frac{K^2}{16} + \frac{K \cdot [TA]}{2}} \quad (2.7)$$

Für die Auswertung wurde (2.7) in (2.3) eingesetzt, so dass eine Anpassung der experimentell bestimmten s_{app} in Abhängigkeit von [TA] möglich war.

2.2.4 UV-VIS-Spektroskopie

2.2.4.1 Konzentrationsbestimmung von DNA und Proteinen

2.2.4.1.1 Bestimmung der Konzentration von DNA

Die Konzentrationsbestimmung zirkulärer Plasmide erfolgte mittels Absorptionsspektroskopie bei 260 nm. Dabei wurde für ein $\Delta E = 1$ eine Konzentration von 50 ng/ μl angenommen (MÜLHARDT, 2003).

2.2.4.1.2 Bestimmung der Konzentration von Proteinen

Zur Bestimmung der Konzentration gereinigter Proteine wurde ein Absorptionsspektrum (240 – 340 nm) aufgenommen. Unter Verwendung des molaren Extinktionskoeffizienten ϵ ($\text{l mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$) und der Absorption bei 280 nm (E) konnte die Proteinkonzentration c (mol l^{-1}) mit dem Lambert-Beerschen Gesetz, in dem d (cm) die optische Weglänge ist, berechnet werden:

$$E = \epsilon \cdot c \cdot d \quad (2.8)$$

Der molare Extinktionskoeffizient wurde nach der Methode von GILL UND VON HIPPEL, 1989 unter der Verwendung des Algorithmus von „Protparam“ auf www.expasy.ch/tools/protparam.html (GASTEIGER *et al.*, 2005) bestimmt. Es ergab sich ein Extinktionskoeffizient von $16960 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$. Nur die Variante F132Y hatte einen veränderten Extinktionskoeffizienten von $18450 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

2.2.4.2 Aktivitätstest – *steady-state*-Messungen

Die Bestimmung der Aktivität von TA erfolgte mittels eines gekoppelten enzymatischen Tests in Anlehnung an TSOLAS UND JORIS, 1975 bzw. SODERBERG UND ALVER, 2004. Das Prinzip ist in Abb. 2.1 dargestellt. Das erste freigesetzte Produkt der Reaktion, Glycerinaldehyd-3-phosphat (GAP), wird durch die Hilfsenzyme Triosephosphatisomerase (TPI) und Glycerinphosphatdehydrogenase (GDH) unter NADH-Verbrauch in Glycerin-3-phosphat umgewandelt und dem Reaktionsgleichgewicht entzogen.

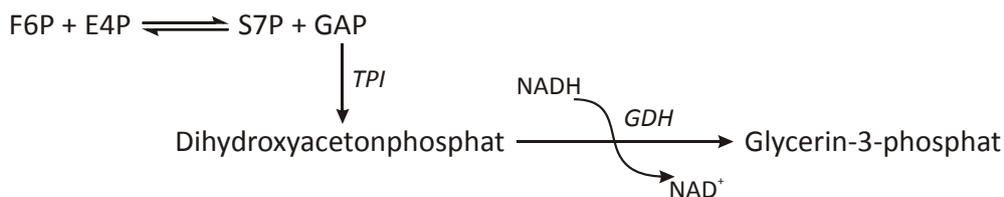


Abb. 2.1 Reaktionssequenz des Aktivitätstests.

Der Standardtest wurde bei 30 °C in 20 mM Glycylglycin, pH 7,5, 0,22 mM NADH, 5 U/ml GDH, 50 U/ml TPI ausgeführt. Die Messung bei Substratsättigung erfolgte mit 15 mM F6P und 2 mM E4P. Es wurde der lineare Beginn der Kurve als *steady-state*-Geschwindigkeit ausgewertet. Für Messungen bei pH 6,5 wurde 20 mM BisTris-Puffer verwendet.

2.2.4.3 Untersuchung von inhibitorischen Effekten

Die Messung erfolgte wie unter 2.2.4.2 beschrieben. Die Konzentration von E4P wurde mit 2 mM konstant gehalten. Die Konzentrationen von F6P und des Inhibitors wurden gegeneinander variiert. Die Initialgeschwindigkeiten wurden nach einer Auftragung nach Dixon aufgetragen (DIXON, 1953) und die Inhibitorkonstante K_i der als kompetitiv identifizierten Inhibitoren durch eine Mittelung der leicht voneinander abweichenden Geradenschnittpunkte ($-K_i, 1/V_{\max}$) bestimmt.

2.2.4.4 Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit vom pH-Wert

Zur Durchführung der Messung wurde in Anlehnung an ELLIS UND MORRISON, 1982 ein Puffergemisch mit 3 Komponenten aus 135 mM MES, 5,5 mM BISTRIS und 135 mM TRIS verwendet. Die restliche Differenz der Ionenstärke bei den verschiedenen pH-Werten wurde durch Zugabe von NaCl ausgeglichen, so dass eine konstante Ionenstärke von 139,33 mM vorlag.

Die Messung wurde bei 30 °C und einer Proteinkonzentration von 0,0127 mg/ml TA mittels gekoppeltem enzymatischem Assay durchgeführt (2.2.4.2).

Eine direkte Anpassung der pH-Optimumskurve ist nach Gleichung (2.9) bzw. (2.10) möglich (MARANGONI, 2002).

$$V_{\max} = V_{\max}^{\text{lim}} \left(1 + \frac{[\text{H}^+]}{K_{\text{ES1}}} + \frac{K_{\text{ES2}}}{[\text{H}^+]} \right)^{-1} \quad \begin{array}{l} V_{\max}^{\text{lim}} - \text{maximale Geschwindigkeit} \\ \text{bei pH-Optimum} \end{array} \quad (2.9)$$

$$V_{\max} - \text{apparente Maximalgeschwindigkeit}$$

$$V_{\max} = V_{\max}^{\text{lim}} \left(1 + 10^{(\text{p}K_{\text{ES1}} - \text{pH})} + 10^{(\text{pH} - \text{p}K_{\text{ES2}})} \right)^{-1} \quad (2.10)$$

2.2.4.5 Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Temperatur

Der Messung erfolgte nach 2.2.4.2 in 50 mM Glycylglycin mit 0,0127 mg/ml TA. Die Konzentration von E4P betrug nur 1 mM. Die Einstellung des pH-Werts von 7,5 erfolgte für jede Temperatur einzeln. Die Berechnung der thermodynamischen Parameter erfolgte nach den Gleichungen von EYRING (2.11) und ARRHENIUS (2.12) aus den Auftragungen $\ln k$ gegen $1/T$ und $\ln(k/T)$ gegen $1/T$.

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{RT} \quad k - \text{Geschwindigkeitskonstante} \quad (2.11)$$

$$\ln \frac{k}{T} = \ln \frac{k_b}{h} - \frac{\Delta H^\ddagger}{RT} + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} \quad \begin{array}{l} A - \text{Frequenzfaktor} \\ E_a - \text{Aktivierungsenergie} \\ R - \text{universelle Gaskonstante} \\ T - \text{Temperatur} \\ k_b - \text{Boltzmannkonstante} \\ h - \text{Planck'sches Wirkungsquantum} \\ \Delta H^\ddagger - \text{Aktivierungsenthalpie} \\ \Delta S^\ddagger - \text{Aktivierungsentropie} \end{array} \quad (2.12)$$

2.2.4.6 Bestimmung der thermodynamischen Parameter der Denaturierung der TA

Analog zum gekoppelten Assay 2.2.4.2 wurde eine Lösung aus F6P, E4P, NADH in Glycylglycin, $\text{pH}_{30^\circ\text{C}} = 7,5$ bereitet. Diese Mischung war bei -20°C für 1 Woche haltbar. Je eine Transaldolase-Lösung (0,6 mg/ml) wurde bei 60, 80 und 90°C inkubiert. Nach bestimmten Zeitintervallen wurden 5 μl der bei entsprechender Temperatur inkubierten Enzym-Lösung entnommen und zum Reaktionsstart zu 194 μl der Vormischung mit 1 μl Hilfsenzym-Lösung gegeben.

Die Berechnung der thermodynamischen Parameter der Inaktivierung erfolgte nach EYRING:

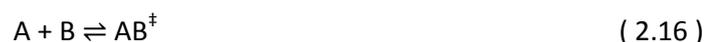
$$A = A_0 e^{-kt} \quad \begin{array}{l} A - \text{Aktivität} \\ A_0 - \text{Ausgangsaktivität} \end{array} \quad (2.13)$$

$$\ln A = \ln A_0 - kt \quad (2.14)$$

Es wurde $\ln A$ gegen die Zeit t aufgetragen und mit den nach (2.14) graphisch ermittelten Konstanten k die thermodynamischen Parameter nach EYRING bestimmt.

$$v = \frac{R \cdot T}{N_A \cdot h} [AB]^\ddagger \quad \begin{array}{l} R - \text{universelle Gaskonstante} \\ N_A - \text{Avogadrozahl} \\ h - \text{Planck'sches Wirkungsquantum} \\ v - \text{Geschwindigkeit der Reaktion} \\ T - \text{Temperatur} \end{array} \quad (2.15)$$

Da der Übergangszustand nicht messbar ist, wird er als Pseudo-Gleichgewicht angenommen. Anhand der Informationen aus den massenspektrometrischen Experimenten (3.4) wird angenommen, dass die Freisetzung des das Messsignal verursachenden ersten Substrats der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Reaktion ist. Somit kann man die Zweisubstratreaktion vereinfachen zu:



$$K^\ddagger = \frac{[AB]^\ddagger}{[A] \cdot [B]} \quad (2.17)$$

$$K^\ddagger \cdot [A] \cdot [B] = [AB]^\ddagger \quad (2.18)$$

Somit ergibt sich:

$$v = \frac{R \cdot T}{N_A \cdot h} \cdot K^\ddagger \cdot [A] \cdot [B] \quad (2.19)$$

Nach Gibbs-Helmholtz gilt:

$$\Delta G = -RT \ln K^\ddagger \quad (2.20)$$

$$K^\ddagger = e^{-\frac{\Delta G^\ddagger}{RT}} = e^{-\frac{\Delta H^\ddagger}{RT} + \frac{\Delta S^\ddagger}{R}} \quad (2.21)$$

ΔG^\ddagger – Freie Aktivierungsenthalpie
 ΔH^\ddagger – Aktivierungsenthalpie
 ΔS^\ddagger – Aktivierungsentropie

Daraus folgt:

$$\frac{k_T}{T} = \frac{R}{N_A \cdot h} \cdot K^\ddagger = \frac{R}{N_A \cdot h} \cdot e^{-\frac{\Delta H^\ddagger}{RT} + \frac{\Delta S^\ddagger}{R}} \quad (2.22)$$

$$\ln \frac{k_T}{T} = \ln \left(\frac{R}{N_A \cdot h} \right) - \frac{\Delta H^\ddagger}{RT} + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} \quad (2.23)$$

$$\ln \frac{k_T}{T} = \ln \left(\frac{R}{N_A \cdot h} \right) - \frac{\Delta H^\ddagger}{RT} + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} \quad (2.24)$$

und

$$T \ln \frac{k_T}{T} = T \ln \left(\frac{R}{N_A \cdot h} \right) + T \frac{\Delta S^\ddagger}{R} - \frac{\Delta H^\ddagger}{R} \quad (2.25)$$

Die aus den Auftragungen $\ln(k_T/T)$ gegen $1/T$ und $T \ln(k_T/T)$ gegen T ermittelten Anstiege dienen zur Berechnung von ΔH^\ddagger und ΔS^\ddagger . Mit diesen Werten ist die freie Aktivierungsenthalpie ΔG^* bei der Messtemperatur $T = 303,15 \text{ K}$ bestimmbar (2.26).

$$\Delta G^* = \Delta H^* - T \Delta S^* \quad (2.26)$$

2.2.4.7 Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Ionenstärke

Das Verhältnis von neutraler und dissoziierter Pufferspezies wurde mit der Henderson-Hasselbalch-Gleichung (2.27) berechnet.

$$\text{pH} = \text{pK}_A + \lg \frac{[A^-]}{[HA]} \quad (2.27)$$

Glycylglycin hat bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ einen pK_A von 8,12.

$$7,5 = 8,12 + \lg \frac{[A^-]}{[HA]} \quad (2.28)$$

$$\frac{[A^-]}{[HA]} = 0,2399 \quad (2.29)$$

$$[A^-] = 0,2399 \cdot [HA] \quad (2.30)$$

Die Pufferkonzentration in der Küvette betrug 20 mM.

$$20 \text{ mM} = [HA] + [A^-] \quad (2.31)$$

$$20 \text{ mM} = [HA] + 0,2399 \cdot [HA] \quad (2.32)$$

$$[HA] = 16,13 \text{ mM} \quad (2.33)$$

Aus (2.30) und (2.33) ergibt sich die Konzentration an Base zu:

$$[A^-] = 3,87 \text{ mM} \quad (2.34)$$

Zusätzlich muss man die zur Neutralisation mit NaOH eingebrachten 3,87 mM Na⁺-Ionen berücksichtigen.

Die Hilfsenzymlösung enthielt 2,4 M (NH₄)₂SO₄. Davon wurde 1 µl in einen Messansatz mit 200 µl Endvolumen gegeben. Somit waren bei pH 7,5 noch zusätzlich 12 mM SO₄²⁻ und 24 mM NH₄⁺ im Ansatz enthalten. Die Ionisierungszustände der Zuckersubstrate wurden vernachlässigt. Die Berechnung der Ionenstärke I₀ im Ansatz erfolgte nach Gleichung (2.35).

$$I = \frac{1}{2} \sum_j c_j Z_j^2 \quad \begin{array}{l} c_j - \text{mol. Konzentration des Ions} \\ Z_j - \text{Ladungszahl des Ions} \end{array} \quad (2.35)$$

$$I = \frac{1}{2} ([A^-] + [Na^+] + 4[SO_4^{2-}] + [NH_4^+]) = 39,869 \text{ mM} \quad (2.36)$$

Der Messung erfolgte nach 2.2.4.2 mit 0,0127 mg/ml TA und 1 mM E4P. Die verschiedenen Ionenstärken wurden mit KCl eingestellt. Die Ausgangsionenstärke im Ansatz betrug durch Puffer und den Beitrag der 2,4 M Ammoniumsulfat enthaltenden Hilfsenzymlösung 39,87 mM.

2.2.4.8 Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Proteinkonzentration

Zur Untersuchung, ob die auftretenden unterschiedlichen Oligomere Unterschiede in ihrer Aktivität besitzen wurden 2 verschiedene Experimente durchgeführt. Beide Messungen wurden nach 2.2.4.2 mit 0,55 mM F6P und 0,18 mM E4P durchgeführt.

2.2.4.8.1 Gleiche Ausgangskonzentration, verschiedene Messkonzentration an Protein

Aus einer Stammlösung von 25,4 mg/ml TA wurden unmittelbar vor der Messung verschiedene Proteinkonzentrationen hergestellt und deren Aktivität gemessen. Wenn gleiche Aktivitäten für verschiedene Oligomerspezies vorliegen, wird eine lineare Abhängigkeit der Geschwindigkeit von der Proteinkonzentration erwartet.

2.2.4.8.2 Verschiedene Ausgangskonzentration, gleiche Messkonzentration an Protein

Es wurden mehrere Proteinlösungen im Konzentrationsbereich von 0,02 bis 1 mg/ml hergestellt und in den Messansatz verdünnt, so dass die Endkonzentration für die Messung jeweils 0,01 mg/ml TA betrug. Diese Messreihe wurde zusätzlich bei Substratkonzentrationen von 15 mM F6P und 1 mM E4P ausgeführt.

2.2.5 Pre-steady-state-Messungen mit stopped-flow-Technik

Die *stopped-flow*-Technik wurde als *pre-steady-state*-Kinetik verwendet um die erste Halbreaktion zu untersuchen. Hierfür wurde der gekoppelte enzymatische Test mit den Hilfsenzymen TPI, GDH und NADH (TSOLAS UND JORIS, 1975) mit Verzicht auf das Akzeptorsubstrat verwendet.

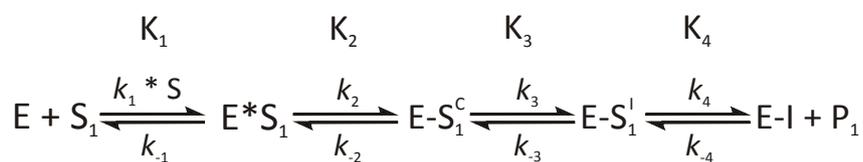


Abb. 2.2 Schematische Darstellung der ersten Halbreaktion der TA.

- E – freies Enzym
- S_1 – Donorsubstrat, Ketose
- $E \cdot S_1^C$ – kovalenter Donorsubstrat-Carbinolamin-Komplex
- $E \cdot S_1^I$ – kovalenter Donorsubstrat-Immonium-Komplex, Schiffbase vor Bindungsspaltung
- E-I – C3-Schiffbase
- P_1 – erstes Produkt, Aldose

Durch die Umwandlung des ersten Produkts Glycerinaldehyd-3-phosphat zu Glycerin-3-phosphat mit den Hilfsenzymen wurde dieses aus dem Gleichgewicht entzogen. Der somit an die Transaldolase-reaktion gekoppelte NADH-Verbrauch der Hilfsenzymreaktion wurde bei 340 nm verfolgt, wobei die Oxidation von NADH äquimolar der Umsetzung von F6P entspricht. Da kein Akzeptorsubstrat zugegeben wurde, stoppte die Reaktion auf der Stufe eines kovalenten C3-Intermediats nach einmaligem

Substratumsatz. Die erste Halbreaktion ist in die Teilschritte untergliedert in Abb. 2.2 schematisch dargestellt.

Die schnellen Kinetiken wurden in einem *stopped-flow*-Absorptionsspektrometer (SX 18 MV und SX20, Applied Photophysics, UK) bei 30 °C in 20 mM Glycylglycin, pH 7,5, einer optischen Weglänge von 1 cm und Wellenlänge 340 nm ausgeführt. Dabei wurde eine Proteinlösung (0,22 – 0,32 mg/ml TA mit 1000 U/ml TPI, 100 U/ml GDH, 0,22 mM NADH, 20 mM GlyGly, pH 7,5) im Verhältnis 1:2 mit einer Substratlösung (mehrere Konzentrationen im Bereich von 0,05 – 30 mM für den Wt in 20 mM GlyGly, pH 7,5) gemischt. Die Hilfsenzymlösung wurde vorher dialysiert, um das Ammoniumsulfat zu entfernen und Vermischungsschlieren sowie hohe Ionenstärken bei der Messung zu vermeiden. Die Messkurven wurden je nach Form einfach oder doppelt exponentiell 1. Ordnung ausgewertet.

2.2.6 Untersuchung des kinetischen Lösungsmittelisotopieeffekts

Kinetische Studien von Lösungsmittelisotopieeffekten dienen der Charakterisierung des geschwindigkeitsbestimmenden Schritts von Protonentransferreaktionen. Die Untersuchung des Lösungsmittelisotopieeffekts erfolgte für die erste Halbreaktion mittels *stopped-flow*-Technik (siehe 2.2.5) bei 30 °C nach dem Protokoll von SCHOWEN, 1978. Dafür wurden Proteinlösung (0,022 mg/ml TA, 1000 U/ml TPI, 100 U/ml GDH, 0,22 mM NADH, 20 mM GlyGly, pH 7,5/ pD 7,5 bei 30 °C) und Substratlösung (30 mM F6P, 20 mM GlyGly, pH 7,5/pD 7,5 bei 30 °C) jeweils in H₂O und D₂O hergestellt. Aus H₂O- und D₂O-Lösungen wurden Mischungen in unterschiedlichen Verhältnissen hergestellt, so dass es Proteinlösungen mit D₂O-Anteilen von 0 bis 1 und Substratlösungen mit den gleichen D₂O-Anteilen gab. Für die Messung wurden Proteinlösung und Substratlösung mit gleichem D₂O-Gehalt 1:2 gemischt. Die verwendete Hilfsenzymlösung wurde vorher mittels Konzentrador entsalzt und in H₂O- bzw. D₂O-Glycylglycin umgepuffert. Die Einstellung des pH-Wertes der D₂O-Lösungen erfolgte mit in D₂O gelöster NaOH. Für jeden Messpunkt wurden 9 Einzelmessungen gemittelt.

Die folgende Kurzdarstellung der Auswertung ist ausführlich bei Schowen, 1978 nachzulesen. Die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten als Funktion des D₂O-Anteils n , $k_n(n)$, wurden genutzt, um die Form der Gross-Butler-Funktion (2.37) der untersuchten Reaktion zu bestimmen. Für jedes während der Reaktion austauschende Proton gibt es einen Term von $1-n+n\phi$ im Zähler und im Nenner von Gleichung (2.37).

$$k_n = k_0 \frac{\text{ÜZB}}{\text{RZB}} = k_0 \frac{(1-n+n\phi_1^{\ddot{U}})(1-n+n\phi_2^{\ddot{U}})\dots(1-n+n\phi_v^{\ddot{U}})}{(1-n+n\phi_1^{\text{R}})(1-n+n\phi_2^{\text{R}})\dots(1-n+n\phi_v^{\text{R}})} \quad (2.37)$$

ÜZB – Beitrag des Übergangszustands \ddot{U}

RZB – Beitrag des Reaktanzustands R

n – Anteil von D_2O in der Lösung

(n = 0 vollständig protoniertes, n = 1 vollständig deuteriertes Lösungsmittel)

k_0 – Geschwindigkeitskonstante in vollständig protoniertem Lösungsmittel (n=0)

k_n – Geschwindigkeitskonstante in Lösungsmittel mit Deuteriumanteil n

$\phi_v^{\ddot{U}}$ – Fraktionierungsfaktor des Übergangszustands

ϕ_v^{R} – Fraktionierungsfaktor des Reaktanzustands

Wenn sich der Zustand des Protons im Reaktand- und Übergangszustand nicht ändert, löschen sich die Terme aus. Ebenso entfallen die Terme mit $\phi = 1$. Die Anzahl der übrig bleibenden Einzelterme und ϕ -Werte kann bestimmt und so die Anzahl der am Übergangszustand beteiligten Protonen ermittelt werden. Da für N-H und O-H-Bindungen meist Fraktionierungsfaktoren von nahe 1 gefunden wurden und die Seitenketten der Aminosäuren, außer Sulfhydrylgruppen ($\phi = 0,40 - 0,46$), Fraktionierungsfaktoren von 1 haben, wird für Proteine oft angenommen, dass alle Protonen im Reaktandzustand Fraktionierungsfaktoren von 1 haben. Somit kann man für die meisten Proteine $\text{RZB} = 1$ annehmen und Gleichung (2.37) vereinfacht sich durch Wegfall des Nenners zu (2.38).

$$k_n = k_0 \prod_i^v (1-n+n\phi_i^{\ddot{U}}) \quad (2.38)$$

Die Beteiligung von nur einem Proton führt zu einer linearen Form der Gross-Butler-Funktion (2.39).

$$k_n = k_0 (1-n+n\phi_1^{\ddot{U}}) \quad (2.39)$$

Bei einem „Mehrprotonenübergangszustand“ mit $\phi_i^{\ddot{U}} < 1$ und $\text{RZB} = 1$ ergibt sich eine nach unten gebogene Kurve. Die Auftragung $k_n(n)$ sind dann Polynome von n in Ordnung von v. Die Ordnung v der Polynome gibt an, wie viele Protonierungsstellen bei der Bildung des Übergangszustands involviert sind.

Ein Sonderfall ergibt sich, wenn eine große Anzahl von Protonen (m) an der Reaktion beteiligt ist, jedes aber nur kleine Beiträge leistet. Die Fraktionierungsfaktoren sind dann kleiner aber fast gleich 1. Für einen Isotopieeffekt k_1/k_0 ergäbe sich somit (2.40) und (2.41):

$$k_1/k_0 = \phi^m \quad (2.40)$$

$$k_n = k_0 (1 - n + n\phi)^m \quad (2.41)$$

Da ϕ kleiner, aber nahe 1 ist, kann man schreiben, $\phi = 1 - \chi$, wobei χ sehr klein ist. Damit wird Gleichung (2.41) zu:

$$k_n = k_0 [1 - n + n(1 - \chi)]^m = k_0 (1 - n\chi)^m \quad (2.42)$$

$$\ln(k_n/k_0) = m \ln(1 - n\chi) \quad (2.43)$$

Da $n \leq 1$ und χ sehr klein ist, ist $n\chi$ auch eine kleine Zahl und $\ln(1 - n\chi) \simeq (-n\chi)$. Somit kann Gleichung (2.43) in der folgenden Form geschrieben werden:

$$\ln(k_n/k_0) \simeq (-mn\chi) \quad (2.44)$$

$$\ln k_n \simeq (-m\chi)n + \ln k_0 \quad (2.45)$$

In diesem Fall wäre eine Auftragung von $\ln k_n$ gegen n linear.

Im Fall eines Zwei-Protonen-Mechanismus, in dem jedes Proton den gleichen Isotopieeffekt beiträgt ($\phi_1^{\ddot{}} = \phi_2^{\ddot{}}$), gilt:

$$k_n = k_0 (1 - n + n\phi_1^{\ddot{}}) (1 - n + n\phi_2^{\ddot{}}) = k_0 (1 - n + n\phi_1^{\ddot{}})^2 \quad (2.46)$$

Eine Auftragung von $(k_n/k_0)^{1/2}$ gegen n ist in diesem Fall linear und stellt einen Schnelltest dar, ob ein solcher Zweiprotonenmechanismus vorliegt.

2.2.7 CD-Spektroskopie

Die Carbonylgruppe einer Peptidbindung wirkt bei der CD-Spektroskopie als optisch aktiver Chromophor. Dadurch ist diese Methode gut zur Konformationsanalyse geeignet. Im Fern-UV-CD-Spektrum (180 – 250 nm) findet man den $n \rightarrow \pi^*$ -Übergang im Bereich von 210 – 230 nm und den $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergang von 180 – 200 nm und kann daraus Informationen über den Sekundärstrukturgehalt eines Proteins gewinnen. Im Nah-UV-CD-Spektrum (250 – 350 nm) findet man vorwiegend die Signale der aromatischen Aminosäuren. Aber auch Disulfidbrücken und prosthetische Gruppen können, falls vorhanden, Beiträge leisten. Somit zeigt sich ein für jedes Protein typisches Spektrum als Abbild seiner Tertiärstruktur.

Die Aufnahme von CD-Spektren erfolgte an einem J-810, Jasco oder Chirascan, Applied Photophysics in Quartzküvetten (Fern-UV 0,1 cm, Nah-UV 1 cm). Für den Wildtyp wurden Fern-UV-CD-Spektren bei 10, 20 und 60 °C aufgenommen. Ein Nah-UV-CD-Spektrum wurde bei 20 °C gemessen. Für die Varianten wurden nur Fern-UV-CD-Spektren bei 20 °C aufgenommen. Die Mess- und Geräteparameter sind wie folgt zusammengefasst:

<u>Messgerät</u>	<u>Parameter</u>	<u>Fern-UV</u>	<u>Nah-UV</u>
Jasco J-810	Wellenlänge	190-260 nm	250-350 nm
	Schrittweite	0,5 nm	0,1 nm
	Scangeschwindigkeit	100 nm/min	100 nm/min
	<i>Response</i>	2 s	0,5 s
	Bandenweite	1 nm	0,1 nm
	Akkumulierte Spektren	10	10
	Proteinkonzentration	0,08 mg/ml	2 mg/ml
Chirascan	Wellenlänge	185-260 nm	260-380 nm
	Schrittweite	1 nm	1 nm
	Akkumulationszeit	10s/point (25µs · 400 000)	10s/point
	Akkumulierte Spektren	1	1
	Proteinkonzentration	0,08 mg/ml	2 mg/ml

Jede Messung wurde mit Puffer wiederholt und die erhaltene Basislinie mit der Instrumentensoftware vom Spektrum subtrahiert. Für die Nah-UV-CD-Spektren wurde das vom Messgerät erhaltene Signal der molaren Elliptizität in mdeg beibehalten, da nur ein geringer Anteil des gesamten Moleküls in diesem Bereich zum Signal beiträgt und der Gehalt an aromatischen Aminosäuren nicht mit dem Molekulargewicht eines Proteins korreliert. Um die erhaltenen Signale unabhängig vom Molekulargewicht betrachten zu können, erfolgte für die Fern-UV-CD-Spektren eine Berechnung der mittleren molaren Masse einer Aminosäure (M_{MRW}) und eine Umrechnung in *mean residue weight*-Elliptizität $[\Theta]_{MRW}$ mit Gleichung (2.47) nach KELLY *et al.*, 2005.

$$[\Theta]_{\text{MRW}} = \frac{\Theta \cdot M_{\text{MRW}}}{10 \cdot c \cdot d} \quad (\text{deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}) \quad (2.47)$$

$[\Theta]_{\text{MRW}}$ – *mean-residue-weight*-Elliptizität ($\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$)

Θ – molare Elliptizität (mdeg), Ausgabeeinheit am Messgerät bei der jeweiligen λ

M_{MRW} – *mean-residue-weight*, mittlere molare Masse einer Aminosäure bezüglich Peptidbindungen ($\text{mg} \cdot \text{mmol}^{-1}$),

c – Proteinkonzentration der Probe ($\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$)

d – optische Weglänge (cm)

2.2.8 Massenspektrometrie zur Intermediatanalyse

Alle Messungen zur Analyse der Intermediate, die während der Reaktion von *TacTA* mit den Substraten auftreten, wurden an einem hybriden linearen Ionenfallen/Orbitrap Massenspektrometer (LTQ-Orbitrap-XL, ThermoElectron, Bremen, Germany) aufgenommen. Das Massenspektrometer war mit einer nano-Elektrospray-Ionisierungsquelle (Proxeon Biosystems, Odense, Denmark) ausgestattet. Für Messungen mit statischem nano-ESI wurden die Proben mithilfe von Metall-ummantelten *off-line* nano-Electrosprayemittern (Proxeon Biosystems, Odense, Denmark) injiziert und eine Sprayingsspannung von -1300 V angewendet.

Die Erfassung der Spektren erfolgte mit der Software XCALIBUR (Version 2.0.7, Thermo Electron, San Jose, CA, USA) Die Messung der Proben wurde durch Dr. Christian Ihling, Pharmazeutische Chemie und Bioanalytik, MLU Halle-Wittenberg ausgeführt.

2.2.8.1 Direkte Messung

Transaldolase wurde allein (2,37 μM) oder mit Substraten (2,37 μM TA, 1 mM F6P, 0,135 mM E4P) in 20 μM Tris zusammengegeben. In eine 5 μl Probenschleife, die an das 6-port-2-Wege-Ventil des Massenspektrometers (MS) angebracht war, wurde die Probe injiziert. Anschließend wurde das Ventil umgeschaltet und die Probe mit einer HPLC-Pumpe aus der Probenschleife in das MS transportiert (300 nl/min, 50 % Acetonitril, 0,1 % HCOOH). Es wurde ein Spektrum des nano-Elektrosprays mit einem online-Emitter (*stainless steel*, 30 μm Innendurchmesser, Proxeon) aufgenommen. Da nur bei Ansäuern Ionen des Proteins detektiert wurden, dafür aber geringe Mengen 50 % Acetonitril, 0,1 % HCOOH ausreichten, wurden die Kapillaren mit dem Lösungsmittelgemisch vor- und zwischengeschpült.

2.2.8.2 Diskontinuierliche Messung durch Säure-*quench*

Durch das Abstoppen der Reaktion lassen sich Verteilungen verschiedener Reaktionsspezies fixieren. Weitere Vorteile dieser Methode sind, dass der normale Reaktionspuffer und höhere Substratkonzentrationen eingesetzt werden können, da Ionen und freie Substratreste durch die Reinigung der Probe mit ZipTip abgetrennt werden.

2.2.8.2.1 Generelle Messung

Für jede Messung wurde ein 25 μ l-Ansatz mit 6 mg/ml (= 245 μ M) TA, 15 mM F6P (2,5 μ l 150 mM F6P), 1 mM E4P (2,5 μ l 10 mM E4P) in 20 mM GlyGly, pH 7,5 bereitet. Dazu wurde Puffer mit Protein vorgelegt und mit 5 μ l der 1+1 Mischung aus beiden Substraten die Reaktion gestartet. Die Reaktion erfolgte bei 20 °C und wurde nach gewünschten Zeitintervallen mit 25 μ l 98 %iger Ameisensäure abgestoppt. Die Proben wurden sofort über ZipTip aufgearbeitet und gemessen. Die ZipTip-Säulchen wurden dazu 5x mit 10 μ l Acetonitril/1 % HCOOH (im Verhältnis 70/30) und anschließend 10x mit 10 μ l 1 % HCOOH gespült. Das äquilibrierte Säulchen wurde mit dem gesamten Volumen der Probe beladen, 20x mit 10 μ l 1 % HCOOH gewaschen und mit 10 μ l des obigen Acetonitril/1 % HCOOH-Gemischs eluiert.

Die entsalzte Probe wurde sofort vermessen und das nano-Elektrospray der ersten 3 min aufgezeichnet und gemittelt. Der Zielwert der *automatic gain control* (AGC) wurde auf 500 000 gesetzt. Die Spektren wurden im m/z -Bereich von 800-2000 mit einer Auflösung bei m/z 400 von 100 000 aufgenommen. Für jeden Messpunkt wurden 9 Messungen ausgeführt, wobei 3 unterschiedliche Enzympräparationen jeweils 3-mal gemessen wurden. Die Empfindlichkeit des Messgerätes variierte zwischen den Messtagen, weswegen nicht immer die gleichen absoluten Intensitäten gemessen wurden.

Für die Messungen mit Inhibitor wurden 21 mM X5P beziehungsweise 20 mM S6P eingesetzt. Nach 15 min wurde die Reaktion gestoppt und die Proben wie beschrieben aufgearbeitet und gemessen.

2.2.8.2.2 Ausbildung des *steady state*

Die Messung erfolgte wie unter 2.2.8.2.1, nur dass die Substrate äquimolar eingesetzt wurden. Die Konzentrationen von F6P und E4P im Ansatz betrug 2 mM. Zur Einstellung des Gleichgewichts wurde die Reaktion nach 2 h durch Säure-*quench* abgestoppt.

2.2.8.2.3 Bildung von TA-Dihydroxyaceton-Intermediat

Um die Bildung des TA-Dihydroxyaceton-Intermediats (C3I) zu fördern, wurde in einen Ansatz mit 245 μM TA nur das Donorsubstrat F6P (15 mM), 0,22 mM NADH (1 μl 5,5 mM NADH) und 1 μl GDH-TPI-Lösung (Konzentration im Ansatz 40 U/ml GDH, 400 U/ml TPI) gegeben. Reaktion, Abstoppen, Aufarbeitung und Messung erfolgten wie beim Ansatz ohne Hilfsenzymlösung.

2.2.8.2.4 Nachweis von Intermediaten mittels D-[UL- $^{13}\text{C}_6$]-F6P

Um nachzuweisen, dass es sich bei den durch Substratzugabe entstehenden Signalen um kovalente Reaktionsintermediate handelt, wurde F6P durch D-[UL- $^{13}\text{C}_6$]-F6P ersetzt. Als Akzeptor wurde weiterhin unmarkiertes E4P eingesetzt. Dadurch war eine Verschiebung der Massen für die C6-Intermediate um 6 Masseneinheiten und der C3- sowie C7-Intermediate um 3 Masseneinheiten zu erwarten. Durchführung und Auswertung der Messung erfolgte wie unter 2.2.8.2.1 beschrieben.

2.2.8.3 Test der Proteinstabilität für *quench*-MS

Um die Stabilität des Proteins unter den gewünschten, sauren Messbedingungen zu testen, wurde Protein gemessen, das a) 1+1 mit Wasser verdünnt und dem kurz vor der Messung 10 % (v/v) einer 1 % HCOOH-Lösung zugegeben wurde, b) 1+1 mit Acetonitril/1 % HCOOH (70/30) verdünnt und 10 min inkubiert wurde, c) 1+1 mit 85 % HCOOH verdünnt und 10 min inkubiert wurde und d) dieselbe Probe wie c) 25 min inkubiert wurde.

Als zweite Studie zur Proteinstabilität bei der *quench*-MS-Methode wurde TA wie in Kapitel 2.2.8.2, Bildung des TA-Dihydroxyaceton-Intermediats, beschrieben für 5 min reagieren gelassen, aufgearbeitet und gemessen. Ein Teil der Probe wurde 3 Tage bei 6 °C aufbewahrt und erneut gemessen.

2.2.8.4 Auswertung der Spektren

Für die Datenanalyse wurden die gemittelten Spektren unter Verwendung des Plug-ins für XCALIBUR (Thermo Electron, San Jose, CA, USA) in Signale mit dem Ladungszustand +1 umgewandelt (*deconvolution*). Für die Auswertung wurden die Intensitäten der monoisotopischen Massen verwendet und innerhalb eines Spektrums zueinander ins Verhältnis gesetzt. Dies stellt eine Vereinfachung zur manuellen Addition der Intensitäten aller einzelnen Isotopenpeaks dar. Diese Vereinfachung war möglich, da das Addieren der verschiedenen Isotopenpeaks von Hand im Vergleich zur von der Software berechneten Intensität der monoisotopischen Masse nur zu einem vernachlässigbar abweichenden Ergebnis führte. In Tab. 2.3 sind die Ergebnisse für beide Verfahren gegenübergestellt. Da bei der

manuellen Methode durch Rauschen im Spektrum leicht Peaks geringer Intensität übersehen werden können, wurde das Ergebnis der Software als genauer angesehen.

Tab. 2.3 Vergleich der Methoden zur Berechnung der Intensitäten und resultierende Verhältnisse der Peaks zueinander.

	Monoisotopische Peaks (berechnet durch XCALIBUR Software)		Summe der Isotopenpeaks (manuell addiert)	
	Intensität	%	Intensität	%
Summe	25 897 472		25 743 823	
TA	11 181 056	43,17	11 046 397	42,91
C6I	14 716 416	56,83	14 697 426	57,09

2.2.8.5 Untersuchung von E4P-Lösung mittels nano-ESI-Massenspektrometrie

Um die Homogenität des kommerziell erworbenen E4P zu überprüfen, wurde E4P massenspektrometrisch untersucht. 20 mM E4P-Lösung in 20 mM GlyGly wurde 1 : 100 in 85 : 15 : 0,1 Methanol : H₂O : Essigsäure verdünnt und in einem Applied Biosystems 4000 hybriden *triple quadrupole/linear ion trap* Massenspektrometer (MDS Sciex, Ontario, Canada) bei 0,2 psi und 1,25 kV gemessen. Die Analyse des Nanoelektrosprays (nanoESI) wurde unter Verwendung einer *chip ion source* (TriVersa NanoMate; Advion BioSciences, Ithaca, NY, USA) ausgeführt. Die Messung wurde freundlicherweise durch Dr. Cornelia Herrfurth, Abteilung Biochemie der Pflanze, Göttingen, durchgeführt.

2.2.9 Kristallographische Arbeiten

2.2.9.1 Kristallisation

Die Kristallisation von TA und Varianten erfolgte mit Modifikationen nach JIA *et al.*, 1996b und THORELL *et al.*, 2000. Für die Methode der Gasphasendiffusion im hängenden Tropfen wurde eine Reservoirolösung von 500 µl in 24-Loch-Zellkulturplatten vorgelegt. Die Reservoirolösung bestand aus 1) 0,1 M Natriumcitrat, pH 4, 10 % (w/v) PEG6000, 25 % (v/v) Glycerin oder 2) 0,3 M Ammoniumacetat, pH 4,4, 10 % (w/v) PEG6000, 25 % (v/v) Glycerin. In Lösung 1) wurde Wt und K86A kristallisiert, Wt-Kristalle aus diesen Ansätzen wurden zum *soaking* mit E4P verwendet. In Lösung 2) wurden Ansätze mit allen Proteinen hergestellt. Alle in dieser Arbeit besprochenen Strukturen, außer Wt + E4P

und K86A + Citrat, entstanden aus Kristallansätzen mit Lösung 2). 3 μ l 13-16 mg/ml Proteinlösung (optimal 16 mg/ml) in einem Puffergemisch aus ca. 30 % 20 mM Tris : 70 % 20 mM Glycylglycin, pH 7,5 wurden mit 3 μ l der Reservoirolösung auf einem silanisierten Deckgläschen durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Der resultierende pH-Wert im Tropfen betrug 4,5. Die Deckgläschen wurden umgedreht über den Vertiefungen der Zellkulturplatte angebracht, wobei mittelviskose Baysilone-Paste (GE Bayer Silicons GmbH & Co. KG, Leverkusen) für luftdichten Verschluss und Fixierung sorgte. Die Anfertigung der Kristallisationsansätze erfolgte bei Raumtemperatur, wobei höhere Temperaturen bis 30 °C bei der Bereitung der Ansätze die Bildung von Kristallen mit der gewünschten Raumgruppe C222₁ förderten. Die Kristallansätze wurden anschließend bei 18 °C gelagert und in regelmäßigen Zeitabständen das Wachstum der Kristalle überprüft. Zum Teil wurde *macroseeding* mit in der Raumgruppe C222₁ kristallisierten, zertrümmerten Kristallen durchgeführt.

2.2.9.1.1 Kokristallisation von Substraten

Die Substrate wurden in 20 mM Glycylglycinpuffer, pH 7,5 gelöst und zur Proteinlösung gegeben, bevor diese mit der Reservoirolösung 1 : 2 gemischt wurde. Die Endkonzentration der Zucker im Tropfen führt Tab. 2.4 auf.

Tab. 2.4 Endkonzentration von Substraten im Tropfen.

Zuckerphosphat	Konzentration
F6P	5 mM
S7P	9,87 mM
S6P	2,5 mM
X5P	15 mM
A5P	5 mM

S7P wurde freundlicherweise von Stefan Lüttke enzymatisch nach CHARMANTRAY *et al.*, 2009 synthetisiert und gereinigt.

2.2.9.1.2 Soaking von E4P

Da E4P schnell dephosphoryliert, wurde dieses Substrat per *soaking* bei 18 °C in die Kristalle gebracht. Die Kristalle waren dabei sehr instabil, so dass Inkubation in der *soaking*-Lösung (5 % PEG6000, 30 % Glycerin, 100 – 300 mM E4P, 26,2 mM NaCitrat, 12,5 mM GlyGly, pH \approx 4) nur für 20 s möglich war.

2.2.9.2 Datenaufnahme und -prozessierung

Da der Glyceringehalt im Tropfen 12,5 % betrug, war es möglich, die Kristalle direkt im Stickstoffstrom (100-130 K) ohne weiteren Gefrierschutz schock zu frieren. Die Datensätze von Einzelkristallen wurden an vier verschiedenen Messplätzen aufgenommen.

- 1) Drehanodengenerator Micromax 007 (Rigaku Corp., Japan), Röntgenstrahlung $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$, CuK $_{\alpha}$, R-Axis IV++ *image-plate*-Detektor (Rigaku Corp., Japan), X-stream 2000 (Rigaku Corp., Japan) Physikalische Biotechnologie, Halle/Saale
K86A (Acetat + F6P)
- 2) BESSY beamline 14.1, Berlin, 225 mm *mosaic* CCD Detektor von MARRESEACH, $\lambda = 0,91841 \text{ \AA}$
Wt + F6P
Wt + S7P
Wt + X5P
E60Q
D6N
E60A + F6P
E60A + S7P
- 3) BESSY beamline 14.2, Berlin, 165 mm *single chip* CCD Detektor von MARRESEACH,
 $\lambda = 0,91841 \text{ \AA}$
Wt Grundstruktur
Wt + E4P
K86A + Citrat
F132Y
- 4) Drehanodengenerator Micromax 007 (Rigaku/MSK, The Woodlands, TX), Röntgenstrahlung $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$, CuK $_{\alpha}$, 40 kV and 20 mA, Mar345dtb Detektorsystem (X-ray Research, Hamburg) mit Osmic focusing mirrors, Cryo-Kühlung: X-Stream system (Rigaku/MSK), Abteilung Molekulare Strukturbiologie, Göttingen
Wt + S6P
Wt + A5P
T110V + F6P (DHA)

Die Datenaufnahme und Prozessierung wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Piotr Neumann (Abteilung Molekulare Strukturbiologie, GZMB, Göttingen) und Dr. Christoph Parthier (AG Physikalische Biotechnologie, Halle/Saale) durchgeführt.

TA kristallisierte in der orthorhombischen Raumgruppe C222₁ oder der monoklinen Raumgruppe P2₁. Für Integration und Skalierung der Rohdaten wurde das Programmpaket XDS/XSCALE (KABSCH, 1993) verwendet.

2.2.9.3 Modellierung und kristallographische Verfeinerung

Die Bestimmung initialer Phasen erfolgte durch Dr. Piotr Neumann über *molecular replacement* mit PHASER (McCOY *et al.*, 2007), wobei als Suchmodell die Transaldolase aus *Thermus thermophilus* HB8 (PDB-Code: 1WX0, 45,3 % Sequenzidentität) verwendet wurde. Anhand der Elektronendichten wurde ein erstes atomares Modell von Dr. Piotr Neumann mit dem Programm COOT erstellt. Weitere Modellierung und Verfeinerungsrechnungen erfolgten mit COOT (EMSLEY UND COWTAN, 2004), PHENIX (AFONINE *et al.*, 2005) und REFMAC5 (MURSHUDOV *et al.*, 1997) und bei der Variante D6N auch durch CNS (BRUNGER *et al.*, 1998, durchgeführt durch Dr. Piotr Neumann). Für fast alle Strukturen wurden bei den Verfeinerungsrechnungen mit Phenix 2 TLS-Gruppen (α/β -barrel und C-terminale Helix) pro Monomer verwendet. Für den Wt-Grundzustand und Wt+S7P wurden 4 TLS-Gruppen pro Monomer verwendet: Aminosäuren 1-33, 34-55, 56-198, 199-223 (C-terminale Helix) bildeten jeweils eine Gruppe. Bei E60Q wurden die Ketten B und C mit 2 TLS-Gruppen/Monomer und A, D sowie E mit 4 TLS-Gruppen pro Monomer verfeinert. Für die Struktur E60A+F6P ließen sich ohne TLS-Gruppen die besten Ergebnisse erzielen.

In Kristallen der Raumgruppe C222₁ war das finale Modell ein Homopentamer, während P2₁ ein Homodekamer in der asymmetrischen Einheit enthielt.

Für Strukturen mit Substratkomplexen, wurden mit Phenix *simulated annealing omit maps* ($T_{\text{start}} = 5000$ K, $T_{\text{final}} = 300$ K) gerechnet. Wenn sich positive Elektronendichte im aktiven Zentrum zeigte, wurde das Proteinmodell um das entsprechende Molekül erweitert.

Die Modelle wurden mit SFCheck (VAGUINE *et al.*, 1999) validiert. Eine Zusammenfassung aller Statistiken findet sich im Anhang (7.3).

2.2.9.4 Graphische Darstellung

Für die graphische Wiedergabe der strukturellen Daten und Strukturvergleiche wurde das Programm PyMOL Version 0.99 und 1.3 (DeLano Scientific LLC) verwendet.

2.2.9.5 Analyse der Strukturen

Zur Analyse von Kontaktflächen und die Art der Kontakte im Pentamer und Dekamer wurden die Programme AREAIMOL (LEE UND RICHARDS, 1971; SAFF UND KUIJLAARS, 1997), PISA (KRISINEL UND HENRICK, 2007) und CONTACT (SKARZYNSKI UND LESLIE, 1988) der CCP4-Suite (COLLABORATIVE COMPUTATIONAL PROJECT, NUMBER 4, 1994) genutzt.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Molekularbiologische Arbeiten

3.1.1 Generierung von Proteinvarianten

Die Auswahl, welche *active site*-Varianten generiert werden sollten, erfolgte basierend auf der vorgeschlagenen Theorie zum Mechanismus der Aldolase (SCHÖRKEN *et al.*, 2001) und ersten Studien zu der neuen Unterfamilie der *transaldolase-like proteins* (THORELL *et al.*, 2002), zu denen *TacTA* aufgrund der Länge und Sequenz zählt. Die Sequenz von *TacTA* wurde mit den Sequenzen klassischer Transaldolasen (Unterfamilie 1), verkürzter Transaldolasen (Unterfamilie 4) und Fructose-6-phosphat-Aldolasen (Unterfamilie 5) computergestützt verglichen (Kategorisierung der Unterfamilien nach SAMLAND UND SPRENGER, 2009). Dieser Sequenzvergleich ist in Abb. 3.1 dargestellt. Anhand des Vergleichs wurden die Kandidaten für die Mutagenese ausgewählt. Von besonderem Interesse waren die Seitenkettenreste Glu60 und Asp6, für die eine Beteiligung an der Säure-Base-Katalyse angenommen wurde. Mit der Variante K86A sollte Lys86 als die Schiffbase bildende Lysin nachgewiesen werden. Da ein katalytisch aktives Wasser als essentiell für den Mechanismus vorgeschlagen wurde, erfolgte auch ein Austausch von Thr110 (T110V), welches zusammen mit Glu60 das Wassermolekül über Wasserstoffbrückenbindungen bindet. Der Austausch F132Y wurde durchgeführt, um die Unterschiede der Katalyse von Fructose-6-phosphat-Aldolasen zu den strukturell sehr ähnlichen Transaldolasen zu beleuchten.

Der Erfolg des gezielten Austausches einzelner Aminosäuren wurde durch Sequenzierung nachgewiesen.

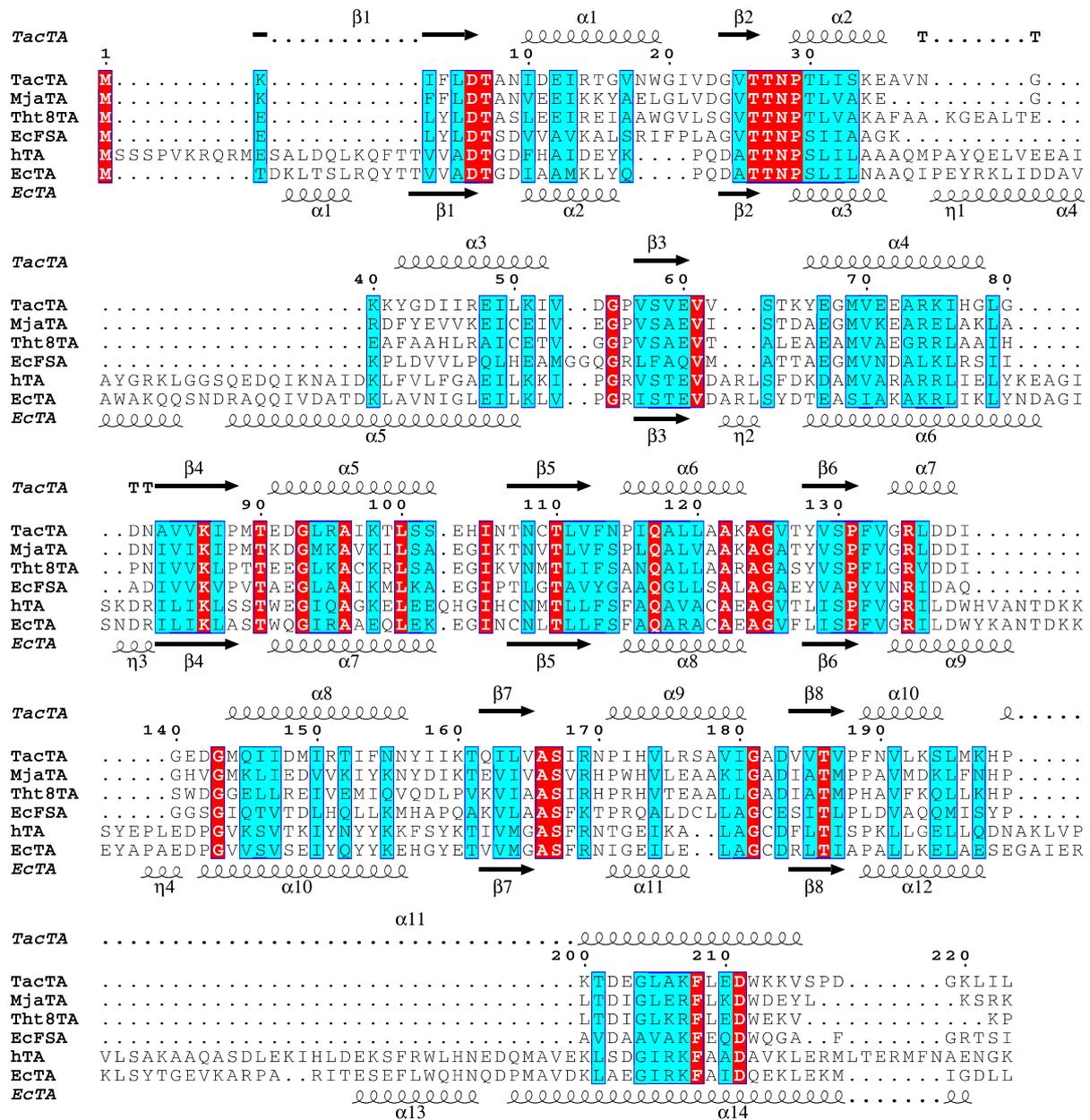


Abb. 3.1 Sequenzvergleich von TacTA mit Proteinen der Transaldolasefamilie. TA aus *Methanococcus jannaschii* (MjaTA), *Thermus thermophilus* HB8 (Tht8TA), Mensch (hTA) und *Escherichia coli* (EcTA), FSA aus *E. coli* (EcFSA). Verwendete Programme: T-Coffee und ESPrift 2.2. Dabei wurden die Sekundärstrukturelemente von TacTA (über den Sequenzen) und *E.coli* TA (darunter) mit einbezogen. Die Nummerierung entspricht der Sequenz von TacTA. Reste mit rotem Hintergrund haben Sequenzidentität, Reste mit blauem Hintergrund zeigen Sequenzähnlichkeit innerhalb der Gruppe.

3.1.2 Finden eines Expressionsstamms

Abb. 3.2 zeigt die Expression des *Tac*-Operons in BL21 (DE3) Star und Rosetta 2 (DE3) sowie eine Testpräparation mit NiNTA. Beide Stämme exprimieren die Gene des *Tac*-Operons. Dabei scheint BL21 (DE3) Star mehr Protein herzustellen und vor allem ist der Anteil an Transaldolase größer. Für die Proteingewinnung wurde dieser Stamm verwendet. An die NiNTA-Säule bindet Tkl mit dem His-tag. Falls eine Komplexbildung mit den beiden anderen Proteinen, die durch das *Tac*-Operon codiert sind, stattfindet, so ist sie schwach. TA ist im Durchlauf, wird aber auch beim Waschen eluiert.

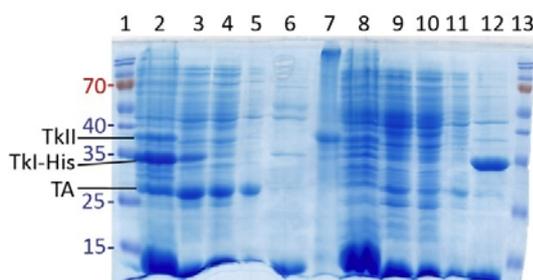


Abb. 3.2 Expression des *Tac*-Operons. Bahnen 2-6: BL21 (DE3) Star, Bahnen 8-12: Rosetta 2 (DE3), Präparation mit NiNTA. 1) Marker, 2) Zellaufschluss Sediment, 3) Zellaufschluss Überstand, 4) Durchlauf, 5) Wasch, 6) Elution, 7) Tkl-Marker, 8) Zellaufschluss Sediment, 9) Zellaufschluss Überstand, 10) Durchlauf, 11) Wasch, 12) Elution, 13) Marker. Tkl und TklII bezeichnet die Transketolasen I und II aus *T. ac.*, deren Gene Teil des Operons sind, dabei trägt Tkl einen N-terminalen His-tag.

3.2 Expression und Enzympräparation

Bei der Kultivierung in Schüttelkolben konnten aus 6 l Kultur Zellen mit einem Feuchtgewicht von 24 g gewonnen werden. Nach Fermentation einer 6 l Kultur wurde ein Zellfeuchtgewicht von 862 g erhalten. Aus 10 g Zellen konnten 15 – 22 mg *TacTA* gewonnen werden. Abb. 3.3 zeigt das Elutionsprofil einer TMAE-Anionenaustauschchromatographie. Um die Peaks besser Basislinien-rein trennen zu können, wurden Stufen in den Gradienten eingefügt. Die Varianten, außer T110V, zeigten ein verändertes Elutionsprofil und eluierten schon bei 23 % Puffer B. Eine letzte, häufig auftretende Verunreinigung, zu sehen als erste Spitze des gelb hinterlegten Peaks, ließ sich durch thermische Denaturierung der restlichen Wirtsproteine bei 60 °C und anschließende Zentrifugation abtrennen. Eine Hitzefällung im Zellrohextrakt war nicht möglich, da die aggregierenden *E. coli*-Proteine anscheinend in Interaktion mit *TacTA* standen und in ihrer Überzahl das Zielprotein mit ausfällten. In einigen Fällen war das Protein nach der Anionenaustauschchromatographie bereits so sauber, dass auf die Hitzefällung verzichtet werden konnte. So auch im Beispiel der in Abb. 3.3 rechts gezeigten Wt-Präparation.

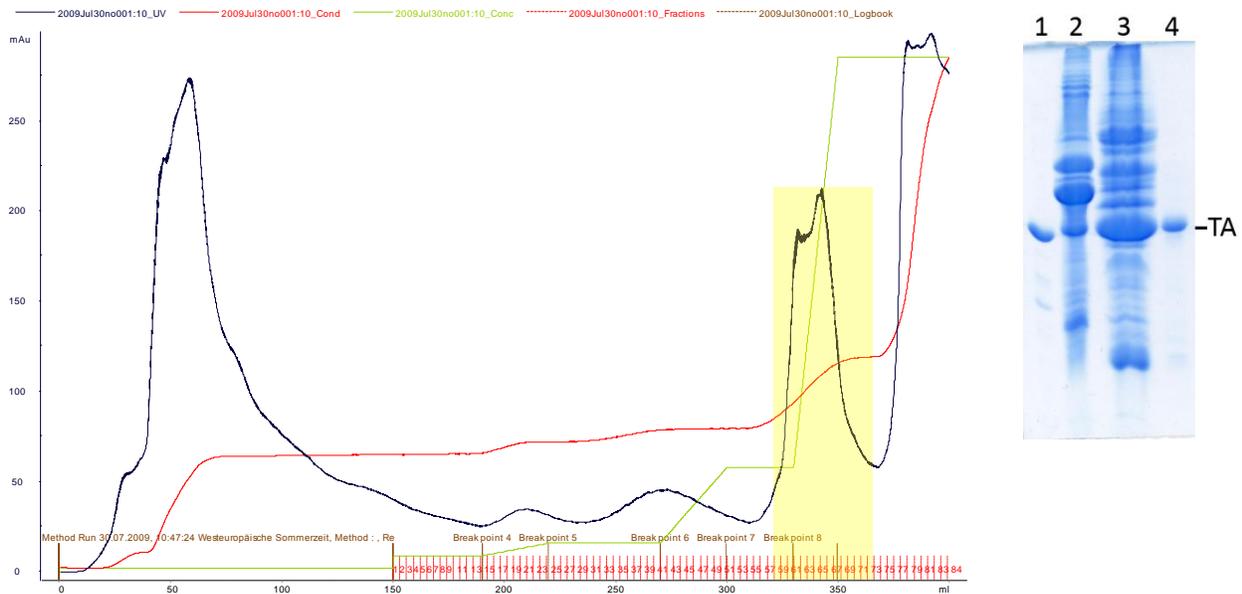


Abb. 3.3 Elutionsprofil von *TacTA* und SDS-PAGE zur Illustration der Reinigungsprozedur.

Links: Elutionsprofil an TMAE von Wt-*TacTA*, die *TacTA* enthaltenden Fraktionen sind gelb hinterlegt. Schwarz: Absorption bei 280 nm, Rot: Leitfähigkeit, Grün: Stufengradient in % Puffer B. Rechts: SDS-PAGE von Wt-*TacTA*. 1) TA-Marker, 2) nach Zellaufschluss, 3) Sediment bei 80 % (Sättigung) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 4) nach TMAE.

Zusätzlich zur Kontrolle des Molekulargewichts im denaturierenden SDS-Polyacrylamidgel wurde nach der ersten Präparation die TA-Bande bei 26 kDa nach tryptischem Verdau massenspektrometrisch analysiert. Die Messung wurde freundlicherweise von Dr. Angelika Schierhorn (Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung, Halle/Saale) durchgeführt. Anhand der mit ESI-QUAD-TOF gemessenen Peptide konnte nach Datenbanksuche (Mascot, www.matrixscience.com) das gereinigte Protein als *TacTA* bestätigt werden. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden das Wt-Protein und alle Varianten unverdaut mittels Massenspektrometrie untersucht und die korrekten Molekulargewichte gefunden.

3.3 Biochemische Charakterisierung

3.3.1 Strukturelle Integrität von Transaldolase und Varianten

Mittels CD-Spektroskopie konnten erste Informationen über den Sekundärstrukturgehalt von *TacTA* erhalten werden (Abb. 3.4). Ein rein α -helikales Protein hat bei 222 nm eine residuelle Elliptizität von $-30\,000\text{ deg cm}^2\text{ dmol}^{-1}$ (KELLY *et al.*, 2005). Transaldolase zeigt bei 222 nm und 20 °C ein negatives Maximum von $-16\,898\text{ deg cm}^2\text{ dmol}^{-1}$. Auch wenn insgesamt der helikale Anteil im Spektrum der *TacTA* sehr hoch ist, ist die Intensität dieser Bande nicht so hoch und nicht so ausgeprägt wie bei einem rein α -helikalen Protein und es konnten Anteile weiterer Strukturelemente angenommen

werden. Das wurde mit den gelösten Röntgenkristallstrukturen bestätigt, die einen Anteil an α -Helix von 53 % und 20 % β -Faltblattstruktur zeigten.

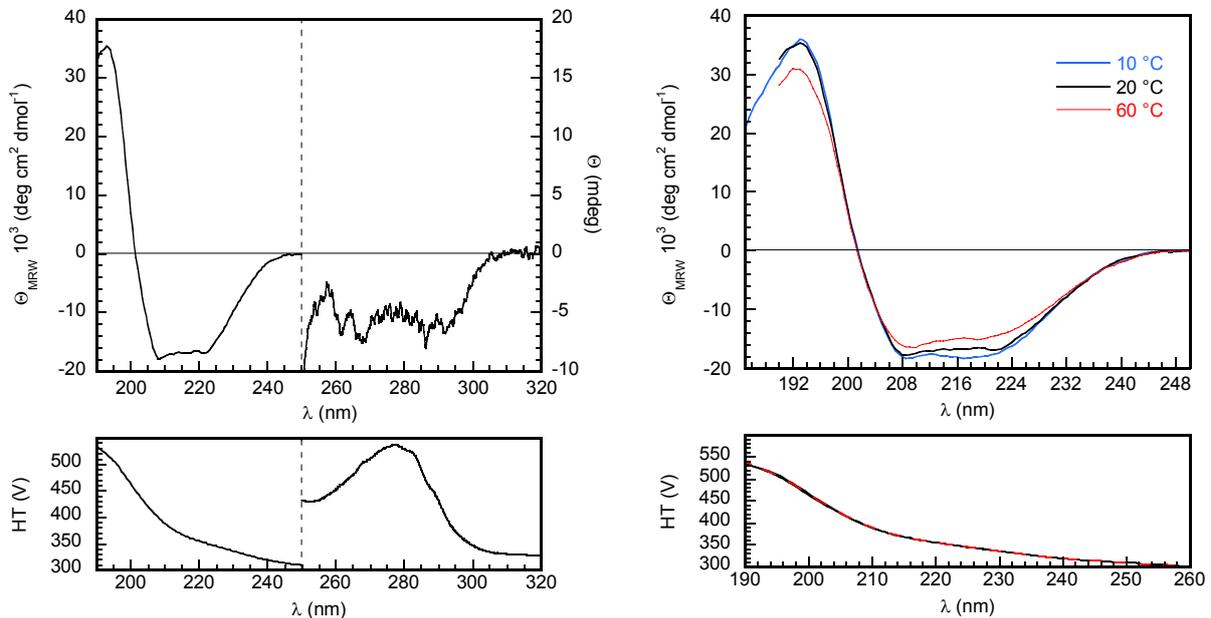


Abb. 3.4 Fern- und Nah-UV-CD-Spektrum von Wt-TacTA. T = 20 °C, pH 7,55. Fern-UV-CD: 88,7 μ g/ml TA, 0,66 mM Glycylglycin, d = 0,1 cm. Nah-UV-CD: 2 mg/ml TA, 3,75 mM Glycylglycin.

Die Sekundärstruktur bleibt im Wesentlichen bei verschiedenen Temperaturen bis 60 °C unverändert. Man sieht eine leichte Verstärkung des helikalen Anteils bei 10 °C, während bei 60 °C der Strukturgehalt leicht abnimmt. 60 °C ist die Lebenstemperatur von *Thermoplasma acidophilum* und das Protein ist bei dieser Temperatur auch über Wochen aktiv (Abb. 3.8). Von einer beginnenden Denaturierung bei 60 °C ist daher nicht auszugehen. Denkbar ist eine erhöhte Flexibilität des Proteins, vor allem in den Bereichen, die schon in der Röntgenkristallstruktur hohe Flexibilität zeigen. Die bei 20 °C aufgenommenen Fern-UV-CD-Spektren der Varianten zeigten im Vergleich mit dem Wt keine Veränderungen, so dass nicht von globalen strukturellen Unterschieden auszugehen ist.

3.3.2 Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit vom pH-Wert

Bei vielen enzymatischen Reaktionen spielen Protonentransferprozesse eine Rolle. Somit sind durch den pH-Wert nicht nur die Enzymstabilität, sondern auch kinetische Parameter, wie z.B. die Stabilität des Enzym-Substrat-Komplexes oder des geschwindigkeitsbestimmenden Schritts beeinflusst. Durch die Untersuchung von pH-Abhängigkeiten enzymkatalysierter Reaktionen können die Art und der Protonierungszustand der am Katalysemechanismus beteiligten Gruppen im Enzym bestimmt werden.

TacTA zeigt eine pH-Optimumskurve. Aus der halblogarithmischen Auftragung kann man über die Geradenschnittpunkte des aufsteigenden, gleichbleibenden und absteigenden Asts ein Optimumsplateau von pH 7,1 - 8,32 ermitteln (Abb. 3.5). Diese ermittelten Plateaugrenzen entsprechen den pK_a -Werten für den Enzym-Substratkomplex pK_{ES} . Bei der Anpassung der nicht-logarithmierten Kurve nach Gleichung (2.10) ergeben sich $pK_{ES1} = 6,36$ und $pK_{ES2} = 9,45$. Im Optimumsbereich zeigen die Progresskurven einen linearen Beginn, der als *steady-state*-Geschwindigkeit ausgewertet wurde. Bei Abweichungen von diesem pH-Optimum, ab $pH < 6,9$ und $pH > 9$, findet man in den Progresskurven eine *lag*-Phase.

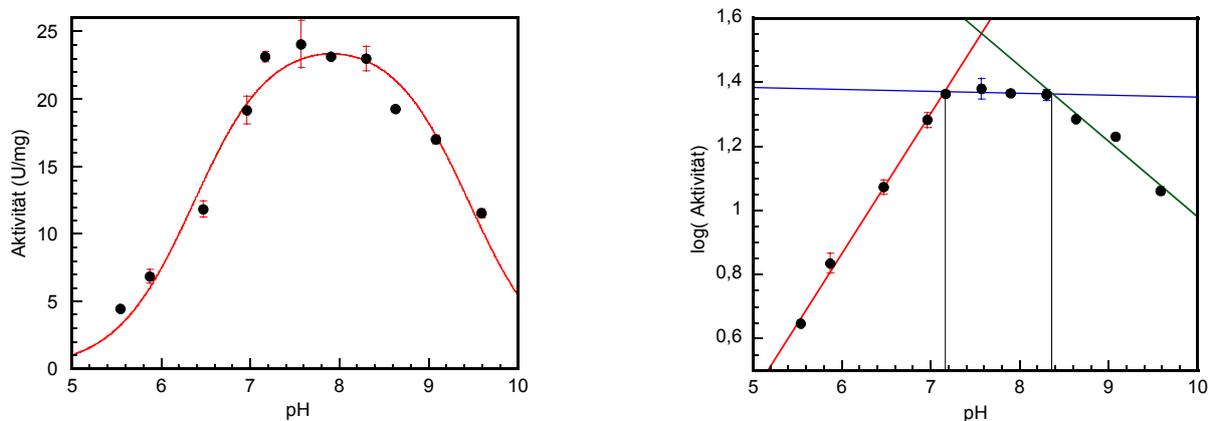


Abb. 3.5 pH-Optimumskurve und logarithmische Auftragung für *TacTA*. Die Messung erfolgte bei konstanter Ionenstärke mit 0,0127 mg/ml TA bei 30 °C. In der logarithmischen Darstellung (rechts) entsprechen die Schnittpunkte des auf- und absteigenden Astes mit dem Plateau den pK_a -Werten für den Enzym-Substratkomplex pK_{ES} .

3.3.2.1 Vorhersage von pK_a -Werten mit PROPKA

Die ermittelten pK_{ES} -Werte wurden mit Berechnungen des Programms PROPKA (Li *et al.*, 2005; BAS *et al.*, 2008) verglichen, welches auf Basis von empirischen Daten anhand der gelösten Röntgenkristallstruktur pK_a -Werte für Aminosäuren im Enzym berechnet. Dabei können auch gebundene Substrate berücksichtigt werden. Die rechnerisch ermittelten pK_a -Werte für das freie Enzym und für den Schiffbasen-Enzym-Substrat-Komplex sind in Tab. 3.1 zusammengefasst und sind laut Angabe der Autoren auf ± 1 pH-Einheit verlässlich.

Tab. 3.1 Mit PROPKA berechnete pK_a -Werte für vermutlich an der Katalyse beteiligte Aminosäuren.

Seitenkette	pK_E	pK_{ES} (Schiffbase)
Asp6	4,94	4,71
Glu60	6,64	7,11
Lys86	9,10	-

Anhand der theoretischen pK_a -Werte der Aminosäureseitenketten im Enzym bei Substratbindung lassen sich die empirisch gefundenen pK_{ES} -Werte den Aminosäuren Glu60 und Lys86 zuordnen.

Da die Berechnung für den ES-Komplex so genau mit dem experimentellen Daten überein stimmt, kann man davon ausgehen, dass auch die Vorhersage für das freie Enzym zuverlässig ist. Im Bereich des pH-Optimums von *TacTA* liegt Asp6 im Grundzustand sowie im Zustand des Schiffbasen-Intermediats deprotoniert vor. Der pK_a -Wert von Glu60 ist ungewöhnlich hoch, kann aber garantieren, dass Glu60 leicht protoniert werden kann, was für die Katalyse der Transaldolasereaktion von Bedeutung ist. Im Schiffbasen-Komplex ist der pK_a von Glu60 sogar noch weiter erhöht, so dass es durch Deprotonierung der Hydroxylgruppe am C4 die Substratspaltung einleiten könnte. Der kleine pK_a -Wert von Asp6 macht dieses für diese Aufgabe unwahrscheinlich. Die Differenz der berechneten Werte für pK_E und pK_{ES} ist zwar innerhalb des Fehlers, aber man kann zumindest qualitativ davon ausgehen, dass Glu60 eine Erhöhung des pK -Wertes bei Substratbindung erfährt.

3.3.3 Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Ionenstärke

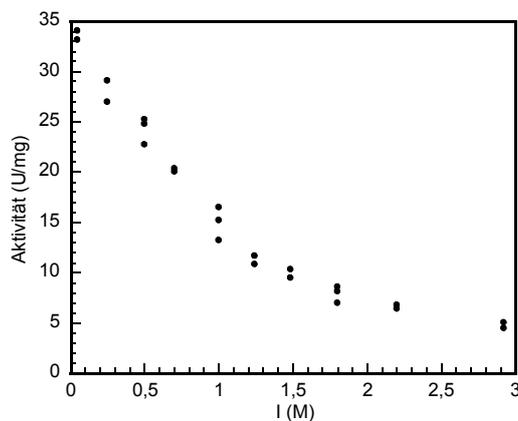


Abb. 3.6 Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von *TacTA* von der Ionenstärke.

Die Aktivität der Transaldolase zeigt eine starke Abhängigkeit von der Ionenstärke. Physiologisch sind so hohe Ionenstärken wie die gemessenen allerdings nicht relevant. *Thermoplasma acidophilum* wächst optimal bei pH 2 und zeigt bei diesem pH eine hohe Empfindlichkeit gegenüber Erhöhung der Ionenstärke (SMITH *et al.*, 1973). Die Abnahme der Zellviabilität mit der Ionenstärke ist vergleichbar mit dem für Transaldolase bestimmten Aktivitätsabfall. In genannter Publikation wird eine Zellyse von *Thermoplasma acidophilum* vermutlich durch Destabilisierung und Zerfall der Zellmembran bei hohen Ionenstärken diskutiert. Man kann also davon ausgehen, dass auch in der Zelle keine erhöhten Ionenstärken auftreten.

3.3.4 Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Temperatur

Wie für ein Enzym aus einem bei 60 °C lebenden Organismus erwartet, zeigt *TacTA* einen starken Anstieg der Aktivität bis 60 °C (Abb. 3.7).

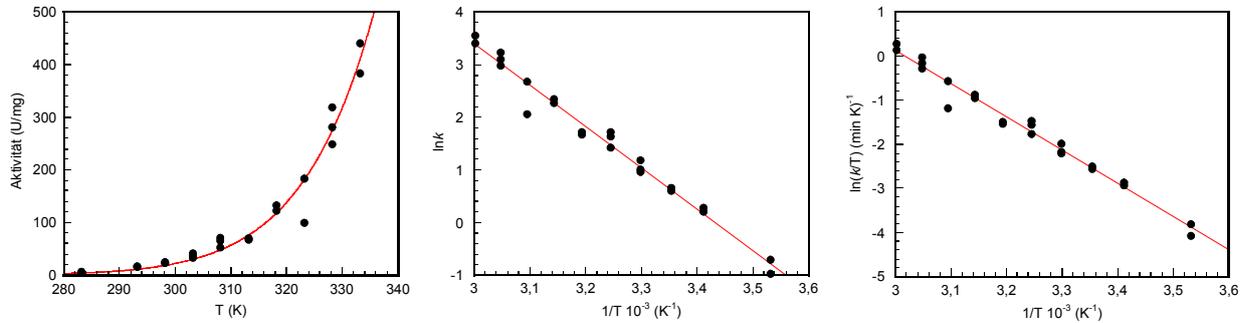


Abb. 3.7 Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit von *TacTA* in Abhängigkeit von der Temperatur. Links: direkte Auftragung. Mittig: Auftragung nach ARRHENIUS. Rechts: Auftragung nach EYRING.

Mit erhöhter Temperatur nimmt die Messgenauigkeit des gekoppelten Assays ab. Über die Auftragungen nach EYRING und ARRHENIUS (Abb. 3.7) konnten folgende thermodynamischen Parameter für $T = 25\text{ °C}$ ermittelt werden:

Frequenzfaktor	Aktivierungsenergie	Aktivierungsenthalpie	Aktivierungsentropie
$A = 5,137 \cdot 10^{11} \text{ min}^{-1}$	$E_A = 65,32 \text{ kJ/mol}$	$\Delta H^\ddagger = 62,8 \text{ kJ/mol}$	$\Delta S^\ddagger = -8,21 \text{ J/(K mol)}$

Die Hilfsenzyme waren keine thermophilen Enzyme, sind aber während der Messdauer nicht sichtbar aggregiert. Die Substrate, besonders E4P, werden bei den hohen Temperaturen schnell dephosphoryliert. Die Aktivität von *TacTA* kann dadurch scheinbar erniedrigt sein. Bei den TA-Isoenzymen aus *C. utilis* wurde eine Aktivierungsenergie der enzymatischen Reaktion von 54 kJ/mol (zwischen 25 und 32 °C) bestimmt (TSOLAS UND HORECKER, 1970).

3.3.5 Thermische Stabilität

Bei der Lebenstemperatur von *T. acidophilum* ist *TacTA* *in vitro* relativ stabil. Nach einmonatiger Inkubation bei 60 °C zeigte *TacTA* noch 65 % Restaktivität. Bei höheren Temperaturen geht die Inaktivierung wesentlich schneller. Bei 80 °C sind nach 4 h nur noch 25 % der Aktivität erhalten und bei 90 °C hat das Enzym nach 7,4 min alle Aktivität verloren.

Es wurden die Geschwindigkeitskonstanten k_T der Inaktivierung der *TacTA* in Abhängigkeit von der Temperatur bestimmt (Abb. 2.1, oben). Mit den ermittelten Geschwindigkeitskonstanten konnte

über die Analyse nach EYRING die Aktivierungsenthalpie der Denaturierung bestimmt werden (Abb. 3.8, unten).

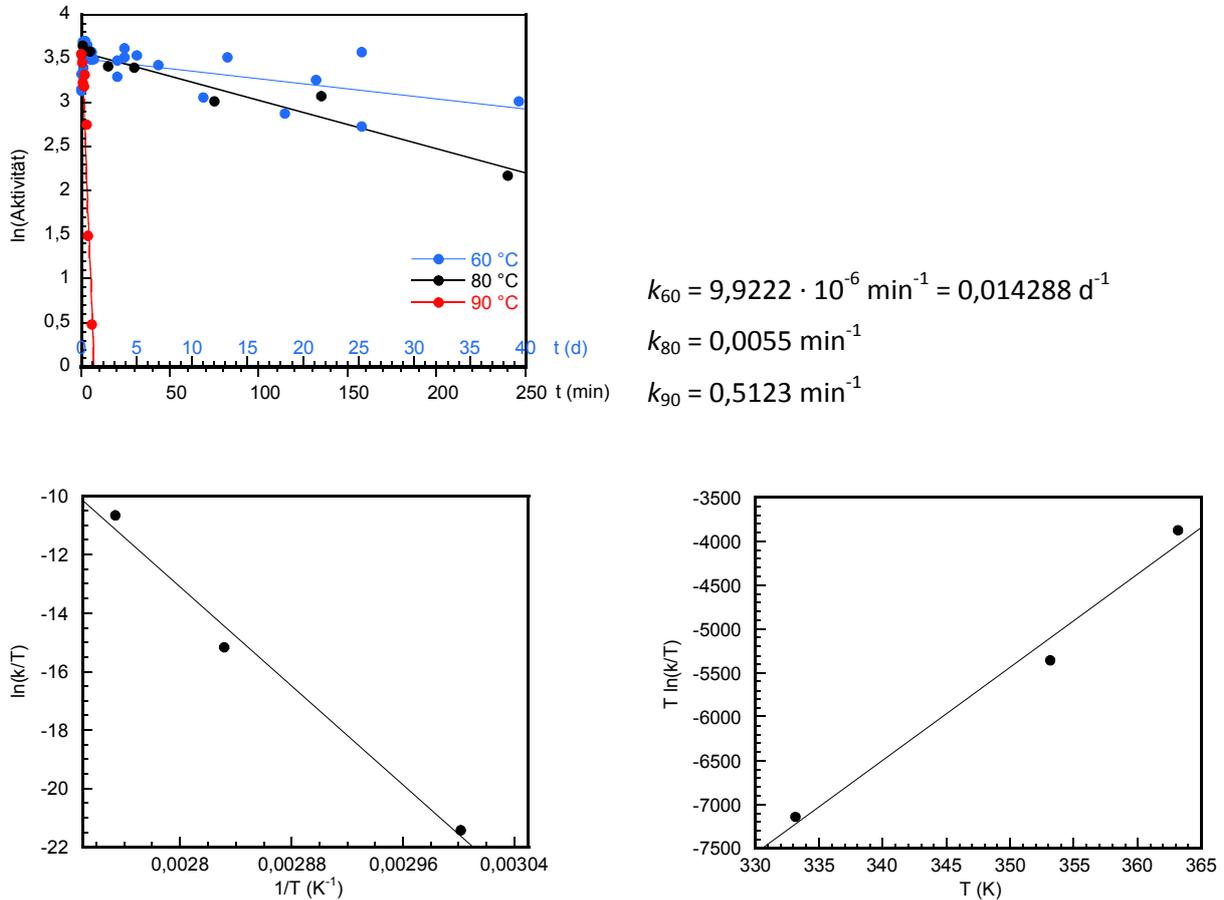


Abb. 3.8 Thermische Inaktivierung von *TacTA*. Oben: Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten der thermischen Denaturierung von TA bei verschiedenen Temperaturen. Für die Messung bei 60 °C gilt die blaue Zeitachse. Unten: Sekundärauftragungen zur Ermittlung der thermodynamischen Parameter der Denaturierung. Auftragungen nach den Gleichungen (2.24) und (2.25) aus Kapitel 2.2.4.6.

Die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten sind Abb. 3.8, oben rechts zu entnehmen. Mit $\Delta H^\ddagger = 352,08 \text{ kJ/mol}$ und $\Delta S^\ddagger = 684,33 \text{ J/(mol K)}$ ergab sich bei 30 °C eine freie Aktivierungsenthalpie der Hitzeinaktivierung von $\Delta G^\ddagger = 144,63 \text{ kJ/mol}$. Für die Isoformen der Transaldolaseenzyme aus der Hefe *Candida utilis* wurden Aktivierungsenergien (E_a) der Hitzeinaktivierung von 435,43 (III) bis 891,79 (I) kJ/mol gefunden (bei 41 und 45 °C, TSOLAS UND HORECKER, 1970).

3.3.6 Bestimmung des Oligomerisierungsgleichgewichts

Der Oligomerisierungsgrad von TA wurde mittels analytischer Ultrazentrifugation untersucht. Das Molekulargewicht eines TA-Dekamers beträgt 244 643 Da. Für ein Pentamer sind 122 321,5 Da zu

erwarten. Die bestimmten apparenten molekularen Massen zeigen im untersuchten Konzentrationsbereich den Übergang vom Pentamer- zum Dekamerzustand mit steigender Proteinkonzentration (Abb. 3.9). Eine Anpassung nach einem Pentamer-Dekamer-Gleichgewicht ohne Festlegung von Parametern führte zu einem die Messdaten gut wiedergebenden Graphen. Dieser gab für die Dekamere ein plausibles Molekulargewicht von 283 640 Da und einen K_D -Wert von 0,04 μM bei einer Norm von 0,38. Die Norm dient als Maß für die Summe der quadrierten Abweichung der Messpunkte von der Anpassung. Das so ermittelte Molekulargewicht für die Pentamere war mit $1,79 \cdot 10^4$ Da völlig unwahrscheinlich. Somit wurden Grenzen angenommen, welche Größe das beobachtete Molekulargewicht eines Pentamers unter Berücksichtigung der Streuung der Messwerte und Ungenauigkeiten bei der Berechnung des apparenten Molekulargewichts aus den s -Werten annehmen könnte. Die Anpassungen sind mit $M = 100\,000$ und $M = 140\,000$ Da als untere bzw. obere Grenze mit schwarzen Linien in Abb. 3.9 dargestellt.

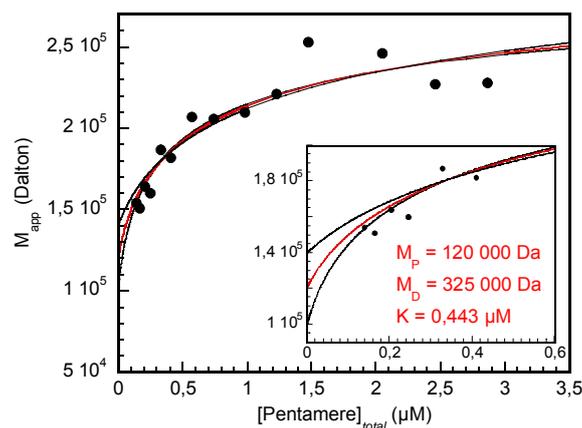


Abb. 3.9 Apparentes Molekulargewicht von *TacTA* in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration mit Anpassung für ein Pentamer-Dekamer-Gleichgewicht. Die Bestimmung erfolgte durch analytische Ultrazentrifugation, 20 mM Tris, pH 7,6, 20 °C. 1 μM Pentamere entspricht einer Proteinkonzentration von 122 $\mu\text{g/ml}$. Schwarze Linien: Anpassung mit Festlegung von $1 \cdot 10^5$ und $1,4 \cdot 10^5$ Da als untere und obere Grenze für das Molekulargewicht eines Pentamers (M_P). Rote Linie: Anpassung mit Festlegung von $M_P = 1,2 \cdot 10^5$ Da.

Die Normen für beide Anpassungen betragen 0,4 und 0,46. Die Quotienten aus diesen Anpassungen und der Anpassung ohne konstante Werte betragen somit 1,05 und 1,21. Anhand dieses Kriteriums kann man davon ausgehen, dass es sich um Kurven sehr ähnlicher Anpassungsqualität handelt. Die K_D -Werte für die Grenzanpassungen betragen 0,24 und 0,98 μM . In dieser Größenordnung sollte auch der reale K_D dieses Gleichgewichts liegen. Eine Anpassung mit dem realen Molekulargewicht der Pentamere von 120 000 Da als Konstante (Abb. 3.9, rote Linie) liefert eine Norm von 0,42, einen K_D -Wert von 0,44 μM und ein Molekulargewicht der Dekamere von 325 000 Da. Letzteres ist mit 133 % des realen Molekulargewichts der Dekamere sehr hoch, aber in der richtigen Größenordnung

und unter Betracht der genannten Fehlerquellen tolerierbar. Dieser Graph wird als die den realen Verhältnisse entsprechendste Anpassung angesehen. Zusammenfassend kann man sagen, dass ein Pentamer-Dekamer-Gleichgewicht zur Interpretation der Messdaten ausreicht, aber das Auftreten kleinerer Spezies nicht ausgeschlossen werden kann.

3.3.7 Aktivität der Oligomerspezies

Um herauszufinden, ob die verschiedenen Oligomerisierungsformen unterschiedliche Reaktivitäten haben, wurde die Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration untersucht. Bei gleichen Aktivitäten für Pentamere und Oligomere wäre eine lineare Korrelation zu erwarten. Es zeigt sich, dass die Reaktionsgeschwindigkeit weniger stark zunimmt als die Proteinkonzentration. Die Aktivität der Dekamere ist schwächer als die der Pentamere, was gut erkennbar ist, wenn man die Änderung der Aktivität mit der Proteinkonzentration und die Daten der analytischen Ultrazentrifugation vergleicht (Abb. 3.10).

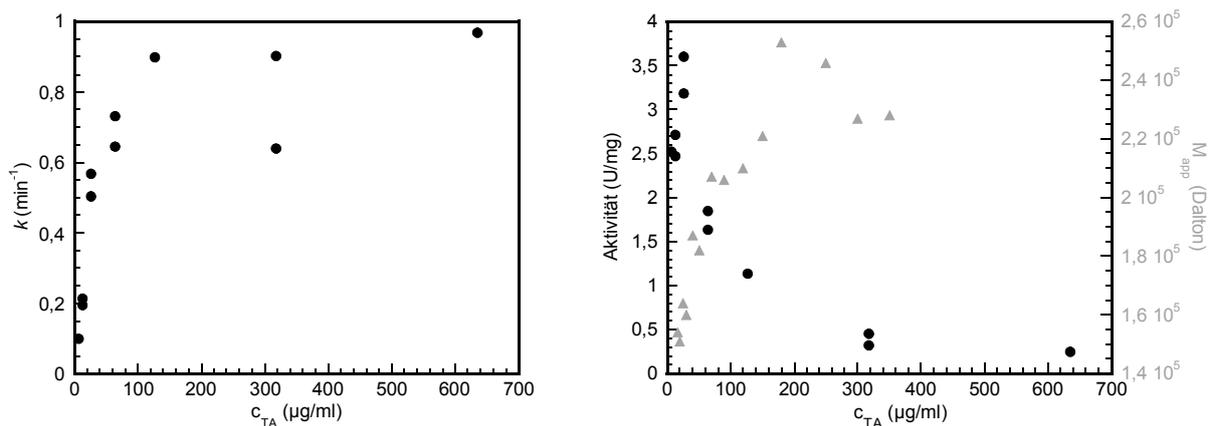


Abb. 3.10 Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der *TacTA* von der Proteinkonzentration.

● Reaktionsgeschwindigkeit, 20 mM GlyGly, pH 7,5; 0,55 mM F6P; 0,18 mM E4P, 30 °C., ▲ apparentes Molekulargewicht aus der UZ-Messung. Zu beachten ist, dass die rechts gezeigten Aktivitäten nicht bei Substratsättigung bestimmt sind.

Eine Anpassung nach einem Pentamer-Dekamer-Gleichgewicht war nicht möglich, so dass auch hier das Auftreten kleinerer Spezies mit anderer Aktivität nicht ausgeschlossen werden kann. Im Gegensatz zu diesem Experiment erhält man gleichbleibende Reaktionsgeschwindigkeiten, wenn TA bei verschiedenen Konzentrationen vorinkubiert und in den Messansatz auf die gleiche Konzentration verdünnt wird (Anhang, Abb. 7.2). Da die Initialgeschwindigkeiten ausgewertet wurden, sollte man davon ausgehen, dass die Gleichgewichtseinstellung der Oligomerisierung schnell und in der Totzeit der Messung abläuft (innerhalb von 5-10 s).

3.4 Detektion von Reaktionsintermediaten mittels Massenspektrometrie

Die Verwendung von Massenspektrometrie im enzymatischen Assay stellt eine gute Möglichkeit dar, Enzym-Substrat-Interaktionen ohne Modifikation eines der Reaktionspartner zu betrachten. Ein weiterer Vorteil ist, dass während der Reaktion auftretende, verschiedene Spezies simultan detektiert und zumindest relativ zueinander quantifiziert werden können. Mit der Entwicklung immer sanfterer Ionisierungsverfahren ist es mit ESI-MS möglich geworden, kovalente und sogar nichtkovalente Enzym-Substrat-Komplexe zu detektieren und verschiedene Spezies mit einem Massenunterschied von 1 Da zu unterscheiden (LIESENER UND KARST, 2005; SHIPOVSKOV UND REIMANN, 2007; GANEM *et al.*, 1991; LI *et al.*, 2003).

Die durchgeführten Experimente basierten auf der Annahme, dass alle im Reaktionszyklus von Transaldolase auftretenden Intermediate die gleiche Ionisationseffizienz haben wie das unmodifizierte Enzym, da der Anteil des Substrats am Gesamtkomplex viel kleiner ist als der des Enzyms.

Anhand des vorgeschlagenen Mechanismus konnten die zu erwartenden Molmassen für die Intermediate berechnet werden. Die erwarteten ungeladenen Molekülmassen sind in Tab. 3.2 dargestellt.

Tab. 3.2 Erwartete Molekülmassen für Transaldolase und auftretende Intermediate.

Protein	M (zentroid) (u)*	monoisotopische M (u)*
unmodifizierte Transaldolase (E)	24 464,20	24 449,14
als Carbinolamin gebundenes F6P (C6C)	24 722,22	24 707,16
als Schiffbase gebundenes F6P (C6I)	24 704,21	24 689,15
als Schiffbase gebundenes DHA (C3I)	24 536,22	24 521,16
als Schiffbase gebundenes S7P (C7I)	24 734,22	24 719,16
als Carbinolamin gebundenes S7P (C7C)	24 752,23	24 737,17

*Die Einheit u steht für *unified atomic mass*.

Zur besseren Verdeutlichung der relativen Lage zueinander ist in Abb. 3.11 das erwartete Massenspektrum skizziert, wobei die proportionalen Verhältnisse der Lage der Messsignale zueinander beachtet wurden.

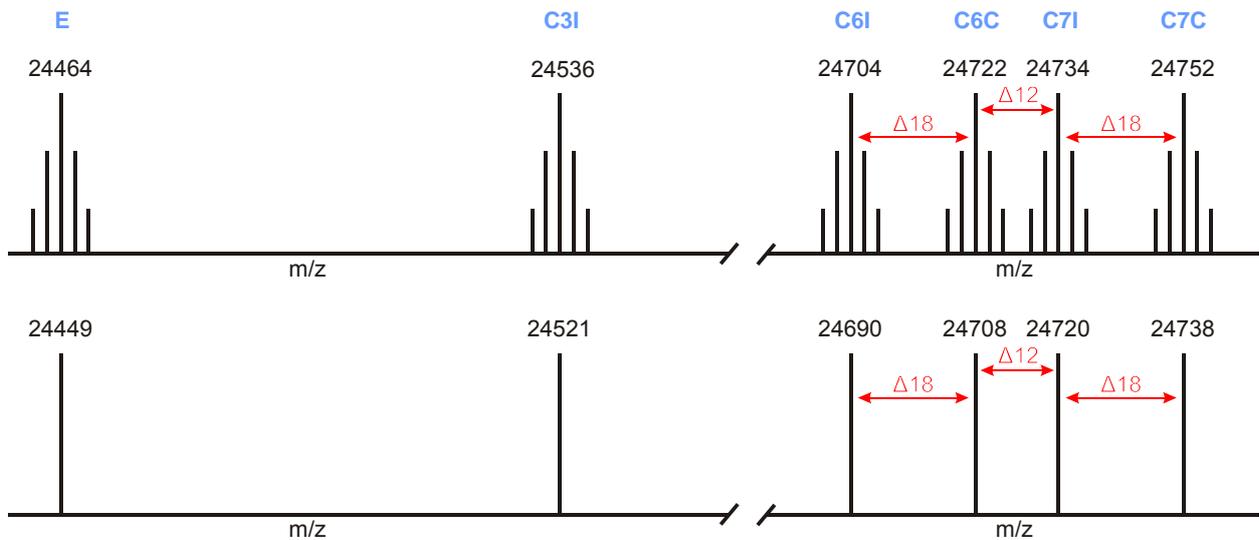


Abb. 3.11 Skizze zur relativen Lage der bei der Reaktion von *TacTA* durch Intermediatbildung erwarteten Messsignale zueinander. Die verwendeten Abkürzungen E, C3I, C6I, C6C, C7I und C7C entsprechen der Beschreibung in Tab. 3.2. Die Abstände der eingezeichneten Signale sind proportional zu den realen Abständen der Messsignale gezeichnet. Oben: erwartete Massen, Isotopenverteilung. Unten: erwartete monoisotopische Massen

3.4.1 Direkte Messung

Erst nach Ansäuern konnte Transaldolase im Ionenspray beobachtet werden. Der Hauptpeak von 24464,23 u ist begleitet von einem kleineren, der wegen des Massenunterschieds von +21 als Signal des Natriumaddukts identifiziert werden konnte.

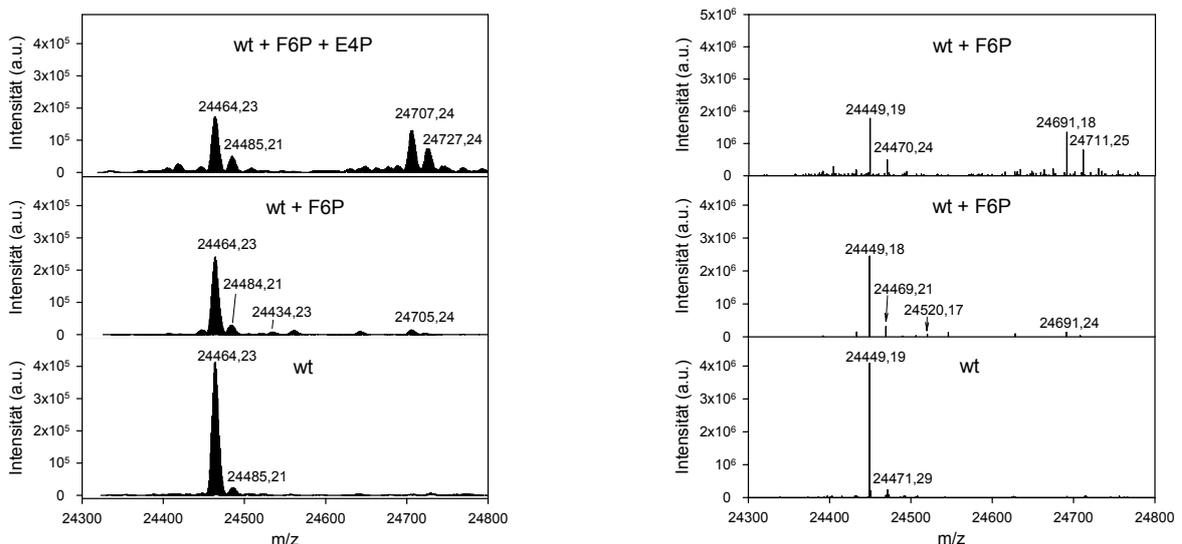


Abb. 3.12 Spektren der direkten Messung von *TacTA* nach *deconvolution*. *TacTA* 2,37 μ M. Unten: ohne Substrate, Mitte: mit Donorsubstrat F6P (1 mM), Oben: mit Donor- (1 mM) sowie Akzeptorsubstrat E4P (0,135 mM) bei 20 °C in 20 μ M Tris. Links ist die Verteilung der Einzelisotope und rechts sind die Peaks der monoisotopischen Massen dargestellt. Die Zugabe des Akzeptorsubstrats fördert die Bildung von C6I (24691,18 u).

Bei Zugabe des Donorsubstrats F6P erscheinen weitere Peaks, von denen der bei 24434,23 u der C3-Schiffbase und der bei 24705,24 u der C6-Schiffbase zugeordnet werden können. Der Ursprung der Intensitäten bei 24560,18 und 24642,29 u blieb ungeklärt. Ein kleiner Anteil mit der Molekülmasse von 24724,22 u könnte die C6-Carbinolamin-Spezies sein. Wenn beide Substrate in den Reaktionsansatz gegeben werden, ist der Anteil der C6-Schiffbase erhöht. Im gekoppelten enzymatischen Assay kann bei *TacTA* und anderen TAs der Substratumsatz erst bei Zugabe des Akzeptorzuckers gemessen werden (INOUE, 2006; SODERBERG UND ALVER, 2004). Hier zeigt sich, dass erst die Anwesenheit des Akzeptorsubstrats eine vermehrte Bildung des Donorsubstrat-Schiffbasen-Intermediats fördert. Wenn E4P im Ansatz vorhanden ist, findet man kein C3I mehr und C6I wird akkumuliert, so dass die Bindungsspaltung zwischen C3 und C4 des Donorsubstrats der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Reaktion sein muss. Die Umsatz fördernde Wirkung von E4P könnte man dadurch erklären, dass E4P einen kleineren K_m -Wert als das erste Produkt GAP hat und die C3-Einheit kompetitiv aus dem aktiven Zentrum verdrängt. Bezüglich des Verhältnisses der K_m -Werte für GAP und E4P findet man in der Literatur verschiedene Möglichkeiten: in *S. cerevisiae* $K_{m(E4P)} = 0,018$ mM; $K_{m(GAP)} = 0,22$ mM (TSOLAS UND HORECKER, 1972), in *E. coli* TAL B $K_{m(E4P)} = 0,09$ mM, $K_{m(GAP)} = 0,038$ mM (SPRENGER *et al.*, 1995). Der K_m für GAP in *TacTA* wurde nicht bestimmt. Für die Bildung von 1 mol S7P werden die gleichen Stoffmengen an F6P und E4P benötigt (je 1 mol). Da E4P 7,4x weniger konzentriert als F6P eingesetzt wurde und die Gleichgewichtskonstante der Reaktion nahe 1 ist, liegt das Gleichgewicht bei den hier eingesetzten Bedingungen auf Seite der C6I-Schiffbase. Eine Reaktion unter äquimolarem Einsatz der beiden Substrate wurde in Kapitel 3.4.2.2.4 untersucht.

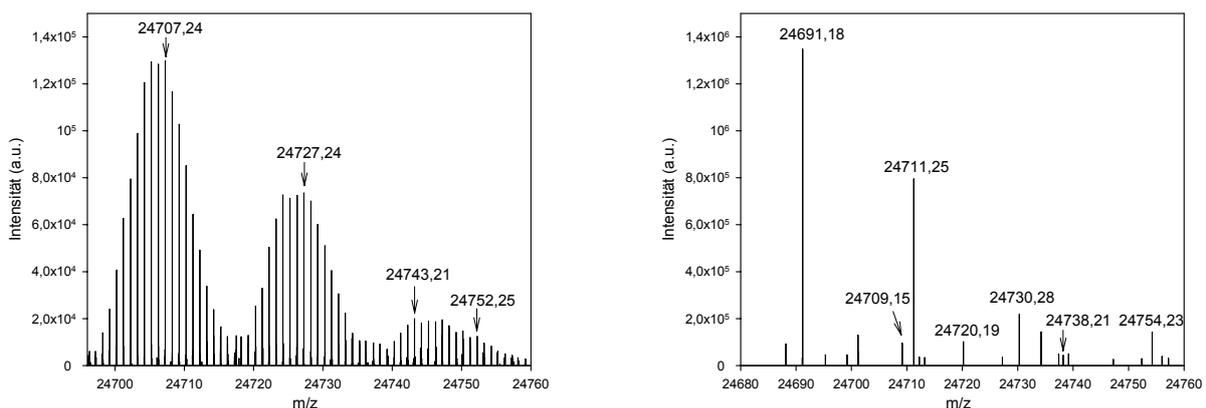


Abb. 3.13 Ausschnitt aus dem Spektrum von TA + F6P + E4P nach *deconvolution*.

Neben dem C6I-Schiffbasen-Peak findet man im Abstand von +20 Massen einen weiteren Peak. Es ist wahrscheinlicher, dass dieser das Natrium-Addukt der C6-Schiffbase ist als das C6-Carbinolamin, da seine monoisotopische Masse 24711,25 u beträgt und sich neben ihm ein kleinerer Peak findet,

dessen Größe der monoisotopischen Masse des C6-Carbinolamins näher kommt. Es lassen sich auch geringe Intensitäten weiterer Intermediate finden. Aufgrund des starken Signalrauschens ist dieser Befund aber nicht gesichert.

Insgesamt ist zu sehen, dass im verwendeten Messbereich die Orbitrap Ungenauigkeiten von 1-2 Masseneinheiten zeigt. Dies kann auf die automatische Peakbeschriftungszuordnung der Begleitsoftware zurückzuführen sein. In Abb. 3.13 kann man sehen, dass die Intensität bei Massenzahl 24724,23 ähnlich groß ist wie bei 24727,24. Das Programm setzt die Beschriftung immer automatisch auf den höchsten Ausschlags eines Peaks. Genauso ist der Massenunterschied der Na⁺-Addukte der unmodifizierten Transaldolase zu erklären, der bei der Messung mit nur F6P lediglich einen Unterschied von +20 anstatt der erwarteten +21 zeigt. In weiteren Messungen zeigte sich, dass die monoisotopischen Massen eine größere Zuverlässigkeit bieten.

3.4.2 Diskontinuierliche Messung

Um die Zusammensetzung der Reaktion zu einem bestimmten Zeitpunkt „einzufrieren“, war es notwendig, die Reaktion zu stoppen, ohne dass das Protein aggregierte oder seine kovalent gebundenen Intermediate zerfielen. Diese Vorteile bot die Verwendung von Ameisensäure. Mit der Zugabe von 85 %iger Ameisensäure wird der pH-Wert der Lösung schlagartig auf unter pH 2 gesenkt, wodurch die Reaktion sofort abgestoppt wird. Nach Entfernen der Salze konnten die Proteinlösungen mit der Orbitrap gemessen werden. Allerdings kam es während dieses Vorgehens vereinzelt zu Formylierungen der Transaldolase.

3.4.2.1 Proteinstabilität unter den Messbedingungen

Transaldolase ionisiert nur, wenn die Lösung angesäuert wird. Mit einer absoluten Intensität der monoisotopischen Masse von 35 825 für den Peak des unmodifizierten Enzyms (24465,28 u) lassen sich aber signifikant weniger Ionen finden als bei starkem Ansäuern mit konzentrierter HCOOH (Abb. 3.14, c und d mit absoluten Intensitäten von 4 197 902 bzw. 3 914 495) oder einem Gemisch aus Acetonitril/1 % HCOOH (70/30) (absolute Intensität = 12 778 496, Abb. 3.14, b).

Als erstes musste geklärt werden, ob und wie lange TacTA und die auftretenden Intermediate unter den sauren Messbedingungen stabil sind. Die Reaktion wurde durch Zugabe des Ansatzvolumens an 85 %iger HCOOH gestoppt. Dabei konnte keine Aggregation in der Probe beobachtet werden. Der Vergleich der Spektren c) und d) in Abb. 3.14 zeigt, dass Transaldolase in 42,5 %iger Ameisensäure

innerhalb von 10 min stabil ist. Das ist die maximal benötigte Zeit für das Abstoppen der Reaktion, Probenaufarbeitung und Messung.

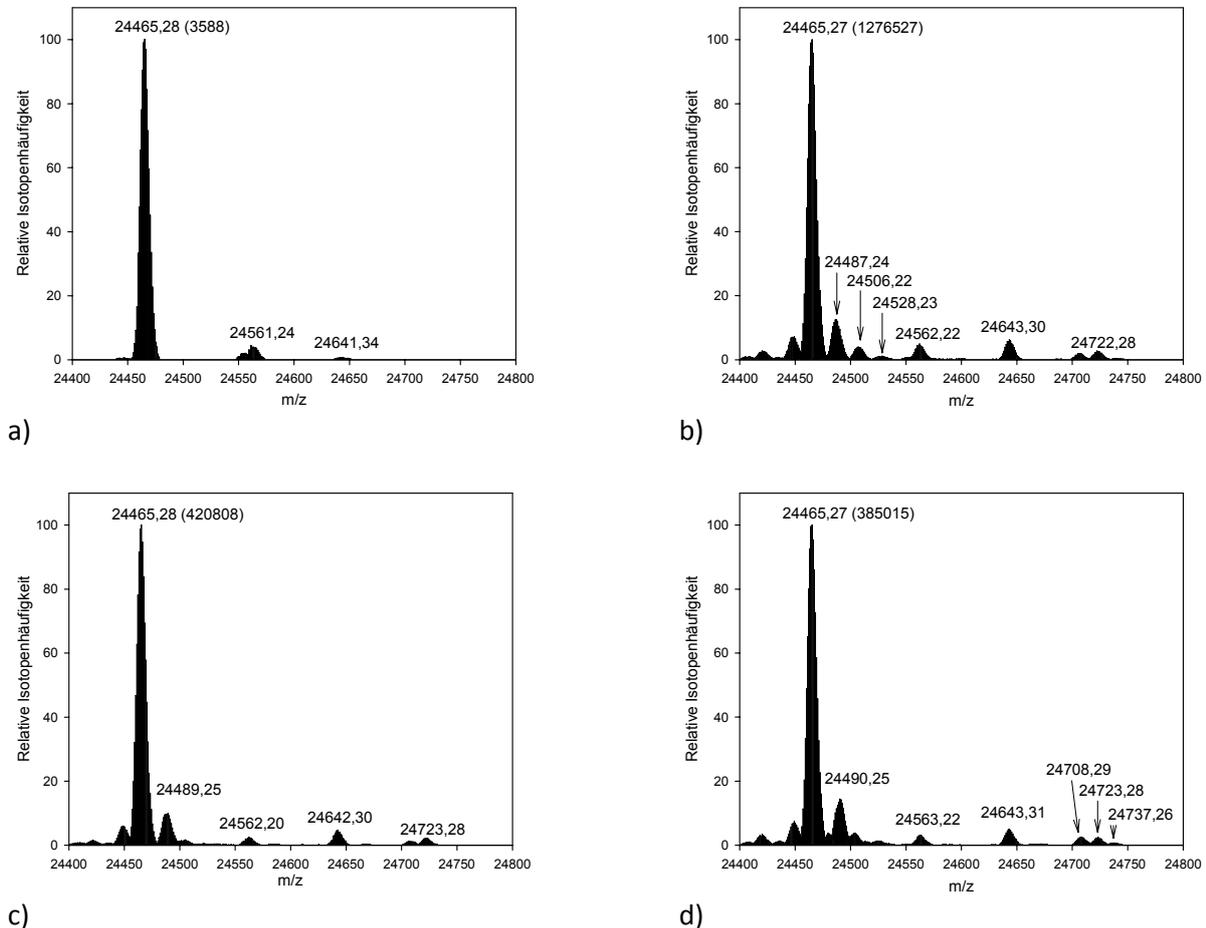


Abb. 3.14 Proteinstabilität von *TacTA* unter den Messbedingungen, Teil 1. In Klammern ist die absolute Intensität des größten Isotopenpeaks angegeben.

- a) TA 1 : 2 mit Wasser verdünnt, kurz vor der Messung mit 10 % (v/v) 1 % HCOOH angesäuert
- b) TA 1 : 2 mit Acetonitril/1 % HCOOH (70/30) verdünnt, 10 min inkubiert
- c) TA 1 : 2 mit 85 % HCOOH verdünnt, 10 min inkubiert
- d) dieselbe Probe wie c), 25 min inkubiert

In einem weiteren Test wurde eine Probe, die wie in Kapitel 2.2.8.2.1 beschrieben vorbereitet wurde, über 12 min gemessen, wobei das Spektrum jeweils über 3 min gemittelt wurde. Die Intensitäten der Peaks von unmodifiziertem Enzym und C6I in den 4 erhaltenen Spektren sind in Tab. 3.3 zusammengefasst. In den ersten 3 – 4 min bleibt die Signalintensität etwa konstant und fällt dann während der weiteren Messung auf 85 % der Startintensität. Somit wurde für alle ermittelten Datenpunkte nur das Spektrum der ersten 3 min berücksichtigt und ausgewertet.

Tab. 3.3 Stabilität von unmodifizierter TacTA (E) und F6P-Schiffbase (C6I) in Acetonitril/1 % HCOOH (70/30). Dargestellt sind die absoluten Intensitäten von E und C6I einer 12minütigen Messung, bei der jeweils die Intensitäten über 3 min gemittelt wurden. Die Spalte „min“ zeigt an, welches Zeitfenster (in Minuten) gemittelt wurde.

min	E	C6I
0 – 3	$1,1506 \cdot 10^7$	$1,1969 \cdot 10^7$
4 – 6	$1,2946 \cdot 10^7$	$1,2574 \cdot 10^7$
7 – 9	$1,1029 \cdot 10^7$	$1,0812 \cdot 10^7$
10 – 12	$9,9384 \cdot 10^6$	$9,8547 \cdot 10^6$

In Abb. 3.15 ist die Stabilität des C3-Intermediats bei langem Aufbewahren der Probe gezeigt. Bei sofortiger Messung findet man einen C3-Anteil an allen TA-Spezies von 5,54 %. Weitere Intermediate treten nicht über der Detektionsgrenze auf, bzw. lassen sich nicht eindeutig zuordnen. Nach drei Tagen ist die Intensität des Peaks der freien TA etwa gleich und macht den Hauptanteil aus, während sich C3 nicht mehr detektieren lässt.

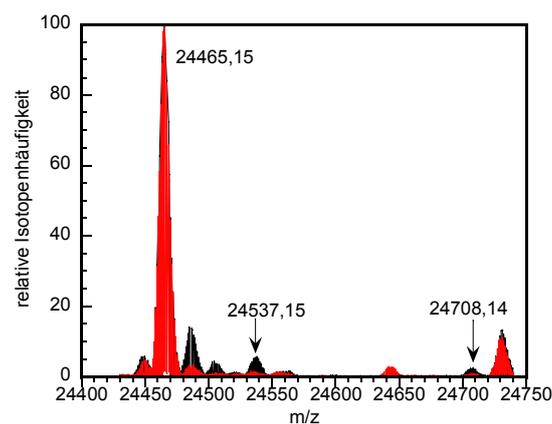


Abb. 3.15 Proteinstabilität von TacTA unter den Messbedingungen, Teil 2.

Schwarz: TA nach 5 min Reaktion in 15 mM F6P, 40 U/ml GDH, 400 U/ml TPI, 0,22 mM NADH, 20 mM GlyGly, Zip-Tip-Aufarbeitung, Rot: gleiche Probe wie a, nach 3 Tagen. Während unmodifizierte TA in Acetonitril/1 % HCOOH (70/30) über 3 Tage stabil war, konnte das C3I-Intermediat über den langen Zeitraum nicht mehr detektiert werden.

3.4.2.2 Wildtyp-Transaldolase und Varianten

Durch Abstoppen der Reaktion konnte die Intermediatverteilung zu bestimmten Zeiten analysiert werden. In Abb. 3.16 sind die Ergebnisse der massenspektrometrischen Messungen mit Säurequench für den Wildtyp und die Varianten nach Reaktion mit F6P und E4P dargestellt.

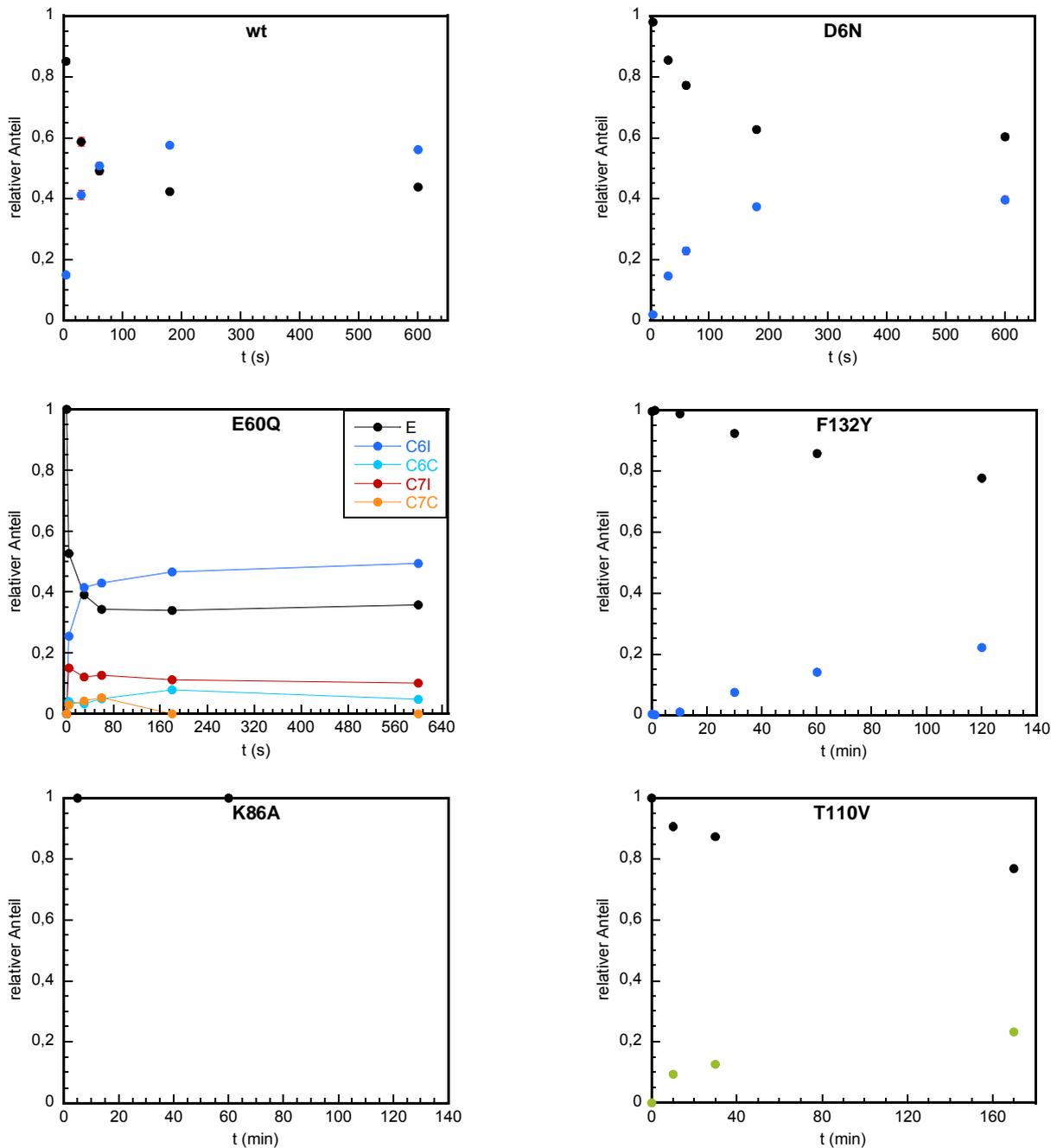


Abb. 3.16 Intermediatbildungskurven von TA und TA-Varianten.

Schwarz: freies Enzym, Blau: TA-C6-Immonium-Komplex, Hellblau: TA-C6-Carbinolamin-Komplex, Rot: TA-C7-Immonium-Komplex, Orange: TA-C7-Carbinolamin-Komplex, Grün: TA-C3-Immonium-Komplex.

Wie in den Röntgenkristallstrukturen von TA findet man beim Wt ausschließlich die Schiffbasen-Spezies der während der Reaktion auftretenden Intermediate. Das Carbinolamin scheint während des Katalysezyklus nur kurzlebig und die C-C-Bindungsspaltung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Reaktion zu sein. Wenn F6P und E4P bei Substratsättigung zugegeben werden, stellt sich

beim Wt das Gleichgewicht bei etwa 55 % C6I und 45 % freiem Enzym ein. Bei D6N und F132Y kommen ebenfalls nur diese beiden Spezies vor, wenn auch bei D6N nur bis zu 40 % der Schiffbase vorliegen und bei F132Y diese nach 2 h nur 20 % erreicht. Weiterhin zeigt letztere Variante eine *lag*-Phase. Die *lag*-Phase und die stark verlangsamte Reaktion von F132Y lassen auf eine gestörte Substratbindung schließen. Verständlich wird dieser Effekt, wenn man bedenkt, dass sich Phe132 an einer Seite des Substratkanals befindet. Die OH-Gruppe des Tyrosins ragt weiter in den Substratkanal hinein und schafft eine andere Polarität, so dass das Eindringen des Substrats in das aktive Zentrum gehindert werden kann.

Im Vergleich mit dem Wt zeigt die Variante D6N nicht nur im Gleichgewicht einen niedrigeren Anteil an C6I, sondern auch eine langsamere Bildung des Intermediats. So findet sich beim Wt nach 4 s Reaktionszeit bereits 15 % C6I, während bei D6N zu diesem Zeitpunkt erst 2 % C6I gebildet wurden. Folglich muss auch in dieser Variante einer der Schritte bis zur Ausbildung des Schiffbasen-Intermediats gestört sein.

In Variante E60Q findet man ähnliche Verhältnisse von freiem Enzym (35 %) und C6-Immonium-Komplex (50 %) wie im Wt. Unter allen untersuchten Varianten und Wt ist E60Q die einzige, bei der man mit den verwendeten Bedingungen auch den C7I-Schiffbasen-Komplex und Carbinolamin-Spezies von C6 und C7 findet. Abb. 3.17 zeigt den entsprechenden Ausschnitt aus dem Spektrum. Das Auftreten der Carbinolamine zeigt die bedeutende Rolle von Glu60 bei der Schiffbasen-Bildung. Erst durch Protonierung der C2-OH-Gruppe im Carbinolamin kann diese als Wasser abgespalten werden und sich eine Schiffbase zwischen C2 des Donorsubstrats und N ζ -Atom der Lysinseitenkette ausbilden. Diese Säurekatalyse kann von Glu60 übernommen werden. E60Q zeigt schon nach kürzerer Zeit als der Wt den hohen Anteil von C6I. Diese vermehrte Akkumulation könnte auf Probleme bei der Spaltung der C3-C4-Bindung hinweisen. Eine Akkumulation von C7-Spezies erklärt sich dadurch, dass die zur Substratfreisetzung führenden Schritte, welche die Umkehrreaktionen der Substratbindung und Schiffbasen-Bildung sind, im gleichen Maß behindert sind.

Bei Variante T110V tritt nur das C3-Schiffbasen-Intermediat auf, welches nach 2 h 50 min einen Anteil von 20 % zeigt. Hier scheint die Bindung des Akzeptorzuckers oder die C-C-Bindungsbildung gestört zu sein. Wie später im Kinetikteil (Kapitel 3.6.1) gezeigt, hat T110V keinen erhöhten K_m -Wert für die Bindung des Akzeptorsubstrats E4P, so dass die erste Interpretationsmöglichkeit entfällt. Ein Beitrag von Thr110 bei der Bindungsspaltung und -knüpfung ist über die Rolle bei der Koordination des katalytisch aktiven Wassermoleküls denkbar. In der Kristallstruktur von T110V ist das Wassermolekül verschoben und damit nicht mehr perfekt für die Spaltung und Knüpfung der C3-C4-Bindung positioniert (Kapitel 3.5.8.2). Da innerhalb der untersuchten Zeitspanne nur ein Anteil von

20 % des C3-Intermediats gebildet wird und T110V keine Aldolaseaktivität zeigt, kann man davon ausgehen, dass auch die Bildung der ersten Intermediate C6C und C6I verlangsamt ist, wofür auch ein erhöhter K_m -Wert der Variante für das Donorsubstrat spricht.

Wie erwartet zeigt die Variante K86A, bei der das Schiffbasen bildende Lys gegen Alanin ausgetauscht wurde, keine Bildung von Komplexen.

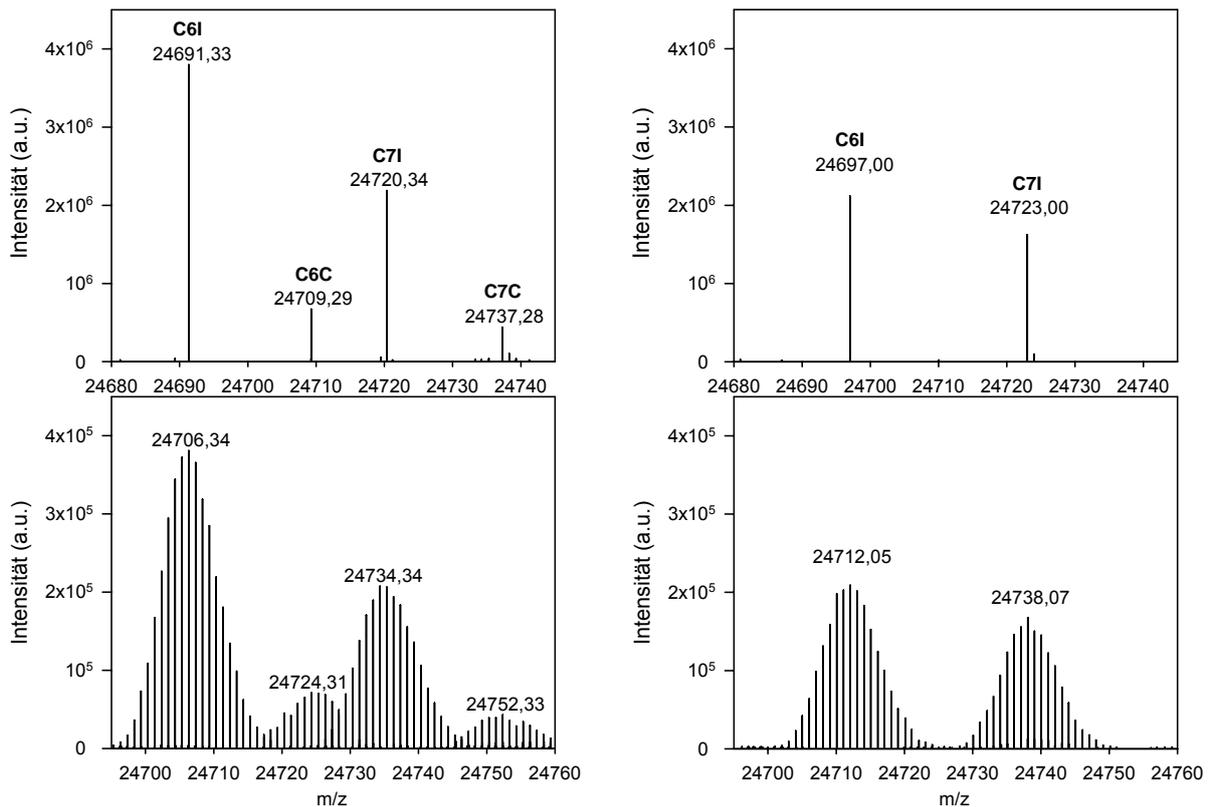


Abb. 3.17 Ausschnitt aus dem Massenspektrum der *TacTA*-Variante E60Q.

Der obere Teil zeigt die monoisotopischen Massenpeaks, der untere Teil die Verteilung der Einzelisotopenpeaks. Der Peak größter Intensität trägt die Kennzeichnung mit der Molekülmasse. Links: Reaktion mit D-F6P und D-E4P. Rechts: Verschiebung der Peaks um 6 bzw. 3 Masseneinheiten durch Reaktion mit D-[UL-¹³C₆]-F6P und D-E4P.

Ein Nachteil dieser Methode ist, dass sie in dieser Form nicht quantifizierbar ist. Die auftretenden Intermediate kann man nicht absolut, sondern nur in Relation zueinander auswerten. Somit wird z.B. bei E60Q automatisch der Anteil an E und C6I kleiner, wenn auch noch C7I gebildet wird. Eine Lösung dieses Problems wäre der Einsatz eines internen Standards, der vor der Messung zugesetzt wird, z.B. in Form der inaktiven Variante K86A.

3.4.2.2.1 Eindeutige Identifizierung von Intermediaten mittels D-[UL-¹³C₆]-F6P

Um auftretende kovalente Intermediate eindeutig zu identifizieren, wurde D-[UL-¹³C₆]-F6P als Donorsubstrat und E4P als Akzeptor eingesetzt. Für alle Varianten, bei denen das C6I-Intermediat auftrat, konnte auch dessen Verschiebung um 6 Masseneinheiten im Vergleich zum unmarkierten Intermediat nachgewiesen werden. Für die Variante E60Q war es auch möglich, den Peak des C7I-Intermediats über dessen Massenverschiebung von 3 Einheiten eindeutig zu identifizieren. Leider wurde dieser Test an den letzten beiden Präparationen durchgeführt, deren Spektren allgemein schlechtere Intensitäten aufwiesen. Bei Einsatz von D-[UL-¹³C₆]-F6P scheint außerdem ein Isotopieeffekt aufzutreten, so dass im gleichen Zeitintervall geringere Mengen an Intermediat gebildet werden als bei Einsatz von F6P. Eine Verschiebung der Massen der Carbinolamin-Spezies ließ sich somit nicht genau zeigen. Ein Ausschnitt aus dem Spektrum ist in Abb. 3.17 im Vergleich zur Messung ohne markierte F6P dargestellt.

3.4.2.2.2 Bildung des TA-Dihydroxyaceton-Intermediats

Nach 2 und 5 min Reaktion von *TacTA* in einem Ansatz mit den Hilfsenzymen GDH-TPI, NADH und dem Donorsubstrat F6P wurden 3,9 und 5,54 % C3I erhalten, während keine weiteren Intermediate auftraten. Die Reaktion wurde nicht bis zur maximalen Akkumulation von C3I verfolgt und diente mehr dem Nachweis, dass C3I unter den Messbedingungen stabil ist und detektiert werden kann. Die geringen Populationen an C3I in einem Assay, in dem dessen Bildung durch Überschuss von Hilfsenzymen erzwungen wird und der Fakt, dass im generellen Ansatz C3I nicht beobachtbar ist, deuten darauf hin, dass dieses Intermediat nur transient populierte wird oder der Erhalt energetisch nicht begünstigt ist. Auch in den Röntgenkristallstrukturen konnte beim Wildtyp kein C3I-Intermediat beobachtet werden und die Kinetik unter *pre-steady-state*-Bedingungen weist darauf hin, dass C3I anfällig für Hydrolyse sein könnte, was zu einer geringen Nebenaktivität des Enzyms als Aldolase führt.

3.4.2.2.3 Messung mit dem Donorsubstrat S7P

Bei Zugabe von 15 mM S7P ohne Akzeptorsubstrat bildet sich innerhalb von 5 min ein Anteil von 59 % C7-Schiffbase (C7I). Somit findet sich dieselbe Verteilung wie bei dem Einsatz von F6P als Edukt, dass nach 3 min zu einer Akkumulation von 60 % C6I-Intermediat, dem ungespaltenen Donor-Schiffbasen-Intermediat, führt. Keine weiteren Intermediate sind identifizierbar. Die Intermediatverteilung nach verschiedenen Zeitintervallen wurde nicht untersucht.

3.4.2.2.4 Reaktion im Gleichgewicht

Bei äquimolarer Zugabe von F6P und E4P findet man im Gleichgewicht nach 2 h 27 % als C7I-Intermediat vorliegend, der Anteil von C6I beträgt 1,6 % und 71,4 % bleiben freies Enzym. Damit ist gezeigt, dass die Lage des Gleichgewichts auf der Seite von S7P liegt. Das ist in Einklang mit den Ergebnissen von HORECKER UND SMYRNIOTIS, 1955, die für TA aus *Saccharomyces cerevisiae* die Lage des Gleichgewichts auf Seiten von S7P bestimmten. In ihrer Untersuchung ist das Gleichgewicht mit $K = (c_{F6P} \cdot c_{E4P}) / (c_{S7P} \cdot c_{GAP}) = 0,82$ (25 °C, pH 7,6) nur leicht auf die Seite von S7P und GAP verschoben. Die Messung wurde allerdings in Anwesenheit des Hilfsenzym TPI durchgeführt. Mit der Annahme $GAP/DHAP = 0,04$ nach MEYERHOF, 1935 wurde die Entstehung von DHAP heraus gerechnet. In der Arbeit von VENKATARAMAN UND RACKER, 1961 wurde die Gleichgewichtskonstante ohne die Beeinflussung der Reaktion durch Hilfsenzyme mit $K = 0,95$ (37°C, pH 7,4) bestimmt. Dahingegen bestimmten CASAZZA UND VEECH, 1986 eine Gleichgewichtskonstante von $K = 2,7$ (38 °C, pH 7,0, Ratte). Diese Gleichgewichtsbestimmungen beziehen sich allerdings auf die in Lösung vorliegenden Edukte und Produkte, während die massenspektrometrische Analyse die Gleichgewichtsverteilung auf dem Enzym betrachtet.

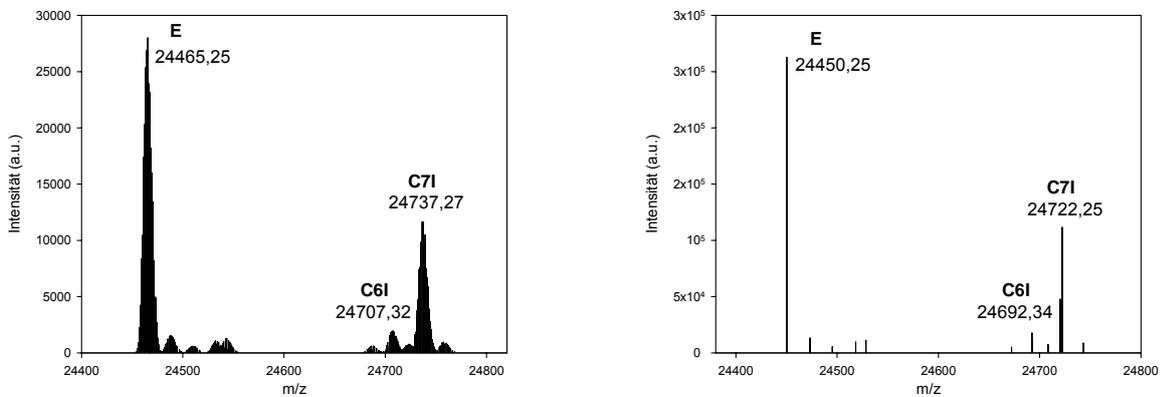


Abb. 3.18 Einstellung des Gleichgewichts der kovalenten Intermediate bei *TactA* nach äquimolarer Zugabe von F6P und E4P. Links ist die Verteilung der einzelnen Isotopenpeaks und rechts sind die monoisotopischen Massenpeaks dargestellt. Reaktion mit 245 µM TA, 2 mM F6P, 2 mM E4P, 20 mM GlyGly, pH 7,5, 20 °C.

3.5 Röntgenkristallstrukturanalyse

Ziel der kristallographischen Arbeiten war die Lösung der Röntgenkristallstruktur der *TacTA* im Grundzustand und im Komplex mit Reaktionsintermediaten. Zum Zeitpunkt der Untersuchungen war nur eine TA-Struktur der mit NaBH_4 reduzierten C3-Schiffbase bekannt (PDB 1UCW, JIA *et al.*, 1997). Eine zweite Struktur mit nicht-natürlichem kovalenten Addukt war die FSA aus der Transaldolasefamilie mit einem als Carbinolamin gebundenem Glycerinaldehyd (PDB 1L6W, THORELL *et al.*, 2002). Somit lag besonderes Interesse in der Aufklärung von Strukturen physiologisch relevanter Intermediate.

3.5.1 Kristallisation

TacTA-Kristalle hatten vielfältige Formen, wiesen aber nur 2 verschiedene Raumgruppen auf. In Abb. 3.19 sind einige Beispielkristalle gezeigt. Kristalle mit der Raumgruppe $P2_1$ enthielten ein Homodekamer in ihrer asymmetrischen Einheit und zeigte Auflösungen von 2,5 – 4 Å, während sich in Kristallen der Raumgruppe $C222_1$ in der asymmetrischen Einheit ein Homopentamer fand, welches höhere Auflösungen von 1,6 – 2,5 Å erreichte.

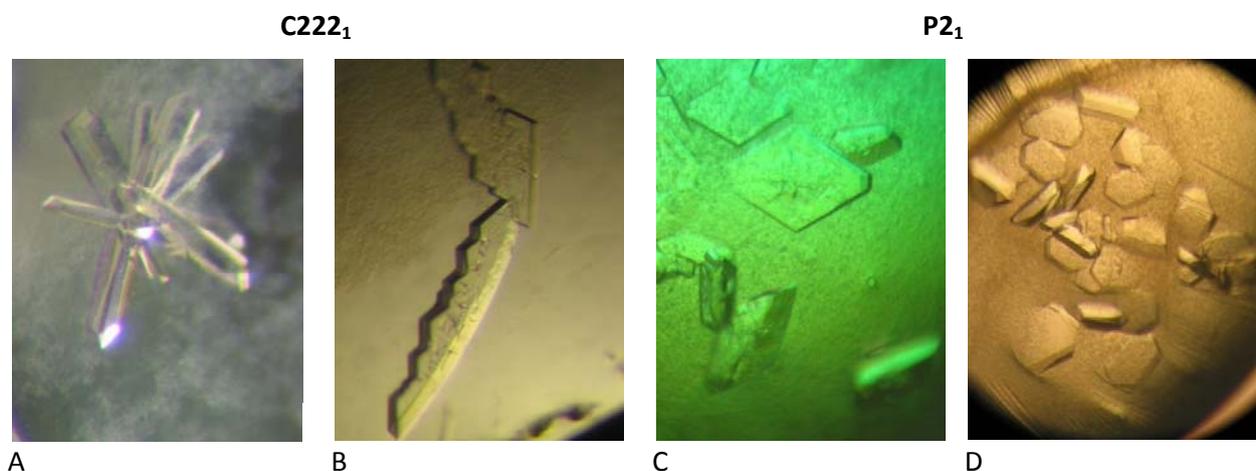


Abb. 3.19 Verschiedene Formen von *TacTA*-Kristallen. Kristalle wie in A und B zeigten die Raumgruppe $C222_1$, während C und D Kristalle der Raumgruppe $P2_1$ sind.

Die Anfertigung der Kristallisationsansätze bei einer Raumtemperatur von 25 – 30 °C förderte die Bildung von Kristallen der Raumgruppe $C222_1$. Für gute Ergebnisse mussten die Kristallisationsansätze aber anschließend unbedingt bei 18 °C gelagert werden. Durch *macroseeding* mit Kristallen der gewünschten Raumgruppe konnte diese ebenfalls gefördert werden. Die Kristalle erschienen bei 18 °C nach 4 – 6 Tagen und wuchsen bis zu einer Größe von 0,4 – 0,8 mm. Bei *macroseeding* zeigten

sich kleine Kristalle bereits nach einem Tag. Abb. 3.20 zeigt eine Übersicht der für die Kokristallisation oder *soaking* verwendeten Zuckerphosphate.

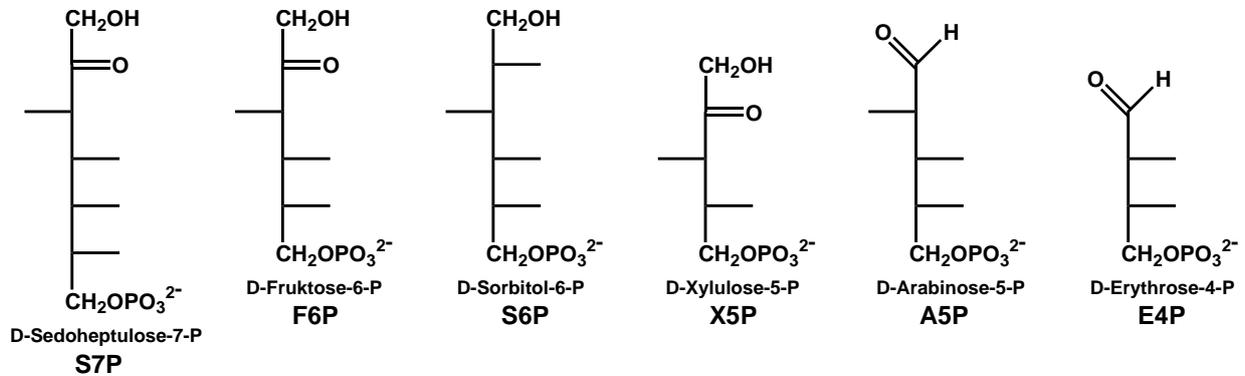


Abb. 3.20 Zuckerphosphate, die für die Kristallisation mit TA eingesetzt wurden. S7P, F6P und E4P sind natürliche Substrate. S6P, X5P und A5P kompetitive Inhibitoren für TA.

Die Anordnung in der Übersicht ist so gewählt, dass, außer für S7P, die Phosphatgruppen auf einer Höhe liegen und die Konfigurationen der Kohlenstoffatome von den Phosphatgruppen aus gesehen gut vergleichbar sind.

3.5.2 Quartärstruktur der Transaldolase aus *Thermoplasma acidophilum*

Im kristallisierten Zustand bei Proteinkonzentrationen im Tropfen von 8 mg/ml bildete *TacTA* ein Homodekamer aus 2 pentameren Ringen (Abb. 3.21). Das Pentamer der Raumgruppe C222₁ konnte durch Symmetrieoperationen zu einem Dekamer ergänzt werden, das sich nicht von dem in Raumgruppe P2₁ unterschied und eine Anordnung der Untereinheiten nach Punktgruppensymmetrie 52 zeigt. Die Struktur der *TacTA* zeigt starke Ähnlichkeit mit den Transaldolasen aus *Thermus thermophilus* (PDB 1WX0), *Bacillus subtilis* (INOUE, 2006), *Thermotoga maritima* (PDB 1VPX) und der homologen FSA aus *E. coli* (PDB 1L6W).

Der Innendurchmesser eines Pentamers beträgt 30 Å und es hat einen Gesamtdurchmesser von etwa 105 Å. Ein Monomer hat eine Oberfläche von durchschnittlich 8534 Å². 30 % dieser Gesamtfläche ist Kontaktfläche zu den benachbarten Untereinheiten im Dekamer, wobei der Anteil an Kontaktfläche für die Dekamerbildung 745 Å² beträgt. Die beiden pentameren Ringe sind um etwa 18° senkrecht zur fünfzähligen Achse gedreht aufeinander gepasst, so dass der Zugang zum aktiven Zentrum jedes Monomers innen zwischen den Pentameren liegt. Damit unterscheidet sich die Struktur von *TacTA* von der Kristallstruktur der homodekameren FBPA von *Thermoproteus tenax* (PDB 1W8S), bei der die beiden pentameren Ringe deckungsgleich aufeinander sitzen und die Substratkanäle nach außen zeigen.

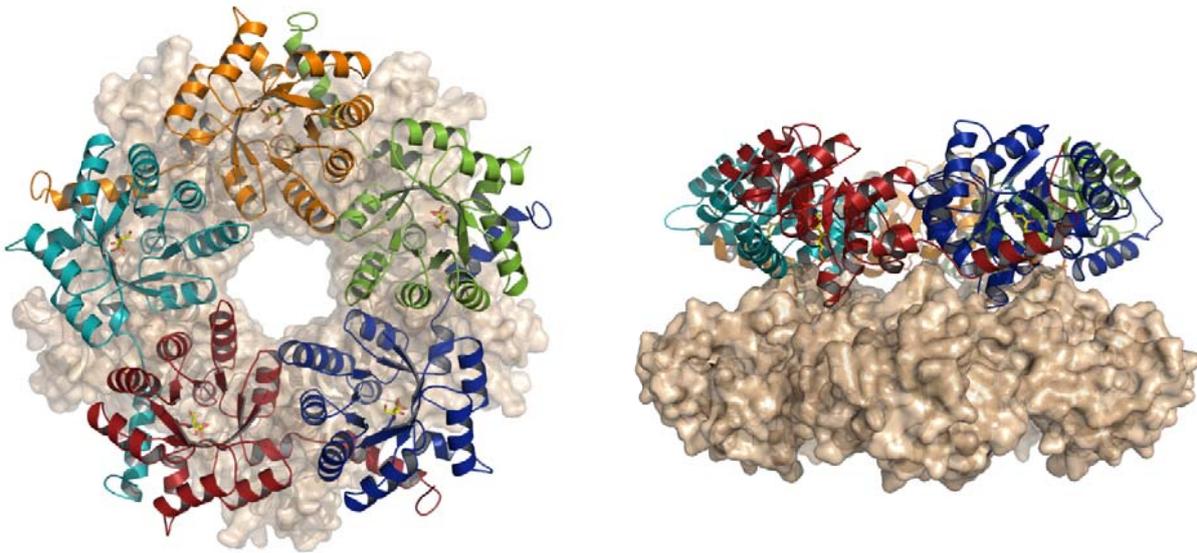


Abb. 3.21 Kristallstruktur eines Dekamers von *TacTA* als Aufsicht (links) und Seitenansicht (rechts). Ein Pentamer in Oberflächendarstellung, das zweite Pentamer als Cartoonzeichnung, als gelbes Stabmodell die S7P-Schiffbase. 1,65 Å.

Durch die Neigung der Monomere in *TacTA* um 27° relativ zur Ringebene, bleibt der Eingang zum aktiven Zentrum zwischen den Pentameren leicht zugänglich. Die Kontaktflächen im Dekamer werden durch die Bereiche von Aminosäure 114 – 116, 137 – 142, 149, 169 – 172, 175 – 176, 194 – 197, 200 und 203 hergestellt. Besonders wichtig sind dabei die Kontakte zwischen der Seitengruppe von Asn114 und dem O der Peptidbindung von Ile139 des Nachbarrings, sowie zwischen Glu141 mit dergleichen Aminosäureseitenkette des Nachbarpentamers.

Jedes Monomer formt ein achtgliedriges α/β -barrel mit dem Schiffbasen bildenden Lys86 auf $\beta 4$. Zwischen $\beta 2$ und $\alpha 3$ sowie $\beta 6$ und $\alpha 8$ befinden sich kleine Helices ($\alpha 2$ und $\alpha 7$), die wie auch die C-terminale Helix ($\alpha 11$) nicht an der Ausbildung der α/β -barrel-Kernstruktur beteiligt sind. Helix $\alpha 7$ fügt sich dicht in den Winkel zwischen $\alpha 10$ und $\alpha 11$ des zweiten Pentamers ein und scheint so Inter-ringkontakte herzustellen. Helix $\alpha 2$ und $\alpha 11$ sind zur Ausbildung von Kontakten zwischen den Monomeren innerhalb des Pentamers wichtig (Abb. 3.22). Wie bei FSA ragt $\alpha 11$ als *inter-subunit helix swapping* zum Nachbarmonomer herüber und bedeckt dabei zum Teil dessen aktives Zentrum. Im Sequenzvergleich (Abb. 3.1) wird deutlich, dass Helix $\alpha 11$ der *TacTA* dem C-terminalen Bereich $\alpha 14$ der *E. coli*-Struktur (PDB 1ONR) zugeordnet wird. Bis auf eine H-Brückenbindung zwischen Asp211 und Thr30 (auf $\alpha 2$, 2. Monomer) sind die Interaktionen der Helix mit der Nachbaruntereinheit eher hydrophober Natur. So gibt es hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Phe208 und Pro29 ($\alpha 2$) und *edge-to-face* π stacking (ANSLYN UND DOUGHERTY, 2005, S. 184) von Trp212 und Tyr42 (Beginn von $\alpha 3$). Alle 3 genannten Kontakte sind in der Transaldolasefamilie konserviert (THORELL *et al.*, 2002).

Die Pentamerbildung wird zusätzlich durch 3 Salzbrücken stabilisiert. So interagieren beide O-Atome der Seitengruppe von Asp23 mit dem Ne-Atom von Lys123 der Nachbaruntereinheit und Arg47 interagiert mit der freien Carboxylgruppe des Leu223 am C-Terminus. Die Ausbildung der Salzbrücke zwischen Asp23 und Lys123 ist bei *M. jannaschii* konserviert.

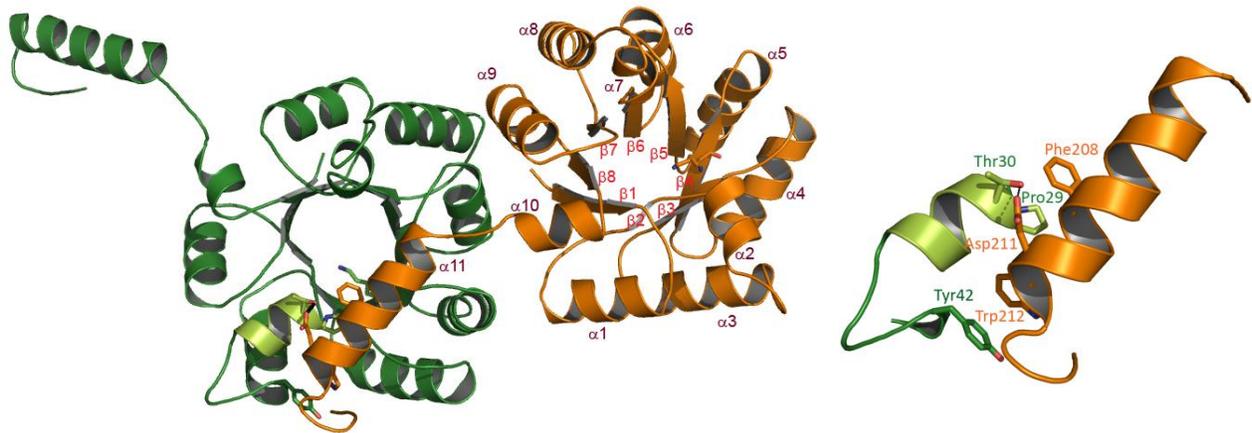


Abb. 3.22 Cartoon-Darstellung eines TacTA-Dimers. Links: *Inter-subunit helix swapping* der C-terminalen Helix $\alpha 11$ über das aktive Zentrum des benachbarten Monomers. Dabei interagiert $\alpha 11$ mit Helix $\alpha 2$ (hellgrün). Das Schiffbasen bildende Lysin86 ist als Stabmodell in der Mitte des α/β -barrels sichtbar. Rechts: Vergrößerung des Bereichs von $\alpha 2$ und $\alpha 11$. Die an der Wechselwirkung beteiligten Aminosäuren sind als Stabmodell dargestellt.

Die Außenbereiche des Pentamers sind beweglicher als die dicht gepackten inneren Ringregionen und haben höhere B-Faktoren. Strukturen ohne kovalentes Addukt, z.B. Wildtyp im Grundzustand und mit E4P, zeigen häufig einen ungeordneten C-Terminus (Abb. 3.23). In einigen Strukturen konnte deswegen der C-Terminus im Modell nicht vollständig erstellt werden.

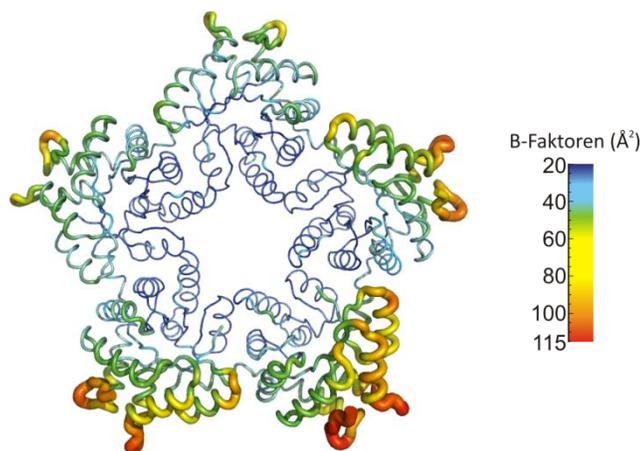


Abb. 3.23 Optische Darstellung der B-Faktoren eines TacTA-Pentamers. Die größte Flexibilität haben der C-Terminus und ein *loop* (aa36-41) an der Außenseite des Enzyms.

Zur Erklärung der Unterschiede in der Qualität der Elektronendichtekarten zeigt Tab. 3.4 beispielhaft eine Übersicht über die Kristallkontakte des Wt-Pentamers im Grundzustand. Zwischen den Pentameren des durch Symmetrioperationen erzeugten Dekamers werden 40 – 44 Kontakte ausgebildet. Für die Wt-Struktur im Grundzustand kommen pro Untereinheit noch ca. 30 Kontakte hinzu, die über Kristallwasser vermittelt werden. In der Auflistung der Kontakte ist zu sehen, dass Untereinheit C besonders viele Interaktionen mit symmetrieverwandten Molekülen eingeht (69). Im Gegensatz dazu verfügt Untereinheit A nur über 18 Kontakte. Das Pentamer ist im kristallisierten Zustand also asymmetrisch. Die Termini „offene“ und „geschlossene“ Konformation werden in Kapitel 3.5.9 erklärt. An Untereinheit D sieht man, dass die geschlossene Konformation weniger Kontakte mit symmetrieverwandten Molekülen eingeht, aber auch, dass hier genug Raum zur Ausbildung einer offenen Konformation besteht. Dies gilt für Untereinheit C nicht, da die geschlossene Konformation durch die umliegenden Kontakte im Kristall fixiert ist. Über die Kristallkontakte lässt sich erklären, weshalb einige Untereinheiten häufiger zwei alternative Konformationen aufweisen als andere und ringäußere Bereiche der Untereinheiten A, D und E höhere B-Faktoren und schlechter definierte Dichte als in Untereinheit C zeigen.

Tab. 3.4 Übersicht über direkte Kontakte des Pentamers (Wt-Grundzustand) zu symmetrieverwandten Molekülen im Abstand von 3,8 Å. „oK“ = offene Konformation, „gK“ = geschlossene Konformation

Untereinheit	Kontakte zu symmetrieverwandten Molekülen, die nicht an der Dekamerbildung beteiligt sind			Kontakte zum 2. Pentamer (-X, Y, -Z+1/2)
	Kontakte gesamt	davon gute Kontakte	zu Symmetrieobjekt	
A	18	5	X+1/2, -Y+1/2, -Z	40
B	30	12	X+1/2, -Y+1/2, -Z	44
	1	0	-X, -Y, Z+1/2	
C	61	28	X, -Y, -Z	41
	4	1	-X+1/2, Y+1/2, -Z+1/2	
	4	2	-X, -Y, Z+1/2	
D „oK“	33	11	X+1/2, -Y+1/2, -Z	43
	5	2	-X, -Y, Z+1/2	
D „gK“	19	8	X+1/2, -Y+1/2, -Z	43
	5	2	-X, -Y, Z+1/2	
E	16	6	X, -Y, -Z	43
	12	5	X+1/2, -Y+1/2, -Z	
	4	1	-X+1/2, Y+1/2, -Z+1/2	

3.5.3 Das aktive Zentrum

Der Substratkanal erstreckt sich von 2 Argininen (Arg135, Arg169) am Eingang schräg durch das β -barrel auf das Faltblatt β_4 zu, so dass sich das katalytisch aktive Lys86 an seinem Boden befindet. Im Grundzustand ist der geradlinige Kanal mit einem Netzwerk aus Wassermolekülen gefüllt. Diese scheinen eine Funktion als Platzhalter zu haben. An ihrer Stelle findet man in Strukturen, in denen Substrat gebunden ist, die OH-Gruppen des gebundenen Zuckers. Nur für die C4-OH-Gruppe in Schiffbasen-Strukturen gibt es kein äquivalentes Wassermolekül. Nach derzeit postuliertem Mechanismus ist an der Reaktion der Transaldolase ein Wassermolekül beteiligt, indem es H^+ -Transfer vermittelt (SAMLAND UND SPRENGER, 2009). Man findet dieses Wasser an der gleichen Stelle wie in *E. coli* TA (1UCW) und FSA (1L6W) in H-Brücken-Abstand zu Thr110 und Glu60. Seine Position ist nach Substratbindung unverändert.

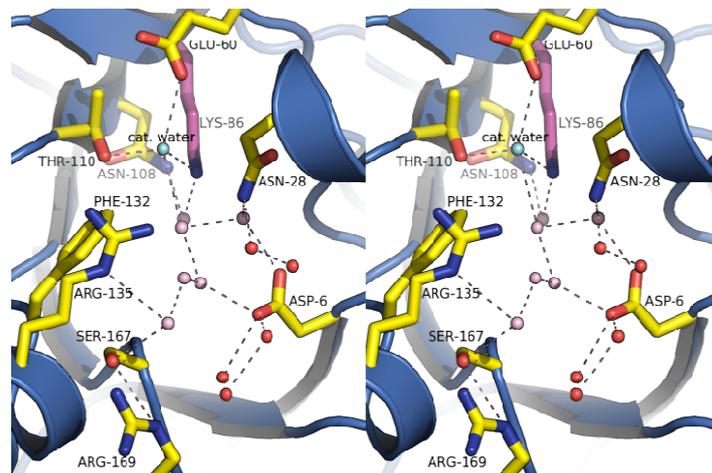


Abb. 3.24 Stereoansicht des aktiven Zentrums von TacTA.

Die Blickrichtung ist von außen in den Substratkanal, an dessen innerem Ende sich das Schiffbasen bildende Lysin (Pink) befindet. Im Substratkanal erstreckt sich ein Netzwerk aus Wassermolekülen. Das katalytisch aktive Wasser („cat. water“, Cyan) ist zwischen Thr110 und Glu60 koordiniert. Rosa sind Wassermoleküle dargestellt, deren Plätze von OH-Gruppen des Donorsubstrats eingenommen werden. In Rot sind die restlichen Wassermoleküle gekennzeichnet.

3.5.4 Schiffbasen mit Donorsubstraten in Wt und Variante E60A

Für den Wt und die Variante E60A konnten durch Kokristallisation mit den Donorsubstraten F6P und S7P Enzym-Substrat-Komplexe kristallisiert werden. Es fand sich gut definierte, zusätzliche positive Elektronendichte für die entsprechenden kovalenten Addukte an der Seitenkette von Lys86.

Generell ist es möglich, dass man Michaelis-Komplex, Carbinolamin- oder Schiffbase-Intermediat erhält. Die kurze Distanz zwischen C2 des Zuckers und Ne-Atom des Lysins von 1,27 – 1,29 Å spricht für die Ausbildung eines kovalenten Komplexes mit einer N-C-Doppelbindung (ALLEN *et al.*, 1987). In

allen gefundenen kovalenten Komplexen gab es keine Dichte, die auf die Anwesenheit der C2-OH-Gruppe eines Carbinolamins deuten würde. Die Elektronendichte um C2 ist nahezu planar und die Anordnung der Nachbaratome C1, C3 und Ne um C2 trigonal mit einem Winkel zwischen ihnen von $119,97^\circ$ (minimal $114,4^\circ$ – maximal $126,79^\circ$). C2 scheint also sp^2 -hybridisiert zu sein. Hybridisierungsgrad, Bindungswinkel und Bindungslänge lassen darauf schließen, dass es sich um Schiffbasen-Addukte nach der Eliminierung von Wasser handelt.

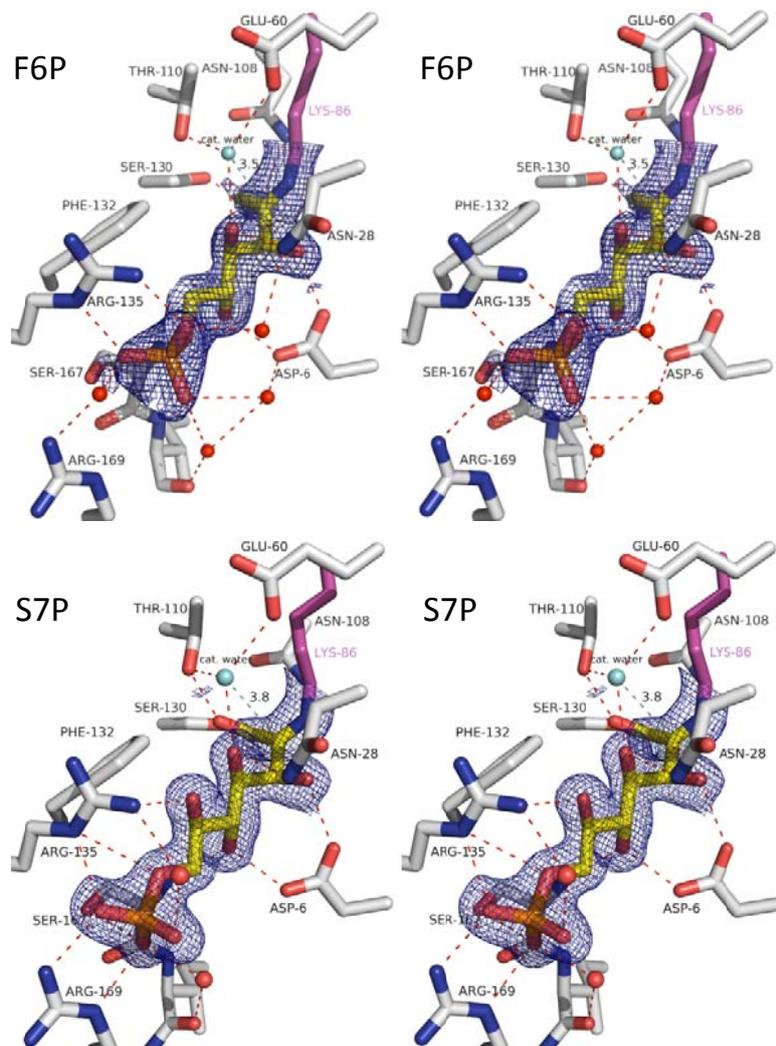


Abb. 3.25 Das aktive Zentrum mit als Schiffbase gebundenen Donorsubstraten bei *TacTA* als Stereoansicht. Gezeigt sind die Wt-Strukturen. Das Substrat ist gelb gefärbt und in die $2F_o - F_c$ simulated annealing omit map (Level 1,0 σ) gelegt. Das Schiffbasen bildende Lysin ist in Pink, das katalytische Wasser in Cyan dargestellt. Oben: F6P 1,8 Å, Unten: S7P 1,65 Å.

Abb. 3.25 zeigt die Schiffbasen-Addukte für den Wt. Die offenkettige Konformation der Donorzucker ist in E-Konfiguration gebunden und in jeder Untereinheit identisch ausgerichtet. Nur die C1-OH-Gruppe zeigt in den Untereinheiten verschiedene Konformationen. So bildet sie in der Wt-F6P-

Struktur H-Brücken entweder mit der Seitenkette von Thr110, Asn108 oder Ser130, wobei die Wechselwirkung mit den letzteren beiden überwiegend populiert ist (Wt: F6P-Schiffbase: 4 von 5 aktiven Zentren, S7P-Schiffbase: 3 von 5 aktiven Zentren; E60A: F6P-Schiffbase: alle aktiven Zentren, S7P-Schiffbase: 4 von 5 aktiven Zentren). Die durchschnittliche Okkupanz der C1-OH-Gruppe ist 0,91 (Wt) bzw. 0,74 (E60A). In Wt+S7P zeigt dieses Atom mit einer Okkupanz von 0,35 (Wt) und 0,23 (E60A) noch mehr Beweglichkeit und ist kaum definiert.

Das Zuckerrückgrat von F6P und S7P ist deckungsgleich, wodurch die Phosphatgruppe des längeren S7P um eine Atombindung weiter nach außen geschoben ist. Bei beiden Substraten wird die Phosphatgruppe zwischen den Seitenketten von Arg135, Arg169 und Ser167 gebunden. F6P ist in H-Brückenabstand zu den Seitenketten von Arg135 und Ser167. Wechselwirkungen mit Arg169 können aufgrund einer mittleren Entfernung von 3,75 Å nur elektrostatischer Art sein. Das längere S7P gelangt auch zu Arg169 in H-Brückenabstand. Zwischen den OH-Gruppen der Zuckerphosphate und den Aminosäuren des aktiven Zentrums gibt es weitere Wechselwirkungen.

Wie eine Klammer hält Asp6, das somit geladen vorliegen muss, C3- und C5-OH in Position. C3- und C4-OH können H-Brücken zu Asn28 ausbilden. Ein wichtiger Punkt ist, dass C4-OH in die zu Asp6 gegenüberliegende Richtung zeigt und eine H-Brücke zum katalytischen Wassermolekül bilden kann. Dieses wiederum ist in H-Brücken-Abstand mit dem zur Säure-Base-Katalyse fähigen Glu60. Um die Bindungsspaltung zwischen C3 und C4 einzuleiten, muss die Hydroxylgruppe am C4 deprotoniert werden. Das katalytisch aktive Wasser könnte die Abstraktion des Protons durch Glu60 vermitteln. C5-OH ist in H-Brücken-Abstand zum Stickstoff der Peptidbindung von Ser167. Auffällig ist, dass sich nur für die C6-OH-Gruppe von S7P keine Interaktionspartner finden lassen.

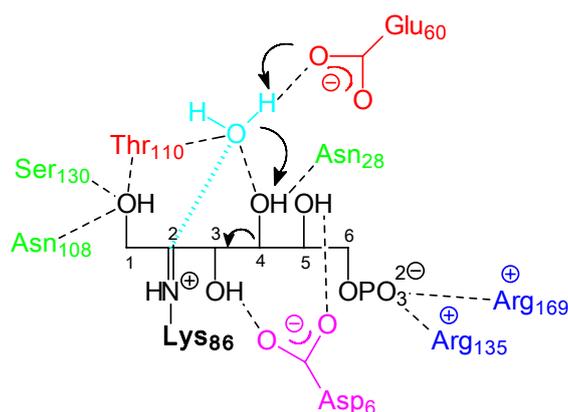


Abb. 3.26 Schematische Darstellung der Bindung des Donorsubstrats F6P im aktiven Zentrum von TacTA als Schiffbase. Die Wechselwirkungen mit den Resten des aktiven Zentrums und katalytischem Wasser sind mit gestrichelten Linien dargestellt. Die Pfeile geben den Protonentransfer wieder, der zur Spaltung der Bindung zwischen C3 und C4 des Zuckers führt.

Abb. 3.26 fasst die wichtigsten Wechselwirkungen des Donorsubstrats F6P im aktiven Zentrum zusammen. Dabei zeigen die Pfeile, wie die Bindungsspaltung bei dieser Substratorientierung eingeleitet werden kann. Die Intermediatstrukturen von Wt und E60A zeigen kaum Abweichungen voneinander.

3.5.4.1 Molekülspannungen als mögliche Triebkraft der Reaktion

Wie man in Abb. 3.25 (unten) sieht, sind die C4- und C6-OH-Gruppe des S7P über die Wechselwirkungen im aktiven Zentrum in einer Ebene fixiert. Beide in R-Konfiguration gebunden, zeigen sie zueinander parallel in eine Richtung, so dass die Sauerstoffatome in 2,55 Å Abstand voneinander liegen. Diese gestreckte Konformation ist für azyklisches S7P ohne die Wechselwirkungen im aktiven Zentrum unwahrscheinlich. Rotamere mit parallelen C-n-O und C-(n+2)-O Bindungen sind aufgrund von Abstoßungskräften zwischen den Sauerstoffatomen konformationelle Zustände hoher Energie und nur mit geringem Anteil in Lösung populiert (JEFFREY UND KIM, 1970). In Lösung können Alditole diesem sterischen Stress entgehen, indem sie durch Drehung um 120° um eine C-C-Bindung eine gebogene Konformation annehmen. S7P müsste sich für eine energiearme Konformation um die C5-C6-Bindung drehen. Auch wenn C6-OH von S7P keinen direkten Interaktionspartner hat, ist diese freie Drehbarkeit im Inneren des Enzyms nicht gegeben. Phe132 flankiert die Ebene der beiden Hydroxylgruppen und verhindert als *steric backstop* eine Drehung um die C5-C6-Bindung in Richtung von Phe132. Jede 120°-Drehung um diese Bindung würde außerdem eine andere Lage der Phosphatgruppe mit sich bringen, was durch deren Raumbedarf und starke Interaktionen im aktiven Zentrum unrealistisch ist. Das Enzym zwingt das Substrat in eine Konformation, in der intramolekulare Spannungen induziert werden. Die Abstoßungskräfte zwischen den ekliptischen C4- und C6-OH-Gruppen könnten Triebkräfte für die Bindungsspaltung zwischen C3 und C4 sein. Wenn bei der Spaltung C4 zur sp²-Hybridisierung übergeht, kann O4 durch einen geänderten Bindungswinkel der Abstoßung von O6 entgehen, wodurch sich ein energieärmerer Zustand ergibt. Im Gegensatz zur hier auftretenden Konformation liegt S7P in der einzigen weiteren enzymgebundenen Struktur, im aktiven Zentrum von Sedoheptulose-7-phosphat-Isomerase, in perizyklischer, offenkettiger Konformation vor (TAYLOR *et al.*, 2008).

Weitere Spannungen des Schiffbasen-Intermediats treten durch eine Distorsion der Schiffbasen-Bindung selbst auf. Die Bindungspartner des sp²-hybridisierten C2-Atoms sollten mit diesem in einer Ebene liegen. In den aufgeklärten Strukturen kommt es zu Abweichungen aus dieser Ebene von 10° für S7P und 22° für F6P im Wildtyp (Abb. 3.27) und 3,3° für S7P und 15° für F6P in der Variante E60A.

Trotz der höheren Auflösung ist in der Variantenstruktur von E60A+F6P bei 1,5 Å die Spannung der Schiffbasen-Bindung identifizierbar.

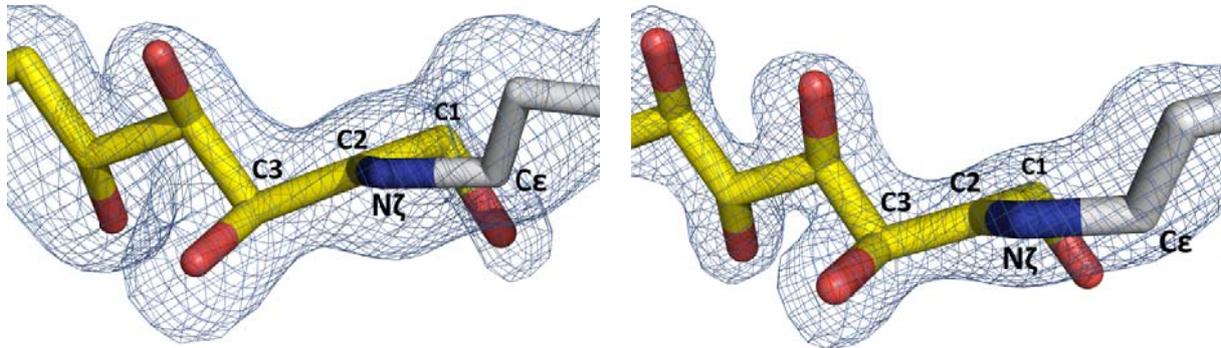


Abb. 3.27 Detailsicht der Schiffbasen-Bindung. Gezeigt sind die Schiffbasen von Wt-*TacTA* mit F6P (links, $2F_o-F_c$ SA-omit map, 1,0 σ) und S7P (rechts, $2F_o-F_c$ SA-omit map, 1,3 σ). Durch die sp^2 -Hybridisierung von C2 und N ζ , sollten die Atome C1, C2, C3, N ζ und C ϵ in einer Ebene liegen. Die aufgeklärten Strukturen zeigen Distorsion in der Schiffbasen-Bindung. Gelb: Donorsubstrate F6P und S7P, Hellblau: Lys86.

Die gefundenen Winkelspannungen könnten ebenfalls Triebkräfte der Reaktion sein. So könnte die Distorsion der Schiffbasen-Bindung sicher stellen, dass die Bindung nicht zu stabil ist und dass das Substrat/Produkt trotz zahlreicher Wechselwirkungen mit dem Enzym auch wieder freigesetzt werden kann. Dafür könnte sprechen, dass beim massenspektrometrischen Experiment mit äquimolarem Angebot von F6P und E4P sich das Gleichgewicht auf Seite der S7P-Schiffbase einstellt, welche in der Kristallstruktur die kleinere Spannung in der Schiffbasen-Bindung besitzt. Dies wäre nur der Fall, wenn diese Distorsion einen größeren Effekt hätte als die molekulare Spannung durch die beiden parallelen OH-Gruppen in der S7P-Struktur. Im Kontrast zu den hier gezeigten Ergebnissen tritt in den Schiffbasen-Komplexen, die bei Aldolase aus Kaninchenmuskel mit vergleichbarer Auflösung gefunden wurden (PDB 1ZAI), in keiner Untereinheit eine Abweichung von der Planarität von mehr als $0,5^\circ$ auf (ST-JEAN *et al.*, 2005).

Molekülspannungen als Triebkraft einer enzymatischen Reaktion sind ein klassisches Prinzip. Entweder liegen ungünstige Interaktionen als Spannungen vor, die im Übergangszustand relaxieren können, oder der Übergangszustand bietet die Möglichkeit für zusätzliche Interaktionen, die der Enzym-Substrat-Komplex nicht bot. In beiden Fällen treten Kräfte auf, die das Substrat in Richtung Übergangszustand verformen (FERSHT, 1999). Auch bei Transketolase, die ebenfalls Reaktionen des nicht-oxidativen Teils des PPWs katalysiert und zum Teil die gleichen Substrate wie TA nutzt, sind Molekülspannungen ein Katalyseprinzip. So führt die Bindungsknüpfung zwischen dem Carbonylkohlenstoffatom von F6P (C2 α) und dem C2 von Thiamindiphosphat zu einem Intermediat, in dem die kovalente Bindung zwischen Substrat und Cofaktor $25 - 30^\circ$ aus der planaren Ringebeine des Thiazolo-

liumrings von ThDP gehoben ist (ASZTALOS *et al.*, 2007). Für TK wird diskutiert, dass dies eine treibende Kraft für die Bindungsspaltung zwischen C2 und C3 des Donorsubstrats F6P ist, da nach Abspaltung des Produkts GAP das kovalent am Cofaktor verbleibende Enamin eine planare Konformation einnehmen kann, was durch FIEDLER *et al.*, 2002 gezeigt worden ist.

3.5.4.2 Wassermoleküle in Variante E60A

Die Schiffbasen-Addukte in der Variante E60A wurden bereits in Kapitel 3.5.4 besprochen. In der Variante treten weder globale Änderungen im Protein noch kleinere Änderungen in den Konformationen der Seitenketten des aktiven Zentrums auf. Selbst die Lage des Kristallwassers und des katalytischen Wasser ist vergleichbar zu den Wildtypstrukturen. Eine durch die Mutation hervorgerufene Änderung in der Kristallstruktur ist das Vorkommen von 3 zusätzlichen Wassermolekülen, die weitläufig den Raum der nicht mehr vorhandenen Carboxylgruppe des Glu60 füllen.

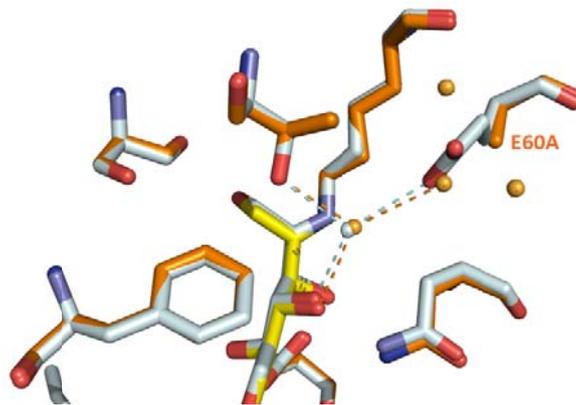


Abb. 3.28 Ausschnitt aus dem aktiven Zentrum der Variante E60A mit F6P-Schiffbasen-Addukt. Vergleich von Wt (Hellblau) und E60A (Orange), Schiffbase von E60A in Gelb. Die Wassermoleküle sind als Kugeln dargestellt. Das in die Katalyse involvierte H₂O ist in beiden Intermediatstrukturen an identischen Positionen lokalisiert, anstelle der Glu60-Seitenkette sind in der Variante 3 zusätzliche Wassermoleküle angeordnet.

3.5.4.3 Auftreten eines nicht-natürlichen kovalenten C3-Addukts

Bei der Struktur von Wt-TA im Grundzustand wurde in Untereinheit A dicht um N ϵ von Lys86 zusätzliche Elektronendichte in Form und Länge einer C3-Einheit gefunden. Die Dichte wurde als Carbinolamin interpretiert, welches durch nukleophilen Angriff der N ϵ -Gruppe von Lys86 auf die Carbonylgruppe von Glycerinaldehyd entstanden ist. Die Entstehung von Glycerinaldehyd aus den hohen Mengen an Glycerin (12,5 % im Tropfen) durch Oxidation unter den Kristallisationsbedingungen ist möglich und wurde auch für FSA angenommen (THORELL *et al.*, 2002). Mittels Massenspektrometrie konnte Glycerinaldehyd in einer Lösung detektiert werden, die in ihrer Zusammensetzung dem Kristallisationsansatz ohne PEG und Protein entsprach und 1 Monat bei 18 °C inkubiert wurde.

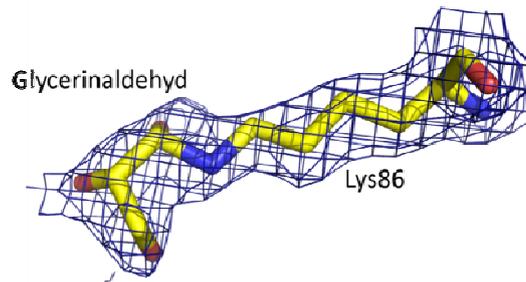


Abb. 3.29 Glycerinaldehyd in Wt-TacTA als Carbinolamin gebunden. In der Wt-Grundstruktur fand sich in Untereinheit A Dichte, die als durch Reaktion mit Glycerinaldehyd aus dem Kristallisationspuffer entstandenes Carbinolamin interpretiert wurde. Auch in anderen Untereinheiten fand sich zusätzliche positive Elektronendichte, die aber nicht durchgängig war.

3.5.5 Michaelis-Komplexe

Im Folgenden werden Strukturen mit verschiedenen Michaeliskomplexen vorgestellt. Es gab drei verschiedene Konzepte zur Generierung dieser nichtkovalent gebundenen Komplexe. Zum einen wurde das Akzeptorsubstrat ohne das Donorsubstrat eingesetzt. Im zweiten Fall kamen als kompetitiver Inhibitor wirkende Substratanaloga für das Donorsubstrat zum Einsatz. Der Begriff Substratanalogon ist hier weiter gefasst zu verstehen, da nur S6P ein Analogon zu F6P darstellt und dessen Struktur imitiert. Im Folgenden werden weitere Zuckerphosphate in die Begrifflichkeit mit einbezogen, die keine natürlichen Substrate von TA sind, aber durch z.B. ähnliche Konfiguration oder die Phosphatgruppe den natürlichen Substraten ähneln und gebunden werden können. Im dritten Ansatz wurde das Schiffbasen bildende Lysin gegen Alanin ausgetauscht und das Donorsubstrat F6P eingesetzt, welches nun nicht mehr kovalent binden konnte.

3.5.5.1 Struktur von Wildtyp-Transaldolase mit dem Akzeptorsubstrat Erythrose-4-phosphat

Das Akzeptorsubstrat E4P bindet mit der Phosphatgruppe an der gleichen Stelle wie F6P. Es hat einen Besetzungsgrad von durchschnittlich 0,8, ist also schlechter gebunden als die Donorsubstrate, was daran liegen könnte, dass es über *soaking* in den Kristall gebracht wurde. E4P zeigt leichte Unterschiede in der Eindringtiefe im Substratkanal (bis zu 0,7 Å Differenz) zwischen den Untereinheiten. Das Zuckerrückgrat von der Phosphatgruppe bis zum C2 und die zugehörigen OH-Gruppen (E4P) nehmen dieselbe Position ein wie bei F6P von Phosphat bis C4. So finden O2 und O3 von E4P ihre Entsprechung in O4 und O5 von F6P. Im Vergleich mit S7P ist E4P um eine Bindungslänge weiter in das aktive Zentrum verschoben, so dass E4P und der E4P-„Anteil“ von S7P nicht deckungsgleich sind (Anhang 7.6). Die Form der Elektronendichte um C1 ist planar, so dass man davon ausgehen kann,

dass die Aldoform mit sp^2 -Hybridisierung von C1 vorliegt. Die Aldehydfunktion folgt der Zickzackkonformation, so dass O1 nahe dem C2 der Donorzucker zu liegen kommt. Im Vergleich mit den Schiffbasenintermediat-Strukturen hat Lys86 eine gestauchte Konformation (Abb. 3.30). Auf diese Art weicht es der sterischen Bedrängung durch die Aldehydgruppe des Akzeptorsubstrats aus.

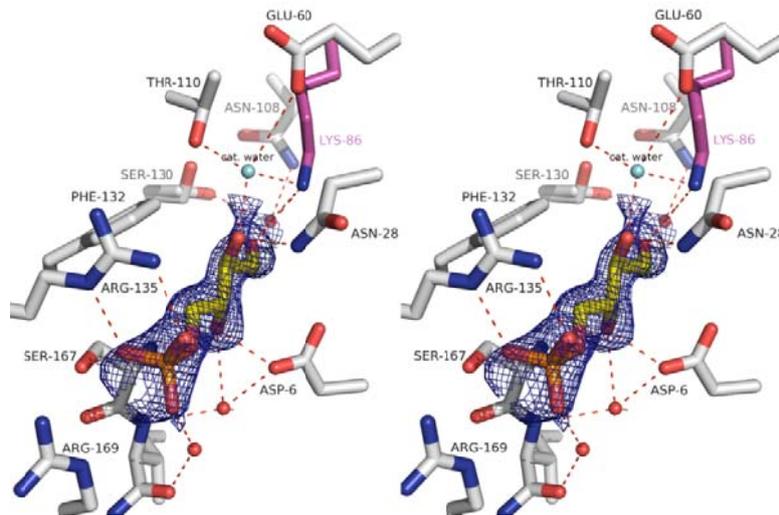


Abb. 3.30 Das aktive Zentrum von *TacTA* mit dem Akzeptorsubstrat *E4P*. Das Substrat ist gelb gefärbt und in die $2F_o - F_c$ simulated annealing omit map (Level 1,0 σ ; Auflösung 1,9 Å) gelegt.

Über Wassermoleküle ist für *E4P*, welches eine kürzere Kohlenstoffkette als die Donorsubstrate besitzt, die Interaktion von O1 mit Asn108 und Ser130 hergestellt. Auch andere Wechselwirkungen der OH-Gruppen mit den Aminosäuren des aktiven Zentrums sind entsprechend zu *F6P* ausgebildet. Für die Aufgabe als C3-Akzeptor ist *E4P* in der aufgeklärten Struktur um eine Bindung zu weit in den Substratkanal gerutscht. Sein C2 liegt auf der Höhe, wo für die Bildung von *S7P* eigentlich das C1 liegen sollte, um vom durch das Enzym aktivierten Dihydroxyacetonphosphat zur Bindungsknüpfung angegriffen zu werden. Das C1 (*E4P*) ist aber nahezu an der Position des C3 von *F6P*. Mit gebundenem Dihydroxyaceton-Schiffbasen-Intermediat würde *E4P* in dieser Position kollidieren und nicht angegriffen werden können. Es ist also wahrscheinlicher, dass *E4P* bei Vorhandensein eines C3-Intermediats nicht so weit in den Substratkanal vorstößt. Zur Überprüfung könnte man das Schiffbasen-Addukt von TA mit NaBH_4 reduzieren und dann mit *E4P* *soaken* oder kokristallisieren. Zwar wäre dann die Geometrie des Immoniumadduktes zerstört, aber der Raumbedarf des C3-Addukts wäre vergleichbar.

3.5.5.2 Struktur von Wildtyp-Transaldolase mit Xylulose-5-phosphat

Der kompetitive Inhibitor Xylulose-5-phosphat (X5P) hat von C1 bis C4 die gleiche Stereochemie wie F6P, ist aber um ein C-Atom kürzer. Für X5P konnten verschiedene Konformationen gefunden werden (Abb. 3.31). In Untereinheit B und C konnte für X5P die gleiche Konformation gebaut werden. Die X5P-Moleküle in den Untereinheiten D und E unterscheiden sich nur in einer Drehung um die C2-C3-Bindung von denen in B und C, während C3 bis Phosphatgruppe identisch sind. Die Konformation von X5P in Untereinheit A ist von denen in den anderen Untereinheiten verschieden. In keiner der Konformationen ist dem O4 entsprechende Dichte gut sichtbar.

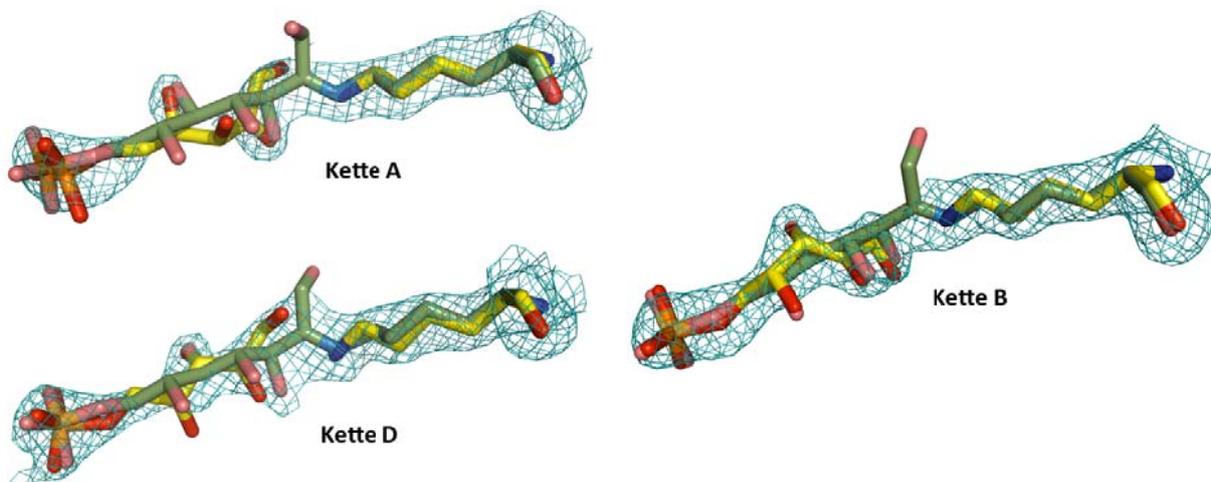


Abb. 3.31 Wt-*TacTA* mit X5P. Lage des nichtkovalent gebundenen X5Ps (gelb) im Vergleich zu als Schiffbase gebundenem S7P (grün). Gezeigt ist die $2F_o - F_c$ simulated annealing omit map (Level 1,0 σ ; Auflösung 1,85 Å).

Die Interpretation der Dichte in Untereinheit B und C scheint dieser am Besten zu entsprechen. Der Versuch, in allen Untereinheiten in die ähnlich aussehende Dichte einheitlich die Konformation wie in B und C zu bauen, ergab zwar einen nur um 0,08 % schlechteren R_{free} -Wert, aber es zeigten sich große Bereiche negativer Differenzelektronendichte von C2 bis C4 und O4, so dass das Endmodell mit verschiedenen Konformationen belassen wurde.

Die Phosphatgruppe bindet an derselben Stelle wie bei S7P. Bei der Konformation der Kette B liegen die OH-Gruppen relativ zu S7P fast übereinander. Allerdings können sie durch die unterschiedlichen Konfigurationen an den übereinanderliegenden C-Atomen nicht zur Deckung gebracht werden. Die Ketogruppe an C2 und C4-OH von X5P liegen fast parallel und zeigen nur eine Auslenkung von 17° voneinander. Sie entsprechen den in gleicher Ebene angeordneten C4-OH und C6-OH-Gruppen von S7P. Ein Unterschied ist, dass bei S7P beide C-Atome sp^3 -hybridisiert sind, während bei X5P C2 sp^2 -hybridisiert ist. Trotz der sp^2 -Hybridisierung ist C2 nicht völlig planar (Abb. 3.32). Diese Abweichung von der Planarität ist nur möglich, wenn ein Anteil von X5P kovalent an das Enzym gebunden ist.

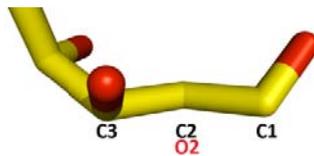


Abb. 3.32 Vergrößerung auf das sp^2 -hybridisierte C2-Atom von in *TacTA* gebundenem X5P. C2 und O2 liegen hintereinander in einer Ebene, so dass O2 verdeckt ist. Die Geometrie an C2 ist nicht vollständig planar.

Die Elektronendichte zwischen Zuckermolekül und Lysin erscheint fast durchgängig (besonders in Untereinheit D), so dass eine kovalente Bindung für einen Anteil des X5P mit niedrigem Besetzungsgrad nicht ganz ausgeschlossen werden kann. Die Datenqualität reicht nicht für die Abschätzung einer Verteilung zwischen freiem und kovalent gebundenem X5P aus. Nach massenspektrometrischer Untersuchung (2.2.8.2.1) mit 246 μM TA und 21 mM X5P scheint eine kovalente Bindung unwahrscheinlich, da nach 15 min keine Spur eines kovalenten Addukts detektiert werden konnte. Allerdings entsprachen Dauer und pH-Wert des massenspektrometrischen Experiments nicht den Bedingungen der Kristallisation, bei der die langen Zeiten der Kokristallisation die Ausbildung einer kovalenten Bindung ermöglichen könnten, aber der niedrige pH-Wert diesen Prozess unwahrscheinlich macht.

In D und E liegt die C3-OH-Gruppe von X5P weiterhin über der C5-OH-Gruppe von S7P, aber alle anderen OH-Gruppen sind aus der Ebene gedreht. Die C2-Ketogruppe und C4-OH stehen fast rechtwinklig zu C4-OH und C6-OH von S7P.

In A ist X5P im Vergleich zur Konformation in B 180° um die Achse des Zuckerrückgrats gedreht und etwas weiter in das aktive Zentrum gerutscht. Trotz veränderter Lage und unterschiedlicher Konformationen der auf selber Höhe befindlichen C-Atome von X5P und S7P positionieren sich die OH-Gruppen wieder an typischen Stellen. Im Vergleich liegen O4, O3 und O2 (X5P) über O5, O4 und O3 (S7P).

3.5.5.3 Struktur von Wildtyp-Transaldolase mit Arabinose-5-phosphat

Die Konformation von A5P ist in jeder Untereinheit annähernd gleich. Kleine Änderungen treten auf durch eine Variabilität von C1 und der Aldehydgruppe und in der Eindringtiefe von A5P in den Substratkanal (Abb. 3.33). Die Verschiebung beträgt durchschnittlich 0,33 Å und kann der schlechteren Auflösung von 2,4 Å geschuldet sein. Der Koordinatenfehler beträgt 0,35 Å. Im Vergleich mit F6P liegen die Phosphatgruppen auf einer Höhe (Untereinheit A und B) bzw. ist die von A5P um 0,7 – 1 Å nach außen geschoben.

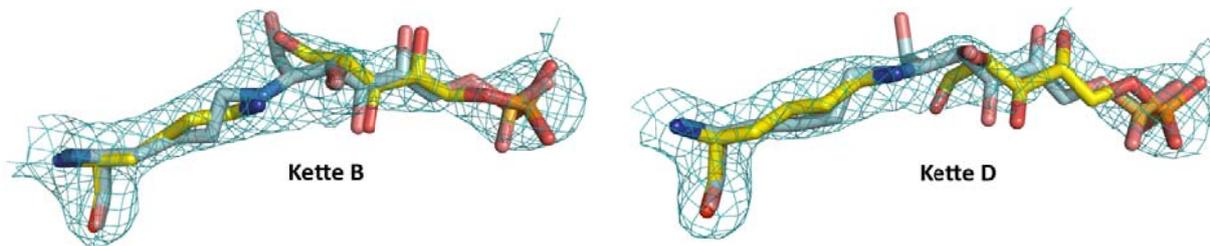


Abb. 3.33 Wt-TacTA mit A5P. Lage des nichtkovalent gebundenen A5Ps (gelb) im Vergleich zu als Schiffbase gebundenem F6P (hellblau). Gezeigt ist die $2F_o - F_c$ simulated annealing omit map (Level 1,0 σ ; 2,4 Å).

Sind die Phosphatgruppen auf gleicher Höhe angeordnet, entsprechen sich die Zuckergrundgerüste von C2 bis C5 (A5P) und C3 bis C6 (F6P), was durch die gleiche Konfiguration der C-Atome ermöglicht wird. Das Vorhandensein des katalytischen Wassermoleküls war nicht zu beobachten, was auch ein Effekt der schlechteren Auflösung sein kann. Für A5P ist ein kompetitiver inhibitorischer Effekt auf TA beschrieben worden (WILLIAMS *et al.*, 1978; SCHÖRKEN, 1997). Es wurde vermutet, dass dieser durch die L- anstelle der D-Konfiguration an C2 ausgelöst wird. Die Art wie A5P in TA gebunden wird lässt darauf schließen, dass die inhibitorische Wirkung nicht aus diesem Unterschied resultiert, sondern aus der Entsprechung der Konfiguration von A5P (C2 bis Phosphatgruppe) zum Molekülbereich von C3 bis Phosphatgruppe von F6P.

3.5.5.4 Struktur von Wildtyp-Transaldolase mit Sorbitol-6-phosphat

Sorbitol-6-phosphat ist ein Substratanalogon für F6P und kompetitiver Inhibitor der Transaldolase. Die Konfiguration der Stereozentren C3, C4 und C5 ist denen in F6P entsprechend. Die kovalente Bindung ist nicht möglich, da es über keine Ketogruppe verfügt. S6P kann aber nichtkovalent im aktiven Zentrum gebunden werden. Dass S6P nicht kovalent von TA gebunden wird, wurde durch Massenspektrometrie verifiziert (Durchführung nach 2.2.8.2.1). In einem Ansatz mit 246 μM TA und 20 mM S6P konnte nach 15 min kein kovalent gebundenes Addukt detektiert werden.

Die Dichte von S6P ist nicht gut definiert. S6P nimmt im aktiven Zentrum mehrere Konformationen ein (Abb. 3.34). Dabei entsprechen sich die Konformationen in Kette A und C sowie D und E. In A, C und B ist die Phosphatgruppe auf der gleichen Höhe wie in S7P. In Kette A und C liegen die C-Atome 6, 5, 4 und ihre zugehörigen OH-Gruppen deckungsgleich mit C7, 6 und 5 und entsprechenden OH-Gruppen von S7P. Relativ zu F6P ist die C6-Kette von S6P also um eine Bindung verrückt. Somit ergibt es sich, dass C3 von S6P (S-Konfiguration) mit C4 von F6P (R-Konfiguration) mit ihrer unterschiedlichen Konformation auf gleicher Höhe zu liegen kommt und die zugehörigen OH-Gruppen in gegensätzliche Richtungen weisen. Die Lage der C2-O2-Bindung von S6P ist ähnlich der C3-O3-

Bindung von F6P/S7P. C1 (S6P) ist auf gleicher Höhe mit dem Schiffbasen bildenden C2 (F6P/S7P), so dass Lys86 dem nicht kovalent bindenden S6P durch Drehung zu Seite sterisch ausweichen muss.

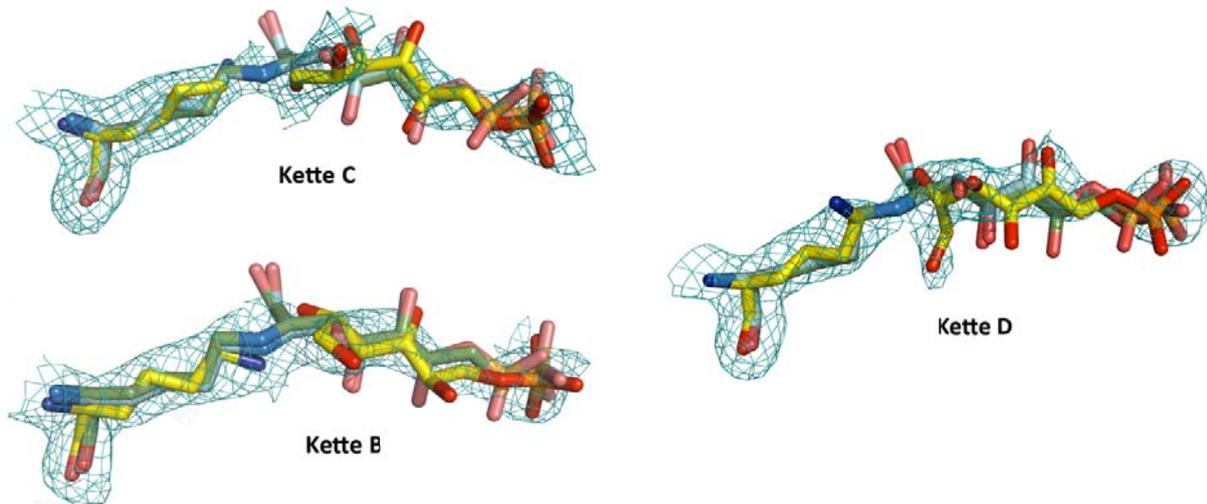


Abb. 3.34 Wt-TacTA mit S6P. Lage des nichtkovalent gebundenen S6Ps (gelb) im Vergleich zu als Schiffbase gebundenen F6P (hellblau) und S7P (grün). Gezeigt ist die $2F_o - F_c$ simulated annealing omit map (Level 1,0 σ ; 2,25 Å).

Zur Konformation in Untereinheit B gelangt man, wenn man die Konformation in A und C um etwa 90° dreht und eine zusätzliche Drehung um 120° um die C3-C4-Bindung in gleicher Drehrichtung ausführt. In dieser Konformation liegen C2 bis C4 (S6P) deckungsgleich über C3 bis C5 (F6P/S7P). Als einzige OH-Gruppe kommt die C4-O4- (S6P) mit der C5-O5-Bindung (F6P/S7P) übereinander zu liegen. Alle anderen OH-Gruppen weisen in andere Richtungen. O5 liegt in dieser Konformation außerhalb der Elektronendichte.

Bei der Konformation in D und E ist S6P 180° um die C2-C3-Bindung gedreht. Im Vergleich mit F6P ist S6P nur um eine halbe Bindung nach außen gerutscht. Die OH-Gruppen von O3, O4 und O5 liegen mit der jeweils entsprechenden in einer Ebene. O1-C1-C2-O2 von S6P nehmen eine zur Schiffbasen-Ebene senkrechte Position ein. Das Lys86 weicht wieder zur Seite aus. Obwohl in Kette D die Dichte für S6P gut definiert ist, lässt sich mit diesem Modell keine Dichte für O4 finden. In A, B und C ist Dichte für das katalytisch aktive Wasser zu finden, während die C1-OH-Gruppe in D und E an dessen Stelle liegt.

3.5.6 Das aktive Zentrum der Variante K86A

3.5.6.1 Bindung von Fruktose-6-phosphat in K86A

In der inaktiven Variante K86A ist die Ausbildung der Schiffbase durch Fehlen des katalytischen Lysins nicht mehr möglich. Anhand der Kristallstruktur konnte gezeigt werden, dass die Bindung des

Donorsubstrats F6P in offenkettiger Form als Michaeliskomplex weiterhin erfolgen kann. Dabei ist F6P in fast allen Untereinheiten nur soweit in das aktive Zentrum vorgedrungen, dass die Phosphatgruppe wie bei S7P weiter außen liegt. Während die Elektronendichte der Phosphatgruppe und eines vorderen Abschnitts des Substrats von 3 Bindungslängen gut definiert sind, fehlt Dichte im Mittelteil des Moleküls. In allen Untereinheiten außer in A ist F6P in gebogener Konformation in das Modell eingefügt worden (Abb. 3.35, links). Durch eine 120° Drehung um die C3-C4-Bindung (bezüglich der gestreckten, planaren Konformation der Schiffbasen-Addukte) stehen O3 und O4 auf einer Seite. Durch diese cis-Konformation im Zuckerrückgrat ergibt sich eine perizyklische Konformation.

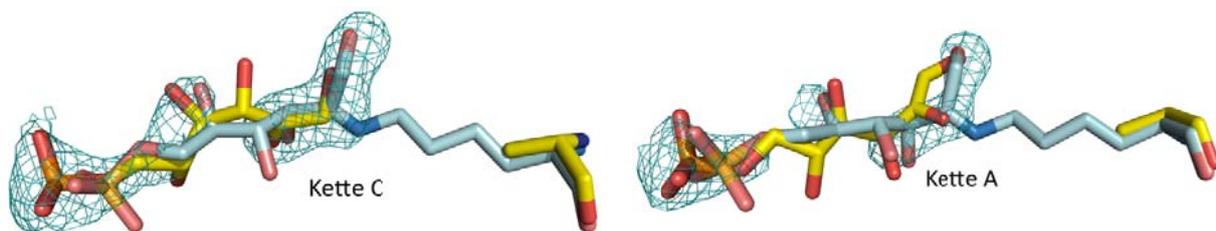


Abb. 3.35 TacTA-Variante K86A mit F6P. Lage des nichtkovalent gebundenen F6Ps (gelb) im Vergleich zu als Schiffbase gebundenem F6P (hellblau). Gezeigt ist die $2F_o - F_c$ simulated annealing omit map (Level 1,0 σ ; 2,0 Å).

Die nicht durchgehend definierte Dichte weist auf hohe Beweglichkeit des mittleren Teils des Zuckermoleküls hin. In Untereinheit A ist F6P in der gestreckten Konformation, wie es auch bei Bindung als Schiffbase gefunden wurde. Das Substrat im Michaeliskomplex müsste aber noch um eine Bindungslänge weiter in das aktive Zentrum rutschen und sich 120° um seine eigene Achse drehen, um die Position der Schiffbase einzunehmen (Abb. 3.35, rechts). Wie bei Transketolase scheint sich das Donorsubstrat schraubenartig in Position zu bringen (unpublizierte Information von Stefan Lüdtker, Abteilung Bioanalytik, Göttingen).

3.5.6.2 Bindung von Glycerin und Citrat in der Variante K86A

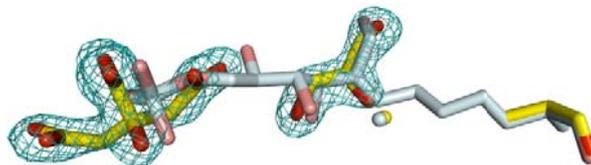


Abb. 3.36 TacTA-Variante K86A mit Glycerin und Citrat als Michaeliskomplex.

Gelb: Ala86, Glycerin, Citrat in der Variante K86A, Hellblau: Wt mit als Schiffbase gebundenem F6P. Gezeigt ist die $2F_o - F_c$ simulated annealing omit map (Level 1,0 σ ; 1,6 Å).

In jeder Untereinheit der Variante fand sich Glycerin an der Position, an der man als Schiffbase gebundenes Dihydroxyaceton erwarten würde (O1-C1-C2-C3-O3 von F6P). Citrat besetzte den Ausgang des Substratkanals an der Phosphatbindestelle. Im Gegensatz zu in Citratpuffer kristallisiertem Wt-

Enzym fand sich bei der Variante K86A immer Citrat im aktiven Zentrum, wenn dieses im Kristallisationspuffer vorhanden war. Das Citrat ließ sich im Kristall nicht durch *soaking* mit dem Donorsubstrat F6P verdrängen. Ob Citrat als kompetitiver Inhibitor für TA wirkt, wurde nicht überprüft. Es wäre aber aufgrund seiner Position im Enzym denkbar. Für FBPA wurde im Gegensatz eine aktivierende Funktion von Citrat gezeigt (BALDWIN UND PERHAM, 1978), aber nicht erklärt. Im Zytosol von *E. coli* beträgt die Citratkonzentration 1,1 – 1,3 mM (BENNETT *et al.*, 2009). Auch in *T. ac.* spielt der Citratzyklus eine Rolle. Da im Wt-Protein kein Citrat im aktiven Zentrum gefunden wurde, kann die starke Bindung des Moleküls auch eine Eigenheit der Variante sein und keine physiologischen Konsequenzen für den Wt haben.

3.5.7 Asp6 zur Protonierung der C2-Ketogruppe des Donorsubstrats

Auch im Michaeliskomplex geht F6P sowie das Substratanalogon S6P mehrere Wechselwirkungen über H-Brücken mit den Aminosäuren des aktiven Zentrums ein. Eine für den Mechanismus bedeutende ist die Wechselwirkung zwischen Asp6 und dem O2 der Ketogruppe von F6P bzw. der C2-OH-Gruppe von S6P. Im Wt+S6P-Pentamer findet man nur in den Untereinheiten A und C diese Ausrichtung des Liganden, in der Struktur K86A+F6P in allen Untereinheiten außer A.

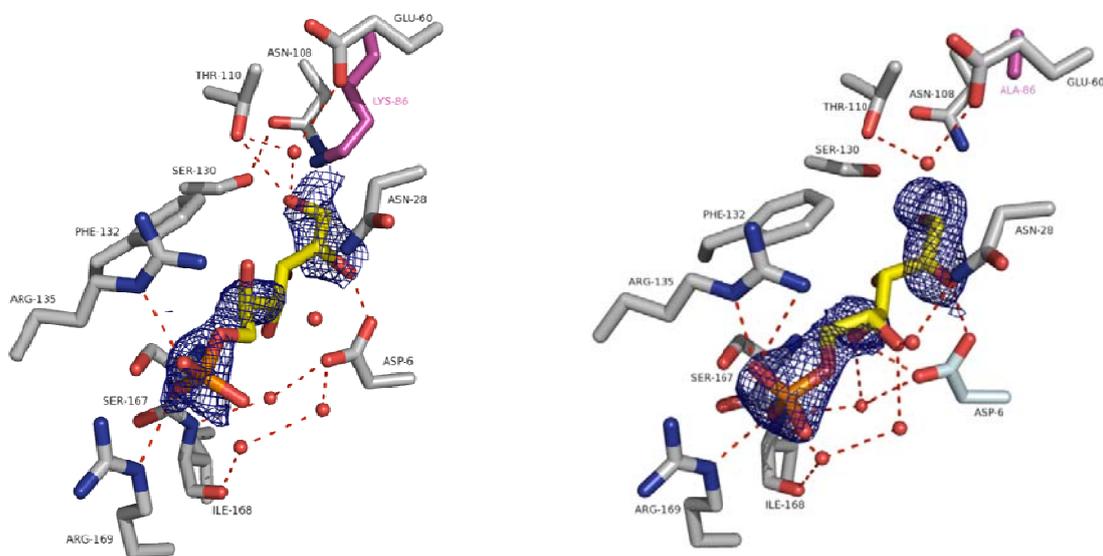


Abb. 3.37 Asp in Wechselwirkung mit O2 von S6P und F6P im Michaeliskomplex bei *TacTA*. Links: Das aktive Zentrum von Wt-*TacTA* mit dem F6P-Analogon S6P (Gelb) als Michaeliskomplex. Rechts: Das aktive Zentrum der Variante K86A mit F6P (Gelb) als Michaeliskomplex. Gezeigt sind die $2F_o - F_c$ SA-omit maps (Level 1,0 σ ; Wt+S6P 2,25 Å, K86A+F6P 2,0 Å). Dargestellt ist jeweils Untereinheit C, Lys86 bzw. Ala86 ist in Magenta hervorgehoben.

Für eine H-Brückenbindung zwischen Asp6 und der F6P-Ketogruppe muss Asp6 protoniert sein. Die Analyse der Struktur mit PROPKA berechnet einen um 1,3 Einheiten auf 6,28 erhöhten pK_a -Wert von

Asp6 in der Variantenstruktur mit gebundenem F6P und eine Erhöhung bis auf 7,52, wenn Glycerin und Citrat im aktiven Zentrum gebunden sind. Wenn in der Wt-Struktur S6P mit Wechselwirkung zwischen C2-OH-Gruppe des Liganden und Asp6 gebunden wird, ist der pK_a -Wert von Asp6 ebenfalls auf maximal 6,47 erhöht. Für eine solche Wechselwirkung muss Asp6 deprotoniert vorliegen. Am pH-Optimum der *TacTA* von 7,5 sollten somit ausreichende Mengen der protonierten und deprotonierten Spezies vorliegen, um die entsprechenden Bindungen mit den Substraten eingehen zu können.

Anhand dieser Strukturen ist anzunehmen, dass auch im Wt eine H-Brücke zwischen Asp6 und dem O2 von F6P bei Substratbindung ausgebildet werden kann. In diesem Fall ist es wahrscheinlich, dass Asp6 das bei Carbinolamin-Bildung entstehende Alkoxid protoniert und sich bei der Bindungsbildung zwischen C und N das Substrat um seine Achse dreht, so dass das nun deprotonierte Asp6 mit den Hydroxylgruppen an C3 und C5 wechselwirken kann. Eine von SCHÖRKEN *et al.*, 2001 diskutierte Rolle des Thr für die Stabilisierung des Übergangszustands bei der Carbinolamin-Bildung durch Stabilisierung des sich am O2 bildenden Alkoxids ist dadurch unwahrscheinlich. Die pK_a -Wert-Erhöhung zeigt, dass Asp6 in ausreichender Menge protoniert vorliegen sollte und die Rolle als Säure wahrnehmen kann. Das würde Asp6 eine neue Rolle im Reaktionsschema zuweisen. Dass Asp6 bei Substratbindung schon unprotoniert vorliegt und die sichtbare Wechselwirkung eine Abstoßung der Ketogruppe darstellt, die die Drehung des Substrats auslöst, ist nicht vorstellbar, da der Komplex durch Kokristallisation entstanden ist und dieser Zustand bis zur Datenaufnahme über lange Zeit stabil geblieben sein muss.

3.5.8 Die Strukturen der Varianten F132Y, T110V, E60Q und D6N

Über die Kristallstrukturen der Varianten wurde abgeklärt, ob Änderungen in den kinetischen Konstanten strukturelle Ursachen haben. Die Varianten zeigen keine Änderungen in ihrer globalen Struktur oder ihrem Oligomerisierungsgrad.

3.5.8.1 Variante F132Y

In der Kristallstruktur von Variante F132Y findet man keine Entsprechung für das katalytische Wasser. Im Vergleich mit den Wt-Strukturen ist der Abstand der OH-Gruppe von F132Y bis zu diesem Wasser nur 1,6 – 2,3 Å (Abb. 3.38).

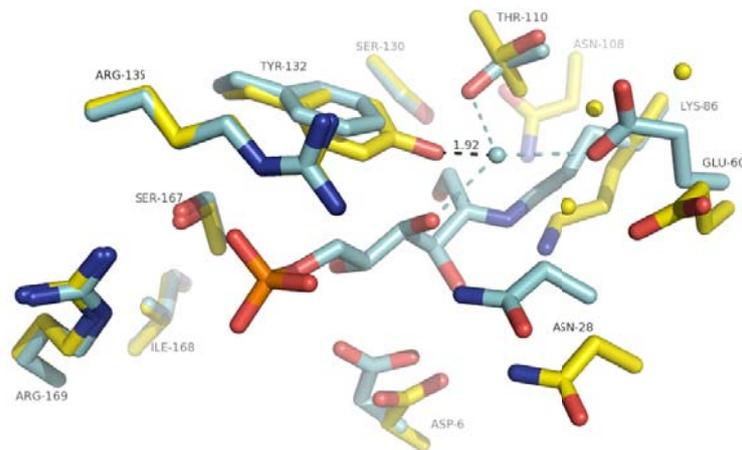


Abb. 3.38 Superposition der aktiven Zentren von Wt-*TacTA*+F6P (Cyan) und *TacTA*-Variante F132Y (Gelb). In der Variante wurde das katalytische Wasser (Cyan in der Wildtypstruktur) durch die OH-Gruppe von Tyr132 verdrängt, so dass sich keine Entsprechung findet. Thr110 nimmt eine alternative Konformation ein. Die Untereinheit zeigt eine offene Konformation wodurch Glu60, Asn28 und Asp6 nach außen verschoben sind.

Somit ist anzunehmen, dass es durch Tyr132 verdrängt wurde. Thr110 zeigt in Kette A, D und E eine um 120° gedrehte Konformation, was Wechselwirkungen mit Tyr132 vermeidet. Diese Konformation ist möglich, da Thr110 kein Wassermolekül koordinieren muss. Wenn Thr110 in der normalen Konformation vorläge, würde der Abstand zur OH-Gruppe des Tyrosins nur $2,3 \text{ \AA}$ betragen. In diesen 3 Untereinheiten ist die offene Konformation ausgeprägt. Im verbreiterten Substratkanal finden sich zusätzliche Wassermoleküle. Die restlichen beiden Untereinheiten zeigen geschlossene Konformation mit normal ausgerichtetem Thr110 im Abstand von $2,8 \text{ \AA}$ zu Tyr132. Bei Superposition mit der Wt-F6P-Struktur ist die OH-Gruppe des Tyrosins nur 2 \AA vom C4-OH des F6P entfernt. Bis zum C2-Atom des Zuckers sind es 3 \AA . Bei den meisten archaealen FBPA's erfolgt die Protonierung der C2-OH-Gruppe durch einen Tyrosinrest und nicht durch Glutamat (LORENTZEN *et al.*, 2003). Somit ist vorstellbar, dass Tyr auch in der Variante katalytische Aufgaben übernehmen kann, die in einer geänderten Reaktivität resultieren (Kapitel 3.6.2). Bei einer Überlagerung der Strukturmodelle von Variante F132Y mit der entsprechenden *E. coli* TA-Variante F178Y (PDB 3CWN, SCHNEIDER *et al.*, 2008, RMS = $0,76 \text{ \AA}$) findet sich die im *E. coli*-Protein kokristallisierte Sulfatgruppe an der gleichen Stelle wie die Phosphatgruppe von F6P.

3.5.8.2 Variante T110V

In der Kristallstruktur von T110V nimmt die Seitenkette von Val eine andere Position ein als Thr110 im Wt. Es zeigt in allen Untereinheiten eine um 120° gedrehte Konformation, analog zu Thr110 in der Variante F132Y, Kette A, D und E. Wie auch in der entsprechenden *E. coli*-Variante T156A (pdb 1I2Q, SCHÖRKEN *et al.*, 2001) ist die Position des katalytischen Wassers um $0,6 - 1,0 \text{ \AA}$ verschoben.

T110V wurde mit F6P kokristallisiert. In der Kristallstruktur der Variante konnte keine zusätzliche Dichte für das C6-Zuckerphosphat gefunden werden. Durchgängige Dichte für ein kleineres Molekül, welches als Dihydroxyaceton-Schiffbase interpretiert wurde, dem kovalenten Intermediat nach Spaltung der C3-C4-Bindung, trat nur in Untereinheit A auf. Gestreute positive Elektronendichte um Lys86 wurde auch in anderen Untereinheiten beobachtet. Es wurde aber kein Modell eingepasst.

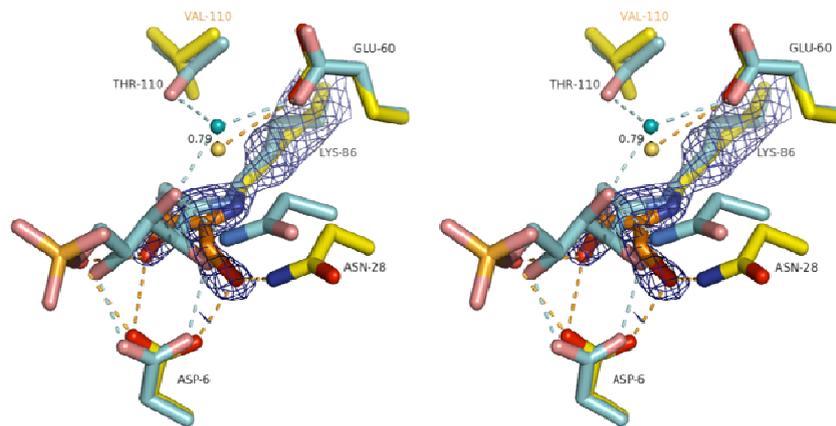


Abb. 3.39 Stereodarstellung der Superposition der aktiven Zentren von Wt-TacTA+F6P (Cyan) und TacTA-Variante T110V+DHA (Gelb+Orange). Gezeigt ist jeweils Untereinheit A. Lys86 und das als Schiffbase gebundene Dihydroxyaceton (Orange) sind von der zugehörigen $2F_o - F_c$ SA-omit map umgeben (Level 1,0 σ ; 1,85 Å). Das katalytische Wasser in T110V ist allein durch Glu60 koordiniert und um 0,79 Å verschoben.

Die Bindungswinkel zwischen den Atomen der Schiffbasen-Ebene betragen durchschnittlich $122,2^\circ$. Die Abweichung von 180° der Dihedralwinkel $C\epsilon-N\zeta-C2-C1$ und $C\epsilon-N\zeta-C2-C3$ beträgt $1,9^\circ$ und $4,3^\circ$. Folglich tritt im C3-Addukt Distorsion der Schiffbasen-Bindung nicht in dem Maß auf wie bei den Addukten vor Bindungsspaltung (Kapitel 3.5.4.1). Die Distorsion der Schiffbasen-Bindung kann unter diesem Aspekt auch als treibende Kraft der C3-C4-Bindungsspaltung diskutiert werden, da nach Spaltung das kovalent verbleibende C3-Addukt relaxieren kann. Im Modell sind C1 und C3 in H-Brückenabstand zu Asp6. C3 kann eine weitere H-Brücken-Interaktion mit Asn28 eingehen.

Untereinheit A in der Variante T110V ist der einzige Fall, wo eine Schiffbase und die offene Konformation zusammen auftreten. DHA hat nur einen Besetzungsgrad von 0,78 bzw. konnte es in anderen Untereinheiten nicht eindeutig detektiert werden. In der abgebildeten Untereinheit A gibt es auch Flecken positiver Elektronendichte, die auf geringe Anteile der geschlossenen Konformation hinweisen. Die Okkupanz war jedoch so gering, dass die alternative Konformation im Modell verzichtet wurde. Das Auftreten der offenen Konformation zusammen mit einem Schiffbasen-Zustand könnte durch eine Defizienz der Variante T110V verursacht sein. Eine andere Möglichkeit wäre, dass sich das Enzym nach Spaltung des Donorsubstrats öffnet, um das erste Produkt GAP freizusetzen.

3.5.8.3 Varianten E60Q und D6N

E60Q und D6N zeigen keine Veränderungen. Bei E60Q ist sogar das Netzwerk an Wassermolekülen weitgehend erhalten. Für die Variante D6N konnten nur Kristalle der Raumgruppe $P2_1$ erhalten werden, so dass sich ein Dekamer in der asymmetrischen Einheit fand.

3.5.9 Beweglichkeit der ringäußeren Helices – Substratbindung nach einem *conformational-selection*-Mechanismus

In den Strukturen ohne kovalentes Addukt findet man zwei alternative Konformationen im Bereich von Aminosäure 6 – 55 (Abb. 3.40), was die ringäußeren Helices α_1 , α_2 und α_3 und Faltblatt β_2 umfasst. Oft existiert nur eine von beiden Konformationen, aber auch ein gleichzeitiges Auftreten beider Konformationen innerhalb eines Monomers ist zu finden. Als Beispiel sind die Elektronendichtekarten der $2F_o - F_c$ *simulated-annealing-omit maps* des Bereichs von Rest 6 – 55 der Untereinheit D in der Wt-Grundstruktur im Anhang dargestellt (7.4).

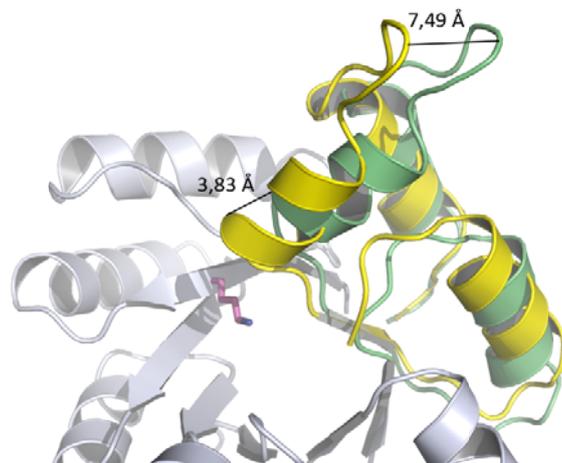


Abb. 3.40 Alternative Konformationen bei TacTA. Im Grundzustand kann der ringäußere Bereich von Aminosäure 6 – 55 in offener (Grün) sowie auch geschlossener (Gelb) Konformation vorliegen. Das zugehörige Monomer ist in grau und das katalytische Lysin in pink dargestellt.

Da der bewegliche Bereich auch eine Seite des aktiven Zentrums beinhaltet, ergibt sich eine offene und geschlossene Form des aktiven Zentrums. In der offenen Konformation ist der Substratkanal an einigen Stellen um bis zu 3,8 Å geweitet. Die Ausbildung einer Schiffbase scheint die geschlossene Konformation zu fixieren. Beziehungsweise ist anzunehmen, dass das Substrat nach einem *conformational-selection*-Mechanismus selektiv an die geschlossene Form bindet (HAMMES *et al.*, 2009). In allen aufgeklärten Strukturen mit Schiffbasen-Intermediat findet sich nur die geschlossene Konformation. Im Weiteren zeigt in diesen Komplexen auch der C-Terminus geringere Flexibilität. Bei Bin-

dung nach einem *induced-fit*-Mechanismus müsste man auch offene Enzymformen als Schiffbasen-Komplex finden, diese scheinen jedoch nicht aufzutreten. Die Aminosäuren 117 – 223 der C-terminalen Helix haben B-Faktoren von 50 – 65 Å², wenn ein Intermediat als Schiffbase gebunden ist und B-Faktoren von 60 – 80 Å², in einigen Untereinheiten sogar 80 – 105 Å², wenn das Enzym in der Grundstruktur kristallisiert ist. Dabei bleiben die B-Faktoren, abgesehen von den beweglichen, äußeren Helices, unverändert. Die Dichte für die Reste ab Aminosäure 217 fehlt in einigen Fällen sogar völlig oder ist nur in Flecken vorhanden.

Einen ähnlichen, aber als *induced fit* bezeichneten Mechanismus bei Substratbindung findet man bei der Aldolase aus Kaninchenmuskel (ST-JEAN *et al.*, 2005). Hier wird das aktive Zentrum ebenfalls von helikalen Strukturen verengt, die nicht an Kontakten zwischen den Untereinheiten beteiligt sind, aber eine Wand des Substratkanals bilden, die der Pentamer-Kontaktregion gegenüberliegt.

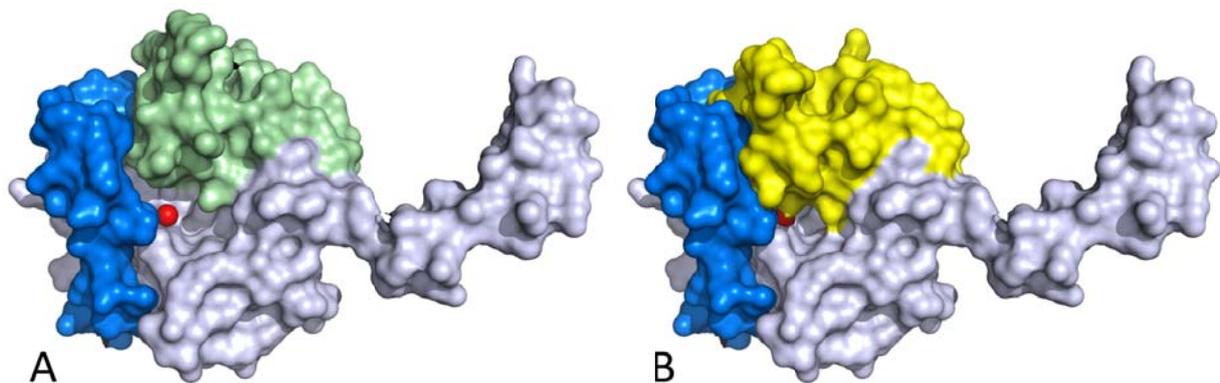


Abb. 3.41 Offene (A) und geschlossene (B) Konformation von TacTA. Gezeigt ist eine Oberflächendarstellung der Wt-Grundstruktur von TacTA. Der unveränderliche Teil eines Monomers ist hellblau, der Bereich von Aminosäure 6 – 55 grün (offen) bzw. gelb (geschlossen). Die C-terminale Helix des Nachbarmonomers ist in Blau dargestellt. In der geschlossenen Form wird das katalytisch aktive Wasser (Rot) neben dem Substratkanal in einer Höhlung eingeschlossen.

Die verschiedenen Konformationen haben einen starken Effekt auf die Lösungsmittelzugänglichkeit des an der Reaktion beteiligten Wassermoleküls. Dieses ist zwischen Thr110 und Glu60 über Wasserstoffbrückenbindungen koordiniert. Eine weitere Seite der Kavität, in der es gebunden ist, wird durch den auf der C-terminalen Helix der Nachbaruntereinheit liegenden, hydrophoben Rest Phe208 abgesperrt. Bei der nach außen geschwungenen Position von Helix α_2 wird die hydrophobe Wechselwirkung von Pro29 und Phe208 aufgebrochen, da ihre Ringe nicht mehr übereinander zu liegen kommen können. Wie in Abb. 3.41 (A) ersichtlich, ist für das Wasser in der offenen Konformation der Austausch mit dem Lösungsmittel ohne weiteres möglich.

In der geschlossenen Konformation interagieren Phe208 und Pro29 miteinander. Der Austausch mit dem Medium ist nur noch über den Substratkanal möglich. Bei Substratbindung füllt das Substrat

den Substratkanal vollständig aus und die mit dem Wassermolekül wechselwirkende C4-OH-Gruppe des Substrats versperrt die letzte Öffnung der Wasserbindestelle. Das Wassermolekül ist dann völlig vom Medium abgeschirmt.

3.5.10 Modell eines Carbinolamins – relative Lage von C2-OH zu Wasser und Glu60

Wenn man anhand der Lage des Zuckergrundgerüsts der Schiffbasen-Struktur das Carbinolamin-Intermediat vor der Wassereliminierung an C2 modelliert (Abb. 7.6 im Anhang), befindet sich das katalytisch aktive Wassermolekül sehr nah an der Position des C2-OH. In diesem Modell ist der Abstand zum Wasser nur 2 Å. Da bei diesem geringen Abstand Abstoßungskräfte zwischen den Sauerstoffatomen auftreten würden, ist es sterisch unwahrscheinlich, dass ein Carbinolamin entsprechend diesem Modell und das katalytische Wasser zur selben Zeit existieren können. In den Schiffbasen-Strukturen findet man auch kein zusätzliches Wassermolekül, welches von der abgespaltenen C2-OH-Gruppe herrühren könnte, wie das bei KDPG-Aldolase der Fall ist (FULLERTON *et al.*, 2006). Das zusätzliche Wasser katalysiert dort die Enaminbildung, was für die Transaldolasereaktion nicht in dieser Art notwendig ist. Eine Möglichkeit wäre, dass das Carbinolamin und/oder Lysin86 eine andere Konformation als in der Schiffbase einnimmt, so dass es nicht zur Abstoßung mit dem Wassermolekül kommt. Da in Michaeliskomplexen F6P und S6P in anderer Orientierung im aktiven Zentrum gefunden wurden (Kapitel 3.5.5.4 und 3.5.6.1), wäre das vorstellbar. Wenn das Substrat schon im Zustand des Carbinolamins die Orientierung der Schiffbase einnimmt, würde die C2-OH-Gruppe das Wasser aus dem aktiven Zentrum verdrängen. In der offenen Enzymform (siehe Kapitel 3.5.9) ist der Austausch mit dem Lösungsmittel durchaus denkbar. Nach dem vorgeschlagenen Mechanismus vermittelt ein Wasser die Protonierung der C2-OH-Gruppe durch Glu60. Massenspektrometrische Ergebnisse unterstützen dieses Modell (Kapitel 3.4.2.2). Bei der Annahme, dass das Wassermolekül bereits bei Ausbildung des Carbinolamins verdrängt wird und die Substratorientierung der Schiffbase entspricht, ergibt sich die Frage, wie der Abstand von 4,3 Å zum Glu60 überbrückt und die Protonierung am C2-OH erfolgen soll. Ein über dichtfunktionaltheoretische Berechnungen generiertes, genaueres Carbinolamin-Modell könnte neue Ansatzpunkte für dieses Problem geben.

3.5.11 Zusammenfassendes zum Substratkanal, Phosphatbindemotiv sowie Bindung von Zuckerphosphaten und Bezüge zur Transketolase

Während die peripheren Helices stark beweglich sind, ist das β -barrel relativ starr mit B-Faktoren um 25 Å². Obwohl die Helices α_1 , α_2 und α_3 hin und her schwingen, weicht das in der Proteinkette dazwischenliegende Faltblatt β_2 kaum von seiner Position ab. Die Weitung des Substratkanals in der

offenen Form betrifft vor allem den Eingangsbereich, während am inneren Ende des Kanals die Abweichung maximal 1 Å beträgt. TA bindet gleiche Zuckersubstrate wie TK, unterscheidet sich dabei aber durch die Mobilität von der bei Substratbindung starren TK.

Prinzipiell erscheint *TacTA* dazu geeignet, Zuckerphosphate sehr unterschiedlicher Kettenlänge zu binden. Alle Zucker ungeachtet ihrer Länge binden mit der Phosphatgruppe über H-Brücken bzw. ionische Wechselwirkungen am Phosphatbindemotiv bestehend aus den Seitenketten der Arginine 135 und 169, sowie Ser167 und dem Sauerstoffatom der Peptidbindung von Ile168. Dieses Phosphatbindemotiv könnte determinieren, wie weit das Zuckerphosphat, unbeeinflusst von seiner Länge, in das aktive Zentrum vordringen kann. Zuckerphosphate mit von den natürlichen Substraten verschiedener Konfiguration im Zuckerrückgrat binden über ihre Phosphatgruppe als Michaelis-Komplex. Die OH-Gruppen orientieren sich entsprechend den Bindeplätzen der natürlichen Substrate und nehmen ähnliche Positionen ein. Diese Plätze für H-Brückenbindungen werden auch schon in der Grundstruktur durch die Position der Wassermoleküle im Substratkanal beschrieben. Durch die unterschiedliche Konfiguration sind die Wechselwirkungen zwischen den OH-Gruppen und den Aminosäuren des aktiven Zentrums gestört und die Substratanaloga zeigen bei der Bindung verschiedene Konformationen und sogar Drehbarkeit um ihre Achse. Auch TK bindet die Zuckersubstrate über mehrere H-Brücken, die vor allem zwischen den OH-Gruppen des Zuckers und Histidinen des aktiven Zentrums ausgebildet werden (ASZTALOS *et al.*, 2007).

Wie auch bei TK werden von TA alle Zuckermoleküle vom Enzym in offenkettiger Form gebunden. Die meisten Zuckerphosphate liegen allerdings nur in geringem Anteil als freie Keto- oder Aldoform vor. Für F6P ist der Anteil an freier Ketoform nur 2 – 2,5 %, für A5P mit 0,2 % sogar noch geringer (PIERCE *et al.*, 1985; SWENSON UND BARKER, 1971). Sogar E4P, das als Monomer nicht zyklisieren kann, bildet zyklische Dimere in Form von 1,3-Dioxan und 1,3-Dioxolan, die bei Verdünnung der Lösungen erst über Stunden wieder vollständig in Monomere dissoziiert sind (BLACKMORE *et al.*, 1976; DUKE *et al.*, 1981). In der Arbeit von Pierce sind Geschwindigkeitskonstanten der Ringöffnung bei pH 7,5 und T = 40 °C von 18 – 21 s⁻¹ für F6P und 33 – 50 s⁻¹ für A5P zu finden. Der k_{cat} -Wert der Gesamtreaktion von TA bei 30 °C mit F6P und E4P beträgt 14 – 17 s⁻¹. Ob TA selektiv die offenkettigen Formen bindet und dem Anomerengleichgewicht entzieht, oder aktiv an der Ringöffnung beteiligt ist, bleibt ungeklärt. Für die Klasse I Aldolase FBPA wurde eine aktive Ringöffnung der β -anomeren Form von FBP durch das Enzym gezeigt (CHOI UND TOLAN, 2004). LORENTZEN *et al.*, 2005 haben die Beteiligung eines katalytischen Wassers, des Schiffbasen bildenden Lysins und der P1-Phosphatgruppe des Substrats an der Ringöffnungsreaktion vorgeschlagen. Letztere tritt bei den natürlichen Substraten der TA nicht auf, es ist aber vorstellbar, dass der zyklische Protonentransfer von einem Rest des aktiven Zentrums übernommen werden kann.

In TA zeigen alle gebundenen Moleküle Bindungslängen, die nicht von anderen experimentellen Daten abweichen (JEFFREY UND KIM, 1970). Selbst die unter Molekülspannungen stehenden Schiffbasen haben optimale Bindungslängen. Hierbei unterscheidet sich TA wiederum von TK, bei der durch DFT-Rechnungen eine Aufweitung der Bindungslängen zwischen C2 und C3, aber auch C3 und C4 gezeigt wurde (ASZTALOS *et al.*, 2007).

Weiterhin ist bei TK die zu spaltende Bindung zwischen C2 und C3 perpendicular zur Ebene des Thiazoliumrings ausgerichtet. Das ermöglicht nach der *least-motion-maximum-overlap*-Theorie (TURANO *et al.*, 1982; KLUGER, 1987; DUNATHAN, 1971) die bestmögliche Überlappung der π -System-Orbitale mit dem Bindungsorbital, in dem sich das Elektronenpaar befindet, das nach Bindungsspaltung frei wird und über das konjugierte System delokalisieren kann. Das positive Thiazoliumsystem wirkt hierbei als *electron sink*. Im TA-Intermediat erreicht der Bindungswinkel C2-C3-C4 zwar nicht 90° und weicht mit 108° bei der F6P-Schiffbasen-Struktur (110° bei S7P-Schiffbasen-Struktur) nur leicht von den idealen C-C-C-Bindungswinkeln im Zuckergrundgerüst ab (JEFFREY UND KIM, 1970). Jedoch ist die Ebene des gestreckten, planaren Zuckerrückgrats so ausgerichtet, dass die zu spaltende Bindung zwischen C3 und C4 des Donorsubstrats eine Anordnung relativ zur Ebene der Schiffbase erlangt, die ebenfalls maximale Überlappung der Molekülorbitale garantiert. Hier würde nach Bindungsspaltung das positiv geladene N ζ -Atom von Lys86 als *electron sink* fungieren und das freie Elektronenpaar über die Carbanion-Enamin-Resonanzstrukturen delokalisieren können.

Das Auftreten verschiedener Konformationen der Liganden innerhalb der Untereinheiten eines Oligomers ist unerwartet. Da bei Kokristallisation die Zeit für die Ligandenbindung lang genug ist, sollte bei identischen aktiven Zentren der Ligand in allen Untereinheiten in der gleichen Konformation und Orientierung vorliegen. Eine Erklärungsmöglichkeit könnte der saure Kristallisationspuffer sein, so dass durch Vereinigung der Protein-Substrat-Lösung mit der Reservoirolösung die Reaktion mit dem Substrat gestoppt wird. Wenn aufgrund von Halbzentrenaktivität die Untereinheiten des Oligomers unterschiedlich schnell mit dem Substrat interagiert haben, könnte das die verschiedenen Konformationen erklären. Der einzige Hinweis auf eine mögliche Halbzentrenaktivität findet sich durch die Größe der Amplituden der *pre-steady-state*-Kinetik (Kapitel 3.6.3). Die Gesamtamplitude ist nur etwa halb so groß wie erwartet. Das gleichzeitige Auftreten verschiedener Konformationen kommt nur in Strukturen von TA im Komplex mit nicht-natürlichen Substraten vor. Die Dichten sind durchweg schlechter definiert, was darauf hindeutet, dass diese Zuckerphosphate schlechter binden. Es ist also auch möglich, dass in allen Untereinheiten alle Konformere gleichzeitig vorliegen und nur jeweils eine Spezies höher populiert ist als in der Nachbaruntereinheit.

3.6 V-S-Charakteristik

3.6.1 *steady-state*-Kinetiken

In einem Sequenzvergleich mit Aldolasen, klassischen Transaldolasen und Transaldolasen der Unterfamilie 4 konnten Reste identifiziert werden, die in der ganzen Transaldolasefamilie konserviert sind (THORELL *et al.*, 2002) und Reste, die charakteristisch für einzelne Unterfamilien sind. Die verschiedenen Aktivitäten als Fruktose-6-phosphataldolase oder Transaldolase sind sehr wahrscheinlich diesen Unterschieden zuzuschreiben. *TacTA*, die in genanntem Sequenzvergleich nicht mit untersucht wurde, zeigt an entsprechenden Stellen alle Reste, die eine Transaldolaseaktivität voraussagen (Ser58, Glu60, Asn108, Leu110, Phe113, Ser130, Phe132, Arg169), die auch im Aktivitätstest bestätigt werden konnte.

In Abb. 3.42 sind exemplarisch die Progresskurven der *v*-S-Charakteristik und die Michaelis-Menten-Auftragung von Wt-*TacTA* gezeigt. Bei dieser Messung wurde die Konzentration von E4P konstant gehalten und die F6P-Konzentration variiert.

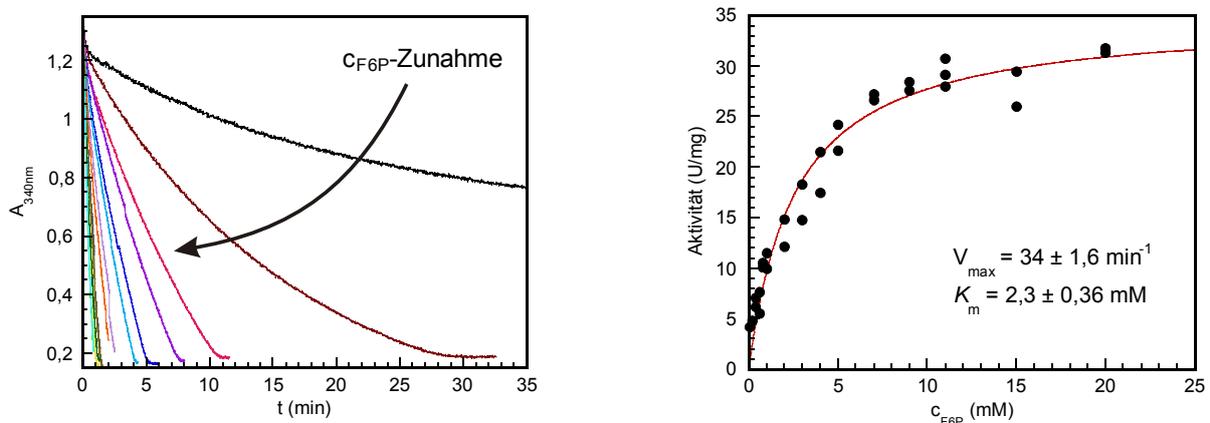


Abb. 3.42 Progresskurven durch Umsatz von F6P und E4P durch Wt-*TacTA* und Michaelis-Menten-Auftragung. 0,011 mg/ml TA, 1 mM E4P, F6P von 0,05 – 20 mM variiert, 20 mM GlyGly, pH 7,5, 5 U/mg GDH, 50 U/mg TIM, 0,24 mM NADH, 30 °C.

Es ist zu sehen, dass die Messkurven ab einer Absorptionsdifferenz von etwa 0,5 beginnen abzuknicken. Das entspricht einem NADH-Verbrauch von 80 μ M. Das Hilfsenzym GDH hat unter den verwendeten Bedingungen nur bei Konzentrationen zwischen 0,15 und 0,22 mM NADH eine maximale Aktivität. Der Abfall der Geschwindigkeit im hinteren Teil der Progresskurve entsteht somit dadurch, dass die Konzentration von NADH limitierend wird. Es bleibt nur ein geringer Spielraum für die Dauer des Gleichgewichtszustands der Transaldolasereaktion. Die kurze *burst*-Phase zu Beginn der Progresskurve könnte durch die Verunreinigung der E4P-Lösung mit F6P verursacht worden sein

(Anhang 7.8). So findet sich in der Lösung auch ein Anteil von GAP, der direkt von den Hilfsenzymen umgesetzt werden kann.

In Tab. 3.5 sind die im gekoppelten enzymatischen Test bestimmten kinetischen Parameter für den Wt sowie die Aktive-Zentren-Varianten zusammengestellt. Die Michaeliskonstanten für das Wt-Enzym von $2,30 \pm 0,36$ mM für F6P und $0,64 \pm 0,13$ mM für E4P liegen im gleichen Bereich wie die aus der Literatur bekannten Werte von $0,056 - 6,66$ mM für F6P und $0,007 - 0,555$ mM für E4P, je nach Ursprungsorganismus (PONTREMOLI *et al.*, 1960; TSOLAS UND HORECKER, 1970; KUHN UND BRAND, 1972; ALBE, 1991; SPRENGER *et al.*, 1995; SODERBERG UND ALVER, 2004; KOURTOGLOU *et al.*, 2008). Bei 30 °C zeigt *TacTA* eine spezifische Aktivität von $34 - 40,7$ U/mg, was bezogen auf das Monomer einem k_{cat} von $13,86 - 16,61$ s⁻¹ entspricht. Damit ist *TacTa* bei 30 °C etwa nur ein Fünftel so aktiv wie Transaldolase B aus *E. coli* mit $71,4 - 79,37$ s⁻¹ (SCHÖRKEN *et al.*, 2001). Bei 60 °C erreicht das thermophile Enzym einen k_{cat} -Wert von 168 s⁻¹, was etwa das Doppelte der Wechselzahl von *E. coli* ist.

Tab. 3.5 Zusammenfassung der im gekoppelten enzymatischen Test bestimmten enzymkinetischen Parameter für das Wildtypenzym *TacTA* und die Varianten. Die Messung erfolgte bei pH 7,5 und 30 °C. Der k_{cat} -Wert bezieht sich auf die molare Masse des Monomers.

Protein	F6P			E4P		
	K_m (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (M·s) ⁻¹	K_m (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (M·s) ⁻¹
Wt	$2,30 \pm 0,36$	$13,86 \pm 0,65$	6037,21	$0,64 \pm 0,13$	$16,61 \pm 1,11$	25954,81
E60Q	$0,49 \pm 0,13$	$0,12 \pm 0,005$	234,64	$0,06 \pm 0,01$	$0,24 \pm 0,005$	4140,01
D6N	$19,40 \pm 3,23$	$0,36 \pm 0,024$	18,35	$0,82 \pm 0,08$	$0,39 \pm 0,015$	474,66
T110V	$28,10 \pm 4,01$	$0,06 \pm 0,003$	2,05	$0,01 \pm 0,002$	$0,05 \pm 0,001$	4675,78
F132Y	$23,91 \pm 4,09$	$0,17 \pm 0,008$	7,18	nicht bestimmt		
K86A	keine Aktivität			keine Aktivität		

Alle untersuchten Varianten mit Austausch im aktiven Zentrum haben eine Restaktivität von etwa 1 %. Die angegebenen Aktivitäten sind allerdings dadurch relativiert, dass sie entsprechend der Aktivität der Enzymvariante bei unterschiedlichen Proteinkonzentrationen ermittelt wurden. Die kinetischen Daten sind somit durch das Vorliegen von verschiedenen Oligomerenverteilungen und den unterschiedlichen k_{cat} -Werten der Oligomerenspezies (3.3.6 und 3.3.7) nicht völlig vergleichbar. Bei einem K_D des Pentamer-Dekamer-Gleichgewichts von $0,44$ µM lagen bei der Messung mit Wt 50 % des Enzyms als Dekamer vor. Hingegen betrug der Anteil der dekameren Spezies im Messansatz bei den Varianten 88 – 93 %. Da die ausgetauschten Seitenketten nicht an Interaktionen zur Dekamer-

bildung beteiligt sind, sollten die Varianten auch kein verändertes Oligomerisierungsverhalten zeigen.

Die Variante K86A zeigte, wie erwartet, keine Aktivität, was Lys86 als den Schiffbasen bildenden Lysinrest bestätigt. Da für Glu60 die Funktion des Säure-Base-Katalysators angenommen wird, war der starke Aktivitätsverlust der Variante erwartet. Die Substratbindung scheint nicht beeinflusst zu sein. Während E60Q sogar eine leichte Abnahme der K_m -Werte für die Substrate F6P und E4P aufweist, ist die Affinität zum Donorsubstrat F6P bei den Varianten D6N, T110V, F132Y um eine Größenordnung gesunken. Asp6, Thr110 und Phe132 sind also wichtig für die Bindung des Donorsubstrats. Eine mögliche Erklärung dieser Effekte gibt ein Blick auf die Röntgenkristallstrukturen. Glu60 und Thr110 koordinieren das an den Protonentransferprozessen beteiligte Wassermolekül. Durch die isosterische Mutation T110V fehlt einer der Interaktionspartner und es kommt zu einer Verschiebung des Wassermoleküls um bis zu 1 Å. Nach postuliertem Mechanismus vermittelt das Wasser nicht nur Protonenübertragungen zur Aktivierung des Lysins und bei der Bindungsspaltung zwischen C3 und C4 des Donorzuckers, sondern auch zur Substratbindung und Schiffbasen-Bildung. Dadurch könnte der erhöhte K_m für das Donorsubstrat der Variante T110V erklärt werden. In der TA-F6P-Struktur sieht man, dass die Threonin-Seitenkette nicht nur das Wasser koordiniert, sondern auch Wechselwirkungen mit der C1-OH-Gruppe eingehen kann. Analog zu der Diskussion der Rolle von Ser176 (entspricht Ser130 in *TacTA*) in *E. coli* (SCHÖRKEN *et al.*, 2001) kann es wichtig für die Ausrichtung des Substrats für die Schiffbasen-Bildung sein. Auch diese Interaktion entfällt in der Valin-Variante, noch dazu nimmt Valin eine zu Thr110 verschiedene, abgewandte Konformation ein.

In den Strukturen mit Schiffbasen-Addukt ist Asp6 in geeigneter Position um H-Brücken-Bindungen mit den Hydroxylgruppen an C3 und C5 eingehen zu können. Asp6 muss dafür deprotoniert vorliegen. Die Funktion als zweifacher H-Brücken-Akzeptor ist durch den Austausch zu Asn gestört. Das Substrat kann schlechter binden, was sich im erhöhten K_m widerspiegelt.

Die stark reduzierte Aktivität der Variante D6N unterstützt die anhand der Michaeliskomplexe von F6P in der Variante K86A und S6P im Wt gefasste Theorie, dass Asp6 nicht allein wichtig für die korrekte Ausrichtung des Substrats zur Bindungsspaltung ist, sondern als Säure auch Schritte der Reaktion katalysiert.

F132Y zeigt eine schwache Aldolaseaktivität. Die angegebenen Werte entstammen einer Messung ohne Akzeptorsubstrat. Der erhöhte K_m könnte dadurch begründet sein, dass Tyrosin durch die OH-Gruppe mehr Raumbedarf hat als Phenylalanin. Die OH-Gruppe hat das katalytische Wasser verdrängt, ist aber selbst noch 2,3 Å von dessen ursprünglicher Position entfernt. Nach Berechnung mit

PROPKA beträgt der pKa der Seitengruppe 11,05 und wäre somit in der Lage nur wenig langsamer als diffusionskontrolliert Protonen der C4-OH-Gruppe ($pK_a = 12 - 13$, DEAN, 1992) zu abstrahieren.

Bei Mutation der entsprechenden Aminosäuren in TA aus *E. coli* zeigen die Varianten einen vergleichbar starken Aktivitätsverlust (SCHÖRKEN *et al.*, 2001). Im Gegensatz zu den *TacTA*-Varianten kommt es aber nicht zum Anstieg des K_m -Wertes für F6P. Für das Akzeptorsubstrat bleibt die Michaeliskonstante bei den Varianten annähernd gleich, nur die Variante D17A (entspricht D6 in *TacTA*) weist eine Verfünffachung des K_m -Wertes für E4P auf. Für das *E. coli*-Protein wurde auch gezeigt, dass sich der Aktivitätsverlust bei Mutation des Glutamats und Aspartats nicht durch eine Verschiebung des pH-Optimums erklären lässt.

3.6.2 Aldolaseaktivität der Variante F132Y

Wt-TA zeigte erst bei Zugabe des Akzeptorsubstrats im gekoppelten enzymatischen Test sichtbare Aktivität, während F132Y F6P auch ohne Anwesenheit von E4P umsetzen konnte, wenn auch nur mit geringer Aktivität. Bei Fruktose-1,6-bisphosphat (FBP) ist der Wt etwas reaktiver als die Variante, obschon von beiden dieses nichtnatürliche Substrat nur schwach umgesetzt wird.

Tab. 3.6 Zusammenfassung der im gekoppelten enzymatischen Test bestimmten enzymkinetischen Parameter für das Wildtypenzym *TacTA* und die Variante F132Y zur Untersuchung der Aldolaseaktivität. Die Messung erfolgte bei angegebenem pH und 30 °C. Der k_{cat} -Wert bezieht sich auf die molare Masse des Monomers.

Protein	F6P			FBP		
	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($M \cdot s$) $^{-1}$	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($M \cdot s$) $^{-1}$
pH 7,5						
Wt (+E4P)	2,30 ± 0,36	13,86 ± 0,65	6037,21	8,99 ± 3,84	0,035 ± 0,004	3,846
Wt	n.b.	0,004 (in Tris)		5,67 ± 1,97	0,007 ± 0,001	1,258
F132Y	23,91 ± 4,09	0,172 ± 0,008	7,181	0,32 ± 0,17	2 · 10 ⁻⁴ ± 2,36 · 10 ⁻⁵	0,626
pH6,5						
Wt	n.b.	0,0014		13,64 ± 1,19	0,007 ± 2,28 · 10 ⁻⁴	0,509
F132Y	25,95 ± 1,05	0,12 ± 0,002	4,617	11,76 ± 0,01	0,004 ± 6,47 · 10 ⁻⁵	0,341

Das veränderte Katalyseverhalten der Variante F132Y zeigt sich besonders bei schnellen Kinetiken mittels *stopped-flow*-Technik. In Abwesenheit des Akzeptorsubstrats wird ein einfacher Substratumsatz erwartet. Die Hilfsenzyme entfernen das entstehende Glycerinaldehyd-3-phosphat aus dem Ansatz, Dihydroxyacetonphosphat bleibt als Schiffbase kovalent am Enzym gebunden, so dass TA für

weitere Umsätze blockiert ist. Nur durch Hydrolyse von Dihydroxyaceton kann unter diesen Bedingungen das Enzym für weitere Umsätze bereit gemacht werden.

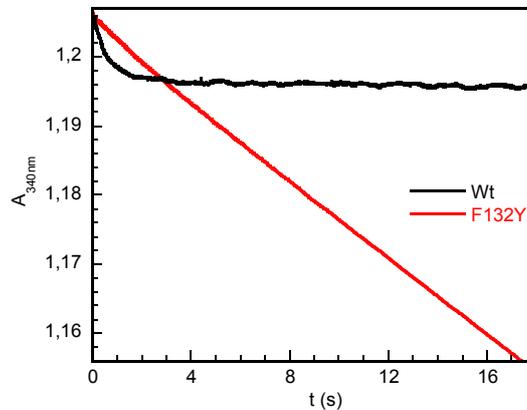


Abb. 3.43 Progresskurven der *pre-steady state* Messungen von Wt-*TactA* und Variante F132Y. Der Wt zeigt einen einfachen Substratumsatz, da das nach der ersten Halbreaktion kovalent am katalytischen Lysin gebundene Carbanion/Enamin eine weitere Reaktion mit Substrat verhindert. Durch die Aldolaseaktivität der Variante F132Y ist mehrfacher Substratumsatz möglich. Nach Spaltung von F6P setzt F132Y beide C3-Produkte frei, so dass Lys86 bereit für weiteren Substratumsatz wird. Messung bei pH7,5 und 30 °C, 0,11 mg/ml Wt, 0,17 mg/ml F132Y, gezeigt sind die Progresskurven bei 1 mM F6P.

Wie beispielhaft in Abb. 3.43 gezeigt, kommt es beim Wt zu einer *burst*-Phase, an die sich ein geringer Anstieg von $6,2 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ bei Substratsättigung anschließt. Dieser kleine Anstieg könnte Ausdruck der Hydrolyse von Dihydroxyaceton aus dem aktiven Zentrum sein und weiterer Umsatz von F6P durch das frei gewordene Enzym. F132Y zeigt keine *burst*-Phase, sondern setzt das Donorsubstrat mit durchgängig linearem Anstieg um. Die Mutation hat die Hydrolyserate auf $8,95 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ erhöht.

Die entsprechenden Austausche F178Y in *E. coli* Transaldolase B und F189Y in humaner TA führen ebenfalls zu erhöhter Aldolaseaktivität (SCHNEIDER *et al.*, 2008). Bei *E. coli* ist dieser Effekt durch den einzelnen Austausch einer Aminosäure besonders stark. Die Aktivität zur Spaltung von F6P wurde mehr als 70fach gegenüber dem Wt erhöht.

3.6.3 *pre-steady-state*-Kinetik

Wie in 3.6.2 beschrieben, lässt sich mit schnellen Kinetiken ohne Einsatz des Akzeptorsubstrats die erste Halbreaktion als einmaliger Umsatz des Donorsubstrats F6P beobachten. Als erste Studie wurde das für den Wildtyp durchgeführt.

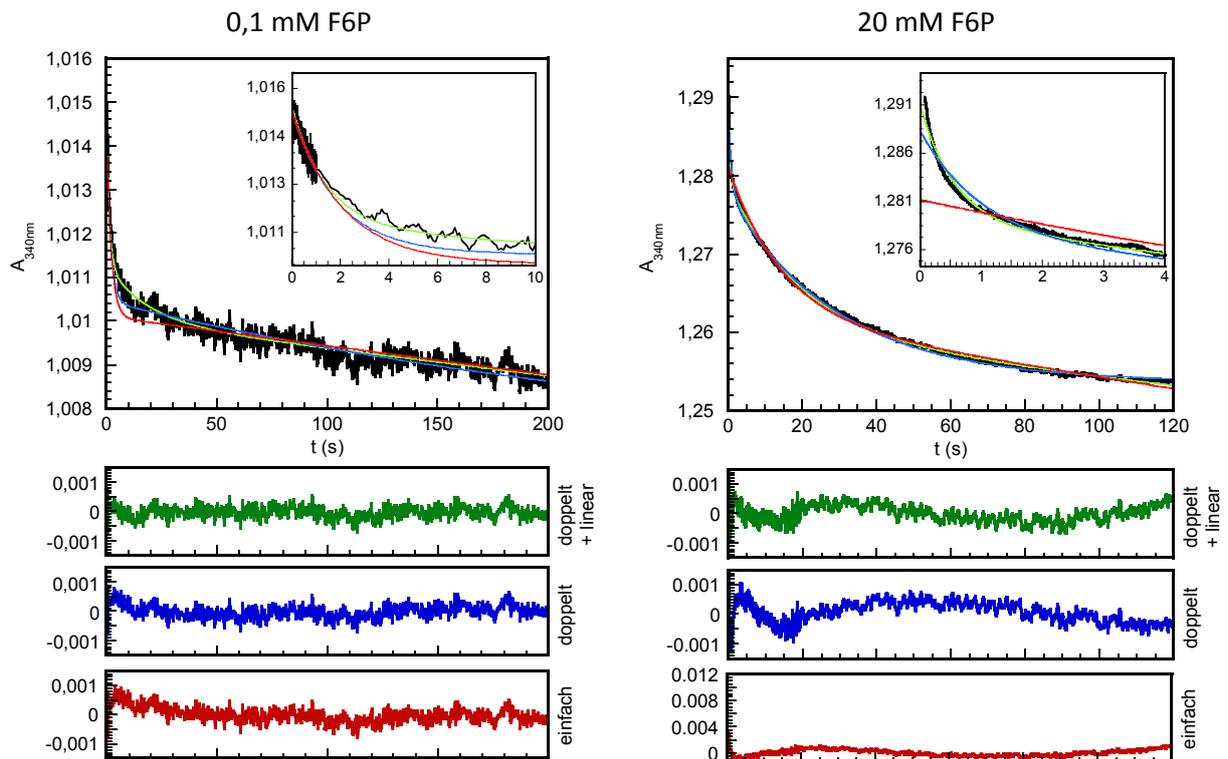


Abb. 3.44 Progresskurven des einmaligen Umsatzes von F6P durch *Wt-TacTA*. 4,5 μ M TA, F6P 0,1 und 20 mM, 20 mM GlyGly, pH 7,5, 100 U/mg GDH, 1000 U/mg TIM, 0,22 mM NADH, 30 °C. Unter den Graphen sind die Residuen für die jeweilige Anpassung aufgetragen. Grün: doppelt exponentiell mit linearem Anstieg, Blau: doppelt exponentiell, Rot: einfach exponentiell mit linearem Anstieg.

Die Progresskurven wiesen mehrere Phasen auf und ließen sich am Besten nach einer doppelt exponentiellen Reaktion 1. Ordnung mit anschließendem linearem Anstieg anpassen. Abb. 3.44 zeigt beispielhaft Progresskurven für 0,01 und 20 mM F6P mit Anpassungen nach Gleichungen für eine doppelt exponentielle Reaktion mit anschließendem linearem Anstieg (grün), doppelt exponentiell (blau) und einfach exponentiell mit anschließendem linearem Anstieg (rot). Die zugehörigen Residuen sind in gleicher Farbcodierung darunter aufgetragen.

Bei kleinen Substratkonzentrationen zeigen sich in den Qualitäten der verschiedenen Anpassungen nur geringe Unterschiede. Augenscheinlich ist, dass eine einfach exponentielle Anpassung nicht ausreicht, um den Verlauf der Kurve wiederzugeben. Bei hohen Substratkonzentrationen zeigen sich die Unterschiede der verschiedenen Anpassungen besonders deutlich in der ersten Phase. Sogar die beste Anpassung nach einer doppelt exponentiellen Funktion mit linearem Anstieg folgt einem etwas zu kleinen Anstieg für die erste Phase. In der Auftragung der Geschwindigkeitskonstanten k_1 gegen die Substratkonzentration zeigt sich daher eine scheinbare Substratüberschusshemmung.

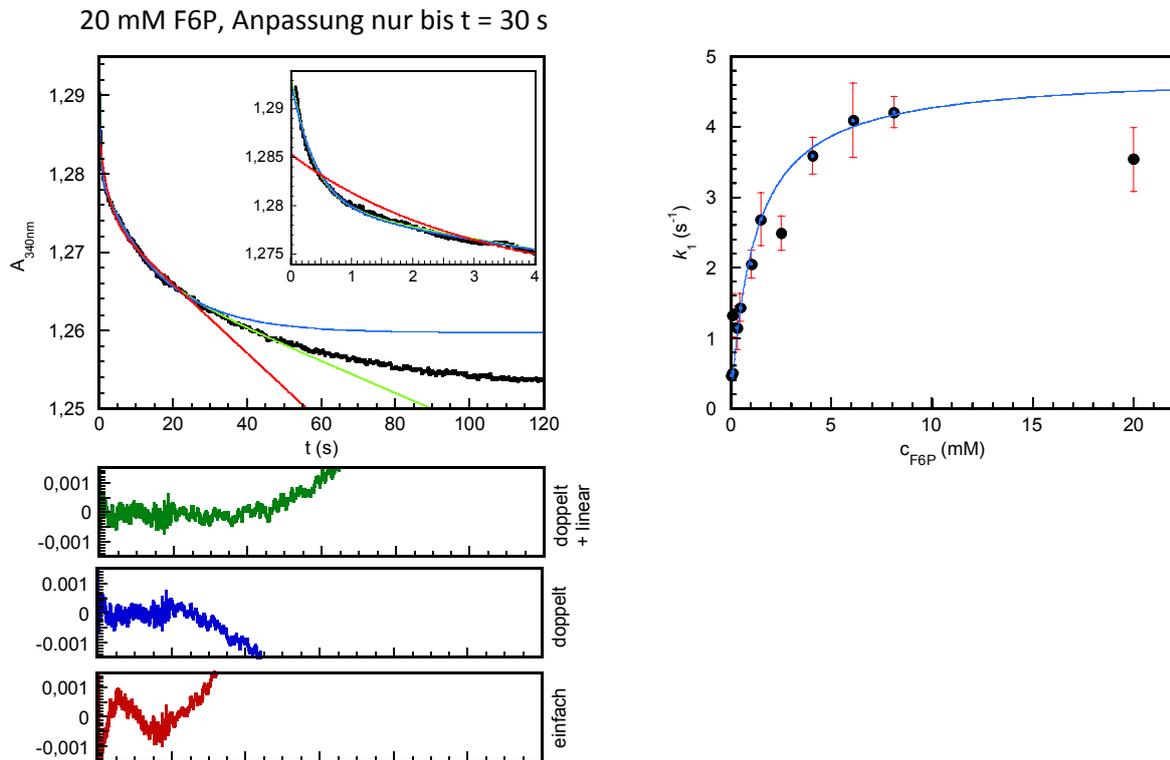


Abb. 3.45 Progresskurve und Michaelis-Menten-Kinetik des einmaligen Umsatzes von F6P durch Wt-TacTA. Die Farbcodierung entspricht Abb. 3.44. Rechts ist die Auftragung der Geschwindigkeitskonstanten der ersten Phase (k_1) gegen die Substratkonzentration dargestellt. Für die Anpassung nach Michaelis-Menten wurden nur die blau markierten Punkte berücksichtigt.

Wenn man den hinteren Teil des linearen 3. Abschnitts der Kurve kürzt, ist es möglich, die 1. exponentielle Phase besser anzupassen. Natürlich wird dadurch die gesamte Anpassung beeinflusst, man kann aber einen Eindruck über die Größe der Anfangsgeschwindigkeit erlangen. In Abb. 3.45 (links) ist dieselbe Progresskurve dargestellt wie in Abb. 3.44 (rechts), aber für die Anpassung wurden nur die Werte bis $t = 30$ s berücksichtigt. Wie man an den Residuen sieht, gibt die Anpassung nach einer doppelt exponentiellen Gleichung mit linearem Anteil in diesem Zeitfenster den Verlauf der Progresskurve besser wieder als wenn man alle Messpunkte einschließt.

Tab. 3.7 zeigt die bei der Untersuchung der ersten Halbreaktion mit F6P für den Wt bestimmten kinetischen Parameter. Alle Messungen wurden bei großem Überschuss der Substratkonzentration über die Proteinkonzentration durchgeführt. Die für die Auftragung verwendeten Geschwindigkeitskonstanten wurden aus Messkurven ermittelt, bei denen der lineare Anteil in den Progresskurven ab 4 mM F6P gekürzt wurde, um die Anpassungsqualität für die erste Phase zu erhöhen. Die kinetischen Parameter k_{\max} und K_S wurden unter Vernachlässigung des Wertes bei 20 mM F6P ermittelt, bei dem das Artefakt der Substratüberschusshemmung zu deutlich auftrat.

Tab. 3.7 Zusammenfassung der mittels *stopped-flow*-Technik bestimmten kinetischen Parameter der ersten Halbreaktion von *TacTA* bei einfachem Substratumsatz. Die Anpassung erfolgte doppelt exponentiell erster Ordnung mit anschließendem linearem Anstieg.

	c (mg/ml)	c (μ M)	k_{1max} (s^{-1})	$K_{S,1}$ (mM)	k_{2max} (s^{-1})	$K_{S,2}$ (mM)	Anteil der Dekamere
Wt	0,11	4,5	4,77 $\pm 0,2$	1,16 $\pm 0,16$	0,22*	n.b.	80 %

n.b. = nicht bestimmbar, *die Datenqualität für k_2 ist schlecht, so dass nur der Endwert bestimmbar ist.

Tab. 3.8 Amplituden der beiden exponentiellen Phasen der Progresskurven der *pre-steady-state*-Kinetik nach doppelt exponentieller Anpassung erster Ordnung mit linearem Folgeanstieg.

Prot.	A_{1max}	A_{2max}	$A_1 + A_2$	$A_{erwartet}$
Wt	0,012	0,0067	0,0187	0,028

Die niedrigen Anstiege von $k_3 = 5 \cdot 10^{-5} s^{-1}$ des linearen Anteils wurden einer geringen Aldolasetätigkeit des Enzyms zugeschrieben. Durch die hohe Konzentration von Hilfsenzymen im Ansatz, die das Produkt GAP durch Umwandlung aus dem Ansatz entfernen, kann man die Halbreaktion als irreversibel annehmen. Das Reaktionsschema der ersten Halbreaktion ist in Abb. 2.2 schematisch dargestellt. Da erst die Produktfreisetzung das Messsignal auslöst, kann die Zweiphasigkeit der Reaktion nicht durch das Auftreten verschiedener Intermediate mit unterschiedlichen Signalintensitäten erklärt werden. Ein Erklärungsansatz bietet die Annahme, dass 2 Enzymspezies vorliegen, die unterschiedlich gut das Substrat umsetzen und nur langsam ineinander umgewandelt werden. Eine Möglichkeit zur Erklärung der Natur der unterschiedlichen Enzymspezies könnten die verschiedenen vorliegenden Oligomerenspezies sein. Mit Annahme des in Kapitel 3.3.6 berechneten K_D -Wertes liegen bei der verwendeten Proteinkonzentration 80 % des Proteins als Dekamer vor. Dieser Erklärungsversuch passt aber nicht mit den zu den beiden Phasen gehörenden Amplituden zusammen. Die schnellere Phase hat einen Amplitudenanteil von 64 % an der Gesamtamplitude. Die schnellere Reaktion sollte von den aktiveren Pentameren ausgelöst sein, die aber gegenüber den Dekameren den geringeren Anteil ausmachen.

Eine andere Möglichkeit bietet das in den Kristallstrukturen beobachtete Auftreten der *conformational selection*. Danach könnte das Substrat schnell an die im geschlossenen Zustand vorliegende Enzymform binden und umgesetzt werden, was der ersten Phase entspricht. Die zweite Phase könnte das wesentlich langsamere Katalyseverhalten der offenen Konformation widerspiegeln oder der sukzessiven Umwandlung von offener in geschlossene Konformation entsprechen, die dann weiteres Substrat binden kann. Bisher gibt es keine Informationen darüber, wie schnell die offene und geschlossene Konformation bei *TacTA* ineinander umgewandelt werden können. Bei Triosephosphat-

isomerase wurden *loop*-Bewegungen mit einer Geschwindigkeitskonstante von 3000 s^{-1} gemessen, aber als natürliche Bewegung des Enzyms und nicht durch einen Liganden verursacht interpretiert (WILLIAMS UND McDERMOTT, 1995). Bei Dehydrofolatreduktase (DHFR) aus *E. coli* und Flavodoxin aus *Desulfovibrio desulfuricans* wurden langsamere Raten für Konformationswechsel gefunden. Bei DHFR wurden Raten zur Umwandlung in die Konformation mit höherer Affinität für den Liganden von 1000 s^{-1} bzw. 20 s^{-1} gemessen, je nachdem ob der Ligand nach einem *induced-fit*-Mechanismus bereits gebunden ist oder der Konformationswechsel ohne Ligand erfolgt (BOEHR *et al.*, 2006). Konformationsänderungen bei Flavodoxin als Faltungsprozess zur Cofaktorbinding wurden mit 46 s^{-1} (ohne Ligand) und 568 s^{-1} (mit Flavinmononukleotid) bestimmt. Die Geschwindigkeitskonstanten der Rückreaktion als Entfaltung des Proteins waren noch langsamer im Zeitrahmen von $0,005 - 0,009\text{ s}^{-1}$ (MURALIDHARA *et al.*, 2006).

Dass die beiden Enzymzustände durch eine protonierte und unprotonierte Form des katalytischen Lysins entstehen, ist auszuschließen, falls Glu60 das katalytische Lysin zur Aktivierung deprotoniert. Bei diesem Protonendonator/-akzeptorpaar ergibt sich $\Delta\text{pK}_a = \text{pK}_a(\text{Akzeptor}) - \text{pK}_a(\text{Donor}) = -2,46$ (Werte nach Tab. 3.1). Bei einem solchen pK_a -Unterschied sollte der Protonentransferprozess von Lysin auf Glutamat mit einer Geschwindigkeit ablaufen, die nur 3 Größenordnungen unter diffusionskontrolliert liegt (EIGEN, 1963).

Die Gesamtamplitude der Reaktion ist nur wenig mehr als die Hälfte der erwarteten Amplitude. Ein solcher Befund könnte auf eine Halbzentrenaktivität hinweisen. Im Dekamer könnte eine negative Kooperativität zwischen den beiden pentameren Ringen bestehen. Das würde auch die auf die Anzahl aktiver Zentren bezogene niedrigere Aktivität der Dekamere erklären. Halbzentrenaktivität wurde auch für TA aus der Hefe *Candida utilis* gefunden, wobei nur die Geschwindigkeitskonstante der Spaltungsreaktion, aber nicht die Substratbindung von der negativen Kooperativität betroffen war (TSOLAS UND HORECKER, 1976). Für TA aus *E. coli* wurde eine Halbzentrenaktivität widerlegt, da Monomere die gleiche Reaktivität zeigten wie die natürlich vorkommenden Dimere (SCHÖRKEN *et al.*, 1998).

3.6.4 Kompetitive Hemmung durch Sorbitol-6-phosphat und Xylulose-5-phosphat

Es wurde der Effekt von S6P und X5P auf die Reaktion von TA mit F6P und E4P untersucht, wobei die Konzentration von E4P konstant blieb und F6P variiert wurde. Für beide Substratanaloga wurde ein kompetitiver inhibitorischer Effekt gefunden.

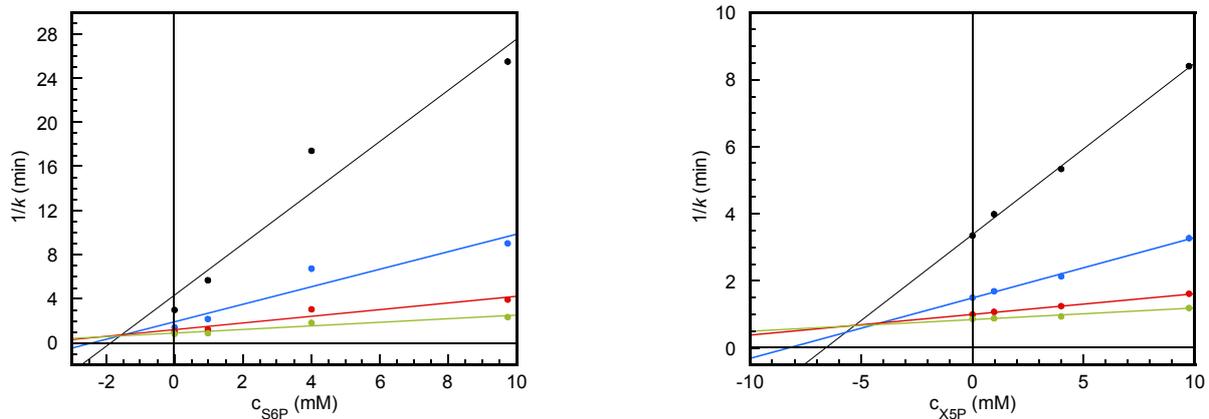


Abb. 3.46 Inhibitorischer Effekt von S6P und X5P auf die Aktivität von TacTA. Links: Inhibitorischer Effekt von S6P, Rechts: Inhibitorischer Effekt von X5P. Die Konzentrationen für beide Inhibitoren sind: Schwarz: ohne Inhibitor, Blau: 0,975 mM, Rot: 4 mM, Grün: 9,75 mM.

S6P zeigt die gleiche Anordnung der OH-Gruppen wie F6P, nur dass die Ketogruppe an C2 reduziert ist und S6P keine kovalente Bindung mit Lys86 mehr ausbilden kann. X5P hat die gleiche Konfiguration wie F6P, inklusive Ketogruppe, ist aber kürzer als das natürliche Donorsubstrat. Mit einem K_i von 1,71 mM ist S6P ein stärkerer Inhibitor als X5P, für das ein K_i von 5,16 mM ermittelt wurde. Vergleicht man die Positionen, an denen S6P und X5P im Vergleich zu den natürlichen Donorsubstraten F6P und S7P binden, sieht man, dass beide Substratanaloga unabhängig von ihrer Länge mit der Phosphatgruppe am Phosphatbindemotiv gehalten werden (Kapitel 3.5.5.4, 3.5.5.2 und 3.5.11). Die Ähnlichkeit zwischen den Substraten ist also nicht von C1 ausgehend zu suchen, sondern bezüglich der Phosphatgruppen. Vergleicht man die Konfigurationen der C-Atome ausgehend von der Phosphatgruppe, entspricht die Reihenfolge der Anordnung von S- und R-konfigurierten C-Atomen von S6P stärker denen von F6P und S7P als das bei X5P der Fall ist. S6P ist den natürlichen Substraten konfigurativer ähnlicher. Zusätzlich hat es überhaupt mehr Hydroxylgruppen als X5P um die Bindeplätze für OH-Gruppen zu besetzen. Dadurch könnte ein Teilaspekt der stärkeren Hemmwirkung von S6P erklärt werden. Welche enthalpischen und entropischen Effekte im Ganzen eine Rolle spielen ist anhand dieser Messung nicht zu sagen.

3.6.5 Analyse des Katalysemechanismus

Dass die Zweisubstratreaktion der Transaldolase nach einem Ping-Pong-Mechanismus abläuft, wurde für die Enzyme aus *Candida utilis* (KUHNS UND BRAND, 1973), *Dictyostelium discoideum* (KOURTOGLOU *et al.*, 2008) und *Fusarium oxysporum* (ALBE, 1991) gezeigt.

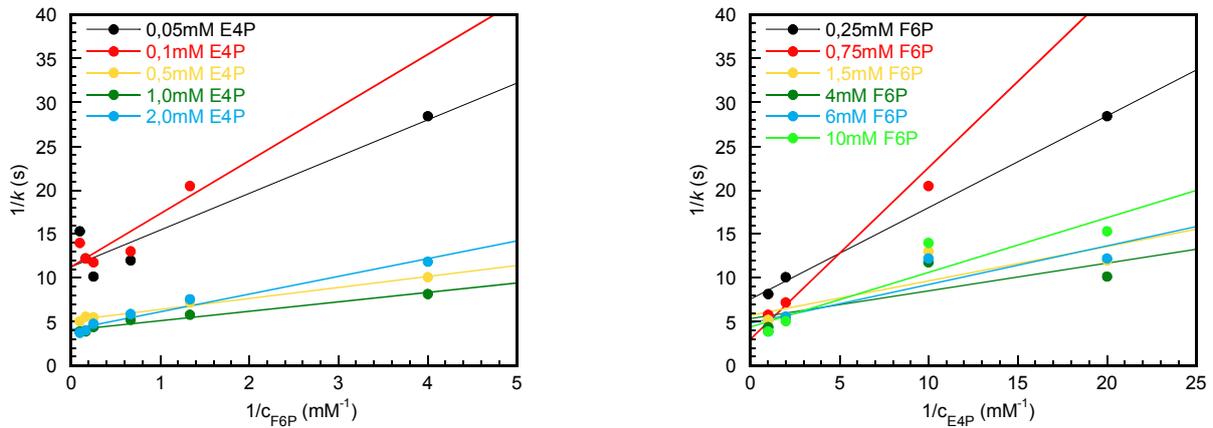


Abb. 3.47 Lineweaver-Burk-Auftragung der Zweisubstratreaktion von *TacTA*.

Für eine Zweisubstratreaktion mit Ping-Pong-Mechanismus würde man in der doppelt rezipoken Auftragung parallele Geraden erwarten. Die sich schneidenden Geraden bei *TacTA* lassen eher einen geordnet sequentiellen Mechanismus mit Auftreten eines Ternärkomplexes vermuten (Abb. 3.47). Allerdings sind die durchgeführten Messungen mit den kommerziellen Substraten stark fehlerbehaftet. Nach Herstellerangaben betrug die Reinheit von E4P je nach Charge 61 – 81 %. Eine Analyse der E4P-Lösung mit ESI-MS ergab einen hohen Grad an Verunreinigung, so dass das 0,4fache der E4P-Konzentration an F6P enthalten ist (Anhang 7.4). Zusätzlich kommt es zu einer Substratüberschuss-hemmung, wobei hohe Konzentrationen an E4P das Donorsubstrat F6P kompetitiv inhibieren. Die Messkurven bei hohen Konzentrationen von E4P zeigen eine *lag*-Phase (Abb. 3.48).

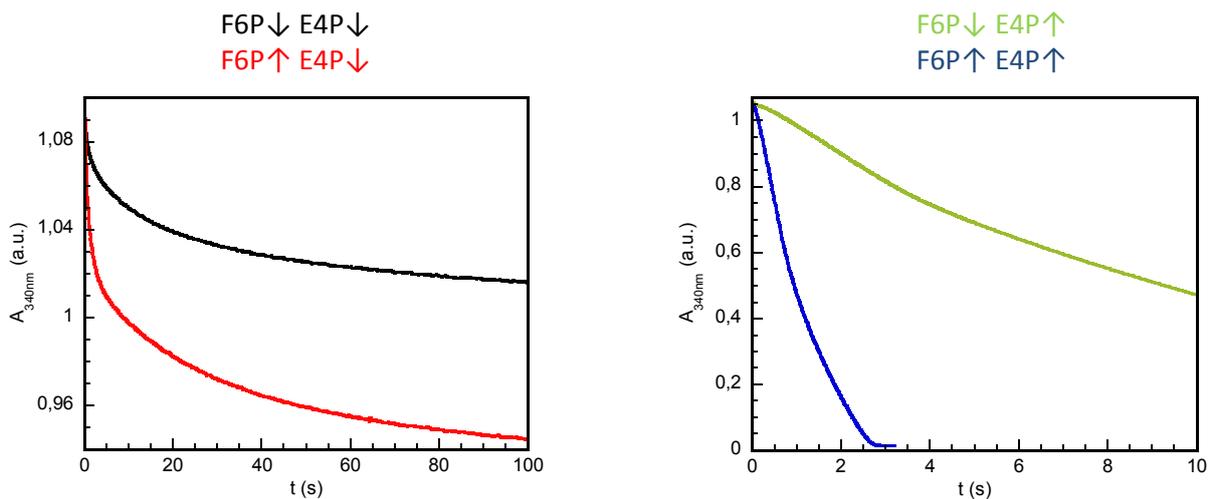


Abb. 3.48 *stopped flow*-Progresskurven von *TacTA* bei Umsatz von unterschiedlichen Konzentrationen von F6P und E4P. Schwarz: 0,25 mM F6P und 0,05 mM E4P, Rot: 10 mM F6P und 0,05 mM E4P, Grün: 0,25 mM F6P und 2 mM E4P, Blau: 10 mM F6P und 2 mM E4P.

Bei sehr niedriger Konzentration von E4P tritt eine *burst*-Phase auf. Die geringe Konzentration des Akzeptorsubstrats wirkt hier limitierend für die Reaktion, so dass die Progresskurven denen der *pre-steady-state*-Messungen ähneln. Die *burst*-Phase entspricht der Freisetzung des ersten Produkts GAP. Wenn E4P verbraucht ist, bleibt die Reaktion auf der Stufe der DHA-Schiffbase stehen. Einen weiteren Einfluss auf den Verlauf der Progresskurven hat der Verbrauch von NADH. Nach einer kurzen Phase im Gleichgewicht kommt es zum Abknicken der Kurven. Durch diese verschiedenen Einflüsse ist es schwierig, bei Variation der Substratkonzentrationen die Geschwindigkeit der Reaktion im *steady state* zu erfassen.

Anhand der Röntgenkristallstrukturen ist nur ein Ping-Pong-Mechanismus vorstellbar, da es nur eine Phosphatbindestelle gibt und der Substratkanal so schmal ist, dass kein Platz für die gleichzeitige Bindung zweier Substrate vorhanden ist.

3.6.6 Lösungsmittelisotopieeffekt

Die Messung des kinetischen Lösungsmittelisotopieeffekts erfolgte, um Informationen über den Übergangszustand des geschwindigkeitsbestimmenden Schritts der Reaktion zu erhalten. Untersucht wurde die erste Halbreaktion bei einmaligem Substratumsatz. Der postulierte Mechanismus geht davon aus, dass die wichtigsten Schritte in der Katalyse der TA durch Säure-Base-Katalyse ablaufen. Es ist also anzunehmen, dass die Protonentransferprozesse durch D_2O als Lösungsmittel beeinflusst sind und man Indizien über die Art und Anzahl der am Prozess beteiligten Protonen erhalten kann. Da bei den massenspektrometrischen Untersuchungen das Gleichgewicht stark auf der Seite des Immoniumintermediats vor der Bindungsspaltung lag, wurde die Spaltung des Donorsubstrats als geschwindigkeitsbestimmender Schritt angenommen. In Abb. 3.26 ist der Protonentransfer zur Bindungsspaltung skizziert. Es wird erwartet, dass am geschwindigkeitsbestimmenden Schritt 2 Protonen beteiligt sind und einen Beitrag zu einem kinetischen Lösungsmittelisotopieeffekt leisten.

Für *TacTA* wurde ein inverser kinetischer Lösungsmittelisotopieeffekt gefunden (Abb. 3.49, A). Da Deuterium die Seite eines Gleichgewichts bevorzugt, in dem die Bindung zu Protonen stärker ist, kann man schlussfolgern, dass die Bindung von Protonen im Übergangszustand gegenüber dem Grundzustand gestärkt wurde. Der beobachtbare kinetische Lösungsmittelisotopieeffekt ist aber immer das Produkt aller auftretenden einzelnen Isotopieeffekte. Über die Form der Kurve kann man Rückschlüsse über die Art und Anzahl der beteiligten Protonen ziehen. Die Form der Kurve in Abb. 3.49 (A) weicht von der Linearität ab und ist leicht nach oben gekrümmt. Somit sind nicht nur 1, sondern mehrere Protonen am Prozess beteiligt.

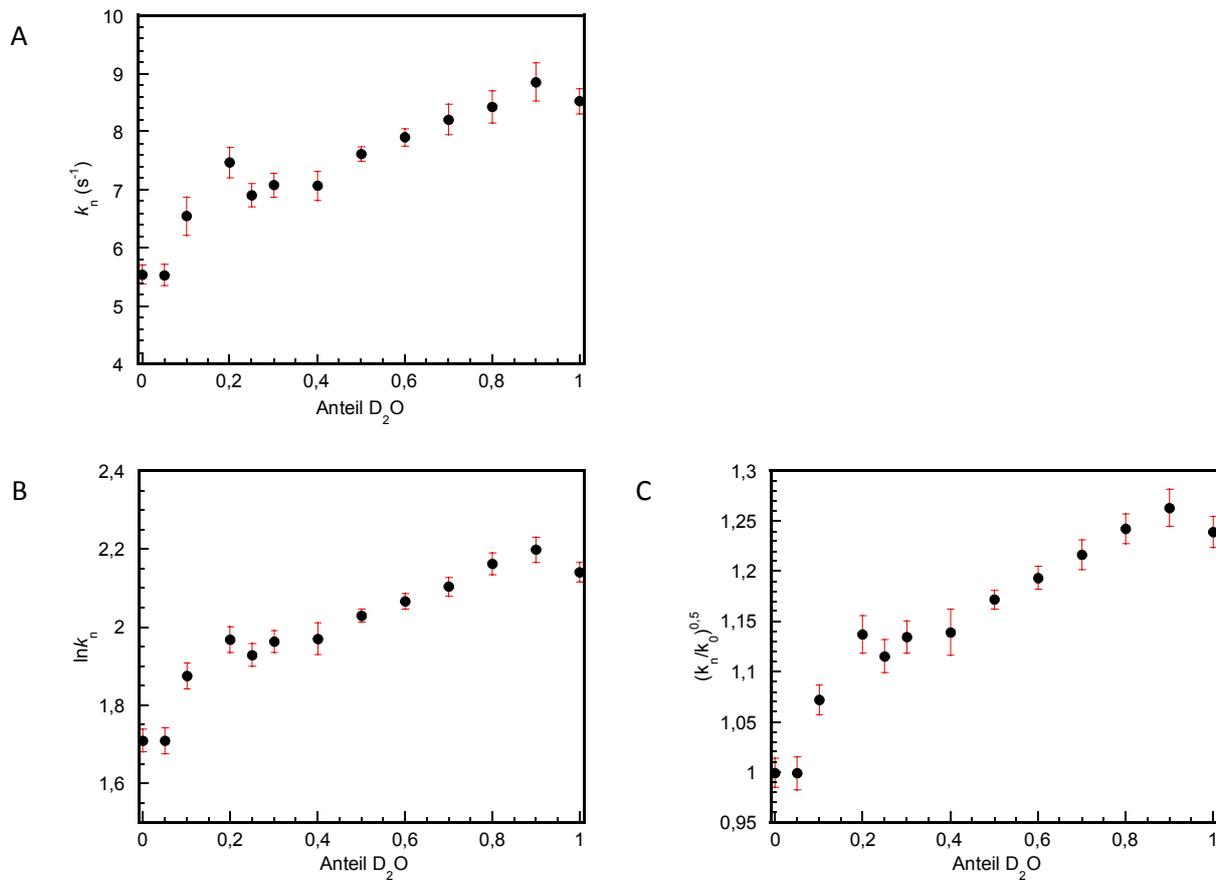


Abb. 3.49 Inverser kinetischer Lösungsmittelisotopieeffekt bei TacTA. Die Messung erfolgte mit 0,11 mg/ml TA bei pH 7,5 und 30°C. k_n ist die Geschwindigkeitskonstante bei einem Anteil n an D₂O. Erklärungen sind im Text zu finden.

Weitere Auftragnungen sind möglich, um etwas über die beteiligten Protonen zu erfahren. Wenn die Auftragung der Quadratwurzel aus dem Quotienten der Geschwindigkeitskonstanten bei einem bestimmten Anteil von D₂O, k_n , und der Geschwindigkeitskonstante in H₂O, k_0 , gegen den Anteil an D₂O, n , linear ist [$(k_n/k_0)^{0.5}$ vs. n], so sind 2 Protonen, die den gleichen Isotopieeffekt beitragen, am Mechanismus beteiligt. Bei einer linearen Form der Auftragung $\ln k_n$ vs. n gibt es viele kleine Beiträge vieler Protonen. Die genannten Zusammenhänge sind bei SCHOWEN, 1978 nachzulesen und kurz im Methodenteil (Kapitel 2.2.6) zusammengestellt. Da keine der Auftragungen linear ist, kann man davon ausgehen, dass 2 Protonen mit unterschiedlichen Beiträgen oder mehr als 2 Protonen am Prozess beteiligt sind. Wenn die C3-C4-Bindungsspaltung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Reaktion ist, sollten, nach gegenwärtiger Annahme des Reaktionsmechanismus, nicht mehr als 2 Protonen einen Effekt geben. Es war nicht möglich mittels polynomialer Anpassungen sinnvolle Interpretationen zu finden. Aufgrund der mangelnden Datenqualität kann man keine weiteren Aussagen über Anzahl und Art der am Katalyseschritt beteiligten Protonen treffen.

4 Zusammenfassung

Das Gen für das Transaldolase-Wt-Protein aus *Thermoplasma acidophilum* und die Varianten D6N, E60Q, E60A, T110V sowie F132Y wurde erfolgreich heterolog in *E. coli* exprimiert. Es konnte ein Reinigungsschema für die Proteine etabliert und mittels Massenspektrometrie die gereinigten Proteine als die Zielproteine bestätigt werden.

TacTA zeigt das Fern-UV-CD-Spektrum eines Proteins mit α - und β -Sekundärstrukturanteilen. Im gekoppelten enzymatischen Test wurde die Aktivität einer Transaldolase bestätigt. Der K_m -Wert für das Donorsubstrat F6P beträgt 2,3 mM und für das Akzeptorsubstrat E4P 0,64 mM (pH = 7,5; T = 30 °C). Das pH-Optimum von *TacTA* liegt zwischen pH 7,1 – 8,32, wobei diese pH-Grenzen den aktiven Gruppen Glu60 und Lys86 des aktiven Zentrums zugeordnet wurden. *TacTA* reagiert empfindlich auf durch NaCl erhöhte Ionenstärken. Die Geschwindigkeit der Reaktion der *TacTA* nimmt bis 60 °C exponentiell zu, was die Lebenstemperatur des thermophilen Organismus *Thermoplasma acidophilum* ist. Die Aktivierungsenergie der Reaktion bei 25 °C wurde als 65,32 kJ/mol bestimmt. Das Enzym zeigte über 40 Tage bei 60 °C in 20 mM GlyGly-Puffer nur geringen Aktivitätsverlust, während es bei höheren Temperaturen (80 °C, 90 °C) innerhalb weniger Stunden bzw. Minuten seine Aktivität verlor. Die freie Aktivierungsenthalpie der Hitzeinaktivierung betrug bei 30 °C 144,63 kJ/mol.

Es konnte ein massenspektrometrischer Assay zur Detektion von während der Reaktion auftretenden Intermediaten entwickelt werden. Durch Abstoppen der Reaktion mittels Säure-*quench* konnte die Intermediatverteilung für das Wt-Protein und die Varianten festgehalten und nach verschiedenen Reaktionszeiten untersucht werden. Die kovalenten Intermediat-Enzym-Komplexe wurden anhand ihrer Molekülmasse sowie der Massenverschiebung bei Reaktion mit D-[UL-¹³C₆]-F6P nachgewiesen.

Es wurden angelehnt an JIA *et al.*, 1996b und THORELL *et al.*, 2000 Bedingungen für die Kristallisation von *TacTA* gefunden. Die Röntgenkristallstrukturen von *TacTA* sowie allen Varianten konnten durch *molecular replacement* gelöst werden. In den Kristallstrukturen ist die Quartärstruktur von *TacTA* ein Homodekamer, aufgebaut aus zwei pentameren Ringen. Dabei zeigt *TacTA* das bereits für die strukturell verwandte FSA beschriebene *intersubunit helix swapping* (THORELL *et al.*, 2002). Daten analytischer Ultrazentrifugation zeigen, dass auch pentamere *TacTA* als physiologische Einheit auftreten kann. Dabei zeigen Pentamere und Dekamere unterschiedliche k_{cat} -Werte, wobei die Dekamere inaktiver sind. Dieser Befund und das Auftreten von nur etwa der halben Amplitude bezüglich des erwarteten Wertes in *pre-steady-state*-Messungen bei Vorliegen von 80 % Dekameren könnte auf eine Kommunikation zwischen den pentameren Ringen im Sinne einer negativen Kooperativität

hinweisen. Das TA-Monomer bildet wie alle TA ein achtgliedriges α/β -barrel Motiv mit dem katalytisch aktiven Lys86 auf $\beta 4$.

Es ist erstmalig gelungen, durch Kokristallisation mit den natürlichen Donorsubstraten F6P und S7P, sowie dem natürlichen Akzeptorsubstrat E4P Momentaufnahmen von während der Katalyse von TacTA auftretenden Intermediaten zu erhalten. Dabei wurden, wie auch bei den mit Massenspektrometrie bestimmten Intermediatverteilungen, beim Wt nur Schiffbasen-Komplexe vor Spaltung der C3-C4-Bindung gefunden. Aus beiden Methoden kann man schlussfolgern, dass das Carbinolamin nur transient gebildet wird und die Bindungsspaltung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Reaktion ist. Weiterhin konnten nichtkovalente Komplexe durch Kokristallisation mit verschiedenen Zuckerphosphaten, die keine natürlichen Substrate sind, erhalten werden.

Im Grundzustand ist der Substratkanal mit einem Netzwerk aus Wassermolekülen gefüllt, deren Positionen den favorisierten Bindeplätzen für die OH-Gruppen der Zuckerphosphatsubstrate entsprechen. Ein Phosphatbindemotiv aus 2 Argininen (Arg135 und Arg169) und dem Sauerstoffatom der Peptidbindung von Ser167 bindet die Zuckerphosphate unabhängig von ihrer Länge auf 2 Arten, die sich nur durch eine Bindungslänge unterscheiden. Alle Zuckerphosphate wurden in offenkettiger Form gebunden, obwohl die Keto- bzw. Aldoform der verwendeten Zucker in Lösung nur gering populiert ist. TacTA zeigt im Bereich der ringäußeren Helices $\alpha 1$, $\alpha 2$ und $\alpha 3$ und Faltblatt $\beta 2$ zwei Konformationen, die zu einer Verengung bzw. Weitung des Substratkanals führen und als geschlossene bzw. offene Konformation benannt wurden. Da keine Schiffbasen-Komplexe in der offenen Enzymform gefunden wurden, kann man annehmen, dass die Bindung von Donorsubstraten nach einem *conformational-selection*-Mechanismus selektiv an die geschlossene Form des Enzyms erfolgt.

Durch die Orientierung der kokristallisierten Substrate relativ zu den Aminosäureseitenketten des aktiven Zentrums ist eine Revision des von JIA *et al.*, 1997 bzw. aktuell von SAMLAND UND SPRENGER, 2009 vorgeschlagenen Mechanismus notwendig (Abb. 4.1).

Wie für D-2-Deoxyribose-5-phosphat-Aldolase (DERA) angenommen, geht der neu vorgeschlagene Reaktionsmechanismus von einem deprotonierten Lys86 aus. Lys86 greift nukleophil die Carbonylgruppe der Donorketose an, wobei das Alkoxid des auftretenden Zwitterions durch Asp6 protoniert werden könnte. Diese Rolle des Asp6 wird vorstellbar anhand der nichtkovalenten Komplexe in den Strukturen K86A mit F6P und Wt mit S6P, in denen O2 und Asp6 in H-Brückenabstand sind. Außerdem deutet der geringere Anteil von C6I bei der Variante D6N in der massenspektrometrisch bestimmten Intermediatverteilung und der erhöhte K_m -Wert im *steady state* der V-S-Charakteristiken auf die Beteiligung von Asp6 an der Bindung des Donorsubstrats hin.

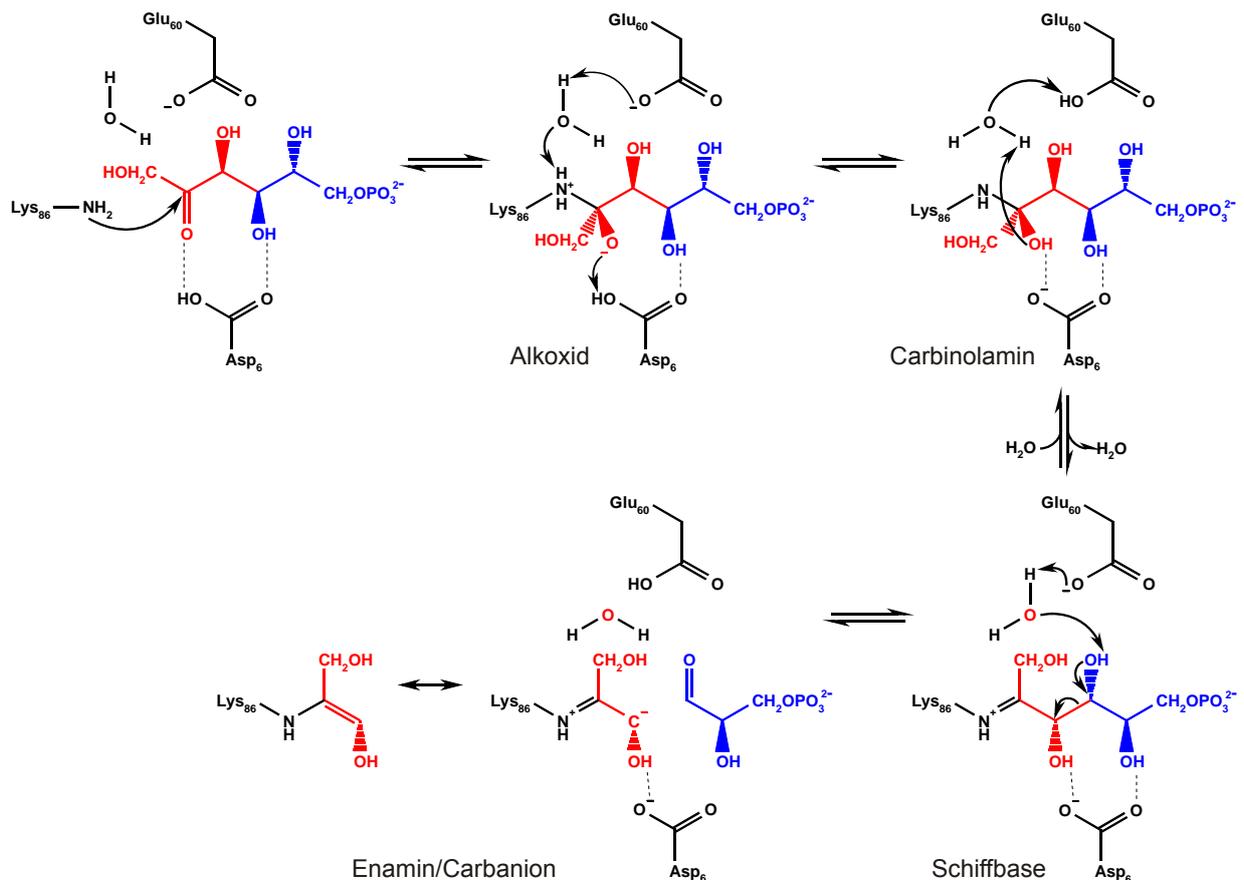


Abb. 4.1 Schema zur Reaktion der Transaldolase. Anhand der in dieser Arbeit gesammelten neuen Erkenntnisse neu vorgeschlagenes. Gezeigt ist die erste Halbreaktion. Nach Bindung des Akzeptorsubstrats, einer Aldose, läuft die Reaktion in entgegengesetzter Richtung ab.

Das Auftreten der Carbinolamin-Spezies in der massenspektrometrischen Untersuchung der Variante E60Q lässt vermuten, dass Glu60 an der Protonierung der entstandenen C2-OH-Gruppe beteiligt ist, welche nach Protonierung als Wasser abgespalten werden kann, so dass die Doppelbindung zwischen N ζ und C2 möglich wird. Außerdem ist dazu eine Deprotonierung der ϵ -Aminogruppe von Lys86 notwendig. Wie genau der Protonentransfer von Lys86 auf C2-OH unter Beteiligung von Glu60 ablaufen sollte, bleibt unklar. Nach Bindung als Michaeliskomplex und Interaktion zwischen O2 und Asp6 ist eine Neuorientierung des Substrats durch Drehung um die Achse seines Zuckerrückgrats notwendig, damit es schließlich die Orientierung der strukturell aufgeklärten Schiffbasen-Intermediate erlangt. Es ist ungeklärt, in welcher genauen Ausrichtung das Carbinolamin im aktiven Zentrum positioniert ist. Vielleicht nimmt das Carbinolamin während der Drehung um die N ζ -C2-Einfachbindung eine Position ein, in der eine direkte Protonierung der C2-OH-Gruppe durch Glu60 stattfinden kann. Da die Variante T110V bezüglich des Wildtyps einen hundertfachen Aktivitätsverlust und zehnfach erhöhten K_m -Wert für das Donorsubstrat aufweist, könnte man eine weiter

reichende Funktion der Aminosäure als die Koordination des katalytischen Wassers vermuten. Vielleicht könnte sie an einem zyklischen Protonentransfer, bei dem Thr110 selbst immer protoniert bleibt, beteiligt sein.

Die als Wasser abgehende C2-OH-Gruppe verdrängt und ersetzt wahrscheinlich das bisher von Glu60 und Thr110 koordinierte Wassermolekül. Im ausgebildeten Schiffbasen-Komplex, bei dem das Enzym in geschlossener Form vorliegt, ist das katalytische Wasser nicht mehr lösungsmittelzugänglich.

Asp6, nun deprotoniert, bringt über Wechselwirkungen mit C3-OH und C5-OH das Intermediat so in Position, dass die C4-OH-Gruppe direkt auf das von Glu60 und Thr110 koordinierte Wasser zeigt. Glu60 ist damit in der Position, die C4-OH-Gruppe zu deprotonieren und so die Bindungsspaltung einzuleiten. Thr110 hat eine wichtige Aufgabe bei der Ausrichtung des katalytischen Wassermoleküls und somit eine Rolle bei der Bindungsspaltung und –knüpfung zwischen C3 und C4. In der Variante T110V ist das katalytische Wasser verschoben und mit Massenspektrometrie konnte eine Akkumulation des C3-Schiffbasen-Addukts beobachtet werden.

Phe132, auf einer Seite des Substratkanals gelegen, wirkt als *hydrophobic backstop* und unterstützt die korrekte Ausrichtung des ungespaltenen Schiffbasen-Addukts. Die zu spaltende Bindung kommt dadurch in eine räumliche Position, dass π -Orbitale der Schiffbase und Bindungsorbital mit zukünftig freiem Elektronenpaar bestmöglich überlappen und das bei Bindungsspaltung frei werdende Elektronenpaar über das Enamin delokalisieren kann.

Durch einen Austausch von Phe132 zu Tyr132 erlangt das Enzym Aldolaseaktivität. Die eingeführte polare Gruppe verdrängt sterisch das katalytische Wasser und könnte dessen katalytische Aufgaben übernehmen. In der Variante zeigen Thr110 und Glu60 alternative Konformationen.

Die in den Kristallstrukturen bei den Donorsubstrat-Schiffbasen auftretenden Molekülspannungen in Form von Distorsion der Schiffbasen-Bindung um 10° bzw. 22° und repulsive Wechselwirkungen im Donorsubstrat S7P durch ekliptische C4- und C6- OH-Gruppen könnten als Triebkräfte der Reaktion wirken. Nach Bindungsspaltung kann die kovalente Bindung der verbleibenden Dihydroxyaceton-Einheit relaxieren. So beträgt die Distorsion der Schiffbasen-Bindung nach Bindungsspaltung in der Variante T110V nur noch $1,9 - 4,3^\circ$.

5 Ausblick

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit lassen sich fortführende Fragestellungen ableiten.

So wäre die Untersuchung des *conformational samplings* des Enzyms und dessen Bedeutung für die Katalyse ein interessanter Aspekt. Ein möglicher Ansatz wäre das Einführen von Cysteinen in der beweglichen *loop*-Region und der benachbarten C-terminalen Helix, um nach Fluoreszenzmarkierung die Öffnungs- und Schließfunktion des Enzyms kinetisch beobachten zu können. Als Untersuchungsmethode würde sich Einzelmolekül-FRET anbieten.

Die Untersuchung der ersten Halbreaktion durch *pre-steady-state*-Kinetiken sollte optimiert werden. So wäre die Messung bei höheren Substratkonzentrationen zu empfehlen, um die Phasen besser auswerten zu können. Die Durchführung des Versuchs mit den Varianten könnte im Vergleich mit der Wt-Reaktion weiteren Aufschluss über Aufgaben der Reste des aktiven Zentrums bei Einzelschritten der Reaktion geben.

Um eine detailliertere Vorstellung über die Lage von E4P im aktiven Zentrum zu bekommen, wenn bereits das C3-Schiffbasen-Intermediat ausgebildet ist, wäre die Kristallisation von mit NaBH_4 reduzierter TA und *soaken* der Kristalle mit E4P denkbar.

Kokristallisation von TA mit 2,5-Anhydro-D-Glucitol-6-phosphat und 2,5-Anhydro-D-Mannitol-1-phosphat, den α - und β -D-F6P-Analoga, bei denen die Ringöffnung unterbunden ist, könnte Aufschluss darüber geben, ob die Bindung der Substrate in zyklischer Form möglich ist, welche Reste an einer solchen Bindung beteiligt sind und ob beide Anomere gebunden werden können.

Die Kristalle erreichen eine Größe, die für die Durchführung von Neutronenstreuung ausreichend ist. Diese Methode würde erlauben, den Protonierungszustand der Reste im aktiven Zentrum aufzuklären.

Die Verwendung von Massenspektrometrie wurde als neue Methode zur Analyse der Intermediatverteilung von TA etabliert. Es könnten sich weitere Untersuchungen bei verschiedenen Konzentrationen und Verhältnissen von Enzym und Substraten zueinander anschließen, um die Methode zu optimieren. Die Verwendung eines internen Standards, z.B. der inaktiven Variante K86A, würde die Methode quantifizierbar machen.

Interessant wäre auch die Untersuchung, ob das katalytische Wasser im Zustand der ausgebildeten Schiffbase seinen Ursprung aus dem Lösungsmittel hat oder aus der Ketogruppe des Donorsubstrats generiert wird. Dafür bietet sich der Einsatz von H^{18}OH als Lösungsmittel an. Mit Massenspektrometrie ließe sich dann untersuchen, inwieweit Wasser in F6P bzw. S7P eingebaut wird.

Untersuchungen mit analytischer Ultrazentrifugation und dynamischer Lichtstreuung könnten abklären, ob die Anwesenheit bzw. Zugabe von Substrat Auswirkungen auf den Oligomerisierungsgrad hat.

6 Literaturverzeichnis

- Afonine, P. V., Grosse-Kunstleve, R. W., und Adams, P. D.** (2005). The Phenix refinement framework. CCP4 newsletter, 850-855.
- Albe, K. R.** (1991). Partial-Purification and Kinetic Characterization of Transaldolase from *Dicystostelium discoideum*. *Exp Mycol* 15, 255-262.
- Allen, F. H., Kennard, O., Watson, D. G., Brammer, L., Orpen, A. G., und Taylor, R.** (1987). Tables of bond lengths determined by X-ray and neutron diffraction. Part 1. Bond lengths in organic compounds. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, S1-S19.
- Anslyn, E. V., und Dougherty, D. A.** (2005). *Modern Physical Organic Chemistry* illustrated edition. (University Science).
- Asztalos, P.** (2008). Untersuchungen zu molekularen, strukturellen und biokatalytischen Aspekten des Vitamin B1-abhängigen Enzyms Transketolase A aus *Escherichia coli*. Verfügbar unter: <http://sundoc.bibliothek.uni-halle.de/diss-online/08/08H049/index.htm>.
- Asztalos, P., Parthier, C., Golbik, R., Kleinschmidt, M., Hübner, G., Weiss, M. S., Friedemann, R., Wille, G., und Tittmann, K.** (2007). Strain and near attack conformers in enzymic thiamin catalysis: X-ray crystallographic snapshots of bacterial transketolase in covalent complex with donor ketoses xylulose 5-phosphate and fructose 6-phosphate, and in noncovalent complex with acceptor aldose ribose 5-phosphate. *Biochemistry* 46, 12037-12052.
- Baldwin, S. A., und Perham, R. N.** (1978). Novel kinetic and structural properties of the class-I D-fructose 1,6-bisphosphate aldolase from *Escherichia coli* (Crookes' strain). *Biochem J* 169, 643-652.
- Bas, D. C., Rogers, D. M., und Jensen, J. H.** (2008). Very fast prediction and rationalization of pKa values for protein-ligand complexes. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 73, 765-783.
- Bennett, B. D., Kimball, E. H., Gao, M., Osterhout, R., Van Dien, S. J., und Rabinowitz, J. D.** (2009). Absolute metabolite concentrations and implied enzyme active site occupancy in *Escherichia coli*. *Nat Chem Biol* 5, 593-599.
- Blackmore, P. F., Williams, J. F., und MacLeod, J. K.** (1976). Dimerization of erythrose 4-phosphate. *FEBS Lett* 64, 222-226.

- Boehr, D. D., McElheny, D., Dyson, H. J., und Wright, P. E.** (2006). The Dynamic Energy Landscape of Dihydrofolate Reductase Catalysis. *Science* *313*, 1638-1642.
- Brunger, Adams, Clore, DeLano, Gros, Grosse-Kunstleve, Jiang, Kuszewski, Nilges, Pannu, u. a.** (1998). Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallographica. Section D. Biological Crystallography* *54*, 905-921.
- Casazza, J. P., und Veech, R. L.** (1986). The interdependence of glycolytic and pentose cycle intermediates in ad libitum fed rats. *Journal of Biological Chemistry* *261*, 690 -698.
- Charmantray, F., H elaine, V., Legeret, B., und Hecquet, L.** (2009). Preparative scale enzymatic synthesis of d-sedoheptulose-7-phosphate from β -hydroxypyruvate and d-ribose-5-phosphate. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* *57*, 6-9.
- Choi, K. H., und Tolan, D. R.** (2004). Presteady-state kinetic evidence for a ring-opening activity in fructose-1,6-(bis)phosphate aldolase. *J Am Chem Soc* *126*, 3402-3.
- Collaborative Computational Project, Number 4** (1994). The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography. *Acta Cryst. D50*, 760-763.
- Dean, J. A.** (1992). *Lange's Handbook of Chemistry* 14. Aufl. (McGraw-Hill Professional).
- Dixon, M.** (1953). The determination of enzyme inhibitor constants. *Biochem. J* *55*, 170-171.
- Duke, C. C., MacLeod, J. K., und Williams, J. F.** (1981). Nuclear magnetic resonance studies of - erythrose 4-phosphate in aqueous solution. Structures of the major contributing monomeric and dimeric forms. *Carbohydrate Research* *95*, 1-26.
- Dunathan, H. C.** (1971). Stereochemical aspects of pyridoxal phosphate catalysis. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol* *35*, 79-134.
- Eigen, M.** (1963). Protonen ubertragung, S aure-Base-Katalyse und enzymatische Hydrolyse. Teil I: Elementarvorg ange. *Angew. Chem.* *75*, 489-508.
- Ellis, K. J., und Morrison, J. F.** (1982). [23] Buffers of constant ionic strength for studying pH-dependent processes. In *Enzyme Kinetics and Mechanism - Part C: Intermediates, Stereochemistry, and Rate Studies* (Academic Press), S. 405-426. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B7CV2-4B7RB7Y-NF/2/ba566662cc2cb0698b92a04d211b92f3> [Zugegriffen August 6, 2010].
- Emsley, P., und Cowtan, K.** (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics. Available at: <http://journals.iucr.org/d/issues/2004/12/01/ba5070/ba5070hdr.html> [Zugegriffen August 20, 2010].

- Fersht, A.** (1999). *Structure and Mechanism in Protein Science: Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding* 3. Aufl. (New York: W.H. Freeman & Co Ltd).
- Fiedler, E., Thorell, S., Sandalova, T., Golbik, R., König, S., und Schneider, G.** (2002). Snapshot of a key intermediate in enzymatic thiamin catalysis: crystal structure of the alpha-carbanion of (α,β -dihydroxyethyl)-thiamin diphosphate in the active site of transketolase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 99, 591-595.
- Frey, P. A., und Hegeman, A. D.** (2007). *Enzymatic Reaction Mechanisms* 1. Aufl. (Oxford University Press, USA).
- Fullerton, S. W. B., Griffiths, J. S., Merkel, A. B., Cheriyan, M., Wymer, N. J., Hutchins, M. J., Fierke, C. A., Toone, E. J., und Naismith, J. H.** (2006). Mechanism of the Class I KDPG aldolase. *Bioorg. Med. Chem* 14, 3002-3010.
- Ganem, B., Li, Y. T., und Henion, J. D.** (1991). Detection of noncovalent receptor-ligand complexes by mass spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.* 113, 6296-6298.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D., und Bairoch, A.** (2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In *The Proteomics Protocols Handbook*, J. M. Walker, hrsg. (Humana Press), S. 571-607.
- Gill, S. C., und von Hippel, P. H.** (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem* 182, 319-326.
- Hammes, G. G., Chang, Y., und Oas, T. G.** (2009). Conformational selection or induced fit: A flux description of reaction mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 13737 -13741.
- Horecker, B. L., und Smyrniotis, P. Z.** (1955). Purification and properties of yeast transaldolase. *J Biol Chem* 212, 811-25.
- Horecker, B. L., und Smyrniotis, P. Z.** (1953). Transaldolase: The Formation of Fructose-6-Phosphate from Sedoheptulose-7-Phosphate. *Journal of the American Chemical Society* 75, 2021-2022.
- Hsung, J., und Haug, A.** (1975). Intracellular Ph of *Thermoplasma-Acidophila*. *Biochimica Et Biophysica Acta* 389, 477-482.
- Inoue, T.** (2006). Microbial aldolases as C-C bonding enzymes : investigation of structural-functional characteristics and application for stereoselective reactions. Available at: <http://elib.uni-stuttgart.de/opus/volltexte/2007/2816/> [Zugegriffen Oktober 20, 2008].
- Jeffrey, G. A., und Kim, H. S.** (1970). Conformations of the alditols. *Carbohydrate Research* 14, 207-216.

- Jia, J., Huang, W., Schörken, U., Sahm, H., Sprenger, G. A., Lindqvist, Y., und Schneider, G.** (1996a). Crystal structure of transaldolase B from *Escherichia coli* suggests a circular permutation of the alpha/beta barrel within the class I aldolase family. *Structure* 4, 715-24.
- Jia, J., Lindqvist, Y., Schneider, G., Schörken, U., Sahm, H., und Sprenger, G. A.** (1996b). Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of recombinant transaldolase B from *Escherichia coli*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 52, 192-193.
- Jia, J., Schörken, U., Lindqvist, Y., Sprenger, G. A., und Schneider, G.** (1997). Crystal structure of the reduced Schiff-base intermediate complex of transaldolase B from *Escherichia coli*: mechanistic implications for class I aldolases. *Protein Sci* 6, 119-124.
- Kabsch, W.** (1993). Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *J Appl Crystallogr* 26, 795-800.
- Kelly, S. M., Jess, T. J., und Price, N. C.** (2005). How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics* 1751, 119-139.
- Kluger, R.** (1987). Thiamin diphosphate: a mechanistic update on enzymic and nonenzymic catalysis of decarboxylation. *Chem. Rev.* 87, 863-876.
- Kourtoglou, E., Mamma, D., Topakas, E., und Christakopoulos, P.** (2008). Purification, characterization and mass spectrometric sequencing of transaldolase from *Fusarium oxysporum*. *Process Biochemistry* 43, 1094-1101.
- Krissinel, E., und Henrick, K.** (2007). Inference of Macromolecular Assemblies from Crystalline State. *Journal of Molecular Biology* 372, 774-797.
- Kuhn, E., und Brand, K.** (1973). Computer analysis of the two-substrate reaction catalyzed by yeast and bovine transaldolase. *Biochemistry* 12, 5217-5223.
- Kuhn, E., und Brand, K.** (1972). Purification and properties of transaldolase from bovine mammary gland. *Biochemistry* 11, 1767-1772.
- Lee, B., und Richards, F.** (1971). The interpretation of protein structures: Estimation of static accessibility. *J.Mol.Biol.* 55, 379-400.
- Li, H., Robertson, A. D., und Jensen, J. H.** (2005). Very fast empirical prediction and rationalization of protein pKa values. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 61, 704-721.
- Li, Z., Sau, A. K., Shen, S., Whitehouse, C., Baasov, T., und Anderson, K. S.** (2003). A snapshot of enzyme catalysis using electrospray ionization mass spectrometry. *J. Am. Chem. Soc* 125, 9938-9939.

- Liesener, A., und Karst, U.** (2005). Monitoring enzymatic conversions by mass spectrometry: a critical review. *Anal Bioanal Chem* 382, 1451-1464.
- Lorentzen, E., Pohl, E., Zwart, P., Stark, A., Russell, R. B., Knura, T., Hensel, R., und Siebers, B.** (2003). Crystal structure of an archaeal class I aldolase and the evolution of ($\beta\alpha$)₈ barrel proteins. *J Biol Chem* 278, 47253-60.
- Lorentzen, E., Siebers, B., Hensel, R., und Pohl, E.** (2005). Mechanism of the Schiff base forming fructose-1,6-bisphosphate aldolase: structural analysis of reaction intermediates. *Biochemistry* 44, 4222-9.
- Marangoni, A. G.** (2002). *Enzyme Kinetics: A Modern Approach* 1. Aufl. (Wiley-Interscience).
- Marsh, J. J., und Lebherz, H. G.** (1992). Fructose-bisphosphate aldolases: an evolutionary history. *Trends Biochem Sci* 17, 110-3.
- McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C., und Read, R. J.** (2007). Phaser crystallographic software. *J Appl Crystallogr* 40, 658-674.
- McRorie, D. K., und Voelker, P. J.** (1993). Self-Associating Systems in the Analytical Ultracentrifuge. In (Beckman Instruments, Inc., Fullerton, CA.).
- Meyerhof, O.** (1935). Über die Kinetik der umkehrbaren Reaktion zwischen Hexosediphosphorsäure und Dioxyacetonphosphorsäure. *Biochem Z* 277, 77-96.
- Mülhardt, C.** (2003). *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics* 4. Aufl. (Spektrum-Akademischer Vlg).
- Muralidhara, B. K., Rathinakumar, R., und Wittung-Stafshede, P.** (2006). Folding of *Desulfovibrio desulfuricans* flavodoxin is accelerated by cofactor fly-casting. *Arch. Biochem. Biophys* 451, 51-58.
- Murshudov, G. N., Vagin, A. A., und Dodson, E. J.** (1997). Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr* 53, 240-255.
- Pierce, J., Serianni, A. S., und Barker, R.** (1985). Anomerization of furanose sugars and sugar phosphates. *J. Am. Chem. Soc.* 107, 2448-2456.
- Pontremoli, S., Bonsignore, A., Grazi, E., und Horecker, B. L.** (1960). A coupled reaction catalyzed by the enzymes transketolase and transaldolase. *J Biol Chem* 235, 1881-1887.
- Ruepp, A., Graml, W., Santos-Martinez, M. L., Koretke, K. K., Volker, C., Mewes, H. W., Frishman, D., Stocker, S., Lupas, A. N., und Baumeister, W.** (2000). The genome sequence of the thermoacidophilic scavenger *Thermoplasma acidophilum*. *Nature* 407, 508-13.

- Rutter, W. J.** (1964). Evolution of Aldolase. *Fed. Proc* 23, 1248-1257.
- Saff, E. B., und Kuijlaars, A. B. J.** (1997). Distributing many points on a sphere. *The Mathematical Intelligencer* 19, 5-11.
- Samland, A. K., und Sprenger, G. A.** (2009). Transaldolase: From biochemistry to human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 41, 1482-1494.
- Schneider, S., Sandalova, T., Schneider, G., Sprenger, G. A., und Samland, A. K.** (2008). Replacement of a phenylalanine by a tyrosine in the active site confers fructose 6-phosphate aldolase activity to the transaldolase of *Escherichia coli* and human origin. *J Biol Chem.* Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18687684> [Zugegriffen Oktober 21, 2008].
- Schörken, U., Jia, J., Sahm, H., Sprenger, G. A., und Schneider, G.** (1998). Disruption of *Escherichia coli* transaldolase into catalytically active monomers: evidence against half-of-the-sites mechanism. *FEBS Lett* 441, 247-50.
- Schörken, U., Thorell, S., Schürmann, M., Jia, J., Sprenger, G. A., und Schneider, G.** (2001). Identification of catalytically important residues in the active site of *Escherichia coli* transaldolase. *Eur J Biochem* 268, 2408-15.
- Schörken, U.** (1997). Untersuchungen zu Struktur und Funktion von Transketolase und Transaldolase, sowie biochemische Charakterisierung der Enzyme aus *Escherichia coli*.
- Schowen, K. B. J.** (1978). Solvent Hydrogen Isotope Effects. In *Transition States of Biochemical Processes*, R. D. Gandour und R. L. Schowen, hrsg. (Springer), S. 225-283.
- Shipovskov, S., und Reimann, C. T.** (2007). Electrospray ionization mass spectrometry in enzymology: uncovering the mechanisms of two-substrate reactions. *Analyst* 132, 397-402.
- Skarzynski, T., und Leslie, A.** (1988). Contact.
- Smith, P. F., Langworthy, T. A., Mayberry, W. R., und Hougland, A. E.** (1973). Characterization of the Membranes of *Thermoplasma acidophilum*. *J Bacteriol* 116, 1019-1028.
- Soderberg, T.** (2005). Biosynthesis of ribose-5-phosphate and erythrose-4-phosphate in archaea: a phylogenetic analysis of archaeal genomes. *Archaea* 1, 347-352.
- Soderberg, T., und Alver, R. C.** (2004). Transaldolase of *Methanocaldococcus jannaschii*. *Archaea* 1, 255-262.
- Sprenger, G. A., Schörken, U., Sprenger, G., und Sahm, H.** (1995). Transaldolase B of *Escherichia coli* K-12: cloning of its gene, talB, and characterization of the enzyme from recombinant strains. *J Bacteriol* 177, 5930-5936.

- St-Jean, M., Lafrance-Vanasse, J., Liotard, B., und Sygusch, J.** (2005). High resolution reaction intermediates of rabbit muscle fructose-1,6-bisphosphate aldolase: substrate cleavage and induced fit. *J. Biol. Chem* *280*, 27262-27270.
- Swenson, C. A., und Barker, R.** (1971). Proportion of keto and aldehyde forms in solutions of sugars and sugar phosphates. *Biochemistry* *10*, 3151-4.
- Taylor, P. L., Blakely, K. M., de Leon, G. P., Walker, J. R., McArthur, F., Evdokimova, E., Zhang, K., Valvano, M. A., Wright, G. D., und Junop, M. S.** (2008). Structure and function of sedoheptulose-7-phosphate isomerase, a critical enzyme for lipopolysaccharide biosynthesis and a target for antibiotic adjuvants. *J. Biol. Chem* *283*, 2835-2845.
- Thorell, S., Gergely, P., Banki, K., Perl, A., und Schneider, G.** (2000). The three-dimensional structure of human transaldolase. *FEBS Lett* *475*, 205-208.
- Thorell, S., Schürmann, M., Sprenger, G. A., und Schneider, G.** (2002). Crystal structure of dcameric fructose-6-phosphate aldolase from *Escherichia coli* reveals inter-subunit helix swapping as a structural basis for assembly differences in the transaldolase family. *J Mol Biol* *319*, 161-171.
- Tsolas, O., und Horecker, B.** (1976). Half-of-Sites Activity of Transaldolase - Titration of Active-Site and Characteristics of Slow Reaction Catalyzed by 2nd Subunit. *Archives of Biochemistry and Biophysics* *173*, 577-585.
- Tsolas, O., und Horecker, B.** (1970). Isoenzymes of Transaldolase in *Candida utilis* .2. Molecular Properties of Transaldolase Isoenzymes-I and Isoenzyme-III and Conditions for Hybridization to Form Isoenzyme-II. *Archives of Biochemistry and Biophysics* *136*, 303-319.
- Tsolas, O., und Joris, L.** (1975). Transaldolase. *Meth. Enzymol* *42*, 290-297.
- Tsolas, O., und Horecker, B. L.** (1972). Transaldolase. In *The Enzymes*, P. D. Boyer, hrsg. (New York: Academic Press), S. 259-280.
- Turano, A., Furey, W., Pletcher, J., Sax, M., Pike, D., und Kluger, R.** (1982). Synthesis and crystal structure of an analog of 2-(α -lactyl)thiamin, racemic methyl 2-hydroxy-2-(2-thiamin)ethylphosphonate chloride trihydrate. A conformation for a least-motion, maximum-overlap mechanism for thiamin catalysis. *Journal of the American Chemical Society* *104*, 3089-3095.
- Vaguine, A. A., Richelle, J., und Wodak, S. J.** (1999). SFCHECK: a unified set of procedures for evaluating the quality of macromolecular structure-factor data and their agreement with the atomic model. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr* *55*, 191-205.
- Venkataraman, R., und Racker, E.** (1961). Mechanism of action of transaldolase. I. Crystalization and properties of yeast enzyme. *J. Biol. Chem* *236*, 1876-1882.

Williams, J. F., Blackmore, P. F., und Clark, M. G. (1978). New reaction sequences for the non-oxidative pentose phosphate pathway. *Biochem J* 176, 257-282.

Williams, J. C., und McDermott, A. E. (1995). Dynamics of the Flexible Loop of Triose-Phosphate Isomerase: The Loop Motion Is Not Ligand Gated. *Biochemistry* 34, 8309-8319.

7 Anhang

7.1 Katalysezyklus von Transketolase

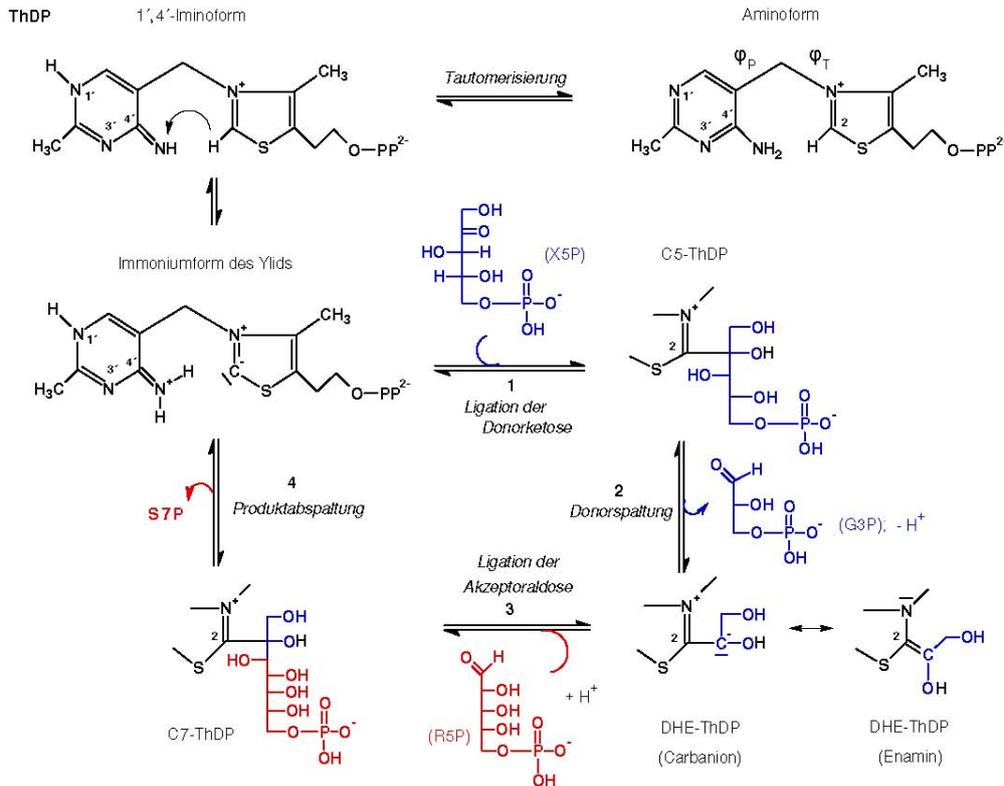


Abb. 7.1 Katalysezyklus der Transketolase für den Umsatz von Xylulose-5-phosphat (X5P) und Ribose-5-phosphat (R5P) zu Sedoheptulose-7-phosphat (S7P) und Glycerinaldehyd-3-phosphat (G3P). Die Reaktion von X5P und Erythrose-4-phosphat (E4P) zu Fruktose-6-phosphat (F6P) und G3P verlaufen analog. Übernommen von ASZTALOS, 2008.

Durch die V-Konformation des Cofaktors ThDP kommen C2 und Aminogruppe in räumliche Nähe zueinander. Die Protonenabstraktion am C2-Atom des Thiazoliumrings führt zum Ylid, dessen Carbanionteil nukleophil das C2 α -Atom der Ketose angreifen kann. Von dem kovalenten Donorintermediat wird das erste Produkt, eine Aldose, abgespalten und das zentrale Intermediat, α -Carbanion des DHE-ThDP, gebildet, das über seine planare Enaminstruktur resonanzstabilisiert ist. Bei Bindung der Akzeptoraldose kommt es zur C-C-Bindungsbildung zwischen dem Ketol und der C1-Aldehydgruppe. Anschließend wird das resultierende zweite Produkt, eine Ketose, abgespalten.

7.2 Anhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Proteinkonzentration

Messung nach 2.2.4.8.2

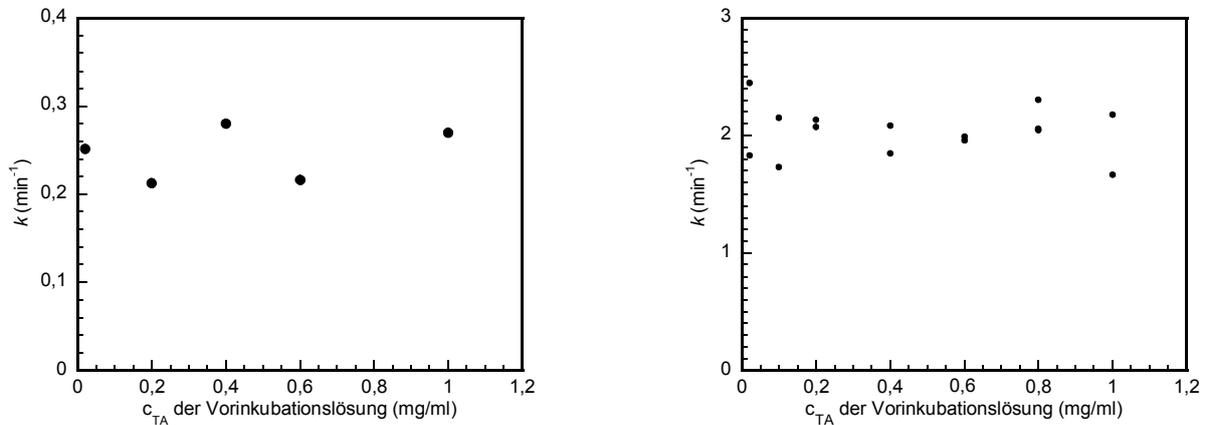


Abb. 7.2 Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der *TacTA* von der Proteinkonzentration.

Substratkonzentrationen: Links: 0,55 mM F6P, 0,18 mM E4P. Rechts: 15 mM F6P, 1 mM E4P. TA unterschiedlicher Proteinkonzentration wurde auf immer gleiche Endkonzentration in den Reaktionsansatz verdünnt. Da keine Korrelation der ursprünglichen Proteinkonzentration mit der Geschwindigkeit gefunden wird, im verwendeten Konzentrationsbereich aber verschiedene Oligomerisierungsformen von *TacTA* auftreten, wobei Dekamere einen kleineren *k_{cat}*-Wert haben als Pentamere, kann man davon ausgehen, dass die Gleichgewichtseinstellung der Oligomerisierung schnell und innerhalb der Totzeit der Messung von 5-10 s abläuft.

7.3 Statistiken der kristallographischen Arbeiten (auf Englisch)

Die Werte in Klammern beziehen sich auf die Schale höchster Auflösung. Jeder Datensatz stammt von einem Einzelkristall.

	TA resting state	TA + F6P	TA + S7P	TA + E4P	TA + S6P
Data collection					
Wavelength (Å)	0.91841	0.91841	0.91841	0.91841	1.54179
Space group	C 2 2 21	C 2 2 21	C 2 2 21	C 2 2 21	C 2 2 21
Cell dimensions					
a (Å)	149.044	148.617	148.579	148.56	149.154
b (Å)	172.024	172.535	172.802	171.85	171.740
c (Å)	100.271	100.277	100.363	99.33	100.165
α (°)	90.00	90.000	90.000	90.000	90.00
β (°)	90.00	90.000	90.000	90.000	90.00
γ (°)	90.00	90.000	90.000	90.000	90.00
Resolution range (Å)	34.2 - 1.78	19.745 - 1.8	19.916 - 1.65	19.901 - 1.9	50 - 2.25
No. of observations	488295 (30658)	976683 (147318)	562970 (90200)	750316 (106211)	252078 (30167)
No. of unique reflections	121135 (8682)	118736 (17640)	152106 (24223)	99730 (14103)	59185 (7369)
Completeness (%)	98.5 (96.3)	99.8 (99.9)	98.6 (98.0)	99.8 (100)	96.7 (99.7)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	21.32 (2.61)	20.34 (4.39)	26.93 (2.82)	31.72 (4.97)	11.85 (2.52)
R-merge (%) ^a	3.9 (43.8)	6.7 (54.3)	2.9 (50.9)	4.3 (44.9)	9.1 (60.4)
Redundancy	4.031 (3.531)	8.226 (8.351)	3.701 (3.724)	7.523 (7.531)	4.259 (4.094)
B-factor from Wilson plot (Å ²)	34.5	32.4	33.3	37.0	38.85

	TA resting state	TA + F6P	TA + S7P	TA + E4P	TA + S6P
Refinement					
Resolution range (Å)	34.191 - 1.78	19.745 - 1.8	19.916 - 1.65	19.852 - 1.895	43.262 - 2.25
Reflections (working/test)	121120/6055	112783/5938	144487/7607	94716 /4988	59078/2956
Rwork/Rfree (%)	18.82/22.80	17.58/21.12	16.74/19.75	17.47/19.92	20.00/25.28
Average B-factor (Å ²)	35.416	30.914	31.845	36.874	43.094
Number of atoms	10051	9777	10095	9294	9052
Protein	9073	8780	8800	8588	8626
Ligand	6	117	85	61	60
Water	972	880	1210	645	366
Deviations from ideals (r.m.s.d.)					
Bond distances (Å)	0.009	0.012	0.009	0.007	0.005
Bond angles (°)	1.107	1.283	1.335	1.008	0.867
Dihedrals (°)	12.992	16.561	16.67	15.597	12.299
Ramachandran plot %Non-glycine or non-proline in favoured regions	99.4	99.8	99.5	99.1	98.4
allowed regions	0.6	0.2	0.5	0.9	1.6
outlier regions	0	0	0	0	0
ligand or chemical component	1 glycerol as carbinolamine	5 F6P 3 glycerol	5 S7P	5 E4P 1 Cl ⁻	5 S6P

	wt + X5P	wt + A5P	E60Q	E60A + F6P	E60A + S7P
Data collection					
Wavelength (Å)	0.91841	1.54179	0.91841	0.91841	0.91841
Space group	C 2 2 21	C 2 2 21			
Cell dimensions					
a (Å)	148.608	148.915	148.767	148.674	148.360
b (Å)	172.570	171.982	172.081	172.482	172.075
c (Å)	99.826	100.316	100.511	100.343	100.111
α (°)	90.00	90.00	90.00	90.00	90.00
β (°)	90.00	90.00	90.00	90.00	90.00
γ (°)	90.00	90.00	90.00	90.00	90.00
Resolution range (Å)	30 – 1.85	50 – 2.4	20 – 1.85	30 – 1.5	30 – 1.85
No. of observations	360138 (52431)	236579 (26685)	633334 (92406)	656843 (114990)	408919 (59354)
No. of unique reflections	108051 (15721)	50538 (5737)	107943 (15834)	199825 (35488)	108081 (15711)
Completeness (%)	99.0 (99.6)	99.8 (99.9)	98.4 (99.9)	97.6 (99.3)	99.2 (99.7)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	19.98 (2.36)	14.96 (2.74)	19.87 (3.15)	21.48 (2.80)	23.21 (2.38)
R-merge (%) ^a	3.7 (54.5)	8.2 (56.6)	6.1 (60.4)	3.0 (49.9)	3.6 (57.7)
Redundancy	3.333 (3.335)	4.681 (4.651)	5.867 (5.836)	3.287 (3.240)	3.783 (3.778)
B-factor from Wilson plot (Å ²)	37.22	43.234	31.657	26.884	36.338

	wt + X5P	wt + A5P	E60Q	E60A + F6P	E60A + S7P
Refinement					
Resolution range (Å)	28.762 – 1.85	47.692 – 2.4	19.789 – 1.85	29.303 – 1.5	28.679 – 1.85
Reflections (working/test)	107926/5397	50522/2526	107902/5395	199809/9993	108050/5404
Rwork/Rfree (%)	19.51/22.70	19.86/24.19	19.26/21.88	15.53/19.14	17.54/21.08
Average B-factor (Å ²)	39.7	44.463	34.2	27.325	38.8
Number of atoms	9548	8999	10095	9998	9705
Protein	8764	8595	9157	8777	8801
Ligand	70	70	0	75	85
Water	714	334	938	1146	819
Deviations from ideals (r.m.s.d.)					
Bond distances (Å)	0.010	0.003	0.004	0.013	0.009
Bond angles (°)	1.149	0.693	0.770	1.336	1.136
Dihedrals (°)	16.306	12.047	11.473	16.648	12.805
Ramachandran plot %Non-glycine or non-proline in favoured regions	99.1	98.7	98.9	99.7	99.7
allowed regions	0.9	1.3	1.0	0.3	0.3
outlier regions	0	0	0	0	0
ligand or chemical component	5 X5P	5 A6P	0	5 F6P	5 S7P

	K86A + F6P	K86A + Citrat	F132Y	T110V + C3	D6N
Data collection					
Wavelength (Å)	1.54179	0.91841	0.91841	1.54179	0.91841
Space group	C 2 2 21	C 2 2 21	C 2 2 21	C 2 2 21	P 21
Cell dimensions					
a (Å)	147.100	145.080	150.420	148.812	100.199
b (Å)	171.200	168.670	172.020	171.984	131.967
c (Å)	99.300	97.920	99.80	100.456	101.340
α (°)	90.00	90.00	90.00	90.00	90.00
β (°)	90.00	90.00	90.00	90.00	108.54
γ (°)	90.00	90.00	90.00	90.00	90.00
Resolution range (Å)	30 – 2.0	20 – 1.8	30 – 1.8	50 – 1.85	20 – 1.995
No. of observations	368970 (47586)	554123 (82483)	709168 (105516)	457857 (64679)	201912 (19625)
No. of unique reflections	84225 (11310)	110566 (16435)	119197 (17737)	109458 (15816)	55215 (5313)
Completeness (%)	99.5 (99.1)	99.8 (99.8)	99.7 (99.9)	99.9 (99.9)	99.4 (99.7)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	16.23 (2.98)	19.8 (3.9)	24.42 (2.86)	16.23 (2.93)	18.42 (2.54)
R-merge (%) ^a	5.9 (55.8)	5.7 (45.8)	4.7 (66.8)	5.7 (50.6)	4.9 (61.7)
Redundancy	4.381 (4.207)	5.0 (5.0)	5.950 (5.949)	4.183 (4.089)	3.657 (3.694)
B-factor from Wilson plot (Å ²)	35.367	32.6	33.487	31.204	80.212

	K86A + F6P	K86A + Citrat	F132Y	T110V + C3	D6N
Refinement					
Resolution range (Å)	29.552 – 2.0	19.447 – 1.8	29.893 – 1.8	47.661 – 1.85	29.798 – 2.9
Reflections (working/test)	84212/4211	110566/5529	119163/5959	109429/5472	55176/2758
Rwork/Rfree (%)	18.46/22.05	17.53/20.93	17.67/20.92	17.63/20.93	20.32/23.19
Average B-factor (Å ²)	38.6	29.5	35.5	34.1	85.0
Number of atoms	9455	9571	9772	9660	17023
Protein	8678	8699	8720	8643	17023
Ligand	80	95	12	5	0
Water	697	777	1040	1012	0
Deviations from ideals (r.m.s.d.)					
Bond distances (Å)	0.004	0.008	0.007	0.006	0.008
Bond angles (°)	0.860	1.121	1.012	0.890	0.651
Dihedrals (°)	12.429	12.555	15.640	11.276	12.298
Ramachandran plot %Non-glycine or non-proline in favoured regions	99.2	99.1	99.4	99.3	98.3
allowed regions	0.8	0.9	0.6	0.7	1.7
outlier regions	0	0	0	0	0
ligand or chemical component	5 F6P	5 citrate 5 glycerol	0	1 glyceraldehyde as Schiff base	0

7.4 Alternative Konformationen in Grundstrukturen

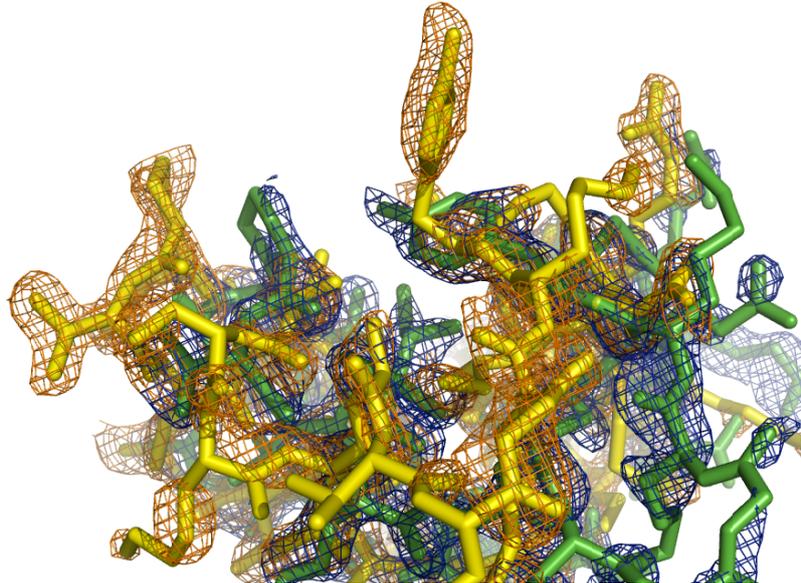


Abb. 7.3 $2 F_o - F_c$ *simulated annealing omit maps* des Bereichs von Rest 6 – 55 in Wt-TacTA im Grundzustand. Jeweils eine Konformation (offen oder geschlossen) in Kette D der Wt-Grundstruktur wurde gelöscht und die *SA-omit map* berechnet (Level 1,0 σ).

7.5 Aromatisch-Aromatische Interaktion (π -stacking) als Kontakt zwischen Monomeren und innerhalb eines Monomers

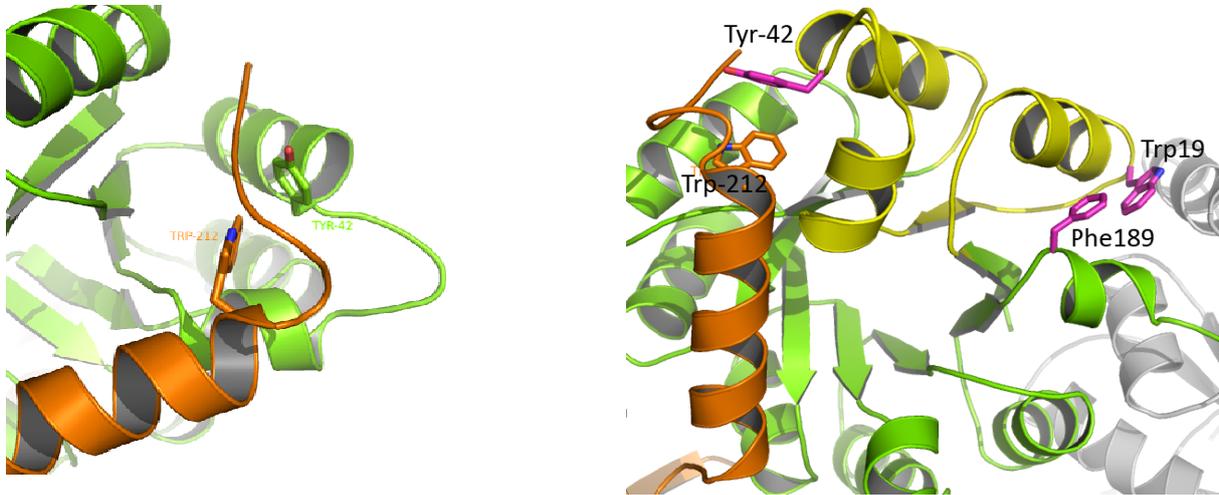


Abb. 7.4 π -stacking zwischen aromatischen Aminosäureseitenketten an den Randbereichen des bei *conformational sampling* mobilen Bereichs von TacTA. (Helices $\alpha 1$, $\alpha 2$ und $\alpha 3$ und $\beta 2$, in Gelb dargestellt). Die *edge-to-face*-Wechselwirkung zwischen Tyr42 und Trp212 auf der C-terminalen Helix des Nachbarmonomers (links, Orange) ist eine der Interaktionen zur Pentamerbildung. Die versetzt angeordneten Ringe von Trp19 und Phe189 eines Monomers bilden eine *slip stacked*-Geometrie und könnten das Enzym in der geschlossenen Form stabilisieren.

7.6 Vergleich der Bindung von S7P und E4P im aktiven Zentrum von Wt-TacTA

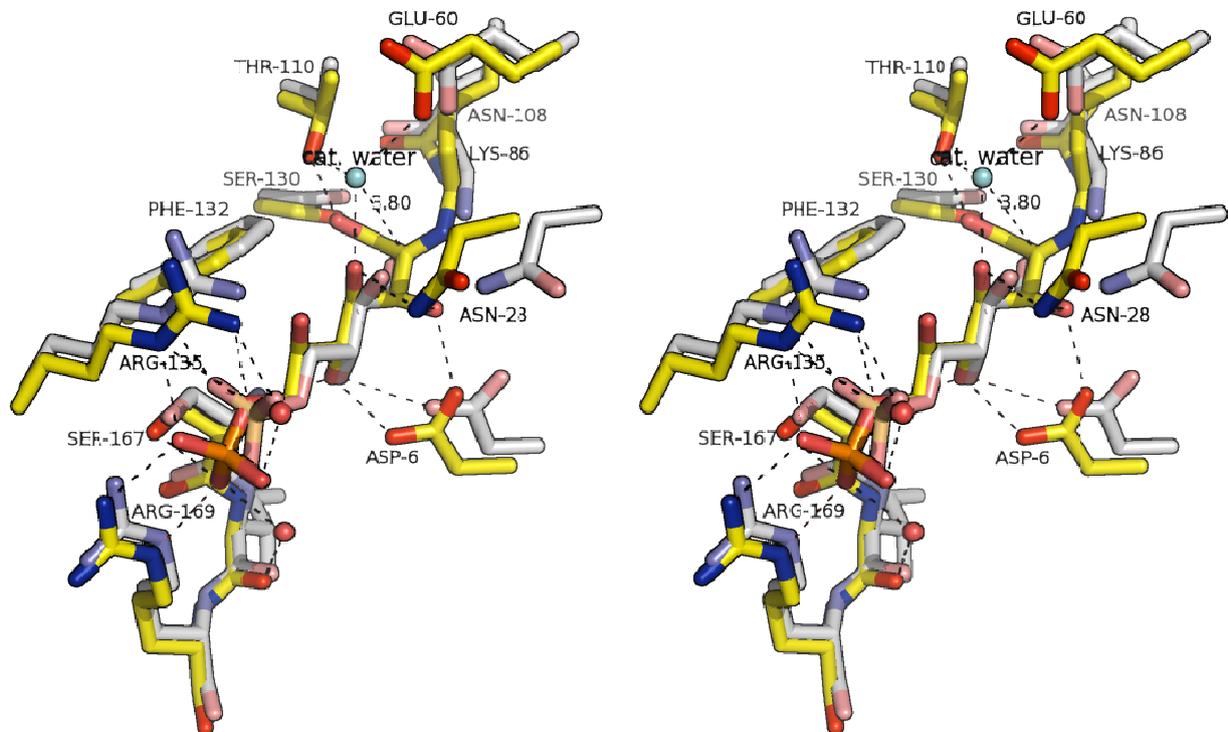


Abb. 7.5 Superposition der aktiven Zentren von *TacTA* mit E4P (Grau) als Michaeliskomplex und der S7P-Schiffbase (Gelb). E4P und der E4P-Teil von S7P sind nicht deckungsgleich. Die Aldose ist um 180° gedreht und ragt eine Bindungslänge weiter in das aktive Zentrum. Das abgebildete aktive Zentrum des E4P-Komplexes ist eines von dreien in offener Konformation. Asp6 und Asn28 haben durch die Öffnung einen Teil ihrer Kontakte zum Substrat verloren.

7.7 Modell eines Carbinolamins in *TacTA*

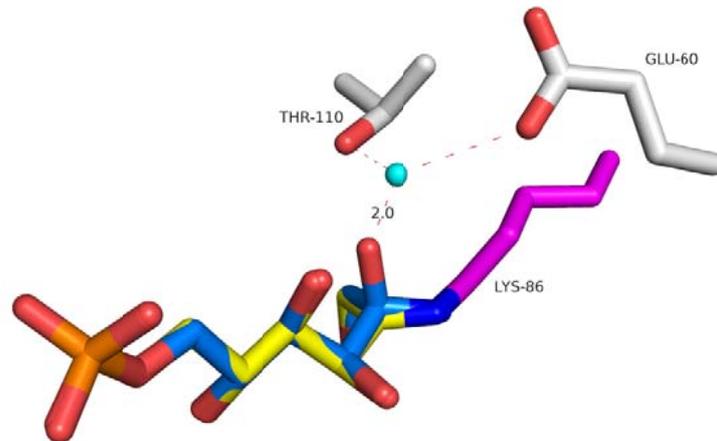


Abb. 7.6 Superposition des experimentell bestimmten F6P-Schiffbasen-Addukts mit einem modellierten Carbinolamin. Das Carbinolamin (Blau) wurde anhand des Zuckerrückgrats von F6P (Gelb) modelliert unter der Annahme, dass beide Intermediate die gleiche Orientierung im aktiven Zentrum einnehmen. In dieser Position würde es zu einer Abstoßung zwischen O2 des Carbinolamins und dem katalytischen Wassermolekül (Cyan) kommen.

7.8 Analyse von E4P-Lösung (Sigma Aldrich) mit ESI-MS

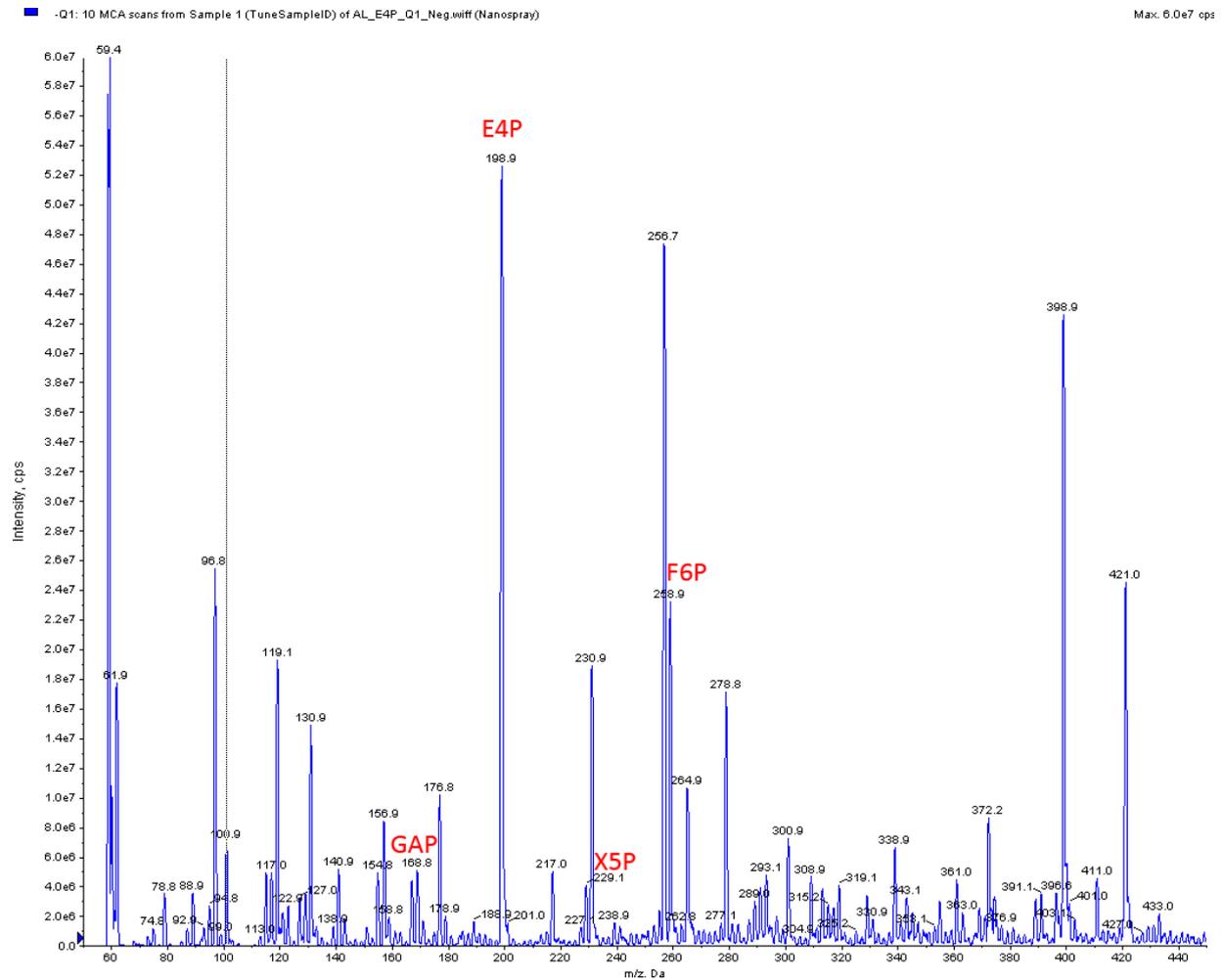


Abb. 7.7 Massenspektrum von E4P-Lösung.

Nach Herstellerangaben enthielt die Substanz 81 % E4P, Na⁺ als Gegenion und Wasser. Im ESI-Massenspektrum fanden sich zahlreiche Verunreinigungen, so auch mit den natürlichen Substraten von TA F6P und GAP. 20 mM E4P-Lösung in 20 mM GlyGly wurde 1 : 100 in 85 : 15 : 0,1 Methanol : H₂O : Essigsäure verdünnt.

Danksagung

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Kai Tittmann für die Möglichkeit, die Arbeit in seiner Gruppe anfertigen zu können, sozusagen „die Adoption“, sowie für die guten Ideen und motivierenden Diskussionen.

Dr. Piotr Neumann und Dr. Christoph Parthier für die Einführung in die Proteinröntgenkristallstrukturaufklärung, die Anleitung meiner ersten Schritte sowie die Unterstützung im fortgeschritteneren Stadium. Die Aufnahme von Datensätzen am BESSY und besonders Piotr Neumann für die Lösung der ersten Struktur.

Meinem akademischen Lehrer PD Dr. Ralph Golbik, dass er mich auf den Pfad der Enzymologie gebracht hat, für die schnelle Unterstützung am Ende des Endspurts, und dazwischen für die fachlichen und menschlichen Ratschläge.

Dr. Christian Ihling für die Durchführung der Messungen zur massenspektrometrischen Analyse der Intermediatverteilungen und damit zusammenhängende Diskussionen.

PD Dr. Hauke Lilie für die Durchführung der Analytischen Ultrazentrifugation.

Dr. Cornelia Herrfurth für die massenspektrometrische Untersuchung der E4P-Lösung.

Michael Spinka für ausgiebige fachliche Diskussionen und dass er sich die Zeit genommen hat, sich mit meinen kinetischen Fragen auseinanderzusetzen.

Stefan Lüdtke für die Synthese von S7P und zusammen mit Dr. Danilo Meyer für Feedback und Diskussionen.

Der gesamten Truppe der Abteilung Bioanalytik für die gute Stimmung und die tolle Zeit.

Den Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Milton Stubbs und Prof. Dr. Ralf Ficner, für die Möglichkeit die „örtlichen Röntgenquellen“ nutzen zu können.

Der Berliner Elektronenspeicherring-Gesellschaft für Synchrotronstrahlung (BESSY) für die Möglichkeit *synchrotron radiation beamtime* nutzen zu können.

Der *Friedrich-Naumann-Stiftung für die Freiheit*, die mich über ein Stipendium mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung gefördert hat.

Allen, die mich während der Zeit der Promotion privat begleitet haben. Dass sie mir Mut gemacht haben, viel Verständnis hatten und in Zeiten von Erfolgen wie auch von Zweifeln für mich da waren.

Eidesstattliche Erklärung

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

Göttingen, den 11.01.2011

Anja Lehweß-Litzmann

Lebenslauf

Angaben zur Person

Name	Anja Lehweß-Litzmann
Geburtsdatum	23.02.1980
Geburtsort	Leipzig
Nationalität	deutsch
Familienstand	ledig
Adresse	Wiesenstraße 16, 37073 Göttingen
E-Mail-Adresse	alehwess@web.de

Schulische und universitäre Ausbildung

1992-1999	Humboldt-Gymnasium in Cottbus, Abschluss Abitur (Note: 1,0)
10/1999 - 08/2004	Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Abschluss: Diplom-Biochemikerin (Note: sehr gut)
04/2005 – 02/2007	Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Arbeitsgruppe Enzymologie von Prof. Dr. Gerhard Hübner, Institut für Biochemie und Biotechnologie, Naturwissenschaftliche Fakultät I der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
03/2007	Beginn der Promotionsarbeit unter Leitung von Prof. Dr. Kai Tittmann, AG „Molekulare Enzymologie“, Institut für Biochemie und Biotechnologie, Naturwissenschaftliche Fakultät I der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
seit 11/2008	Fortführung der Promotion unter Leitung von Prof. Dr. Kai Tittmann, Abteilung Bioanalytik, Institut für Pflanzenbiochemie der Georg-August-Universität Göttingen
seit 11/2010	Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Abteilung Physikalische Biochemie von Prof. Dr. Marina V. Rodnina, Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen

Weitere Tätigkeiten und Weiterbildungen

- 08/2000-10/2000 Praktikum am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie, Halle (Saale)
(Arbeitsgruppe Prof. Dr. Dieter Strack, Betreuer Dr. Thomas Vogt)
- 12/2002-02/2003 Wissenschaftliche Hilfskraft in der Biotechnologie der Martin-Luther-
Universität Halle-Wittenberg (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Rainer Rudolph,
Betreuer Dr. Hauke Lilie)
- 09/2005 Intensivkurs „Grundlagen der Säuger-Zell- und Gewebekultur und aktuelle
Aspekte der Stammzellforschung“, Arbeitsgruppe In vitro Differenzierung
am IPK Gatersleben
- 04/2009 TeachSG Workshop: Expertise in Macromolecular Structure Refinement,
Prag
- 07/2007 – 08/2007 Wissenschaftliche Hilfskraft mit Abschluss
- 05/2005 – 07/2005 Betreuung des Praktikums Enzymkinetik I an der Martin-Luther-
Universität Halle-Wittenberg

Förderungen

- 10/2007 – 09/2008 Promotionsstipendium der Friedrich-Naumann-Stiftung für die Freiheit

Vortrag

- 09/2009 “X-ray crystallographic snapshots of intermediates in transaldolase”, 12th
Heart of Europe Bio-Crystallography Meeting (HEC 12) Třešť, Tschechien

Poster

- 08/2010 Anja Lehweß-Litzmann, Piotr Neumann, Ralf Ficner & Kai Tittmann: Struc-
ture and mechanism of transaldolase from the thermophilic archeon
Thermoplasma acidophilum. GZMB-summer symposium