Untersuchungen zu molekularen, strukturellen und biokatalytischen Aspekten des Vitamin B1-abhängigen Enzyms Transketolase A aus *Escherichia coli*.

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

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



von

Peter Asztalos

geboren am 18. August 1978 in Halle/Saale

Gutachter:

- 1. Professor Dr. G. Hübner
- 2. Professor Dr. Y. Muller
- 3. Professor em. Dr. R. L. Schowen

Tag der öffentlichen Verteidigung: 20. Februar 2008

urn:nbn:de:gbv:3-000013193 [http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000013193]



ULB Sachsen-Anhalt

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen und Symbole

Enzyme	
AHAS	Acetohydroxysäure-Synthase (EC 2.2.1.6.)
DXS	1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat-Synthase (EC 2.2.1.7)
PDC	Pyruvat-Decarboxylase (EC 4.1.1.1.)
PDH	Pyruvat-Dehydrogenase (EC 1.2.4.1.)
POX	Pyruvat-Oxidase (EC 1.2.3.3.)
TK´s	Transketolase (EC 2.2.1.1.)
TKA	Transketolase A Wildtyp aus Escherichia coli (ohne His6-tag)
ТК	Transketolase A Wildtyp aus Escherichia coli mit His6-tag
Glu ⁴¹¹ Ala	Proteinvariante Glu ⁴¹¹ Ala der TK
His ⁴⁷³ Ala	Proteinvariante His ⁴⁷³ Ala der TK
DV	Proteindoppelvariante His ²⁶ Ala/His ²⁶¹ Ala der TK
уТК	Transketolase Wildtyp aus Saccharomyces cerevisiae
hTK	Transketolase Wildtyp aus Homo sapiens

Intermediate	
C5-ThDP	2-[2-(1,2,3,4-Tetrahydroxy-5-phospho-pentyl)]-ThDP
C5-Thiamin	2-[2-(1,2,3,4-Tetrahhydroxy-5-phospho-pentyl)]-thiamin
C5-Thiazolium	2-[2-(1,2,3,4-Tetrahhydroxy-5-phospho-pentyl)]-3,4-dimethyl-5-
	hydroxyethyl-thiazoliumion
C6-ThDP	2-[2-(1,2,3,4,5-Pentahydroxy-6-phospho-hexyl)]-ThDP
C7-ThDP	2-[2-(1,2,3,4,5,6-Hexahydroxy-7-phospho-heptyl)]-ThDP
DHE-ThDP	2-(1,2-Dihydroxyethyl)-ThDP
HE-ThDP	2-(1-Hydroxyethyl)-ThDP
HL-ThDP	2-Hydroxylactyl-ThDP
L-ThDP	2-Lactyl-ThDP
PL-ThDP	Phosphonolactyl-ThDP

Auf die Benennung der Konfigurationen der einzelnen Chiralitätszentren der Intermediate wurde verzichtet.

Weitere Abkürzungen und Symbole

A ₂₈₀	UV-Absorption bei 280 nm
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-diphosphat
Amp	Ampicillin
арр	apparent
Аро	Apoenzym, Protein ohne Cofaktor(en)
B3LYP	Becke-3-Parameter-Lee-Yang-Parr Methode
bp	Basenpaare
CD	Circulardichroismus
δ	chemische Verschiebung (ppm)
d	Schichtdicke (cm)
Da	Dalton
ΔE	Absorptionsänderung
DFT	Dichtefunktionaltheorie
DTE	1,4-Dithioerythrit
3	Extinktionskoeffizient (M ⁻¹ · cm ⁻¹)
E4P	D-Erythrose-4-phosphat
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
F6P	D-Fructose-6-phosphat
Ferricyanid	Kaliumhexacyanoferrat-(III)
FPLC	fast protein liquid chromatography
Θ	Elliptizität (mdeg)
[Θ] _{MRW}	<i>mean residue weight</i> -Elliptizität (deg · cm ² · dmol ⁻¹)
G3P	D-Glycerinaldehyd-3-phosphat
G3P-DH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GA	Glycolaldehyd
GI.	Gleichung
Gly-Gly	Glycylglycin
HAHL	Hydroxyaceto-hydroxylactat
Holo	Holoenzym, Protein mit Cofaktor(en)
HPA	β-Hydroxypyruvat
IPTG	IsopropyI-β-D-thiogalactosid
k, k _{app}	Geschwindigkeitskonstante, apparente Geschwindigkeitskonstante (s ⁻¹)
kB	Kilobasenpaar
K _D	Dissoziationskonstante (M)
K _M	Michaelis-Menten-Konstante (M)

Kı	Inhibitorkonstante (M)
λ	Wellenlänge (nm)
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
MRW	mean residue weight dh. mittlere Molmasse einer
	Aminosäure: 110 g · mol ⁻¹
MW	Molekulargewicht (Da)
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid (reduzierte Form)
obs	beobachteter Wert
OD	optische Dichte
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
pGSJ427	Expressionsvektor der bakteriellen Transketolase A
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
R5P	D-Ribose-5-phosphat
r.m.s.	root mean square, Standardabweichung vom Mittelwert
rpm	Umdrehungen pro Minute
S7P	D-Sedoheptulose-7-phosphat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
ThDP	Thiamindiphosphat
tktA	Gen für die TKA Wildtyp
T _M	Schmelztemperatur
TPI	Triosephosphat-Isomerase
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>units</i> , Internationale Einheit (μ mol \cdot min ⁻¹)
UV	ultraviolett
X5P	D-Xylulose-5-phosphat

Anmerkung zur Terminologie

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Anglizismen sind *kursiv* gedruckt. Für Aminosäuren wurde der Dreibuchstaben-, für Nukleinsäuren der übliche Einbuchstaben-Code verwendet.

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Transketolase	1
1.2.	Funktionen des Cofaktors ThDP	9
2.	MATERIALIEN & METHODEN	11
2.1.	Materialien	11
2.1 2.1	.1.Chemikalien, Enzyme, Bakterien.2.Geräte & sonstige Materialien	11 13
2.2.	Molekularbiologische Arbeiten	15
2.3.	Expression und Reinigung	21
2.3 2.3 2.3 2.3 2.3	 Zellanzucht, homologe Genexpression und Zellernte Proteinreinigung Reinigung der Transketolase Wildtyp ohne His₆-tag (TKA) Reinigung der Proteine mit His₆-tag (TK und Varianten) Bestimmung der Molekulargewichte mittels Massenspektrometrie 	
2.4. 2.5.	Elektrophoresen für DNA und Proteine	25
2.6.	Spektroskopische Methoden	
2.6 2.6 2.6 2.6 2.6 2.6 2.6	 Fluoreszenzspektroskopie	28 29 31 31 34 35 35 35 36
2.7.	Röntgenkristallographie	38
2.8.	Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC)	40
2.9.	GC/MS-Analysen	41
2.10.	DFT-Rechnungen	41

3.	ERGEBNISSE & DISKUSSION	42
3.1.	Sequenzvergleiche von Transketolase-Primärstrukturen	42
3.2.	Molekularbiologische Arbeiten	45
3.2 3.2 3.2	 Rückmutation zu Transketolase Wildtyp (TKA) Herstellung von <i>active-site</i>-Varianten der Transketolase A Insertion einer Sequenz für einen C-terminalen His₆-<i>tag</i> 	45 46 46
3.3.	Expression, Reinigung, strukturelle Integrität der Transketolase A (-varianten)	48
3.3 3.3 3.3	 Expression und Reinigung Massenspektrometrische Molekulargewichtsbestimmung Bestimmung des Sekundärstrukturgehalts der Proteine 	48 48 49
3.4.	Charakterisierung der Transketolase A (-varianten)	52
3.4 3.4 3.4 3.4	 Fluoreszenzspektroskopische Bestimmung der Dissoziationskonstanten für ThDP und ThDP-Analoga Enzymatische Aktivität Schnelle Kinetiken (¹H-NMR und <i>stopped-flow</i>-Absorptionsspektroskopie) Untersuchungen zur C2-Deprotonierung des enzymgebundenen Cofaktors ThDP 	52 56 62 73
3.5.	Strukturelle Untersuchungen von Transketolase A	77
3.5 3.5 3.5	 Donorintermediatstrukturen der bakteriellen Transketolase A Struktur des Komplexes von Transketolase A mit Akzeptorsubstrat Strukturen der Holoenzymkomplexe von TK-Varianten mit ThDP sowie des Holoenzymkomplexes vom Wildtypenzym mit N3´-Pyridyl-ThDP 	79 86 94
3.6.	Untersuchungen zur Existenz einer iminotautomeren Form des Cofaktors	98
3.7.	Nachweis einer AHAS-ähnlichen Reaktion der Transketolase A	107
4.	ZUSAMMENFASSUNG	113
4.1.	Ausblick	117
5.	REFERENZEN	118
6.	ANHANG	131

1. Einleitung

Neben den chemischen sind es vor allem biologische Katalysatoren, welche von großem Interesse für die Wissenschaft, Medizin und Industrie sind. Auf der einen Seite stehen dabei mechanistische Fragestellungen zur Katalyse und zur Regulation im Vordergrund, während auf der anderen Seite die Herstellung von Produkten mit spezifischen Eigenschaften unter ökonomischen und ökologischen Gesichtspunkten von Bedeutung ist. Eine Klasse von Enzymen, welche bereits unter diesen Aspekten untersucht wurde, ist die Gruppe der Transketolasen, welche sich durch ihre medizinisch relevante Position im Stoffwechsel beziehungsweise durch ihre hohe Stereo- und Regiospezifität bei einem relativ breiten Substratspektrum in der Zuckerchemie auszeichnen.

Diese Dissertationsschrift befasst sich mit dem prokaryotischen Enzym Transketolase A aus *Escherichia coli* als Untersuchungsobjekt. Nach einer allgemeinen Einführung werden im Weiteren kinetische, strukturelle, spektroskopische und biokatalytische Resultate vorgestellt.

1.1. Transketolase

Historisch betrachtet, wurde im Hefeorganismus eine enzymatische Aktivität durch die Arbeitsgruppen um RACKER und HORECKER entdeckt, welche die Bildung von Triosephosphat aus Pentosephosphat katalysiert. Ribulose-5-phosphat wurde als die zu spaltende Pentose identifiziert, wobei die Spaltreaktion nur in Anwesenheit von Aldehyden ablief (de la Haba *et al.*, 1955). Die Übertragung eines C2-Ketolrests wurde vermutet, weshalb das unbekannte Protein aufgrund der Transferreaktion als "Transketolase" (TK) benannt wurde (Racker *et al.*, 1953). Nachdem die Synthese und Reinigung einzelner Zuckerphosphate in entsprechenden Ausbeuten gelang wurde jedoch klar, dass Xylulose-5-phosphat (X5P) das eigentliche Donorsubstrat der Transketolase darstellt (Horecker *et al.*, 1956, Datta *et al.*, 1961_{a, b}). Die vorher beobachtete TK-Reaktion mit Ribulose-5-phosphat ließ sich schließlich auf eine Verunreinigung der Enzympräparation mit Ribulose-5-phosphat-Epimerase zurückführen (Hurwitz *et al.*, 1956; Stumpf *et al.*, 1956). Die darauf folgende Suche nach weiteren Zuckern und deren umsetzenden Enzymen erlaubte in den folgenden Jahren einen neuartigen Stoffwechselweg zur Umsetzung von Glucose zu formulieren. Dieser hielt als "Pentosephosphatweg" Einzug in die Literatur (Horecker *et al.*, 2002).

Transketolase im Stoffwechsel

Neben der Glycolyse ist der Pentosephosphatweg eine wichtige Stoffwechselroute beim Umsatz von Glucose im Cytosol. So erfolgen etwa in der Leber rund 30 % der Glucoseoxidation über diesen Weg (Voet & Voet, 1995). Der Pentosephosphatweg lässt sich in zwei Abschnitte untergliedern, welche als "oxidativer" und "nicht-oxidativer" Teil bezeichnet werden (Schema 1.1). Der oxidative Teil, charakterisiert durch die Umsetzung von Glucose-6-phosphat zu Ribulose-5phosphat, dient der Generierung von NADPH, welches als Reduktionsäquivalent zur Biosynthese (Fettsäuren, Cholesterin) genutzt wird. Im nicht-oxidativen Teil schließen sich verschiedene Interkonversionsschritte von Ribulose-5-phosphat, Ribose-5-phosphat und Xylulose-5-phosphat an, um für die Glycolyse verwertbare Zuckerphosphate, wie Fructose-6-phosphat und Glycerinaldehyd-3-phosphat, zu erhalten. Transketolase stellt eines der für diese Interkonversionen essentiellen Enzyme dar, welches im Zusammenspiel mit Transaldolase die reversible Verbindung zur Glycolyse ermöglicht. Einige der dabei auftretenden Metabolite sind zudem wichtige biosynthetische Vorstufen.



Schema 1.1 Pentosephosphatweg. Die Reaktionen im nicht-oxidativen Teil stellen reversible Schritte dar (Voet & Voet, 1995).

Von besonderer Bedeutung ist hierbei Ribose-5-phosphat, welches als Nukleotidbaustein für DNA-Replikationsprozesse und als Bestandteil verschiedener Cofaktoren (zum Beispiel FAD, NAD⁺, Coenzym A) essentiell ist. Weiterhin wird durch die Zuckerumwandlungen im nichtoxidativen Teil Erythrose-4-phosphat gebildet, welches als Vorstufe zur Synthese aromatischer Aminosäuren und des Pyridinrings des Vitamin B₆ in *E. coli* dient (Sundström *et al.*, 1993; Zhao *et al.*, 1994). Neben den Umsätzen im Pentosephosphatweg ist Transketolase für gleiche Reaktionen im Calvin-Zyklus pflanzlicher Chloroplasten verantwortlich.

Cofaktoren und Struktur des Enzyms

Allgemein katalysiert das Enzym Transketolase den reversiblen Transfer einer Ketoleinheit von einer Donorketose auf eine Akzeptoraldose. Für den enzymatischen Umsatz sind dabei zwei niedermolekulare Komponenten essentiell, bei denen es sich zum einen um Thiamindiphosphat (ThDP), der biologisch aktiven Form des Vitamin B₁, handelt. Zum anderen ist die Anwesenheit zweiwertiger Metallionen notwendig, welche die Ankerfunktion zwischen dem Diphosphatrest des ThDP und der Apoproteinkomponente übernehmen und diese so im aktiven Zentrum fixieren (Abb. 1.1, unten). KOCHETOV *et al.* (1970_{a, b}) wiesen Ca²⁺ als natives Metallion nach, wobei jedoch auch andere zweiwertige Ionen, wie Mg²⁺, Ni²⁺ und Mn²⁺, vom Enzym akzeptiert werden (Sprenger *et al.*, 1995; Wood, 1985). Diesbezüglich fand SCHÖRKEN (1997) für das bakterielle Enzym identische Aktivitäten für Mg²⁺ und Ca²⁺ als Metallionen bei der Rekombination mit Apotransketolase.

1989 war es HAWKINS et al. durch Sequenzvergleiche möglich, ein allgemeines Motiv für die Bindung des Phosphatrests von ThDP zu identifizieren. Röntgenkristallstrukturen ThDPabhängiger Enzyme waren bis dato nicht verfügbar, so dass elektronenmikroskopische Untersuchungen durch HÜBNER et al. (1975a) erstmals einen Blick auf die räumliche Struktur eines von diesem Cofaktor abhängigen Enzyms, der Pyruvat-Decarboxylase aus Hefe, lieferten. Durch Arbeiten der Gruppe um SCHNEIDER gelang schließlich die Lösung der Röntgenkristallstruktur der Transketolase aus Saccharomyces cerevisiae (Schneider et al., 1989; Sundström et al., 1992; Lindqvist et al., 1992; Nikkola et al., 1994) und damit erstmals die Aufklärung der Struktur-Funktionsbeziehungen eines ThDP-abhängigen Enzyms. Kurz darauf veröffentlichten LITTLECHILD et al. (1995) und ISUPOV et al. (1999) die Struktur des bakteriellen Enzyms mit einer Auflösung von 1,9 Å (Abb. 1.1). Nach derzeitigem Stand sind neben den beschriebenen zwei Transketolasen die Strukturen der Enzyme aus Zea mays (Gerhardt et al., 2003) und Leishmania mexicana (Veitch et al., 2004) in der Brookhaven Proteindatenbank verzeichnet.

Basierend auf Experimenten mittels analytischer Ultrazentrifugation vermuteten HEINRICH *et al.* (1971_a) und CAVALIERI *et al.* (1975) für Transketolase eine homodimere Oligomerisierung in Lösung, welche durch die Röntgenkristallstrukturen bestätigt werden konnte. Je nach

Organismus ergaben sich pro Monomer dabei Molekulargewichte von etwa 68–76 kDa (Wood, 1985). Eine Ausnahme hinsichtlich des Oligomerisierungsgrades scheint das Enzym aus *Candida boidinii* zu bilden, welches als Tetramer beschrieben wurde (Kato *et al.*, 1982).



Abb. 1.1 <u>Oben links</u>: Röntgenkristallstruktur der Transketolase A aus *E. coli* nach ISUPOV *et al.* (1999; Datenbankeintrag: 1QGD). Die Untereinheiten sind grün und orange, die flexiblen *loops* zur Cofaktorbindung blau und rot sowie ThDP gelb dargestellt. <u>Oben rechts</u>: Domänenstruktur eines Transketolasemonomers. Jede Domäne ist unterschiedlich farbig markiert. Zur Orientierung wurden beide ThDP-Moleküle eines Dimers beigefügt. <u>Unten</u>: Schematische Darstellung des aktiven Zentrums zur Cofaktorbindung im Abstand von 5 Å um ThDP sowie die Interaktionen einzelner Seitenketten. Unterstrichene beziehungsweise nicht unterstrichene Reste stellen jeweils Aminosäuren unterschiedlicher Untereinheiten dar. Die Nummerierung wichtiger Atome des Cofaktors wurde nach der Nomenklatur der Brookhaven Datenbank durchgeführt und wird während der gesamten Arbeit beibehalten.

Ferner offenbarten die Röntgenkristallstrukturen die stöchiometrische Bindung eines ThDP-Moleküls im Komplex mit einem Metallatom pro Monomer Apoprotein. Der interessanteste Befund der Kristallstrukturen war jedoch die Tatsache, dass Thiamindiphosphat im enzymgebundenen Zustand in der "V-Konformation" zu finden ist, welche die Aminogruppe in räumliche Nähe zum reaktiven C2-Atom des Thiazoliumrings zwingt.

Diese Konformation ist von SCHELLENBERGER, HÜBNER und Mitarbeitern aufgrund von Cofaktoranalogastudien bereits 1967 postuliert (Schellenberger *et al.*, 1967_{a, b}) und eine Beteiligung der Aminogruppe an der Katalyse gezeigt worden (Hübner *et al.*, 1975_b). Alle gegenwärtig bekannten Kristallstrukturen ThDP-abhängiger Enzyme weisen die V-Konformation des Cofaktors im enzymgebundenen Zustand auf, während in Lösung hauptsächlich die F- und S-Konformationen zu finden sind. Generell unterscheiden sich die Konformationen lediglich in der Orientierung der Ringsysteme um die Methylenbrücke zueinander, welche durch die Winkel φ_{T} und φ_{p} charakterisiert sind (Schema 1.2). Für die V-Konformation betragen φ_{T} und $\varphi_{p} \pm 90^{\circ}$ (Shin *et al.*, 1993; Plechter *et al.*, 1966, 1972).

Die Bindung von ThDP in Transketolase erfolgt in der Kontaktregion der Monomere, wobei Seitenketten beider Untereinheiten an der Cofaktorbindung beteiligt sind (Abb. 1.1, unten). Zwei flexible *loops* des Apoproteins erfahren zudem eine Stabilisierung infolge der Cofaktorbindung (Abb. 1.1, links) (Sundström *et al.*, 1992; Nikkola *et al.*, 1994). Das Dimer kann somit als die minimale funktionelle Einheit verstanden werden.

Jedes Monomer der bakteriellen Transketolase unterteilt sich in 3 Domänen (Schneider et al., 1998), wobei die N-terminale (PP-) Domäne (Reste 1-317) den Pyrophosphatrest (Diphosphatrest) des ThDP fixiert (Abb. 1.1, rechts). Die mittlere (Pyr-) Domäne (318 - 528) ist für die Amino**pyr**imidinrings verantwortlich. Die Überlagerung Bindung des der Transketolasedomänen mit Strukturen anderer ThDP-abhängiger Enzyme ergab eine zirkulär permutierte Domänenanordnung im Vergleich zur Pyruvat-Oxidase (POX) und Pyruvat-Decarboxylase (PDC) (Muller et al., 1993a). N-terminal wurde bei diesen Enzymen die Pyr-Domäne und C-terminal die PP-Domäne auf einer Polypeptidkette lokalisiert. Dennoch ließen sich für die Cofaktorbindung dieselben Sekundärstrukturelemente durch die Interaktion zweier Monomere¹ festhalten (Schneider *et al.*, 1998). Für die C-terminale Domäne (Reste 529 - 662) der Transketolase konnte bisher keine Funktion festgestellt werden, wobei DUGGLEBY et al. (2006) jedoch eine Nukleotidbindungsfunktion postulierten, wie sie die FAD-bindenden Enzyme POX (Muller et al., 1993_b) und AHAS (Pang et al., 2002) aufweisen. Eine Nukleotidbindungsfunktion aufgrund von $\beta\alpha\beta$ -Strukturelementen in Anlehnung an NADH-bindende Enzyme wurde auch von SCHENK et al. (1997, 1998) identifiziert und als "Transketolase-spezifisches Motiv" vorgeschlagen.

¹ XIANG *et al.* (2007) zeigten erstmals die einzige Ausnahme, das Enzym 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat-Synthase (DXS), bei dem der Cofaktor ThDP vollständig durch die Polypeptidkette eines Monomers gebunden ist.

Unterstützt wird diese Vermutung durch die kompetitive Hemmung der Transketolaseaktivität durch die Metabolite ADP ($K_I = 0,54$ mM) und 5-Phosphoribosyl-1-diphosphat ($K_I = 0,14$ mM). HOSOMI *et al.* (1989) vermuteten aus diesen Resultaten eine Regulationsfunktion des Enzyms bei der Nukleotidbiosynthese.

Der enzymatische Katalysezyklus der Transketolase

Durch Arbeiten von BRESLOW (1957, 1958) wurde das C2-Atom des Thiazoliumrings als Ort der kovalenten Thiaminkatalyse identifiziert und der pK_A-Wert des C2-Protons im freien ThDP mit 17-19 (Washabaugh *et al.*, 1988) ermittelt. Aufgrund dieses hohen pK_A-Wertes ließen sich jedoch nicht die beobachteten enzymatischen Umsatzgeschwindigkeiten ThDP-abhängiger Enzyme erklären. Erst die Arbeiten von KERN *et al.* (1997) und HÜBNER *et al.* (1998) konnten die Einflüsse des Apoproteins sowie funktioneller Bereiche des Cofaktors (N1´-Atom, 4´-Aminofunktion) auf dessen Aktivierung in Proteinen klären, welche für die schnellen enzymatischen Umsätze verantwortlich sind. Zudem war es SCHOWEN (1998) und HONG & SCHOWEN (1998) möglich, die enzymatischen Geschwindigkeiten durch Analyse der energetischen Beiträge einzelner Elementarschritte an den Beispielen der Pyruvat-Decarboxylasen aus Hefe und *Zymomonas mobilis* zu erklären und ein Bild der Grund- und Übergangszustände im Vergleich zur nichtenzymatischen Thiaminkatalyse zu zeichnen. Das Prinzip der Cofaktoraktivierung durch schnelle Dissoziation des C2-Protons bestätigte sich bisher für alle ThDP-abhängigen Enzyme.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeiten resultierte jedoch die dringliche Frage nach dem Protonierungszustand der Aminogruppe des ThDP und der möglichen Beteiligung einer 1´,4´iminotautomeren Form des Cofaktors an der Katalyse (Schema 1.2), welche aktuell kontrovers diskutiert wird. Nach den derzeitigen Vorstellungen zur Aktivierung von ThDP sowie dem für Transketolasen beschriebenen *ping-pong*-Mechanismus kann folgender Katalysezyklus für das Enzym (Schema 1.2) erstellt werden.

Nach dem initialen Schritt der Protonenabstraktion am C2-Atom des Thiazoliumrings zum Ylid, kann der nukleophile Angriff des Carbanions auf die Ketose unter Ausbildung des kovalenten Donorintermediats stattfinden. Durch Abspaltung der Aldose aus dem Donorintermediat wird die zentrale Zwischenstufe, das α-Carbanion des DHE-ThDP, gebildet, welches in Resonanz mit der Enaminstruktur steht. Der C2-Ketolrest wird im nächsten Schritt mit einer Akzeptoraldose unter C-C-Bindungsbildung ligiert und das Produkt abgelöst. Mit einer ¹H-NMR-basierten Methode nach TITTMANN *et al.* (2003) sind die während des Katalysezyklus' auftretenden kovalenten ThDP-Intermediate detektierbar.



Schema 1.2 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 Fructose-6-phosphat (F6P) und G3P verlaufen analog. Die räumliche Lage der Ringsysteme des Cofaktors wird durch die Winkel ϕ_{T} und ϕ_{p} wiedergegeben (siehe Text). PP²⁻ kennzeichnet den Diphosphatrest des Cofaktors.

Phylogenese

Die Transketolase ist als ubiquitär vorkommendes Enzym in allen Organismenreichen bekannt, wobei Reinigungsvorschriften des Proteins aus mindestens 12 unterschiedlichen Quellen etabliert sind (Schenk et al., 1998). Der Vergleich von 22 Primärstrukturen der TK ergab 50 Aminosäuren, welche absolut konserviert sind (Schenk et al., 1997). Diese umfassen vor allem Reste der Cofaktor- und Substratbindung. Aufgrund der geringen evolutionären Dynamik (die Geschwindigkeit der synonymen Substitutionen wurde mit 2,65 ± 0,28 pro Aminosäure und 10⁹ Jahren für die humane TK bestimmt) und der ubiquitären Verteilung schlossen die Autoren, dass Transketolase ein evolutionär eher konserviertes Protein darstellt und schlugen dieses als Modellsystem einer "Molekularen Uhr" vor. Zusätzlich wurde für das Enzym das Auftreten von Isoformen in diversen Organismen wie Escherichia coli (Sprenger, 1991, 1992, 1993; lida et al., 1993) und Hefe (Sundström et al., 1993; Schaaff-Gerstenschläger et al., 1993) beschrieben. Phylogenetisch vermuteten SCHENK et al. (1997) daher, dass das Gen der bakteriellen Transketolase B eine Vorläuferform der Transketolase A darstellt. Neuere Arbeiten von JUNG et al. (2005) zeigten jedoch eine transkriptionell entgegengesetzte, Sigmafaktor (RpoS)-abhängige Genexpression der Isoenzyme in Escherichia coli. Während das Gen der Transketolase A hauptsächlich in der exponentiellen Wachstumsphase exprimiert wird, lässt sich Transketolase B

vornehmlich in der stationären Phase nachweisen. Eine Vorläuferfunktion der Isoform B ist deshalb eher fragwürdig. Plausibler erscheint die vermutete evolutionäre Entwicklung aller ThDPabhängigen Enzyme nach DUGGLEBY (2006), der ein allgemeines "Vorläuferprotein" postuliert und als dieses die Sulfopyruvat-Decarboxylase vorschlägt.

Medizin

Spannende Aspekte zur Transketolase stammen aus diversen Bereichen der Humanmedizin, wobei diesbezüglich das Enzym mit dem Wernicke-Korsakow-Syndrom (WKS) in Verbindung gebracht wird. Das Korsakow-Syndrom beschreibt das chronische Auftreten einer Wernicke-Encephalopathie, einer nicht-entzündlichen Erkrankung des zentralen Nervensystems. Die Ursache liegt in einem Mangel an Vitamin B₁ begründet, welcher häufig bei chronischem Alkoholismus durch Resorptionsstörungen auftritt. Vielfach wurden in der Literatur Mutationen des humanen Transketolasegens als molekulare Ursache des Wernicke-Korsakow-Syndroms vermutet. Einige DNA-Sequenzvergleiche mit Kontrollen ergaben jedoch keinerlei Veränderungen des genetischen Materials des Patienten (McCool *et al.*, 1993; Martin *et al.*, 1995). Vielmehr ließ sich durch andere Studien die Aktivität des ThDP-abhängigen Enzyms α-Ketoglutarat-Dehydrogenase mit dem Krankheitsbild des WKS korrelieren (Zusammenfassung in Schenk *et al.*, 1998).

Andererseits gelang in Fibroblastenkulturen von Alzheimerpatienten der Nachweis einer veränderten Transketolaseaktivität, welche durch die proteolytische Aktivität einer Cysteinprotease erklärbar war (Paoletti *et al.*, 1997). Aus diesem Grund wurde die humane TK als Marker für die Alzheimer´sche Krankheit vorgeschlagen (Tombaccini *et al.*, 1994).

Interessanterweise zeigen neuere Untersuchungen, dass das ThDP-Derivat Benfotiamin, (Monographie "Benfotiamine", 2006) mehrere Wege der Pathogenese von durch Diabetes verursachten Gefäßerkrankungen (*diabetic vascular disease*) inhibiert, indem der Umsatz von F6P und G3P zu Pentosephosphaten aktiviert wird. Dies wiederum führt zu einer Reduktion der Überproduktion von Superoxid in der Atmungskette. Als molekulare Ursache ließ sich eine gesteigerte Transketolaseaktivität feststellen, während andere ThDP-abhängige Enzyme keinerlei Aktivitätsunterschiede aufwiesen (Hammes *et al.*, 2003). Diese Daten deuten auf eine Möglichkeit zur Prophylaxe von Folgeschäden bei Diabetes hin.

Als letztes sei auf Untersuchungen zur Transketolase in der Krebsforschung hingewiesen. Durch Arbeiten von BOROS *et al.* (1998_{a, b, c}; Referenzen darin) und CASCANTE *et al.* (2000) konnte gezeigt werden, dass etwa 70 % der Ribosebausteine zur *de novo*-Nukleinsäuresynthese durch den "Transketolaseweg" synthetisiert werden. Zudem wurde nachgewiesen, dass die Tumorzellproliferation durch Oxithiamin *in vivo* zu über 90 % inhibiert werden kann. Aus dem stark erhöhten Bedarf an R5P als Zuckerbaustein zur Nukleinsäuresynthese in Tumorzellen

schlussfolgerten die Autoren, dass den Transketolase-katalysierten Schritten des Pentosephosphatwegs eine hohe Bedeutung beigemessen werden muss. Gleichzeitig empfahlen sie eine Thiamin-reduzierte klinische Behandlung von Krebspatienten als geeignete Therapiemethode. Bisher angewandte Protokolle sahen im Falle einer Krebserkrankung eine Überversorgung mit Vitamin B₁ von bis zu 20000 % vor.

1.2. Funktionen des Cofaktors ThDP

Neben der "katalytischen Cofaktorfunktion" sind aufgrund neuer Ergebnisse weitere Funktionen von ThDP entdeckt beziehungsweise vorgeschlagen worden.

"Schalterfunktion" in riboswitches

Riboswitches stellen untranslatierte mRNA-Regionen dar, welche in Abhängigkeit der Assoziation spezifischer Metabolite unterschiedliche strukturelle Konformationen annehmen. Diese verschiedenen Zustände werden als "molekularer Schalter" erkannt und dienen zur Regulation der Genexpression des *riboswitch*-Substrats (Edwards *et al.*, 2007).

Für *Escherichia coli* fanden WINKLER *et al.* (2002), dass mRNA's, welche für Enzyme der Vitamin B₁-Biosynthese codieren, Thiamin und ThDP zu binden vermögen und somit die Translation der mRNA durch eine strukturelle Änderung des Shine-Dalgarno-Sequenzbereichs inhibieren. Es zeigte sich weiterhin, dass ähnliche mRNA-Elemente in eukaryotischen Organismen zu finden sind (Sundarsan *et al.*, 2003). 2006 klärten THORE *et al.* und SERGANOV *et al.* die Kristallstrukturen der *riboswitches* im Komplex mit ThDP und Mg²⁺ aus *Arabidopsis thaliana* bzw. *Escherichia coli* auf, wobei die strukturelle Ursache des "molekularen Schalters" identifiziert wurde. Im Gegensatz zur Konformation in von Vitamin B1-abhängigen Proteinen wies ThDP in diesen Komplexen eine gestreckte Orientierung auf, welche nicht der enzymatischen V-Konformation ähnlich ist.

"Signalfunktion" als Adenosin-thiamintriphosphat (AThTP)

Adeninnukleotide werden häufig in Form von Cofaktoren als NAD⁺, FAD und Coenzym A in biochemischen Prozessen gefunden. BETTENDORFF *et al.* (2007) entdeckten kürzlich eine unbekannte Adenosin-thiamintriphosphatstruktur, in welcher Thiamin kovalent an ATP gebunden vorliegt. Neben dem Vorkommen in *Escherichia coli* gelang auch der Nachweis von AThTP in pflanzlichen und tierischen Geweben. BETTENDORFF *et al.* demonstrierten zudem für *Escherichia coli* die Akkumulation von AThTP bei Hungerstress in Abwesenheit einer Kohlenstoffquelle und vermuteten daher eine Signalfunktion. Eventuell stellt AThTP auch ein Präkursor für Thiamintriphosphat dar, welches als Phosphoryldonor bestimmter Kinasen dient.

Zielstellung der Dissertation

Der Schwerpunkt der Untersuchung im Rahmen dieser Dissertation lag auf mechanistischstrukturellen Aspekten der Transketolase A aus *Escherichia coli*, da diesbezüglich für das prokaryotische Protein nur wenige Daten vorlagen und deshalb ein besseres Verständnis des Enzyms auf molekularer Ebene wünschenswert war. SPRENGER *et al.* (1995) veröffentlichten eine erste Charakterisierung diverser enzymatischer Substratumsätze, jedoch wurden keine detaillierten mechanistischen Untersuchungen durchgeführt. Daher war es notwendig, durch ortsgerichtete Mutagenesen *active-site*-Varianten zu generieren und diese zu charakterisieren. Besonderer Wert sollte bei der Auswahl jenen Aminosäuren zukommen, welche im aktiven Zentrum an der Spaltung der enzymgebundenen Donorsubstrate beteiligt sind. Um ein einfaches Reinigungsschema der Proteine zu etablieren, war die Einführung eines Hexahistidin-*tags* vorgesehen, dessen Einfluss auf diverse Enzymeigenschaften (Aktivität, Cofaktorbindung) bestimmt werden sollte.

Strukturell ist, wie bereits erwähnt, von der bakteriellen Transketolase A nur die Röntgenkristallstruktur des Holoenzymkomplexes verfügbar (Isupov *et al.*, 1999). Durch Wahl geeigneter Reaktionsbedingungen und durch Einsatz von Varianten des Enzyms sollte versucht werden, enzymgebundene Intermediate bzw. Enzym/Substrat-Komplexe zu kristallisieren und deren Struktur aufzuklären. Damit wäre ein Einblick in die während der Katalyse ablaufenden Reaktionsschritte gegeben.

In der Literatur ist für Transketolasen diverser Organismen ein hohes biotechnologisches Potential in chemo-enzymatischen Synthesen zur C-C-Bindungsbildung beschrieben worden. Neben den natürlichen Substratumsätzen von Ketosen und Aldosen kamen hierbei vor allem Umsätze von β -Hydroxypyruvat als Donorsubstrat mit verschiedenen Aldehyden als Akzeptoren (zum Beispiel phosphorylierte bzw. unphosphorylierte α -Hydroxyaldehyde) unter Bildung enantiomerenreiner Produkte zur Anwendung. Es sei an dieser Stelle vorweggenommen, dass eine bisher für die bakterielle Transketolase A unbekannte Carboligationsreaktion von β -Hydroxypyruvat in einer Acetohydroxysäure-Synthase-ähnlichen Reaktion gefunden wurde.

Ein aktuell diskutiertes Thema in der Thiaminforschung ist die Frage nach der spektroskopischen Nachweisbarkeit einer 1',4'-iminotautomeren Form des Cofaktors in ThDP-abhängigen Enzymen (Nemeria *et al.*, 2007; Kovina *et al.*, 2004). Dazu sollten ThDP-analoge Verbindungen als intramolekulare Sonden eingesetzt werden, um die Existenz dieser tautomeren Form in Transketolase zu untersuchen.

Materialien & Methoden 2.

2.1. Materialien

2.1.1. Chemikalien, Enzyme, Bakterien

Chemikalien Hersteller Acrylamidlösung (30 %) Agar-Agar Agarose (*electrophoresis grade*) Ampicillin, Natriumsalz Ammoniumperoxodisulfat Ammoniumsulfat Bacto[™] Trypton Bisacrylamidlösung (2%) Bromphenolblau, Natriumsalz Calciumchlorid-Dihydrat Coomassie Brilant Blue G-250 dNTP-Mix D₂O (99,9 %) DTE **EDTA** Erythrulose Ethylenglycol Ethidiumbromid Kaliumhexacyanoferrat-(III) Fructose-6-phosphat, Dinatriumsalz Glycerin (87 %) Glycylglycin Glycolaldehyd Hefeextrakt β-Hydroxypyruvat, Lithiumsalz Imidazol Magnesiumchlorid Magnesiumsulfat 2-Mercaptoethanol NADH Natriumchlorid **PEG 6000** Merck KGaA, Darmstadt

Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe MP Biomedicals Inc., USA Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe Merck KGaA, Darmstadt Becton, Dickinson and Co., USA Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe Merck KGaA, Darmstadt Merck KGaA, Darmstadt SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg Merck Biosciences (Novagen), UK Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe Laborchemie Apolda Sigma Chemical Co., St. Louis, USA Merck KGaA, Darmstadt ICN Pharmaceuticals Inc., USA Laborchemie Apolda Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Merck KGaA, Darmstadt AppliChem GmbH, Darmstadt ICN Biomedicals Inc., USA SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg Fluka Chemie GmbH, Schweiz Merck KGaA, Darmstadt Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn Merck KGaA, Darmstadt Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe SERVA Feinbiochemica, Heidelberg ICN Biomedicals Inc., USA

PMSF	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
D-Ribose-5-phosphat, Dinatriumsalz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Salzsäure 37 %	Merck KGaA, Darmstadt
SDS	SERVA Feinbiochemica, Heidelberg
Streptomycinsulfat	AppliChem GmbH, Darmstadt
TCA	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
TEMED	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Thiamindiphosphat	ICN Biomedicals Inc., USA
Tris	AppliChem GmbH, Darmstadt
D-Xylulose-5-phosphat, Natriumsalz	Sigma Chemical Co., USA

Alle Substanzen waren von höchstmöglichem Reinheitsgrad.

Enzyme	Hersteller
<i>Bam</i> Η I (15 U/μΙ)	GE Healthcare Europe
calf intestine phosphatase (10000 U/ml)	New England Biolabs, USA
<i>Dpn</i> I (20000 U/ml)	New England Biolabs, USA
<i>Eco</i> R I (20000 U/ml)	New England Biolabs, USA
<i>Mlu</i> I (10000 U/ml)	New England Biolabs, USA
Pfu Turbo DNA Polymerase (2,5 U/µl)	Stratagene, USA
<i>Sma</i> Ι (10 U/μΙ)	GE Healthcare Europe
T4 DNA Ligase (400000 U/ml)	New England Biolabs, USA
G3P-DH/TPI-Mix (310 U/ml; 900 /ml)	Roche Diagnostics, Mannheim

Die angegebenen *units* entsprechen den vom Hersteller definierten Einheiten.

Stamm und Plasmid	Hersteller/ erhalten von
Escherichia coli-JM109	Stratagene, USA
e14 ⁻ (McrA ⁻) <i>recA1 supE44 endA1 h</i>	sdR17($r_{K}^{-}m_{K}^{+}$) gyrA96 relA1 thi-1 (Δ lac-proAB)
[F´ traD36 proAB lac1 ⁹ Z∆M15]	
pGSJ427	freundlicherweise von Prof. Georg Sprenger

(Stuttgart) zur Verfügung gestellt

2.1.2. Geräte & sonstige Materialien

french	-press	
	Gaulin-Hochdruckhomogenisator	APV Homogeniser GmbH, Lübeck
	Micron Lab 40	
Zentrif	ugen	
	Beckman J2-HC Zentrifuge	Beckman Instruments Inc., USA
	Beckman L8-60M Ultrazentrifuge	Beckman Instruments Inc., USA
	Sorvall RC 5B Plus	Kendro Laboratory Products, USA
	Biofuge pico	UniEquip GmbH, Martinsried
UV-Vi	s-Spektrometer	
	DU-640 Spektrophotometer	Beckman Instruments Inc., USA
	V-560 Spektrophotometer	Jasco Inc., USA
	stopped-flow-Absorption SX 18 MV	Applied Photophysics, UK
CD-Sp	pektropolarimeter	
	JA-810	Jasco Inc., USA
	<i>stopped-flow</i> π* -180	Applied Photophysics, UK
NMR-	Spektrometer	
	ARX 400-MHz Avance	Bruker Biospin GmbH, Karlsruhe
rapid-o	quenched-flow-Apparatur	
	RQF-3	KinTek Althouse, USA
Fluore	szenzspektrometer	
	FluoroMax-3	Jobin-Yvon ISA Instruments, Frankreich
Transf	ormationsgerät	
	GenePulser II	Bio-Rad Laboratories, USA
Therm	ocycler	
	Whatman Biometra T-Gradient	Biometra GmbH, Göttingen
X-ray		
	Generator: Micromax 007	Rigaku Corp., Japan
	Detektor: R-AXIS IV++	Rigaku Corp., Japan
	Cryo-Cooler: X-stream 2000	Rigaku Corp., Japan
Masse	enspektrometer	
	Q-TOF 2	Waters GmbH, Eschborn
ITC-Sy	ystem	
	VP-ITC	Microcal Inc. Northampton, USA
DNA-ł	Kits	
	QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen GmbH, Hilden
	QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden
	QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden

FPLC-System

Chromatographiesäulen	
Superdex 75 XK16	GE Healthcare Europe
HiLoad [™] 26/10 Q-Sepharose [™] HP	GE Healthcare Europe
Fractogel EMD TMAE 650 (S)	Merck KGaA, Darmstadt
Ni-NTA Superflow	Qiagen GmbH, Hilden
Standards	
Protein-Standard	3 mg/ml TKA Leu ⁶² Pro (MW = 72 kDa)
DNA-Standard (je 500 µg/ml)	
λ DNA <i>Hin</i> d III- <i>digest</i>	New England Biolabs, USA
50 bp-DNA-Marker (1 mg/ml)	New England Biolabs, USA
1 kB-DNA-Marker	New England Biolabs, USA
KiloBase-DNA-Marker	GE Healthcare, München
sonstige Materialen und Software	
Konzentratoren	
Vivaspin 20 (30000 MWCO)	Sartorius AG, Göttingen
Vivaspin 500 (10000 MWCO)	Sartorius AG, Göttingen
Küvetten	
Präzisionsküvetten (Suprasil)	HELLMA GmbH & Co. KG, Müllheim
Software	
KaleidaGraph V3.6	Synergy Software, USA
Gene Runner V3.05	Hastings Software Inc., USA

Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden

2.2. Molekularbiologische Arbeiten

Das Plasmid pGSJ427, welches freundlicherweise von Professor Georg Sprenger (Stuttgart) zur Verfügung gestellt wurde, diente als Ausgangsmaterial der molekularbiologischen Arbeiten. Es handelte sich hierbei um ein vom pUC19-Vektor abgeleitetes Plasmid, auf welchem das Gen der *Escherichia coli* Transketolase A unter der Kontrolle eines konstitutiven Promotors steht. Detaillierte Informationen zur Isolierung und Klonierung des Gens *tktA* aus *Escherichia coli*-K12 lassen sich in SPRENGER (1991) und SPRENGER *et al.* (1995) finden.

Die Sequenzierung des zur Verfügung gestellten Gens *tktA* zeigte eine Punktmutation an Position 185 von Thymin gegen Cytosin. Die entsprechende Aminosäure Leu⁶² im Protein war gegen Prolin substituiert. Daher war es notwendig, durch ortsgerichtete Mutagenese das Gen für das Wildtypenzym zu generieren, welches schließlich zur Herstellung weiterer *active-site*-Varianten diente. Zur Vereinfachung der Proteinreinigung wurde die Sequenz eines Hexahistidin-*tags* (His₆-*tags*) in die Gene der Wildtyptransketolase A und der Transketolasevarianten eingeführt. Falls nicht explizit anders erwähnt, wurden in der Promotion die Proteine mit His₆-*tag* verwendet.

PCR-Reaktionen

Die PCR-Reaktionen zur Durchführung der ortsgerichteten Mutagenesen wurden nach dem Protokoll des "*QuikChange site-directed mutagenesis kit"* (Stratagene, USA) durchgeführt. Alle Primer wurden von der Firma MWG Biotech (Martinsried) bezogen, die entsprechenden Schmelztemperaturen wurden nach Gleichung 2.1 ermittelt.

$$T_{M} = 81,5 + 0,41 (\% \text{ GC}) - 675/\text{N} - \% \text{ Fehlpaarung}$$
(Gl. 2.1)
$$T_{M} \qquad Schmelztemperatur (\%)$$

N \qquad Anzahl der Basen des Primers

a) Herstellung des Gens für das Wildtypenzym der Transketolase A aus dem Gen der Proteinvariante Leu⁶²Pro

Anhand der aus dem *Escherichia coli*-Genom (Blattner *et al.*, 1997) stammenden Gensequenz für das Wildtypenzym der bakteriellen Transketolase A (*tktA*) wurden mittels des Programms *Gene Runner V3.05* (Hastings Software Inc., USA) spezifische Primer konstruiert, welche für die gewünschte Rückmutation des Nukleotids 185 (C \rightarrow T) eingesetzt wurden. Die Primer sind in Tabelle 2.1. wiedergegeben. Als DNA-*template* der Polymerasekettenreaktion diente das mutierte Plasmid pGSJ427 (T₁₈₅C). Die PCR wurde mit folgenden Parametern durchgeführt:

 a) initiale Denaturierung b) Denaturierung annealing Elongation 	1 Zyklus 12 Zyklen	95 ℃ 95 ℃ 53-66 ℃ 72 ℃	45 s 45 s 1 min 11 min
c) finale Elongation	1 Zyklus	72 ℃	5 min

Tab. 2.1 Primer zur Rückmutation von C₁₈₅T. Ausgetauschte Nukleotide sind fettgedruckt dargestellt.

Funktion	Primer	Nukleotidsequenz $(5^{\prime} \rightarrow 3^{\prime})$	T _M nach Gl. 2.1 (℃)	GC- Gehalt
Rückmutation C ₁₈₅ T	RM-forward	ACC GCT TCG TGC T GT CCA AC	67,35	60 %
	RM-reverse	GTT GGA CAG CAC G AA GCG GT	67,35	60 %

Nach Beendigung der PCR wurden 10 U *Dpn* I zu jedem Reaktionsansatz gegeben, für 1 h bei 37 °C zum vollständigen Abbau der parentalen (methylierten) Plasmidstränge inkubiert und anschließend 2 μl des Ansatzes zur Transformation in *E. coli*-JM109-Zellen (Yanisch-Perron *et al.*, 1985) verwendet.

Aminosäure- austausch	Primer	Nukleotidsequenz $(5^{\prime} \rightarrow 3^{\prime})$	T _M nach Gl. 2.1 (℃)	GC- Gehalt
Glu ⁴¹¹ Ala	forward	GGT GTT CGC G C G TTC GGT AT	67,35	60 %
	reverse	ATA CCG AAC G CG CGA ACA CC	67,35	60 %
Glu ⁴¹¹ Gln	forward	GGT GTT CGC GA C TTC GGT AT	65,30	55 %
	reverse	AT ACC GAA G TC GCG AAC ACC	65,30	55 %
His ⁴⁷³ Ala	forward	GCC CGA CT G CG C AGC CGG TTG AGC AGG TCG	79,05	73,3 %
	reverse	CGA CCT GCT CAA CCG GCT G CG C AG TCG GGC	79,05	73,3 %
His ²⁶ Ala	forward	GCC AAA TCC GGT GCG CCG GGT GCC CCT ATG	77,7	70 %
	reverse	CAT AGG GGC ACC CGG CGC ACC GGA TTT GGC	77,7	70 %
His ²⁶¹ Ala	forward	CAC GAC TCC GCG GGT GCG CC	65,55	80 %
	reverse	GGC GCA CC C GC G GAG TCG TG	65,55	80 %
His ²⁶ Ala/His ²⁶¹ Ala		Primer der Einzelvarianten verwendet (sie	ehe Text)	

Tab. 2.2 Primer für die ortsgerichteten Mutagenesen zur Herstellung der *active-site*-Varianten der bakteriellen Transketolase A. Ausgetauschte Nukleotide sind fettgedruckt dargestellt.

b) Herstellung von active-site-Varianten der bakteriellen Transketolase A

Die PCR-Reaktionen zur Generierung diverser *active-site*-Varianten erfolgten wie unter Abschnitt a) beschrieben, wobei das rückmutierte Plasmid pGSJ427(*tktA*) als DNA-*template* diente und die Primer aus Tab. 2.2 zur Anwendung kamen. Die jeweiligen optimalen *annealing*-Temperaturen der Primer wurden mittels Gradienten-PCR evaluiert. Zur Herstellung der Doppelvariante wurde das Gen der His²⁶Ala-Variante als DNA-*template* in einer PCR mit den Primern für einen His²⁶¹Ala-Austausch verwendet. Die Elongationszeit der PCR-Zyklen wurde auf 8 min 15 s reduziert. Anschließend erfolgten der Verdau mit *Dpn* I und die Transformation in *E. coli*-JM109-Zellen wie unter Abschnitt a) erläutert.

c) Insertion der Sequenz eines His6-tags in die Gene der TKA und Varianten

Für das Wildtypenzym der Transketolase A und die Varianten war die C-terminale Einführung eines His₆-*tags* wünschenswert, um eine schnelle und effiziente Reinigung der Proteine zu ermöglichen. Die Plasmidkarte (Anhang, Abb. 6.1) zeigte ein kurzes Fragment am 3´-Ende des Gens der Transketolase A, welches durch die *Mlu* I-Schnittstelle (Position 3337) sowie die *Bam*H I-Schnittstelle (Position 3698) definiert ist. Es bot sich daher an, diesen Bereich aus den Plasmiden (für das Wildtypenzym und die Varianten) zu entfernen und durch ein DNA-Fragment mit codierender His₆-*tag*-Sequenz zu ersetzen (Abb. 2.1).







Der DNA-Abschnitt mit His₆-*tag*-Sequenz konnte erhalten werden, indem dieser in zwei Segmente unterteilt wurde. Teilfragment 1 lieferte die Sequenz von der *Mlu* I-Schnittstelle zum 3'-Ende des Gens, an welches durch geeignete Primerwahl (Tab. 2.3) die His₆-*tag*-Sequenz eingefügt wurde. Teilfragment 2 generierte die Sequenz vom 3'-Ende des Gens mit der tag-Sequenz zur downstream liegenden BamH I-Schnittstelle. Die PCR zur Generierung der Teilfragmente wurde anhand von Sma I-linearisiertem pGSJ427 als DNA-template wie nachfolgend beschrieben durchgeführt und über ein 2 %iges Agarosegel mittels "QIAquick Gel Extraction Kit" gereinigt. Die erhaltenen Teilstücke ließen sich durch PCR amplifizieren und mittels "QIAquick PCR Purification Kit" reinigen.

a) initiale Denaturierung	1 Zyklus	95 °C	45 s
b) Denaturierung	25 Żyklen	95 °C	40 s
annealing		55-60 °C	45 s
Elongation		72 ℃	40 s
c) finale Elongation	1 Zyklus	72 ℃	5 min

Anschließend erfolgte das *annealing* der beiden Teilsegmente über die komplementäre, neu eingeführte 21 bp His₆-*tag*-Sequenz zur Erzeugung des vollständigen Fragments (1+2). Es wurden 20 µl-Ansätze genutzt, welche je 50 ng der Teilfragmente 1 und 2 sowie je 50 ng HisPr 1 und 3 (Tab. 2.3) enthielten. Die Bedingungen der PCR wurden wie folgt gewählt:

a) initiale Denaturierung	1 Zyklus	95 ℃	1 min
b) Denaturierung	25 Żyklen	95 ℃	1 min
annealing	-	60-70 ℃	45 s
Elongation		72 ℃	1 min
c) finale Elongation	1 Zyklus	72 ℃	5 min

Das erhaltene PCR-Produkt wurde über ein 2 %iges Agarosegel gereinigt, das isolierte Produkt zur Amplifikation mittels HisPr 1 und 3 eingesetzt.

Fragment	Primer	Nukleotidsequenz $(5^{\prime} \rightarrow 3^{\prime})$	T _M nach Gl. 2.1 (℃)	GC- Gehalt
Teilfragment 1	HisPr 1	TAC TGC CGA AAG CGG TTA CT	68,25	50 %
	HisPr 2	TTA GTG GTG GTG GTG GTG GTG CAG CAG TTC TTT TGC TTT CGC	76,7*	52,4 %
Teilfragment 2	HisPr 3	TGA CCA TGA TTA CGC CAA GC	68,25	50 %
	HisPr 4	CTG CAC CAC CAC CAC CAC CAC TAA TTA GCA TTT CGG GTA AAA	76,7*	47,6 %
* Die Schmelztemperatur wurde für den 21 bp-Überlappungsbereich (= tag-Seguenz + Stopp-Codon) berechnet.				

Tab. 2.3 Primer zur Generierung der Teilfragmente zur Einführung der His₆-*tag*-Sequenz in die Gene der Transketolase A und Varianten. Die His₆-*tag*-Nukleotidsequenz ist fettgedruckt abgebildet.

Doppelverdau der Plasmide von Wildtyptransketolase und Varianten

Je 700 ng Plasmid-DNA wurden für 2 h in einem 20 µl-Ansatz bei 37 °C mit 2 U *Mlu* I und 4 U *Bam*H I inkubiert und anschließend für 1 h mit 8 U *calf intestine phosphatase* versetzt, um die Vektor-DNA an den generierten *sticky-ends* zu dephosphorylieren. Die Kontrolle der DNA-Verdaue erfolgte mittels Agarosegel-Elektrophorese, die entsprechenden Banden wurden ausgeschnitten und mittels "*QIAquick Gel Extraction Kit*" gereinigt.

Ligation

In einem 20 μl-Ligationsansatz befanden sich 25 ng doppelverdaute Plasmid-DNA (codierend für Wildtypenzym oder Proteinvarianten) und ein 5fach molarer Überschuss an doppelverdautem Gesamtfragment mit His₆-*tag*-Sequenz. Die Ligation wurde mit T4 DNA-Ligase für 1 h 10 min bei Raumtemperatur durchgeführt. Im Anschluss erfolgte die Transformation von 2 μl des Ligationsansatzes in *E. coli*-JM109-Zellen.

Transformation, Miniexpression und Plasmidpräparation

Die Herstellung elektrokompetenter Zellen sowie die Transformation erfolgten nach TUNG et al. (1995). 2 µl PCR-Reaktion wurden auf Eis zu 40 µl elektrokompetenten E. coli-JM109-Zellen (Yanisch-Perron et al., 1985) gegeben und mittels Elektroporation (Gene Ruler II, Biorad) transformiert. Nach sofortiger Zugabe von 1 ml SOC- (2 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 10 mM MgSO₄, 10 mM MgCl₂) oder LB-Medium (1% (w/v) Trypton, 1% (w/v) NaCl, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, pH 7) zum Transformationsansatz wurde dieser für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte ein Verdünnungsausstrich unter Verwendung verschiedener Volumina (30 µl-500 µl) des Ansatzes auf LB/Amp-Platten (LB-Medium, 2 % (w/v) Agar-Agar, 100 µg/ml Ampicillin). Diese wurden bei 37℃ inkubiert. Nach etwa 20 h Wachstum wurden einzelne Kolonien in Kulturröhrchen mit je 2 ml LB/Amp-Medium transferiert und bei 200 rpm für 8-16 h bei geschüttelt. 100 µl der resultierenden Zellsuspensionen wurden 37°C für einen Miniexpressionstest verwendet und das übrige Zellmaterial zur Plasmidpräparation nach dem Protokoll des "QIAprep Spin Miniprep Kits" verwendet. Die Konzentration der präparierten Plasmid-DNA wurde spektroskopisch bei 260 nm bestimmt und mittels Sequenzierung auf eine erfolgreiche Mutation/Insertion geprüft.

Für den Miniexpressionstest wurden 100 µl Zellsuspension bei 13000 rpm in einer Biofuge pico-Zentrifuge pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 50 µl SDS-Probenpuffer resuspendiert und für 10 min bei 95℃ erhitzt. Nach Inkubation des Ansatzes für mindestens 10 min auf Eis konnten je 10 µl für eine 10 % SDS-PAGE verwendet werden.

DNA-Sequenzierung

Alle DNA-Proben wurden zur Sequenzierung an die Firma MWG Biotech (Martinsried) geschickt. Zur Kontrolle der Nukleotidsequenz wurden mehrere Primer abgeleitet, die in Tabelle 2.4 zusammengefasst sind. Zeigte die Sequenzierreaktion die erfolgreiche Mutation bzw. Insertion, wurden erneut je 0,5 µl präparierte Plasmid-DNA transformiert und aus den daraus resultierenden Plasmidpräparationen die vollständige Sequenzierung der Gene durchgeführt.

Sequenzier- primer	Nukleotidsequenz $(5^{\prime} \rightarrow 3^{\prime})$	Relative Position zum Start-Codon	T _M nach Gl. 2.1 (℃)	GC- Gehalt
SP 1	GCT TGC GGT AAA TTG TTG GC	- 101	68,25	50 %
SP 2	GGC ATC TAT CAA ACG CGC AG	666	70,3	55 %
SP 3	CCG TAA AGC GTC TCA GAA TG	1074	68,25	50 %
SP 4	CGT CAG GTG ATG GTT TAC AC	1363	70,3	55 %
SP 5	CGT CTA CCG ACG CAT TTG AC	1754	70,3	55 %

 Tab. 2.4
 Zusammenfassung der spezifischen Primer zur Sequenzierung der Gene.

2.3. Expression und Reinigung

2.3.1. Zellanzucht, homologe Genexpression und Zellernte

Zellanzucht und Genexpression

Die Anzucht der Zellen zur Herstellung der Proteine erfolgte nach dem gleichen Schema. Dabei wurden ca. 0,5-50 ng Plasmid-DNA durch Elektroporation in *Escherichia coli*-JM109-Zellen steril transformiert. Die Transformation, der Verdünnungsausstrich und das Anziehen einer 2 ml-Startkultur in LB/Amp-Medium erfolgten wie in Kapitel 2.2 beschrieben. Nach achtstündiger Inkubation der Startkultur bei 37 ℃ wurden die Zellen bei 4000 rpm und 8 ℃ für 5 min zentrifugiert, das Pellet mit 1 ml frischem LB/Amp-Medium gewaschen und resuspendiert. Die resuspendierten Zellen dienten zur Initiation einer 50 ml-LB/Amp-Vorkultur, welche anschließend bei 170-200 rpm und 37 ℃ inkubierte. Nach 16-22 h wurden die Zellen erneut bei 4000 rpm mit 8 ℃ in einer Beckman-Zentrifuge (J2-HC) mit *swingout*-Rotor pelletiert. Das Zellpellet wurde zweimal mit frischem Medium gewaschen und in 6 ml LB/Amp-Medium aufgenommen. Sechsmal 1 L Hauptkulturen wurden mit je 1 ml resuspendiertem Zellmaterial angeimpft und für weitere 20-24 h bei 180 rpm und 37 ℃ bis zum Erreichen einer OD_{600 nm} von 3,0-3,7 geschüttelt. Auf eine Induktion mit IPTG (oder anderen Induktoren) konnte verzichtet werden, da die Expression der plasmidcodierten Transketolase A durch einen konstitutiven Promotor permanent erfolgte.

Zellernte

Die Zellernte wurde an der Sorvall RC 5B Plus- oder einer Beckman J2-HC-Zentrifuge bei 4000 rpm und 8℃ für 20 min durchgeführt. Zellen, welche das Gen des Wildtypenzyms TKA exprimierten, wurden in 150 ml Resuspensionspuffer 1 (10 mM Tris; 1 mM EDTA; 1 mM PMSF; pH 7,6) aufgenommen. Zellen, welche die Gene der Proteine mit His₆-*tag* exprimierten, wurden in 150 ml Resuspensionspuffer 2 (25 mM Tris; 300 mM NaCl; 20 mM Imidazol; 1 mM PMSF; 1 mM EDTA; pH 8) aufgenommen. Das jeweils resuspendierte Zellmaterial wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -72 ℃ gelagert.

2.3.2. Proteinreinigung

Im Folgenden wird zwischen der Transketolase ohne und mit His₆-*tag* unterschieden. Alle Reinigungen wurden bei 8 °C an einer FPLC-Anlage (Pharmacia Biotech, Schweden) durchgeführt.

2.3.2.1. Reinigung der Transketolase Wildtyp ohne His₆-tag (TKA)

Die Reinigung der Transketolase A (ohne His₆-*tag*) erfolgte mit einigen Modifikationen nach einer Vorschrift von SCHÖRKEN (1997) bzw. SPRENGER *et al.* (1995).

Zellaufschluss

Zu 150 g schockgefrorenem Zellmaterial (Kapitel 2.3.1.) wurden 200 µl einer 1 mg/ml Lysozymlösung und 100 ml Puffer 1 (50 mM Tris; 10 mM MgCl₂; 1 mM DTE; pH 8,5) zugegeben, bei 20 °C im Wasserbad aufgetaut und anschließend für 30 min unter gelegentlichem Rühren auf Eis inkubiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch 2 Passagen an einem Gaulin-Hochdruckhomogenisator (*french press*) bei einem Druck von 1200 bar. Der entstandene Zelldebris wurde für 1 h bei 4 °C und 20000 rpm in einer Sorvall RC 5B Plus-Zentrifuge abgetrennt, der Zentrifugationsüberstand anschließend mit Ammoniumsulfat fraktioniert gefällt.

Ammoniumsulfatfällung

Zwei fraktionierte Fällungen mit Ammoniumsulfat wurden bei 8 °C durchgeführt. Das Salz wurde jeweils innerhalb von 30 min portionsweise unter moderatem Rühren zugesetzt. Im ersten Schritt betrug der $(NH_4)_2SO_4$ -Gehalt 22 % (w/v), im zweiten Schritt wurde der Gehalt auf 48 % $(NH_4)_2SO_4$ (w/v) erhöht. Nach erfolgter Salzzugabe wurde jeweils für 1 Stunde bei 8 °C nachgerührt und anschließend für 45 min bei 4 °C und 20000 rpm zentrifugiert. Das Pellet der ersten Zentrifugation wurde verworfen, das Pellet der zweiten Zentrifugation in 150 ml Puffer 1 aufgenommen und in flüssigem N₂ schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -72 °C.

Entsalzung der Ammoniumsulfat-haltigen Proteinlösung mittels Gelfiltration

Das Entsalzen der (NH₄)₂SO₄-haltigen Proteinlösung erfolgte mittels einer mit Puffer 1 äquilibrierten Superdex-75-Gelfiltrationssäule (GE Healthcare Europe). Es wurden jeweils 15 ml Proteinlösung mit einer Geschwindigkeit von 1-2 ml min⁻¹ auf die Säule aufgetragen und mit Puffer 1 eluiert. Die Fraktionen wurden durch SDS-PAGE auf ihren Enzymgehalt geprüft und geeignete Fraktionen vereinigt.

Anionenaustauschchromatographie

Die Reinigung von TKA wurde mittels Anionenaustauschchromatographie durchgeführt. 50 ml entsalzte Proteinlösung wurden auf eine mit Puffer 1 äquilibrierte HiLoad 26/10 Q-Sepharose-Säule (GE Healthcare Europe) mit einer Flussrate von 2 ml min⁻¹ aufgetragen. Die Proteinelution

erfolgte mittels eines linearen NaCl-Gradienten innerhalb von 500 ml durch Puffer 2 (50 mM Tris; 10 mM MgCl₂; 1 mM DTE; 400 mM NaCl; pH 8,5). Die Fraktionen wurden durch SDS-PAGE auf ihren Enzymgehalt geprüft und die geeigneten Fraktionen vereinigt. Zur Entsalzung diente eine Dialyse gegen zweimal 2 L Puffer 1. Die weitere Reinigung erfolgte durch eine Fractogel EMD TMAE 650 (S)-Anionenaustauschchromatographie-Säule (Merck KGaA, Darmstadt). Der Probenauftrag und die Proteinelution erfolgten wie für die HiLoad Q-Sepharose-Säule beschrieben. Der erreichte Reinheitsgrad der Fraktionen wurde erneut mittels SDS-PAGE überprüft. Fraktionen der gereinigten Transketolase wurden vereinigt und gegen zweimal 2 L Lagerpuffer (20 mM Tris; 1 mM DTE; pH 7,6) dialysiert. Das Volumen der dialysierten Probe wurde mittels Vivaspin-Konzentratoren (Ausschlussgröße 30000 Da) reduziert und die Proteinkonzentration auf rund 30 mg/ml eingestellt. Nach Aliquotierung wurde das Protein in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -72 °C gelagert.

2.3.2.2. Reinigung der Proteine mit His₆-*tag* (TK und Varianten)

Für die Proteine mit His₆-tag (TK und Varianten) fand dasselbe Reinigungsschema Anwendung.

Zellaufschluss

Zu 40 g schockgefrorenem Zellmaterial (Kapitel 2.3.1.) wurden 150 µl einer 1 mg/ml Lysozymlösung und 25 ml Puffer A (25 mM Tris; 300 mM NaCl; 20 mM Imidazol; pH 8) gegeben, dieses bei 20 °C im Wasserbad aufgetaut und anschließend für 25 min unter gelegentlichem Rühren auf Eis inkubiert. Danach wurde der Zellsuspension CaCl₂ bis zu einer Endkonzentration von 2 mM zugesetzt, um das enthaltene EDTA zu komplexieren, welches sich nachteilig auf die anschließende Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie auswirken würde. Der Zellaufschluss erfolgte an einem Gaulin-Hochdruckhomogenisator (*french press*) bei einem Druck von 1200 bar. Der entstandene Zelldebris wurde für 1 h bei 4 °C und 20000 rpm in einer Beckman-Ultrazentrifuge abgetrennt und der Überstand einer Streptomycinsulfatfällung unterzogen.

Fällung mit Streptomycinsulfat

Zum Entfernen der Nukleinsäuren wurde eine Fällung mit Streptomycinsulfat bei 8°C durchgeführt. Hierzu wurden 2 % (w/v) Streptomycinsulfat innerhalb von 8-10 min zum Ansatz unter moderatem Rühren zugegeben und anschließend für weitere 15-20 min inkubiert. Das gefällte Material wurde für 20 min bei 4°C und 30000 rpm in einer Beckman-Ultrazentrifuge pelletiert und der Überstand für eine Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie verwendet.

Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie

30 ml des Überstandes der Fällung mit Streptomycinsulfat wurden auf eine selbstgepackte, mit Puffer A äquilibrierte, Ni²⁺-NTA-Säule mit einer Geschwindigkeit von 2 ml min⁻¹ aufgetragen und die nichtbindenden zellulären Proteine und andere Bestandteile mit weiteren 50 ml Puffer A ausgewaschen. Die Elution der durch den His₆-*tag* gebundenen Enzyme erfolgte mittels eines linearen Imidazolgradienten durch 80 ml Puffer B (25 mM Tris; 300 mM NaCl; 250 mM Imidazol; pH 8) mit einer Flussgeschwindigkeit von 2 ml min⁻¹. Die Fraktionen wurden durch eine SDS-PAGE überprüft und geeignete Proben vereinigt. Anschließend wurde das Volumen auf etwa 22 ml mittels Vivaspin-Konzentrator (Ausschlussgröße: 30000 Da) reduziert und das Protein durch 2 Trennungen an einer Superdex-75-Gelfiltrationssäule weiter gereinigt und umgepuffert.

Reinigung und Umpufferung mittels Gelfiltration

Rund 11 ml aufkonzentriertes Proteinmaterial der Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie wurden auf eine mit Lagerpuffer (20 mM Tris; 1 mM DTE; pH 7,6) äquilibrierte Superdex-75-Gelfiltrationssäule mit einer Geschwindigkeit von 1 ml min⁻¹ aufgetragen und mit demselben Puffer eluiert. Die Fraktionen wurden durch SDS-PAGE auf Reinheit und Enzymgehalt geprüft, geeignete Proben vereinigt und mittels Vivaspin-Konzentrator (Ausschlussgröße 30000 Da) auf eine Proteinkonzentration von etwa 30 mg/ml konzentriert. Nach dem Aliquotieren wurde das gereinigte Protein in flüssigem N₂ schockgefroren und bei -72 °C gelagert.

2.3.3. Bestimmung der Molekulargewichte mittels Massenspektrometrie

Die gereinigten Proteine (Konzentrationen 30 mg/ml) ließen sich etwa direkt zur Molekulargewichtsbestimmung verwenden. wurden die Proteine Dazu in einem Acetonitril/Wasser-Gemisch (1:1) mit 1 %iger Ameisensäure im Verhältnis 1:50 verdünnt eingesetzt. Es wurde an einem Q-TOF 2-Massenspektrometer der Firma Waters GmbH mit Nanoelektrospray-Quelle (ESI) gearbeitet. Die Auswertung erfolgte mittels des Programms "Mass Lynx".

2.4. Elektrophoresen für DNA und Proteine

Agarosegel-Elektrophorese von DNA

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten zur Größenbestimmung sowie zur Kontrolle der Reinheit und Konzentration der Proben erfolgte durch Elektrophorese mit 0,8-2 % (w/v) Agarosegelen. Als Laufpuffer diente TAE-Puffer (40 mM Tris/Acetat, 2 mM EDTA, pH 8,5). Die Laufparameter wurden auf U = 120 V und I = 300 mA eingestellt. Die Färbung der Agarosegele erfolgte im Ethidiumbromidbad (0,5 µg/ml Ethidiumbromid in Wasser). Die DNA-Proben wurden in 5fach Probenpuffer (40% (w/v) Sucrose, 30% (v/v) Glycerin, 50 mM EDTA; Bromphenolblau) aufgenommen und mit Wasser auf die Endkonzentration eingestellt.

SDS-PAGE von Proteinen

Der Erfolg der Miniexpressionstests und der erreichte Grad der Reinigung der Proteine wurden mittels SDS-PAGE nach der Methode von LAEMMLI (1970) überprüft. Die verwendete Konzentration der Trenngele betrug 10 %, die Konzentration der Sammelgele betrug 5 % Acrylamid. Die Elektrophoresen erfolgten in einem Laufpuffer mit 25 mM Tris, 200 mM Glycin, 3,5 mM SDS bei pH 8,3. Die Proteinproben wurden in Probenpuffer (4 % (v/v) Glycerin, 80 mM SDS, 150 mM Tris (pH 6,8); pro 1 ml Aliquot des Probenpuffers: Zugabe von 20 μl β-Mercaptoethanol und Bromphenolblau) aufgenommen und bei einer Spannung von 180 V und einer Stromstärke von 20 mA an einem Pharmacia Biotech (Eps 200)-Elektrophoresegerät aufgetrennt. Die Visualisierung der Proteinbanden erfolgte durch Anfärben des Gels in Coomassielösung (0,25 % (w/v) Coomassie Brilant Blue; 30 % Methanol; 6 % Essigsäure). Der nicht-proteingebundene Farbstoff wurde durch Inkubation in Entfärberlösung (30 % Methanol; 10 % Essigsäure) entfernt und das Gel mittels Trocknungslösung (2-3 % Glycerin; 40-50 % Methanol; optional 10 % Essigsäure) haltbar gemacht.

2.5. Konzentrationsbestimmung von DNA, Proteinen und ThDP (-Analoga)

Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

Die Konzentration der zirkulären Plasmide wurde mittels Absorptionsspektroskopie bei 260 nm in einer 1 cm Quarzküvette an einem Beckman DU-640 Spektrometer bestimmt. Dabei wurde für ein $\Delta E = 1$ eine Konzentration von 50 ng/µl angenommen (Mülhardt, 2003). Die Konzentrationsbestimmung geschnittener Plasmide erfolgte mittels Agarosegel-Elektrophorese unter Einsatz entsprechender Vergleichsproben des Markers mit bekannter DNA-Menge.

Bestimmung der Konzentration von Proteinen

Die Konzentration der gereinigten Proteine wurde spektroskopisch nach der Methode von GILL & VON HIPPEL (1989) bei 280 nm an einem Beckman-DU-640-Spektrometer bestimmt. Die Extinktionskoeffizienten sowie die Absorptionen für je 1 mg/ml Protein wurden durch Eingabe der Aminosäuresequenzen des jeweiligen Proteins in das Analytikprogramm "Protparam" auf www.expasy.ch/tools/protparam.html (Kelly *et al.*, 2005) ermittelt. Die entsprechenden Werte sind in Tab. 2.5 zusammengestellt.

Protein	Anzahl der Aminosäuren	MW (Da)	A ₂₈₀ für 1mg/ml Protein
TKA	662	72080,5	1,277
ТК	668	72903,4	1,262
Glu ⁴¹¹ Ala	668	72845,3	1,263
His ⁴⁷³ Ala	668	72837,3	1,264
DV	668	72771,1	1,265

Tab. 2.5 Zusammenfassung der verwendeten Extinktionen bei 280 nm für je 1 mg/ml Protein nach der Methode von GILL & VON HIPPEL. Der molare Extinktionskoeffizient beträgt $\epsilon_{280 \text{ nm}} = 92030 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Bestimmung der Konzentration von ThDP und ThDP-Analoga

Alle Analoga wurden freundlicherweise von PD Dr. Ralph Golbik (Abteilung Mikrobielle Biotechnologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle/Saale) zur Verfügung gestellt. Die Konzentrationen wurden spektroskopisch bei einer optischen Weglänge von 1 cm in 50 mM Gly-Gly-Puffer (pH 7,6) ermittelt (Abweichungen sind angegeben, Tab. 2.6).

Cofaktor	Konzentrationsbestimmung	Struktur*
ThDP	isosbestischer Punkt bei 273,5 nm mit $\epsilon_{273,5 nm}$ = 7757 M ⁻¹ cm ⁻¹ (Ullrich <i>et al.</i> , 1967 und Schellenberger <i>et al.</i> , 1965)	H ₃ C NH ₂ H ₂ CH ₃ PP ²⁻
Desamino- ThDP	Extinktionsmaximum bei 260 nm in 100 mM Phosphatpuffer (pH 6), $\epsilon_{260 \text{ nm}}$ = 6350 M ⁻¹ cm ⁻¹ (Neef, 1970)	H_{3C} H
N3´- Pyridyl- ThDP	isosbestischer Punkt bei 297,6 nm mit $\epsilon_{260 \text{ nm}}$ = 5900 M ⁻¹ cm ⁻¹ (Golbik, 1986)	H H ₃ C N NH ₂ H ₂ CH ₃ CH ₃ PP ²⁻
Oxi- ThDP	Extinktionsmaximum bei 266 nm in 100 mM Phosphatpuffer (pH 6) mit $\epsilon_{266 nm}$ = 8100 M ⁻¹ cm ⁻¹ (Eppendorfer, 1991)	H ₃ C
*	D D D D D D D D D D	

Tab. 2.6 Übersicht der verwendeten Cofaktoren (ThDP und ThDP-Analoga) mit Angaben zur spektroskopischen Bestimmung der Konzentrationen.

* Der Diphosphatrest ist durch " PP²⁻ " abgekürzt.

2.6. Spektroskopische Methoden

2.6.1. Fluoreszenzspektroskopie

Theoretische Grundlagen zur Methode

Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen nach HEINRICH et al. (1972) kamen bei der Bestimmung der Dissoziationskonstanten des Cofaktors (ThDP oder Analoga) mit dem jeweiligen Enzym (TKA, TK oder Varianten) zum Einsatz. Eine ausführliche Abhandlung zu den Fluoreszenzeigenschaften von ThDP und diverser Analoga lässt sich in GOLBIK (1986) finden. Durch die sukzessive Titration des Cofaktors zum Protein wird ein abnehmendes Fluoreszenzsignal beobachtet, welches durch quenching der intrinsischen Fluoreszenz des Proteins durch Cofaktorbindung im aktiven Zentrum erklärt werden kann. Die während der Cofaktorbindung erfolgte Absorption des eingestrahlten Lichts durch die Proteinfluorophore (z.B. das π-Elektronensystem aromatischer Aminosäuren) bleibt unverändert, währenddessen die Energie des ersten angeregten Zustands strahlungslos auf das guencher-Molekül (ThDP oder Analoga) übertragen wird und die Abnahme des Fluoreszenzsignals verursacht. Hierbei existieren prinzipiell zwei Arten der Wechselwirkungen des quenchers mit dem Fluorophor, die als dynamisches und als statisches quenching bezeichnet werden. Beim dynamischen quenching erfolgt die Wechselwirkung des quenchers mit dem Fluorophor im angeregten Zustand durch Kollisionsprozesse und ist umso größer, je höher die Konzentration des quenchers in der Lösung ist. Im Gegensatz dazu wird beim statischen quenching die Löschung des Fluoreszenzlichtes durch Komplexbildung von Fluorophor und quencher im Grundzustand verursacht. Anhand der um den dynamischen quench-Anteil korrigierten Fluoreszenzspektren lässt sich der KD-Wert für die Bildung des Fluorophor-quencher-Komplexes (Enzym und Cofaktor) ermitteln.

Durchführung

Es wurde ein 1 ml Ansatz für das Apoprotein mit einer Konzentration von 0,1 µM in 50 mM Gly-Gly-Puffer (pH 7,6) und 2,5 mM CaCl₂ gewählt. Durch Titration des Cofaktors zum jeweiligen Apoprotein konnten konzentrationsabhängige Fluoreszenzspektren aufgenommen werden. Die Rekombinationszeit pro Konzentration betrug > 12 min. Parallel dazu wurde ein identischer Ansatz hergestellt, bei welchem das Apoprotein durch Puffer ersetzt war. Nach sukzessiver Cofaktorzugabe wurden ebenfalls Spektren gemessen, welche als Basislinien zur Auswertung herangezogen wurden. Die Aufnahme der Emissionsspektren erfolgte an einem Fluoromax-3-Fluoreszenzspektrometer (Jobin-Yvon ISA Instruments, Frankreich). Die Anregungswellenlänge betrug 295 nm, die Emissionsspektren wurden im Bereich zwischen 310 und 450 nm aufgenommen und jeweils 10fach akkumuliert. Alle Messungen erfolgten mit einer Integrationszeit von 0,3 s/nm und einer Spaltbreite der Monochromatoren von 5 nm bei 25 °C. Es wurden 4x10 mm Quarzküvetten (Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim) verwendet.

Auswertung

Die Auswertung der Spektren erfolgte mit dem Programm KaleidaGraph V3.6 (Synergy Software, USA). Nach Abzug der Grundlinienspektren und der Volumenkorrektur des Fluoreszenzsignals aufgrund der sukzessiven Cofaktorzugabe wurden die Spektren bei 450 nm normiert (*offset*-Korrektur) und gegebenenfalls geglättet. Die Korrektur des Fluoreszenzsignals (im Maximum des Emissionsspektrums) um den dynamischen *quench*-Anteil erfolgte durch Bestimmung der dynamischen Löschkonstante aus der Stern-Volmer-Gleichung (Gl. 2.2).

$\frac{F_o}{F} = 1 + L \cdot C_Q$			(Gl. 2.2)
	F₀ F L ¢₀	Fluoreszenz ohne <i>quencher</i> gemessene Fluoreszenz (dynamische) Löschkonstante (M ⁻¹) Konzentration des <i>quenchers</i> (M)	

Die um den dynamischen *quench*-Anteil korrigierten Fluoreszenzsignale bei 335 nm bzw. bei 340 nm wurden gegen die eingesetzte Konzentration des jeweiligen Cofaktors auftragen und nach einer Bindungskurve gefittet.

2.6.2. CD–Spektroskopie

Die Aufnahme der Fern- und Nah-UV-CD-Spektren erfolgte an einem JA-810-Spektropolarimeter (Jasco Inc., USA). Die Temperatur wurde einheitlich auf 25 ℃ eingestellt.

Theoretische Grundlagen zur Methode

Circulardichroismus im Fern-UV-CD-Bereich (185 nm bis 250 nm) wurde zur Bestimmung des Sekundärstrukturgehalts von Proteinen herangezogen. Die Carbonylfunktion der Peptidbindung dient dabei als Chromophor, welche sich in direkter Nachbarschaft zu einem asymmetrischen Kohlenstoff befindet und dadurch den Chromophor optisch aktiv werden lässt.

Linear polarisiertes Licht lässt sich auch durch zwei entgegengesetzt zirkular polarisierte Vektoren darstellen. Tritt beim Durchgang von diesem Licht durch eine optisch aktive Lösung eine unterschiedlich starke Absorption der links- bzw. rechtszirkular polarisierten Komponenten auf, lässt sich die Differenz der Absorptionen als CD-Signal (Gl. 2.3) darstellen.

$$\Delta A(\lambda) = A_{L}(\lambda) - A_{R}(\lambda)$$
GI. 2.3

$$A_{L}(\lambda), A_{R}(\lambda)$$
Absorption des links- bzw. rechtszirkular
polarisierten Lichts bei Wellenlänge λ

Durch Multiplikation mit Faktor 33 erhält man daraus die Elliptizität Θ in (deg) (Gl. 2.4). Der Faktor 33 ergibt sich aus der Umrechnung von Bogenmaß in Gradeinheiten.

Die Division durch die Substratkonzentration c und die verwendete Schichtdicke d der Meßküvette ermöglicht die Standardisierung der CD-Daten. Durch Gl. 2.5 erhält man die molare Elliptizität [Θ].

$$[\Theta] = \frac{\Theta \cdot 100}{c \cdot d}$$
GI. 2.5

$$[\Theta] \qquad molare Elliptizität (deg \cdot cm^2 \cdot dmol^{-1})
Faktor 100 Umrechnung von mmol in dmol$$

Durch Verwendung der mittleren Molmasse einer Aminosäure (MRW, *mean-residue-weight*) statt der Molmasse des Proteins (Monomer) erhält man [Θ]_{MRW}. Die in der Praxis angewandte Formel ergibt sich daher zu Gl. 2.6.

$$\left[\Theta \right]_{\text{MRW}} = \frac{\text{Signal} \cdot \frac{142,5}{5610051} \cdot 3300 \cdot \text{MRW}}{\text{c} \cdot \text{d}}$$
 Gl. 2.6
$$\left[\begin{array}{c} \Theta \right]_{\text{MRW}} \\ \text{Signal} \\ \text{MRW} \\ \text{MRW} \\ \text{MRW} \\ \text{c} \cdot \text{d} \end{array} \right]$$
 Gl. 2.6
$$\left[\begin{array}{c} \Theta \right]_{\text{MRW}} \\ \text{Signal} \\ \text{MRW} \\ \text{mean-residue-weight-Elliptizität (deg \cdot cm^2 \cdot dmol^{-1}) \\ \text{Ausgabeeinheit am Messgerät bei der jeweiligen } \lambda \\ \text{mean-residue-weight, mittlere molare Masse einer } \Lambda \\ \text{minosäure des betreffenden Proteins (mg \cdot mmol^{-1}) \\ \text{c} \\ \text{d} \\ \text{optische Weglänge (cm)} \end{array} \right]$$

Die MRW-Werte der Proteine wurden nach KELLY *et al.* (2005) berechnet und betrugen für TKA = 109,047; TK = 109,3; Glu⁴¹¹Ala = 109,213; His⁴⁷³Ala = 109,201 und die Doppelvariante = 109,102 g mol⁻¹.

Durchführung und Auswertung der Fern-UV-CD-Messungen

Die Messungen des jeweiligen Apoproteins erfolgten in 50 mM Phosphatpuffer bei pH 7,6 mit je 0,1 mg/ml Enzym und 2,5 mM MgCl₂ bei einer optischen Weglänge von 1 mm. Messungen des jeweiligen Holoenzyms wurden unter gleichen Bedingungen mit einem Zusatz von 150 μ M ThDP durchgeführt. Darüber hinaus ließen sich entsprechende Basislinien mit Puffer messen. Die Akkumulation von jeweils 5 Spektren wurde mit einer Messgeschwindigkeit von 50 nm/min durchgeführt. Die Auswertung nach Abzug der Grundlinien erfolgte nach Gl. 2.6.
Durchführung und Auswertung der Nah-UV-CD-Messungen

In einem 900 µl-Ansatz wurde eine Konzentration des Apoproteins von 3 mg/ml mit 2,5 mM CaCl₂ und 50 mM Gly-Gly-Puffer (pH 7,6) eingestellt. Durch Titration des Cofaktors zum Apoprotein konnten konzentrationsabhängige CD-Spektren aufgenommen werden. Die Rekombinationszeit pro Konzentration betrug > 12 min. Parallel dazu wurde ein identischer Basislinien-Ansatz mit Puffer gemessen. Die Spektren wurden mit einer Geschwindigkeit von 200 nm/min aufgenommen, wobei Quarzküvetten (Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim) mit einer Weglänge von 4 mm zur Anwendung kamen. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm KaleidaGraph (V3.6) durch Abzug der Spektren der Grundlinien vom jeweiligen Proteinspektrum. Nach Korrektur der Signale um das zugesetzte Volumen durch den jeweiligen Titrationsschritt wurden alle Spektren bei 400 nm normiert (*offset*-Korrektur) und gegebenenfalls geglättet.

Durchführung und Auswertung zur Carboligationsreaktion der Transketolase A

Die kinetischen Messungen sowie die entsprechenden Spektren der Produktbildung wurden in Quarzküvetten (Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim) mit einer Weglänge von 4 mm gemessen. Die Ansätze enthielten dabei in der Regel 0,5-2 mg/ml Enzym, 0,2 mM ThDP und 2,5 mM CaCl₂ in 50 mM Gly-Gly-Puffer (pH 7,6). Angaben zu Substratkonzentrationen sind in den entsprechenden Legenden der Abbildungen wiedergegeben. Deproteinisierte Produktspektren wurden durch vorherige Filtration der enzymatischen Ansätze mittels Vivaspin-500-Konzentratoren (Sartorius AG, Göttingen, Ausschlussgröße 10000 Da) erhalten.

2.6.3. Kinetische Messungen

2.6.3.1. Bestimmung der enzymatischen Aktivität

1) Oxidativer Test (Ferricyanidtest)

Theoretische Grundlagen zur Methode

Die enzymatische Aktivität der Transketolase wurde nach CHRISTEN *et al.* (1980) bzw. USMANOV *et al.* (1981) durch Umsatz von Ferricyanid gemessen. Die Verwendung von Ferricyanid als Elektronenakzeptor stellt eine preisgünstige Alternative zum gekoppelten optischen Test nach KOCHETOV (1982) durch Einsparung der Hilfsenzyme und der nativen Substrate dar. Das durch Zugabe von Donorsubstrat gebildete α -Carbanion des DHE-ThDP wird durch Ferricyanid oxidiert (*oxidative-trapping*; Christen *et al.*, 1980) und zu Glycolsäure umgesetzt (Schema 2.1). Als Substrat wird das zu Synthesezwecken häufig verwendete β -Hydroxypyruvat (HPA) eingesetzt, welches durch Abspaltung von CO₂ irreversibel zu DHE-ThDP reagiert. Die Reduktion von Ferricyanid [Fe(CN)₆]³⁻ zu [Fe(CN)₆]⁴⁻ kann spektroskopisch bei 420 nm verfolgt werden, wobei







 R_1 : -CH₂-Aminopyrimidinring R_2 : -C₂H₄-Diphosphat

Durchführung und Auswertung

Alle Messungen erfolgten standardisiert bei $T = 25 \,^{\circ}C$ und $d = 1 \,^{\circ}C$ an einem V-560 Spektrophotometer (Jasco, USA) als Doppelbestimmung. Es wurden Messansätze folgender Endkonzentrationen verwendet: 0,3 mg/ml TK oder TKA, 2,5 mM CaCl₂, 200 µM ThDP, 1 mM Ferricyanid in 50 mM Gly-Gly-Puffer (pH 7,6). Proteinvarianten wurden in einer Endkonzentration von 0,5 mg/ml eingesetzt. Die Zugabe von Ferricyanid zum Protein in Abwesenheit von Substrat verursachte eine geringe Absorptionsänderung, welche sich nach 4 min stabilisieren ließ und daher vor jeder Messung abgewartet wurde. Die Reaktion wurde durch Zugabe von HPA² gestartet. Parallel zum Ansatz mit Enzym wurde eine Blindreaktion erfasst, bei welcher das Apoprotein gegen Puffer substituiert war. Die Blindreaktion wurde bei der Auswertung von der Messreaktion abgezogen. Der Extinktionskoeffizient für Ferricyanid bei 420 nm beträgt 1000 M⁻ 1 cm⁻¹ (Christen *et al.*, 1980). Die Anpassung der Messdaten erfolgte nach einer Gleichung für eine Substratüberschusshemmung (Gl. 2.7); v_{opt} und S_{opt} wurden nach Gl. 2.8 und 2.9 berechnet. Die Gleichungen wurden aus SCHELLENBERGER (1989) entnommen.

$$v = \frac{V_{max}}{1 + \frac{K_M}{S_0} + \frac{S_0}{K_1}}$$
Gl. 2.7

$$S_{opt} = \sqrt{K_1 \cdot K_M}$$
$$V_{max}$$
Maximalgeschwindigkeit (min⁻¹)

$$K_M$$
Michaelis-Menten-Konstante (M)

$$K_1$$
Inhibitorkonstante (M)

$$S_0$$
Ausgangskonzentration des Substrats (M)

$$v_{opt}$$
optimale Geschwindigkeit (min⁻¹)

$$S_{opt}$$
Optimale Substratkonzentration (M)

$$v_{opt} = \frac{V_{max}}{1 + 2\sqrt{\frac{K_M}{K_1}}}$$
Gl. 2.9

² Die Reinheit des HPA (Li⁺)-Salzes betrug 37 %, wie durch ¹H-NMR Messungen gezeigt werden konnte. Dies wurde bei der Einwaage des Substrats berücksichtigt.

2) Gekoppelt optischer Test nach KOCHETOV (1982)

Theoretische Grundlagen zur Methode

Die Bestimmung der Aktivität mit den nativen Substraten X5P und R5P ist durch Nutzung der Hilfsenzyme Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (G3P-DH) und Triosephosphat-Isomerase (TPI) möglich. Das während der Reaktion gebildete G3P wird dem Gleichgewicht durch TPI entzogen und ist mit der Oxidation von NADH als spektroskopischem Signal in der G3P-DH-Reaktion gekoppelt (Schema 2.2). Der Umsatz von NADH erfolgt äquimolar zum gebildeten G3P.





Durchführung und Auswertung

Die Progresskurven wurden standardgemäß bei einer Temperatur von 25 °C und d = 1 cm an einem V-560-Spektrophotometer (Jasco, USA) als Doppelbestimmung aufgenommen. Die analytische Wellenlänge betrug 340 nm. Typischerweise enthielt ein Ansatz 3-60 µg/ml Protein, 2,5 mM CaCl₂, 300 µM ThDP und 0,25 mM NADH in 50 mM Gly-Gly-Puffer (pH 7,6). Die Substrate X5P und R5P wurden im Bereich von 0,025-5 mM bzw. 0,2-5 mM variiert. Die Endkonzentrationen der Hilfsenzyme G3P-DH und TPI betrugen 1,55 U und 4,55 U im Ansatz. Die *steady-state*-Geschwindigkeiten wurden gegen die eingesetzten Substratkonzentrationen aufgetragen und durch die linearisierte Form der Geschwindigkeitsgleichung für einen *ping-pong*-Mechanismus (Gl. 2.10) und der entsprechenden Sekundärplots ausgewertet (Schellenberger, 1989; Bisswanger, 2002).

A₀, B₀ Ausgangskonzentration des Substrats A bzw. B (M)

2.6.3.2. Schnelle Kinetiken (*stopped-flow*-Absorptionsspektroskopie)

Theoretische Grundlagen zur Methode

Durch die Arbeit von KOCHETOV (1973) wurde dargelegt, dass durch Zugabe von HPA zur yTK eine Absorptionsänderung bei 300 nm beobachtet wird. Später ließ sich die spektroskopische Änderung mit der Bildung des Intermediats DHE-ThDP (Golbik *et al.*, 2005; Fiedler, 2002) korrelieren, wobei der $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergang des Enamins als molekulare Ursache vermutet wird. Schnelle kinetische Messungen sollten daher genutzt werden, um mikroskopische Geschwindigkeitskonstanten für die Bildung und den Zerfall des zentralen Intermediats DHE-ThDP für die Transketolase A aus *E. coli* (Wildtyp und Varianten) zu bestimmen.

Durchführung

Die schnellen Kinetiken wurden an einem *stopped-flow*-Absorptionsspektrometer (SX 18 MV, Applied Photophysics, UK) aufgenommen. Die Messtemperatur betrug standardgemäß 25°C, die optische Weglänge 1 cm, die Wellenlänge war auf 300 nm eingestellt. Es wurde jeweils eine Protein- und verschiedene Substratlösungen unterschiedlicher Konzentrationen hergestellt, welche separat in Spritzen gefüllt und zur Messung im Verhältnis 1+1 gemischt wurden. Die Proteinlösung (vor Mischung) enthielt typischerweise 4 mg/ml Protein, 0,6 mM ThDP, 5 mM CaCl₂ in 50 mM Gly-Gly-Puffer (pH 7,6). Die HPA-Substratlösungen wurden im Konzentrationsbereich von 0,02-80 mM (vor Mischung) eingestellt. Für *single-turnover*-Messungen kamen äquimolare Konzentrationen an Enzym, ThDP und Substrat zum Einsatz. Jede *stopped-flow*-Kinetik wurde aus mindestens drei einzelnen Progresskurven gemittelt.

2.6.4. ¹H-NMR-Spektroskopie

Die ¹H-NMR-Messungen wurden in Zusammenarbeit mit Junior-Prof. Dr. Kai Tittmann (AG Molekulare Enzymologie, Halle/Saale) an einem ARX-400 Mhz Avance NMR-Spektrometer (Bruker Biospin GmbH, Karlsruhe) mit einer tatsächlichen Protonenfrequenz von 401,3 MHz durchgeführt. Der Nullpunkt der ¹H-NMR-Spektren wurde durch die Frequenz der Methylsignale der externen Referenz Trimethyl-silyl-*d*₆-propansulfonsäure (*d*₆-TSP) definiert. Aufgrund der hohen Empfindlichkeit wurden bei allen ¹H-NMR-spektroskopischen Experimenten Pulsprogramme mit eingebundener Wasservorabsättigung verwendet (Tittmann, 2000).

2.6.4.1. Untersuchungen zur C2-Deprotonierung nach KERN et al. (1997)

Theoretische Vorbetrachtung

Wie in der Arbeit von KERN *et al.* (1997) gezeigt wurde, kann die Aktivierung des Cofaktors ThDP durch H/D-Austauschmessungen des Protons am C2-Atom des Thiazoliumrings gemessen werden. Die Abnahme des C2-Protonensignals des Cofaktors bei δ = 9,68 ppm durch Austausch gegen ein Deuteron wird dabei diskontinuierlich im ¹H-NMR-Spektrometer verfolgt und daraus die Geschwindigkeitskonstante des H/D-Austauschs ermittelt. Als interner Standard wird dabei das nicht mit dem Lösungsmittel austauschende C6⁻-Protonensignal des Aminopyrimidinrings bei einer chemischen Verschiebung von 8,01 ppm genutzt. Detaillierte Informationen zur Methodik sowie eine theoretische Abhandlung der Cofaktoraktivierung lassen sich in KERN *et al.* (1997) und TITTMANN (2000) finden.

Durchführung

Die Messungen erfolgten mit einer Proteinlösung folgender Zusammensetzung: 15 mg/ml (= 205,75 μ M) Enzym, 205,75 μ M ThDP, 5 mM CaCl₂ in 5 mM Gly-Gly-Puffer (pH 7,6). Die Proteinlösung wurde im Verhältnis 1+1 mit D₂O (99,9 %) an einer *rapid-quenched-flow*-Apparatur (Kintek, Althouse, USA) gemischt und die Reaktion nach definierten Zeiten mit Quenchlösung (1 M DCl, 12,5 % (w/v) TCA in D₂O) abgestoppt. Für Austauschzeiten größer 2 s wurden die Versuche manuell durchgeführt, indem 200 μ l Proteinlösung mit 200 μ l D₂O gemischt und die Reaktion nach festgelegten Zeiten durch Zugabe von 200 μ l Quenchlösung gestoppt wurden. Zur vollständigen Denaturierung des Proteins wurden die Ansätze für weitere 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zentrifugation in einer Biofuge pico bei 13000 rpm wurde das denaturierte Protein entfernt, der Überstand mit einen 0,45 μ m-Spritzenfilter (GE Osmonics Inc., USA) filtriert und anschließend mittels ¹H-NMR gemessen. Alle Messungen wurden standardgemäß bei 25 °C mit vortemperierten Lösungen durchgeführt.

Auswertung

Zur Ermittlung der Geschwindigkeitskonstante des H/D-Austauschs am C2-Atom des enzymgebundenen Cofaktors wurde das relative Verhältnis des Integrals des C2-H-Signals bei 9,68 ppm in Bezug auf das interne Standardsignal C6⁻-H bei 8,01 ppm bestimmt und dieses nach einer Gleichung 1. Ordnung gefittet. Durch die Mischung von H₂O und D₂O im Verhältnis 1+1 lässt sich eine maximale Amplitude von 0,5 erwarten.

2.6.4.2. Intermediatanalyse nach TITTMANN et al. (2003)

Theoretische Vorbetrachtung

Zur Aufklärung der Katalyse im molekularen Detail ist die Bestimmung der enzymgebundenen Intermediate (bzw. deren Verteilungen) notwendig. Deshalb wurde die Intermediatanalyse nach TITTMANN *et. al.* (2003) angewandt, welche es erlaubt, einen Einblick in die während der Umsetzung diverser Substrate auftretenden Intermediate im *steady-state* oder unter *singleturnover*-Bedingungen zu erhalten. Dabei ist zu beobachten, dass verschiedene am C2-Atom des Thiazoliumrings gebundene Intermediate zu unterschiedlichen chemischen Verschiebungen des C6'-H-Signals führen und somit einen *fingerprint* zur Identifizierung und Quantifizierung darstellen. Als molekulare Ursache der unterschiedlichen Verschiebungen wird der durch die Intermediate veränderte Ringstrom im Thiazoliumring und die damit verbundene Wirkung auf das C6'-H-Signal des Aminopyrimidinrings diskutiert. Tabelle 2.7 gibt die chemischen Verschiebungen der ¹H-NMR-Signale der während der TK-Reaktion auftretenden möglichen Intermediate in Bezug zum Standard (*d*₆-TSP) wider.

Durchführung

Zur Messung wurden 200 µl Proteinlösung (15 mg/ml Protein, äquimolar ThDP, 2,5 mM CaCl₂ in 50 mM Gly-Gly-Puffer, pH 7,6) mit 200 µl Substratlösung (äquimolare Konzentration oder im Überschuss, jeweils in 50 mM Gly-Gly-Puffer, pH 7,6 gelöst) gemischt und die Reaktion nach festgelegten Zeitintervallen abgestoppt. Für Reaktionszeiten unter 2 s wurde eine *rapid-quenched-flow*-Apparatur (Kintek, Althouse, USA) verwendet, während bei Reaktionszeiten größer 2 s die Reaktion manuell gestoppt wurden. Zum Stoppen der Reaktion wurde Quenchlösung (1 M DCl, 12,5% (w/v) TCA in D₂O) zum Ansatz gegeben und für 5 min inkubiert, um ein vollständiges Denaturieren des Proteins zu erzielen. Durch Zentrifugation in einer Biofuge pico bei 13000 rpm wurde das denaturierte Protein entfernt, der Überstand mit einen 0,45 µm Spritzenfilter (GE Osmonics Inc., USA) filtriert und anschließend ¹H-NMR-spektroskopisch gemessen. Alle Messungen wurden standardgemäß bei 25 °C mit vortemperierten Lösungen durchgeführt.

Tab. 2.7 Übersicht der chemischen Verschiebungen der ¹H-NMR-Signale des C6´-H in Abhängigkeit der am C2-Atom des Thiazoliumrings gebundenen kovalenten Intermediate unter sauren Bedingungen. Die Intermediatstrukturen unter enzymatischen Bedingungen sind nebenstehend abgebildet; Rest R kennzeichnet dabei den Cofaktor ThDP.

		HL-ThDP	DHE-ThDP
Intermediat	chemische Verschiebung δ (ppm)	сн ₂ он но—с — в	сн ₂ он но—с — в
ThDP	8,01	o [#] C o	Ĥ
HL-ThDP	7,26	C ₅ -ThDP	C ₆ -ThDP CH₂OH
DHE-ThDP	7,31	сн ₂ он 	но—с — R
C5-ThDP	7,35	но—с — в но—сн	HO-CH
C6-ThDP	7,34	нс-он о	нс он нс—он о
Puffer/TCA	7,69	H ₂ C—O—P—O ⁻	
		ÓН	ОН

Auswertung

Zur Auswertung wurden das Integral des C6⁻H-Signals der Fraktion des jeweiligen Intermediats (I₁) relativ zum Gesamt-ThDP-Gehalt gesetzt und anhand von Gl 2.11 die Intermediatverteilung berechnet. Da die Konzentration des eingesetzten ThDP der Konzentration der aktiven Zentren entsprach (bei entsprechend geringem K_D-Wert des Cofaktors), konnten daraus quantitative Aussagen getroffen werden.

$$[I_{x}] = \frac{\int C6' - H(I_{x})}{\sum \int C6' - H(I_{n}) + \int C6' - H(ThDP_{nr})}$$
GI. 2.11

l _x	Konzentration des entsprechenden Intermediats x
l _n	auftretende Intermediate (1n)
ThDPnr	nicht reagiertes, enzymgebundenes ThDP

2.7. Röntgenkristallographie

Alle angegebenen pH-Werte wurden bei Raumtemperatur eingestellt.

Kristallisation

Die Kristallisationen der TK und Varianten erfolgte mit Modifikationen nach FIEDLER (2002) bzw. SCHNEIDER *et al.* (1989) nach der Methode der Gasphasendiffusion im hängenden Tropfen. Dazu wurden jeweils 3 µl Holoenzymlösung (8-20 mg/ml Protein, 10 mM ThDP oder ThDP-Analogon, 10 mM CaCl₂ in 50 mM Gly-Gly-Puffer, pH 7,9) mit 3 µl Reservoirlösung (19-22 % PEG 6000 in 50 mM Gly-Gly-Puffer, pH 7,9, optional 1-2 % Glycerin) bei Raumtemperatur gemischt und auf ein silanisiertes Deckgläschen gegeben. Das Deckgläschen wurde anschließend auf eine Zellkulturplatte (24-Loch-Zellkulturplatte, TPP AG, Trasadingen, Schweiz) mit je 500 µl Reservoirlösung pro Vertiefung überführt. Zum luftdichten Verschluss zwischen Deckglas und Zellkulturplatte wurde eine mittelviskose Baysilone-Paste (GE Bayer Silicones GmbH & Co. KG, Leverkusen) verwendet. Die Zellkulturplatte wurde bei 6-8 °C gelagert und in regelmäßigen Abständen auf das Wachstum der Kristalle geprüft.

Datenaufnahme

Die Datensammlungen erfolgten an zwei verschiedenen Messplätzen durch die Methode der Kryokristallographie. Diese wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Christoph Parthier (AG Physikalische Biotechnologie, Halle/Saale) und Dr. Georg Wille (Institut für Biophysik, Frankfurt/Main) durchgeführt.

Kristalle geeigneter Größe wurden bei 6-8 °C kurz in Gefrierschutzlösung (20 % (w/v) PEG 6000, 20 % (v/v) Ethylenglycol, 5 mM CaCl₂, 10 mM ThDP in 50 mM Gly-Gly-Puffer, pH 7,9) inkubiert und anschließend sofort in flüssigem N₂ schockgefroren. Die schockgefrorenen Kristalle wurden in den Kältestrom eines X-*stream* 2000 (Rigaku Corp., Japan) auf den Goniometerkopf überführt und mittels der von einem Drehanodengenerator (Micromax 007, Rigaku Corp., Japan) erzeugten Röntgenstrahlung ($\lambda = 1,54$ nm, Cu-K_a) an einem R-AXIS IV⁺⁺ *image-plate*-Detektor (Rigaku Corp., Japan) gemessen. Als zweiter Messplatz stand die Beamline BW7B, EMBL Außenstelle Hamburg, Deutsches Elektronensynchrotron ($\lambda = 0,85$ Å, Synchrotronstrahlung) zur Verfügung.

Substrat-*soaking*-Experimente

Für die TK wurden Substrat-*soaking*-Experimente mit den Donorsubstraten D-Xylulose-5phosphat (X5P) und D-Fructose-6-phosphat (F6P) sowie mit dem Akzeptorsubstrat D-Ribose-5phosphat (R5P) durchgeführt. Dazu wurden jeweils 1 ml Gefrierschutzlösung mit dem entsprechenden Substrat in einer Endkonzentration von 25 mM versetzt (= *soaking*-Lösung) und der pH-Wert gegebenenfalls auf pH 7,9 nachgestellt. Kristalle geeigneter Größe wurden für 10-

39

25 s (für X5P und F6P³) bei 8 °C in *soaking*-Lösung inkubiert und anschließend sofort in flüssigem N₂ schockgefroren. Die Zeitpunkte zum Abstoppen der Reaktionen der Kristalle in *soaking*-Lösung wurden durch Messungen mittels Intermediatanalyse bestimmt. Für R5P betrug die Inkubationszeit der Kristalle in der *soaking*-Lösung 1 min.

Modellierung und Verfeinerung

Die Indizierung und Skalierung erfolgte mit den Programmen DENZO/SCALEPACK (Otwinowski *et al.*, 1997) oder Mosflm/Scala (Leslie, 1992). Die Bestimmung des initialen Phasensatzes erfolgte für alle Strukturen der Transketolase mit der Methode des molekularen Ersatzes (*molecular replacement;* Rossmann *et al.*, 1962). Als Suchmodel diente hierbei die Struktur der Wildtyptransketolase A, welche von LITTLECHILD *et al.* (1995) bzw. ISUPOV *et al.* (1999) gelöst wurde (PDB-Zugangscode: 1QGD). Das *molecular replacement* wurde im CCP4i-Paket (Potterton *et al.*, 2003) mit dem Programm MOLREP (Vagin *et al.*, 1997) mit zwei asymmetrischen Einheiten pro Einheitszelle, die Verfeinerungen mit dem Programm REFMAC5 (Murshudov *et al.*, 1997) durchgeführt. Nach der Verfeinerung wurde die erstellte Elektronendichtekarte durch manuelle Inspektion mit den Programmen COOT (Emsley *et al.*, 2004) oder WINCOOT (Lohkamp *et al.*, 2005) überprüft, gegebenenfalls weiter verfeinert und das erstellte Strukturmodell mittels "Procheck" (Laskowski *et al.*, 1993) validiert. Die Definitionen der R-, R_{free}- und B-Faktoren, die Berechnung der Elektronendichtekarten sowie der Differenzelektronendichtekarte sind im Anhang zusammengestellt.

Die Modellierung der kovalenten Intermediate erfolgte durch Anfügen des Zuckerrests an den in der *monomer-library* des CCP4-Programmpakets befindlichen Eintrag für "ThDP". Die Inspektion der Elektronendichte mit dem Modell ergab, dass für den Winkel der C2-C2α-Bindung der Donorintermediate signifikante Abweichungen zu einem planaren *sp*²-Hybridisierungszustand auftraten. Daher wurden erneut Verfeinerungsschritte durchgeführt, wobei die Winkelvorgaben aufgehoben waren, was zur deutlich verbesserten Anpassung des Modells an die beobachtete Elektronendichte führte. Im Falle von F6P wurde dabei ein Belegungsgrad von 0,8 angenommen. Die Modellierung der Strukturen für R5P erfolgte mit dem Bibliothekseintrag für ThDP und den offenkettigen bzw. zyklischen Zuckerstrukturen der Aldose (Asztalos *et al.*, 2007).

³ Die Zuckerphosphate lagen in Sättigung vor, wie dies durch Aktivitätsmessungen bzw. ITC-Messungen nachgewiesen wurde.

2.8. Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC)

Die ITC stellt eine geeignete Methode zur Messung von Energieänderungen dar, wie sie bei der Bindung von Liganden bzw. Inhibitoren an Biopolymere beobachtet werden. Die Energieänderungen können dabei auch aus Enthalpieänderungen bei nicht-kovalenten Komplexbildungen, Konformationsänderungen, Oligomerisierungen und Ionisationen von polaren Gruppen resultieren.

Durchführung

ITC-Experimente zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten von R5P an TK wurde in Analogie zu den Substrat-*soaking*-Untersuchungen (Kapitel 2.7) in Zusammenarbeit mit Dr. Martin Kleinschmidt (Probiodrug AG, Halle/Saale) durchgeführt. Dazu wurde das Apoprotein der Transketolase zweimal mittels eines Vivaspin-Konzentrators (Ausschlussgröße 30000 Da, Sartorius, Göttingen) in 50 mM Gly-Gly-Puffer (pH 7,9) mit 5 mM CaCl₂ umgepuffert und anschließend zweimal jeweils 1 h gegen denselben Puffer dialysiert. Der Ansatz enthielt 100 μM an aktiven Zentren der TK, 1 mM ThDP, 5 mM CaCl₂ in 50 mM Gly-Gly-Puffer (pH 7,9). Die ITC-Messungen erfolgten bei 8 °C an einem VP-ITC System (Microcal Inc. Northampton, USA), wobei zum Holoenzym jeweils Injektionen von 10 μl R5P-Lösung (10 mM in obigem Puffer) zugegeben wurden. Zur Kontrolle von nicht mit der Assoziation von R5P verbundenen Energieänderungen wurde dieselbe Messung mit Puffer anstelle des Apoproteins durchgeführt (Basislinie).

Auswertung

Die Energieänderungen der Basislinientitration wurden von denen der enzymatischen Titrationen abgezogen. Die korrigierten Daten konnten nach einer quadratischen Gleichung (Gl. 2.12) für ein *one-site-binding*-Modell mit der Stöchiometrie von einem Molekül R5P pro aktivem Zentrum gefittet und eine Dissoziationskonstante für R5P ermittelt werden.

$$\begin{split} & \mathsf{K}_{\mathsf{D}} = \frac{\mathsf{E}_{\mathsf{GG}} \cdot \mathsf{R}_{\mathsf{GG}}}{\mathsf{E}\mathsf{R}} & \mathsf{K}_{\mathsf{D}} & \mathsf{Dissoziationskonstante} \; (\mathsf{M}) \\ & \mathsf{E}_{\mathsf{0}} & \mathsf{Gesamtenzymkonzentration} \; (\mathsf{M}) \\ & \mathsf{R}_{\mathsf{0}} & \mathsf{totale} \; \mathsf{R5P}\text{-}\mathsf{Konzentration} \; (\mathsf{M}) \\ & \mathsf{E}_{\mathsf{GG}} & \mathsf{Enzymkonzentration} \; \mathsf{im} \; \mathsf{Gleichgewicht} \; (\mathsf{M}) \\ & \mathsf{R}_{\mathsf{GG}} & \mathsf{R5P}\text{-}\mathsf{Konzentration} \; \mathsf{im} \; \mathsf{Gleichgewicht} \; (\mathsf{M}) \\ & \mathsf{R}_{\mathsf{RG}} & \mathsf{R5P}\text{-}\mathsf{Konzentration} \; \mathsf{im} \; \mathsf{Gleichgewicht} \; (\mathsf{M}) \\ & \mathsf{RR} & \mathsf{Enzym}\text{-}\mathsf{R5P}\text{-}\mathsf{Komplex} \; \mathsf{im} \; \mathsf{Gleichgewicht} \; (\mathsf{M}) \\ & \mathsf{RR} & \mathsf{Enzym}\text{-}\mathsf{R5P}\text{-}\mathsf{Komplex} \; \mathsf{im} \; \mathsf{Gleichgewicht} \; (\mathsf{M}) \\ & \mathsf{RSP} & \mathsf{RSP}\text{-}\mathsf{Komplex} \; \mathsf{im} \; \mathsf{Gleichgewicht} \; (\mathsf{M}) \\ & \mathsf{RSP} & \mathsf{RSP}\text{-}\mathsf{Komplex} \; \mathsf{im} \; \mathsf{Gleichgewicht} \; (\mathsf{M}) \\ & \mathsf{RSP} & \mathsf{RSP}\text{-}\mathsf{Komplex} \; \mathsf{im} \; \mathsf{Gleichgewicht} \; (\mathsf{M}) \\ & \mathsf{RSP} & \mathsf{RSP}\text{-}\mathsf{Komplex} \; \mathsf{im} \; \mathsf{Gleichgewicht} \; (\mathsf{M}) \\ & \mathsf{RSP} & \mathsf{RSP}\text{-}\mathsf{Komplex} \; \mathsf{im} \; \mathsf{Gleichgewicht} \; (\mathsf{M}) \\ & \mathsf{RSP} & \mathsf{RSP}\text{-}\mathsf{Komplex} \; \mathsf{im} \; \mathsf{Gleichgewicht} \; (\mathsf{M}) \\ & \mathsf{RSP} & \mathsf{RSP}\text{-}\mathsf{Komplex} \; \mathsf{im} \; \mathsf{Gleichgewicht} \; (\mathsf{M}) \\ & \mathsf{RSP} & \mathsf{RSP}\text{-}\mathsf{Komplex} \; \mathsf{im} \; \mathsf{Gleichgewicht} \; (\mathsf{M}) \\ & \mathsf{RSP} & \mathsf{RSP}\text{-}\mathsf{Komplex} \; \mathsf{im} \; \mathsf{Gleichgewicht} \; (\mathsf{M}) \\ & \mathsf{RSP} & \mathsf{RSP}\text{-}\mathsf{Komplex} \; \mathsf{im} \; \mathsf{Sleichgewicht} \; \mathsf{KSP} \\ & \mathsf{RSP} & \mathsf{RSP} \; \mathsf{KOP} \; \mathsf{KSP} \; \mathsf{KOP} \; \mathsf{KO$$

$$ER = \frac{E_0 + R_0 + K_D}{2} \pm \sqrt{\frac{(E_0 + R_0 + K_D)^2}{4} - E_0 R_0}$$
Gl. 2.12

2.9. GC/MS-Analysen

Die Gaschromatographie stellt eine sensitive analytische Methode zur Trennung von Gasen oder anderen flüchtigen Substanzen dar, wobei als mobile Phase ein inertes Trägergas wie He, N₂ oder H₂ verwendet wird. Die Trennung erfolgt über die Ausprägung unterschiedlicher Verteilungsgleichgewichte zwischen mobiler und stationärer Phase aufgrund verschiedener temperaturabhängiger Verdampfungspunkte der flüchtigen Substanzen.

Durchführung

GC/MS-Analysen der Carboligationsprodukte wurden an einem Agilent Technologies 6890N-Gerät mit einem 5975 MS-Detektor am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie (Halle/Saale) in Zusammenarbeit mit Frank Brettschneider durchgeführt. Dabei wurde eine 30 m Zebron ZB-5-Säule (0,25 µm Filmdicke; 0,25 mm Durchmesser) mit einer 10 m Vorsäule verwendet. Als Trägergas wurde Helium mit einer Flussrate von 1 ml/min eingesetzt. Das Ofenprogramm wurde für 24 min mit einem Temperaturgradient von 10 °C/min, startend bei 60 °C betrieben. In Wasser oder 50 mM Gly-Gly-Puffer (pH 7,6) gelöste Substanzen (HPA, GA, Erythrulose) ließen sich als Kontrollsubstanzen nutzen, da ein entsprechender Substanzstandard des Carboligationsprodukts nicht verfügbar war. Enzymatische Reaktionsansätze wurden deproteinisiert (Vivaspin 500, Ausschlussgröße 10000 Da), anschließend evaporiert und mit MOA (O-Methylhydroxylamin) und MSTFA (N-Methyl-N-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid) derivatisiert, bevor der Probenauftrag auf die GC-Säule erfolgte.

2.10. DFT-Rechnungen

Dichtefunktionaltheorie-Rechnungen auf dem B3LYP/6-31G(d)-Level wurden mit dem Programm GAUSSIAN98 (Frisch et al., 1998) in Zusammenarbeit mit PD Dr. R. Friedemann (Abteilung für Organische Chemie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle/Saale) zur Validierung der mittels Röntgenkristallographie gefundenen gespannten Zustände der Donorintermediate durchgeführt. Dabei wurden vereinfachte Strukturen zu den Rechnungen herangezogen: C5-Thiamin (1',4'-iminotautomere Form von 2-[2-(1,2,3,4-Tetrahhydroxy-5-phospho-pentyl)]-Thiamin) und C5-Thiazolium (2-[2-(1,2,3,4-Tetrahhydroxy-5-phospho-pentyl)]-3,4-dimethyl-5-hydroxyethylthiazoliumion) wurden als Modelle entweder mit (out-of-plane-Zustand) oder ohne (in-plane-Zustand) dem experimentell gefundenen Auslenkungswinkel zur Berechnung verwendet. Bei voller Optimierung erfolgten keine Vorgaben der Winkel und Bindungslängen für die Rechnungen, während bei partieller Optimierung der experimentell gefundene Auslenkungswinkel der C2-C2a-Bindung und die aus der Kristallstruktur beobachteten Winkel der Zuckerkette im Intermediat vorgegeben wurden. Single-point-Berechnungen ließen sich ohne Geometrieoptimierung durchführen und wurden zur Bestimmung der totalen Energien von Konformeren genutzt. Die Phosphatgruppe des Zuckerrests wurde als einfach negativ geladen angenommen, so dass formal ein neutraler Zustand für das thiamin- bzw. thiazoliumgebundene Intermediat vorlag.

3. Ergebnisse & Diskussion

3.1. Sequenzvergleiche von Transketolase-Primärstrukturen

Mit Hilfe eines Sequenzalignments der Primärstruktur verschiedener Proteine ist es möglich, ein unbekanntes Protein einer bestimmten Enzymklasse zuzuordnen bzw. eine erste Identifizierung konservierter bzw. homologer Aminosäuren innerhalb einer Klasse vorzunehmen. Aus diesem Grund wurde ein alignment der prokaryotischen Escherichia coli-Transketolasen mit den am häufigsten untersuchten eukaryotischen Enzymen, denen aus Saccharomyces cerevisiae und der humanen Transketolase, durchgeführt (Abb. 3.1). Für die Isoenzyme TKA und TKB aus Escherichia coli wurde dabei festgestellt, dass die Transketolase A (Sprenger et. al., 1992 und 1995) zu 75,4 % identisch bzw. zu 93,9 % homolog zu Transketolase B (lida et al., 1993) ist. IIDA et al. beschrieben für einen TKA-defizienten Escherichia coli-Stamm eine deutlich reduzierte Transketolaseaktivität und schlussfolgerten, dass TKB nur eine "Minderaktivität" in Escherichia coli darstellt. In Hefe wurden ebenfalls zwei unterschiedliche Transketolaseaktivitäten beschrieben (Sundström et al., 1993; Schaaff-Gerstenschläger et al., 1993). Der Sequenzvergleich zwischen den bakteriellen und den Hefeenzymen ergab eine 38,3 %ige Identität sowie eine 70 %ige Sequenzhomologie (siehe Anhang, Abb. 6.2). Der Vergleich der TKA aus Escherichia coli mit der Transketolase aus Zea mays (Gerhardt et al., 2003) zeigte ein ähnliches Ergebnis (48,4 % Identität, 77,9 % Homologie). Deutlich größere Unterschiede wies der Sequenzvergleich zur humanen Transketolase auf, der deshalb für einen größeren phylogenetischen Abstand dieser Organismen spricht. Das alignment mit den Transketolasen A und B jeweils aus Escherichia coli und Hefe und der humanen Transketolase ergab eine Identität von 14,5 % und eine Sequenzhomologie von 42,1 % (Abb. 3.1). Sequenzvergleiche der Hefetransketolase zu anderen ThDP-abhängigen Enzymen (POX, PDC) ergaben etwa 10 % Identität (Muller et al., 1993).

HAWKINS *et al.* (1989) gelang die Identifizierung eines 30 Aminosäuren umfassenden, hochkonservierten Sequenzmotivs (Gly-Asp-Gly...Asn-Asn) in ThDP-abhängigen Enzymen, welches Ähnlichkeit zur Diphosphatbindungsstelle von Dinukleotid-bindenden Enzymen aufweist. Daher wurde für das ThDP-Motiv eine Bindungsfunktion am Diphosphatrest des ThDP vorgeschlagen, welches später durch Röntgenkristallstrukturen diverser ThDP-abhängiger Enzyme bestätigt wurde. Das Motiv ließ sich teilweise für die *Escherichia coli*-TKA finden und entspricht den Resten Gly¹⁵⁴-Asp¹⁵⁵-Gly¹⁵⁶...Asn¹⁸⁵, welche in Wechselwirkung mit dem Diphosphatrest des ThDP stehen. Das zweite Asn des Strukturmotivs wurde in allen verglichenen Transketolasen nicht gefunden, hingegen zeigte sich Asp¹⁸³ als hochkonservierter Rest in diesem Motiv.

ecTKA (663 AS) 1 ecTKB (666 AS) 1 -----SRKDLAN AIRALSMDAV QKANSGHPGA PMGMADIAEV LWNDFLKHNP TDPTWYDRDR FILSNGHASM YTKA (680 AS) 1 ------MTQ FTDIDKLAVS TIRILAVDTV SKANSGHPGA PLGMAPAAHV LWS-QMRMNP TNPDWINRDR FVLSNGHAVA -----MAQ FSDIDKLAVS TLRLLSVDQV ESAQSGHPGA PLGLAPVAHV IFK-QLRCNP NNEHWINRDR FVLSNGHSCA yTKB (681 AS) 1 hTK (623 AS) 1 MESYHKPDQQ KLQALKDTAN RLRISSIQAT TAAGSGHPTS CCSAAEIMAV LFFHTMRYKS QDPRNPHNDR FVLSKGHAAP Consensus K R A SGHP А V DR F LS GH ectka (663 AS) 70 liyslihltg ydlpmeelkn frqlhsktpg hpevgytagv etttgplggg ianavgmaia ektlaaqfnr pghdivdhyt ectkb (666 AS) 68 LLYSLLHLTG YDLPLEELKN FRQLHSKTPG HPEIGYTPGV ETTTGPLGQG LANAVGLAIA ERTLAAQFNQ PDHEIVDHFT 73 LLYSMLHLTG YDLSIEDLKQ FRQLGSRTPG HPEF-ELPGV EVTTGPLGQG ISNAVGMAMA QANLAATYNK PGFTLSDNYT VTKA (680 AS) 73 LLYSMLHLLG YDYSIEDLRQ FRQVNSRTPG HPEF-HSAGV EITSGPLGQG ISNAVGMAIA QANFAATYNE DGFPISDSYT vTKB (681 AS) 81 ILYAVWAEAG F-LAEAELLN LRKISSDLDG HPVP-KQAFT DVATGSLGQG LGAACGMAYT GKYFDKASYR ------V hTK(623 AS) L R S G HP G G LGQG AGA Consensus Y ectka (663 AS) 150 YAFMGDGCMM EGISHEVCSL AGTLKLGKLI AFYDDNGISI DGHVEGWFTD DTAMR-FEAY GWHVIRDIDG -HDAASIKRA ectkb (666 AS) 148 YVFMGDGCLM EGISHEVCSL AGTLGLGKLI GFYDHNGISI DGETEGWFTD DTAKR-FEAY HWHVIHEIDG -HDPQAVKEA YTKA (680 AS) 152 YVFLGDGCLQ EGISSEASSL AGHLKLGNLI AIYDDNKITI DGATSISFDE DVAKR-YEAY GWEVLYVENG NEDLAGIAKA *yTKB* (681 AS) 152 FAIVGDGCLQ EGVSSETSSL AGHLQLGNLI TFYDSNSISI DGKTSYSFDE DVLKR-YEAY GWEVMEVDKG DDDMESISSA htk (623 AS) 150 YCLLGDGELS EGSVWEAMAF ASIYKLDNLV AILDINRLGQ SDPAPLQHQM DIYQKRCEAF GWHAIIVD-G -H---SVEEL Consensus GDG EG E A L L DN D EA W G ectka (663 AS) 228 VEEARAVTDK PSLLMCKTII GFGSPNKAGT HDSHGAPLGD AEIALTREQL GWK-YAPFEI PSEIYAQWDA K---EAGQAK ectkb (666 AS) 226 ILEAQSVKDK PSLIICRTVI GFGSPNKAGK EEAHGAPLGE EEVALARQKL GWH-HPPFEI PKEIYHAWDA R---EKGEKA VTKA (680 AS) 231 IAQAKLSKDK PTLIKMTTTI GYGS-LHAGS HSVHGAPLKA DDVKQLKSKF GFNPDKSFVV PQEVYDHYQ- KTILKPGVEA VTKB (681 AS) 231 LEKAKLSKDK PTIIKVTTTI GFGS-LQQGT AGVHGSALKA DDVKQLKKRW GFDPNKSFVV PQEVYDYYK- KTVVEPGQKL (623 AS) 225 CKAFGQAKHQ PTAIIAKTFK GRGITGVEDK ESWHGKPLPK N------ ----MAEQI IQEIYSQIQS K-----hTKTGG HG L Consensus Ρ ΕΥ ecTKA (663 AS) 304 ESAWNEKFAA YAKAYPOEAA EFTRRMKGEM PSDFDAKAKE FIAKLQANPA KIASRKASON AIEAFGPLLP EFLGGSADLA 302 QQSWNEKFAA YKKAHPQLAE EFTRRMSGGL PKDWEKTTQK YINELQANPA KIATRKASON TLNAYGPMLP ELLGGSADLA ecTKB (666 AS) yTKA (680 AS) 309 NNKWNKLFSE YOKKFPELGA ELARRLSGOL PANWESKLPT YTAKDSA--- -VATRKLSET VLEDVYNOLP ELIGGSADLT 309 NEEWDRMFEE YKTKFPEKGK ELQRRLNGEL PEGWEKHLPK FTPDDDA--- -LATRKTSQQ VLTNMVQVLP ELIGGSADLT yTKB (681 AS) hTK(623 AS) 281 -----KKILA TPPQEDAPSV DIANIRMPSL PSYKVGDK-- ----- -IATRKAYGQ ALAKLGHASD RIIALDGDTK Consensus Ρ A RK D ectka (663 AS) 384 PSNLTLWSGS KAINE----- -DAAGNYIHY GVREFGMTAI ANGISLHGG- FLPYTSTFLM FVEYARNAVR MAALMKQRQV 382 PSNLTIWKGS VSLKE----- -DPAGNYIHY GVREFGMTAI ANGIAHHGG- FVPYTATFLM FVEYARNAAR MAALMKARQI ecTKB (666 AS) 385 PSNLTRWKEA LDFQPPSSGS GNYSGRYIRY GIREHAMGAI MNGISAFGAN YKPYGGTFLN FVSYAAGAVR LSALSGHPVI VTKA (680 AS) (681 AS) 385 PSNLTRWEGA VDFQPPITQL GNYAGRYIRY GVREHGMGAI MNGISAFGAN YKPYGGTFLN FVSYAAGAVR LAALSGNPVI VTKB (623 AS) 344 NSTFSEIFKK ------ -EHPDRFIEC YIAEQNMVSI AVGCATRNR- TVPFCSTFAA FFTRAFDQIR MAAISESNIN hTKE M I G Ρ TF F А Consensus S I R Α ecTKA (663 AS) 457 MVYTHDSIGL GEDGPTHOPV EOVASLRVTP NMSTWRPCDO VESAVAWKYG VERODGPTAL ILSRONLAOO ERTEEOLANI CTKB (666 AS) 455 MVYTHDSIGL GEDGPTHOAV EQLASIBLTP NESTWRPCDO VEAAVGWKLA VERHNGPTAL LLSRONLAOV ERTPDOVKET YTKA (680 AS) 465 WVATHDSIGV GEDGPTHOPI ETLAHFRSLP NIQVWRPADG NEVSAAYKNS LESKHTPSII ALSRONLPOL E--GSSIESA 465 WVATHDSIGL GEDGPTHOPI ETLAHLRAIP NMHVWRPADG NETSAAYYSA IKSGRTPSVV ALSRONLPOL E--HSSFEKA yTKB(681 AS) hTK (623 AS) 412 LCGSHCGVSI GEDGPSOMAL EDLAMFRSVP TSTVFYPSDG VATEKAVELA ANTKG----I CFIRTSRPEN AIIYNNNEDF Consensus Η GEDGP EARP ΡD R ectka (663 AS) 537 ARGGYVLKDC AGQPELIFIA TGSEVELAVA AYEKL-TAEG VKARVVS--- ---MPSTDAF DKQDAAYRES VLPKAVTARV ectkb (666 AS) 535 ARGGYVLKDS GGKPDIILIA TGSEMEITLQ AAEKL-AGEG RNVRVVS--- ---LPSTDIF DAQDEEYRES VLPSNVAARV yTKA (680 AS) 543 SKGGYVLQDV A-NPDIILVA TGSEVSLSVE AAKTL-AAKN IKARVVS--- ---LPDFFTF DKQPLEYRLS VLPDNVP-IM 543 LKGGYVIHDV E-NPDIILVS TGSEVSISID AAKKLYDTKK IKARVVS--- ---LPDFYTF DRQSEEYRFS VLPDGVP-IM VTKB (681 AS) 488 QVGQAKVVLK SKDDQVTVIG AGVTLHEALA AAELL-KKEK INIRVLDPFT IKPLDRKLIL DSARATKGRI LTVEDHYYEG hTK (623 AS) A L RV Consensus G G ecTKA (663 AS) 610 AV-EAGIADY WYKYVGLNGA IVGMTTFGES APAELLFEEF GFTVDNVVAK AKELL-----608 AV-EAGIADY WYKYVGLKGA IVGMTGYGES APADKLFPFF GFTAENIVAK AHKVLGV-KG A-----ecTKB (666 AS) 614 SV-EVLATTC WGKYAHOS-- -FGIDRFGAS GKAPEVFKFF GFTPEGVAER AOKTIAFYKG DKLISPLKKA F VTKA (680 AS) YTKB (681 AS) 615 SF-EVLATSS WGKYAHQS-- -FGLDEFGRS GKGPEIYKLF DFTADGVASR AEKTINYYKG KQLLSPMGRA F (623 AS) 567 GIGEAV-SSA VVGEPGITVT HLAVNRVPRS GKPAELLKMF GIDRDAIAQA VRGLIT--K- A------hTKConsensus E S F

Abb. 3.1 Alignment verschiedener Transketolase-Primärsequenzen. ecTKA: Transketolase A aus Escherichia coli (NCBI-Datenbankeintrag: YP_026188); ecTKB: Transketolase B aus Escherichia coli (NP_416960); yTKA: Transketolase A aus Saccharomyces cerevisiae (CAA51693); yTKB: Transketolase B aus Saccharomyces cerevisiae (CAA51937); hTK: humane Transketolase (P29401). Das alignment wurde mittels ClustalW (V1.83; Chenna et al., 2003), die Darstellung mittels Bioedit (Hall, 1999) durchgeführt. Anhand des Sequenz*alignments* konnten Aminosäuren identifiziert werden, welche in den verglichenen Transketolasen konserviert auftraten (Consensus-Sequenz, Abb. 3.1). Da bereits für die Hefe- bzw. humane Transketolase Mutagenesestudien vorlagen⁴, konnten neben dem Diphosphatbindungsmotiv für einige Aminosäuren des bakteriellen Enzyms Funktionen vermutet werden. Deshalb wurde das *alignment* für die Auswahl einiger Aminosäurereste des aktiven Zentrums zur ortsgerichteten Mutagenese herangezogen.

Neben dem Wildtypenzym interessierte vor allem die Glu⁴¹¹Ala-Variante, da das Glu⁴¹¹ mit dem N1´-Atom des Aminopyrimidinrings in Wechselwirkung steht und für dieses bei allen ThDPabhängigen Enzymen (mit Ausnahme der Glyoxylat-Carboligase) eine Rolle bei der Cofaktoraktivierung gezeigt werden konnte (Kern *et al.*, 1997).

Weiterhin interessierten die Interaktionen der Transketolase mit den funktionellen Gruppen der Donorsubstrate, hierbei vor allem jene bezüglich der Spaltstelle zwischen C2 und C3 im Zuckerrest (Abb. 3.2). Es standen daher auf der einen Seite die Interaktionen mit der intermediären C2-OH-Gruppe im Vordergrund, wobei vermutet wurde, dass diese auf Wechselwirkungen mit dem His⁴⁷³ zurückzuführen sind. Auf der anderen Seite wurde ein Einfluss der Histidine 26 und 261 auf die Abspaltung des ersten Aldoseprodukts aus dem Donorintermediat vermutet. Diese sollten in Wechselwirkung mit der OH-Gruppe am C3 des Intermediats (Abb. 3.2.) stehen und somit für die Protonenabstraktion zur Ausbildung der Aldehydfunktion in Position C1 der abzuspaltenden Aldose verantwortlich sein. Eine Säure/Base-Funktion von Histidinresten im aktiven Zentrum der TK ließ sich auch durch den pKA-Wert der Histidinseitenkette von ~ 6 vermuten. Diese Überlegungen wurden durch die zu diesem Zeitpunkt vorhandene 3D-Struktur der Hefetransketolase mit dem gebundenen Akzeptorsubstrat E4P (Nilsson et al., 1997) gestützt. Die Protonierungs-/Deprotonierungsfunktion der Histidine im Sinne einer allgemeinen Säure/Base-Katalyse sollte durch Generierung einer Doppelvariante (His²⁶Ala/His²⁶¹Ala) untersucht werden. Ausgehend von einem *ping-pong*-Mechanismus der TK würde letztendlich durch eine spaltungsdefiziente Variante die Möglichkeit zur Kristallisation eines enzymgebundenen Donorintermediats gegeben sein, für welches bisher keine Röntgenkristallstruktur bekannt war.



Abb. 3.2 Schematische Darstellung des cofaktorgebundenen C5-ThDP-Intermediats. Die Positionen der Kohlenstoffe 2 und 3 sind gekennzeichnet und stellen die Spaltstelle im Intermediat dar.

⁴ Wikner *et al.* (1994, 1995, 1997); Singleton *et al.* (1996); Kern *et al.* (1997); Meshalkina *et al.* (1997); Nilsson *et al.* (1997, 1998); Fiedler *et al.* (2001); Selivanov *et al.* (2004)

3.2. Molekularbiologische Arbeiten

Die in diesem Abschnitt gezeigten Agarosegele können zur verbesserten Visualisierung nachbearbeitet sein, jedoch nur insoweit, dass keine Veränderungen des Inhalts auftraten.

3.2.1. Rückmutation zu Transketolase Wildtyp (TKA)

Das Plasmid pGSJ427, welches das Gen des Wildtypenzyms der Transketolase A trägt, wurde freundlicherweise von Prof. Georg Sprenger (Stuttgart) zur Verfügung gestellt. Die Sequenzierung des Gens offenbarte jedoch die Punktmutation T₁₈₅C, welche mittels ortsgerichteter Mutagenese rückgängig gemacht werden sollte. Im Protein resultierte die Mutation in der Aminosäuresubstitution Leu⁶²Pro. Leu⁶² ließ sich als hochkonservierter Rest aller Transketolasen nachweisen (Abb. 3.1; Schenk *et al.*, 1997).

Das Agarosegel des Verdaus des *tktA*-Gens nach Rückmutation mit Restriktionsenzymen sowie das SDS-Gel eines Miniexpressionstests sind in Abb. 3.3. dargestellt. Mittels Agarosegel konnten die erwarteten Fragmente (1,7 kB, 3,7 kB) nach vollständigem *Eco*R I-Verdau nachgewiesen werden. Beim Verdau mit *Bam*H I erschienen erwartungsgemäß die Bande des linearisierten Plasmids bei 5,4 kB sowie zwei weitere dünne Banden, welche einen nicht vollständig verdauten Anteil an Plasmid darstellen. Das unverdaute Plasmid wies mehrere Banden auf, welche auf Supersekundärstrukturen der DNA zurückzuführen sind und somit keine Verunreinigungen darstellen. Das SDS-Gel der Miniexpression in *Escherichia coli*-JM109-Zellen mit dem Plasmid pGSJ427 bestätigte das rekombinante Überexpressionsprodukt TKA auf Laufhöhe des Proteinmarkers.



Abb. 3.3 <u>Links</u>: 1 %iges Agarosegel des Verdaus von pGSJ427 mit Restriktionsenzymen nach Rückmutation. M: λ-DNA-Marker; 1: unverdautes pGSJ427; 2: pGSJ427 nach *Eco*R I-Verdau; 3: pGSJ427 nach *Bam*H I-Verdau. <u>*Rechts:*</u> 10 %ige SDS-PAGE der Miniexpression von Plasmid pGSJ427 (*tktA*) nach Rückmutation in *E. coli*-JM109-Zellen. S: Proteinstandard (Variante Leu⁶²Pro, 72 kDa); Z: Proteinbestandteile von 100 µl *E. coli*-JM109-Zellen transformiert mit pGSJ427(*tktA*) und aufbereitet nach Kapitel 2.4.

Die korrekte Nukleotidsequenz des rückmutierten *tktA*-Gens im Plasmid ließ sich mittels Sequenzierung überprüfen. Der Ausschnitt der Sequenzierung um die Base 185 ist in Abb. 3.4 wiedergegeben. Anhand des rückmutierten Gens *tktA* für das Wildtypenzym wurden weitere ortsgerichtete Mutagenesen zur Herstellung der gewünschten *active-site*-Varianten durchgeführt.



Abb. 3.4 Ausschnitt aus der Nukleotidsequenz des Gens *tktA*. Der Bereich um die Base 185 ist dargestellt (Base 185 in *tktA* entspricht dem Nukleotid 242 der gezeigten Sequenzierung und ist durch einen Pfeil gekennzeichnet).

3.2.2. Herstellung von active-site-Varianten der Transketolase A

Die Auswahl der auszutauschenden Aminosäuren erfolgte durch *alignment* der Aminosäuresequenzen (Kapitel 3.1) der Transketolase A aus *Escherichia coli* und der bereits charakterisierten Transketolase A aus *Saccharomyces cerevisiae* (yTKA).

Anhand des rückmutierten Gens der TKA wurden durch ortsgerichtete Mutagenese weitere Basenaustausche im Plasmid vorgenommen, welche im Protein zu den gewünschten Aminosäuresubstitutionen führten. Folgende Varianten wurden generiert: Glu⁴¹¹Ala, Glu⁴¹¹Gln, His²⁶Ala, His²⁶¹Ala, His⁴⁷³Ala sowie die Doppelvariante His²⁶Ala/His²⁶¹Ala (DV). Die Kontrolle der durchgeführten Mutagenesen erfolgte mittels Sequenzierung der Plasmid-DNA und zeigte, dass alle Mutationen erfolgreich in das Gen eingefügt werden konnten.

Anhand der generierten Plasmide für das Wildtypenzym bzw. die Varianten wurden gentechnisch weitere Modifikationen durch jeweiliges Einbringen einer His₆-*tag*-Sequenz durchgeführt, um eine vereinfachte Reinigung mittels Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie zu ermöglichen.

3.2.3. Insertion einer Sequenz für einen C-terminalen His₆-tag

Die experimentelle Durchführung ist in Kapitel 2.2 beschrieben. Es wurden zwei Teilfragmente (TF) mit einer Größe von 212 bp (TF1) und 180 bp (TF2) erzeugt, an welche die Sequenz des Hexahistidin-*tags* angefügt wurde, (Abb. 3.5). Durch Hybridisierung der Einzelfragmente über den komplementären Überlappungsbereich erfolgte die Generierung des Gesamtfragments mit einer Größe von 368 bp. Durch Doppelverdau mit *Mlu* 1 und *Bam*H 1 wurde das zur Ligation bestimmte Segment mit einer Länge von 294 bp erhalten.



Abb. 3.5 2 %ige Agarosegele zur Generierung des His₆-*tag*-enthaltenden Gesamtfragments. M: 50 bp-DNA-Marker. <u>Links</u>: Agarosegel der Teilfragmente (TF) 1 und 2; Spur 1: TF1 nach PCR; 2: TF1 nach Reinigung durch Gelextraktion; 3: TF2 nach PCR; 4: TF2 nach Reinigung durch Gelextraktion <u>Mitte</u>: Spur 5: 368 bp-Gesamtfragment. <u>Rechts</u>: Spur 6: 294 bp-Gesamtfragment nach Doppelverdau mit *Mlu* I und *Bam*H 1.

Der korrekte Einbau der His₆-*tag*-Nukleotidsequenz wurde durch Sequenzierung überprüft und ist exemplarisch für alle verwendeten Proteine (Wildtypenzym und Varianten) in Abb. 3.6 wiedergegeben. Die SDS-PAGE einer zugehörigen Miniexpression für das Wildtypenzym ist ebenfalls dargestellt.



Abb. 3.6 <u>Links</u>: Sequenzierung der Plasmid-DNA nach Einführung der Nukleotidsequenz für den Hexahistidin-*tag* (6x CAC). Die Sequenz wurde direkt zwischen das Codon der letzten Aminosäure und dem Stopp-Codon (TAA) eingeführt. <u>*Rechts*</u>: 10 %ige SDS-PAGE der Miniexpression von 100 μl *Escherichia coli*-JM109-Zellen mit den Plasmiden für TKA und TK. S: Proteinstandard (Leu⁶²Pro, 72 kDa), 1: TK, 2: TKA.

3.3. Expression, Reinigung und strukturelle Integrität der Transketolase A (-varianten)

3.3.1. Expression und Reinigung

Nach der im Kapitel 2.3 beschriebenen Durchführung wurde eine optische Dichte von 3,0 bis 3,7 der Zellkulturen nach 20 bis 24 h Inkubation bei 37 ℃ erreicht. Nach Zellernte betrug das Feuchtgewicht der Zellpellets aus 6 L Hauptkultur etwa 24 g. Daraus ließen sich annähernd 500 mg Protein erhalten. Im Rahmen der Promotion wurden die in Tabelle 3.1 aufgeführten Proteine näher untersucht.

Sowohl TKA, als auch TK und deren Varianten konnten in hoher Homogenität erhalten werden (Abb. 3.7). Eine Kontamination der rekombinant hergestellten Varianten mit der in *Escherichia coli* nativ gebildeten Transketolase konnte aufgrund der Reinigung mittels Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie ausgeschlossen werden.



Abb. 3.7 10 %ige SDS-PAGE der Reinigungen von Transketolase. S: Proteinstandard (Variante Leu⁶²Pro, 72 kDa) <u>Links:</u> SDS-Gel der TKA-Fraktionen nach Anionenaustauschchromatographie (siehe Material & Methoden). Fraktionen, die vereinigt wurden, sind durch Markierungen gekennzeichnet. <u>*Rechts:*</u> SDS-Gel nach Reinigung der TK über Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie. 1: 30 μg TK; 2: 3 μg TK; 3: 1,5 μg TK.

3.3.2. Massenspektrometrische Molekulargewichtsbestimmung

Neben der Gensequenzierung der Plasmide und der Kontrolle der Expressionsprodukte im denaturierenden SDS-Gel erfolgte die Überprüfung des jeweils gereinigten Proteins durch Bestimmung des Molekulargewichts mittels Massenspektrometrie. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 3.1 wiedergegeben. Die Messungen wurden freundlicherweise von Dr. Angelika Schierhorn (Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung, Halle/Saale) durchgeführt. Für alle gereinigten Proteine wurden die erwarteten Molekulargewichte gefunden. Die Reinheit des jeweils präparierten Enzyms wurde durch SDS-PAGE überprüft.

Transketolase	erwartetes MW (Da)	ermitteltes MW (Da)
ТКА	72 080	72 078
ТК	72 903	72 899
Glu ⁴¹¹ Ala	72 845	72 843
His ⁴⁷³ Ala	72 837	72 836
DV	72 771	72 774

 Tab. 3.1
 Übersicht der erwarteten und ermittelten Molekulargewichte der

 Wildtyptransketolase aus Escherichia coli sowie der entsprechenden Varianten.

3.3.3. Bestimmung des Sekundärstrukturgehalts der Proteine

Durch CD-Messungen zum Sekundärstrukturgehalt sollte überprüft werden, welchen Einfluss die Einführung des zusätzlichen His₆-*tags* auf die strukturelle Integrität der Transketolase A und der Varianten zeigt, da dieser direkt C-terminal angefügt und nicht abgespalten wurde. Dies war deshalb von Interesse, da mit Hilfe der Proteine im Rahmen der Dissertation mechanistische Aussagen getroffen werden sollten, welche unbeeinflusst von der Präsenz des *tags* sind.

Allgemein wird im Fern-UV-CD-Bereich ($\lambda \sim 185-250$ nm) die Peptidbindung als Chromophor genutzt, wobei in der Region um 220 nm dessen n $\rightarrow \pi^*$ Übergang bzw. in der Region um 190 nm der $\pi \rightarrow \pi^*$ Übergang detektiert wird (Kelly *et al.*, 2005). Aromatische Aminosäuren können ebenfalls einen Beitrag in diesem spektralen Bereich leisten. Je nach Sekundärstrukturgehalt ergeben sich daher charakteristische Spektren im CD.

1) Wildtyptransketolase (TKA und TK)

In Abbildung 3.8 sind jeweils die Spektren der Apo- und Holoenzyme der Transketolase A mit und ohne His₆-*tag* wiedergegeben. Generell werden CD-Spektren beobachtet, welche einen hohen αhelikalen Anteil anzeigen. Zudem werden kaum Unterschiede zwischen den Apoproteinen gefunden. Weiterhin zeigt die Bindung des Cofaktors keine Änderung im Fern-UV-CD-Spektrum. Anhand dieser Daten wurde geschlussfolgert, dass der eingeführte tag keinen Einfluss auf die strukturelle Integrität des Enzyms hat und somit aus struktureller Sicht die Proteine mit tag für mechanistische Untersuchungen äquivalent zu den Enzymen ohne tag verwendet werden können. Die Ergebnisse der Fern-UV-CD-Messungen wurden durch die Aktivitätsmessungen mittels oxidativen Tests (Kapitel 3.4), den fluoreszenzspektroskopischen und den Nah-UV-CD-Untersuchungen (Kapitel 3.6) bestätigt. Auf eine prozentuale Abschätzung des Sekundärstrukturgehalts anhand der Fern-UV-CD-Spektren wurde verzichtet, da die Röntgenkristallstruktur des Wildtyps bekannt ist (Littlechild et al., 1995; Isupov et al., 1999).



Abb. 3.8 Vergleich der Fern-UV-CD-Spektren der Apoenzyme der TKA (grün) und TK (rot) bzw. der jeweiligen Holoenzyme (blau und schwarz). Experimentelle Bedingungen: Je 0,1 mg/ml Protein +/- 150 μ M ThDP, 2,5 mM MgCl₂, 50 mM Phosphatpuffer pH 7,6, d = 1 mm, T = 25 °C.

2) Proteinvariante His⁴⁷³Ala

Die Spektren in Abb. 3.9 lassen erkennen, dass sich in Bezug auf den α-Helixgehalt kaum Unterschiede der Variante zum Wildtypenzym zeigen. Dennoch fällt ein geringfügig höheres Signal des Holoenzyms der Variante im Vergleich zum Apoprotein in der Region um 195 nm auf, was für eine eventuell stärkere Ausprägung von Sekundärstrukturelementen im cofaktorgebundenen Zustand spricht. SUNDSTRÖM et al. (1992) zeigten durch die Röntgenkristallstruktur der Transketolase aus Hefe, dass zwei loops (Reste 187-198 und 383-393) flexibel im Apoprotein vorliegen. Durch Bindung des Cofaktors im Holoenzym (Lindqvist et al., 1992; Nikkola et al., 1994) werden diese stabilisiert und das ThDP durch die loops vom Lösungsmittel abgeschirmt (Abb. 1.1; Schneider et al., 1998). Für die bakterielle Transketolase A wurde bisher keine Apoenzymstruktur gelöst, sodass eine loop-Flexibilität (Reste 185-196 und 382-392 aus dem Sequenzalignment Abb. 3.1) für das Escherichia coli-Enzym nur vermutet werden kann. Dennoch könnten die zusätzlich definierten loops im Holoenzym für das erhöhte Signal im CD-Spektrum verantwortlich sein, wobei die Signalerhöhung in der Variante stärker ausgeprägt zu sein scheint als im Wildtypenzym. Bei der aufgeklärten Kristallstruktur des Holoenzyms der Variante (Kapitel 3.5.3) konnten keine Änderungen in der Struktur (bis auf den Aminosäureaustausch) im Vergleich zum Wildtypenzym gefunden werden.



Abb. 3.9 Vergleich der Fern-UV-CD-Spektren der Apoproteine der His⁴⁷³Ala-Variante (blau) und des Wildtypenzyms der Transketolase A (grün) sowie die jeweiligen Spektren der Holoenzyme (schwarz und rot). Experimentelle Bedingungen wie in Abb. 3.8 beschrieben.

3) Proteinvariante Glu⁴¹¹Ala

Die CD-Spektren in Abb. 3.10 bestätigen die erwartete α-helikale Struktur des Proteins, wobei die Variante im Vergleich zum Wildtypenzym ähnliche Spektren zeigt. Dennoch wird auch hier für

das Holoprotein der Variante ein leicht stärkeres Signal bei 195 nm als beim Apoprotein gefunden. Dies lässt sich ebenfalls mit der durch die Bindung des Cofaktors möglichen Stabilisierung flexibler *loops* erklären.



Abb. 3.10 Vergleich der Fern-UV-CD-Spektren der Apoproteine der Glu⁴¹¹Ala-Variante (grün) und des Wildtypenzyms der Transketolase A (rot) sowie die jeweiligen Spektren der Holoenzyme (blau und schwarz). Experimentelle Bedingungen wie in Abb. 3.8 beschrieben.

4) Proteindoppelvariante His²⁶Ala/His²⁶¹Ala

Abbildung 3.11 gibt die Fern-UV-CD-Spektren der Doppelvariante im Vergleich zum Wildtypenzym wieder, wobei die DV ähnliche α-helikale Spektren wie das Wildtypenzym aufweist. Die bereits für die anderen Varianten beobachtete Signalerhöhung bei 195 nm durch Zugabe von Cofaktor zum Apoenzym lässt sich auch hier registrieren und auf eine mögliche Stabilisierung flexibler *loops* zurückführen. Allerdings wird bereits für das Apoenzym der Doppelvariante eine leichte Erhöhung des CD-Signals bei 195 nm im Vergleich zum Wildtyp gefunden, während in der Region um 220 nm keine Unterschiede auftraten. Generell ist jedoch die gleiche Tendenz, wie bereits für die anderen Varianten beobachtet, erkennbar.



Abb. 3.11 Vergleich der Fern-UV-CD-Spektren der Apoproteine der Doppelvariante (blau) und des Wildtypenzyms (schwarz) sowie der Spektren der jeweiligen Holoenzyme (grün und rot). Experimentelle Bedingungen wie in Abb. 3.8 beschrieben.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Einführung des C-terminalen His₆-*tags* auf die strukturelle Integrität des Wildtypenzyms und der Varianten der Transketolase A keinen Einfluss hat und die Proteine mit *tag* für mechanistische Untersuchungen herangezogen werden konnten. Dieses Resultat wurde zudem durch den Vergleich der enzymatischen Aktivitäten, der K_D-Werte für ThDP sowie der Nah-UV-CD-spektroskopischen Untersuchungen zu TKA und TK untermauert.

3.4. Charakterisierung der Transketolase A (-varianten)

3.4.1. Fluoreszenzspektroskopische Bestimmung der Dissoziationskonstanten für ThDP und ThDP-Analoga

Die Methode quenching der intrinsischen Fluoreszenz zur Bestimmung der des Dissoziationskonstanten des Cofaktors (ThDP oder Analoga) mit dem jeweiligen Enzym wurde nach HEINRICH et al. (1972) durchgeführt (siehe Materialien & Methoden). Als molekulare Ursache des quenching durch ThDP-Zugabe wurde die Interaktion des Cofaktors mit einem im aktiven Zentrum lokalisierten Tryptophanrest vermutet (Heinrich et al., 1972; Kochetov et al., 1973; Farzami et al., 1977). Nachdem jedoch die Kristallstruktur der Hefetransketolase gelöst wurde, konnte diese Hypothese widerlegt werden, da sich kein Tryptophan in unmittelbarer Nähe des Cofaktors befindet. Durch den Vergleich zwischen Apo- und Holotransketolase ließ sich vielmehr feststellen, dass die Cofaktorbindung zwei flexible loops im Apoenzym stabilisiert (Sundström et al., 1992; Lindqvist et al., 1992) und daher zum Ring-stacking von yTrp³⁹¹ mit yTyr³⁷⁰ führt. Das stacking der aromatischen Ringe wurde als Ursache des Quencheffekts herangezogen (Abb. 1.1; Meshalkina et al., 1996). Weitere Interaktionen der gebundenen Metallionen bzw. des Diphosphatrestes von ThDP mit Trp¹⁹⁶ im bakteriellen Enzym wurden als Ursache des guenching durch MARTINEZ-TORRES et al. (2007) beschrieben.

In der Literatur wurden folgende Dissoziationskonstanten für die Bindung des Cofaktors an diverse Transketolasen beschrieben. HEINRICH *et al.* (1972) ermittelten für die TK aus *Saccharomyces cerevisiae* (yTK) einen K_D-Wert für ThDP von 1,1 μ M. EAGEN *et al.* (1981) beschrieben in Abhängigkeit der verwendeten Methode für das Hefeenzym zwei unterschiedliche K_D-Werte (0,08 und 0,5 μ M). Ähnliche Werte (K_D) wurden durch Rekonstitutionsmessungen im Kompetitionstest von MESHALKINA *et al.* (1997) mit 0,26 μ M und von 0,5 μ M durch WIKNER *et al.* (1994) gefunden. GOLBIK *et al.* (1991) ermittelte für ThDP einen K_D von 0,97 μ M. Das humane Enzym (hTK) aus Erythrocyten lieferte apparente K_D-Werte (Booth *et al.*, 1993; Tate *et al.*, 1987) im Bereich zwischen 0,06 und 2,3 μ M in Abhängigkeit der verwendeten Methode.

Für die Transketolase A aus *Escherichia coli* sind durch die Arbeiten von SPRENGER *et al.* (1995) und SCHÖRKEN (1997) Dissoziationskonstanten für ThDP indirekt mit Hilfe der enzymatischen Aktivität als analytische Größe ermittelt worden. Die K_D-Werte zeigten durch die Variation der Metallionenkonzentration deutliche Schwankungen und lieferten apparente Werte im Bereich von 8-29 μM. Durch Messungen mittels der Methode des *quenching* der intrinsischen Fluoreszenz wurden daher die Dissoziationskonstanten reevaluiert. Da es sich bei dieser Methode um eine direkte Methode handelt, konnte auf die Anwendung von Hilfsenzymen und Substraten verzichtet und somit mögliche Fehlerquellen ausgeschlossen werden. Zusätzlich ließen sich durch die Fluoreszenzmethode ebenfalls für die katalytisch inaktiven ThDP-Analoga (z.B. N3´-Pyridyl-ThDP,

Desamino-ThDP, u.a.) bzw. für die inaktiven Proteinvarianten (z.B. Glu⁴¹¹Ala) Dissoziationskonstanten ermitteln, welche vor allem für Untersuchungen in mechanistischer Hinsicht interessant waren.



Links: Fluoreszenzspektren der His⁴⁷³Ala-Variante (0,1 µM) in Ab- bzw. Anwesenheit Abb. 3.12 verschiedener Konzentrationen des quenchers ThDP (0-30 μM) bei 25 °C (die Spektren sind nicht um den dynamischen quench-Anteil korrigiert dargestellt). Die Zugabe des quenchers führte zur Abnahme des Signals bei 335 nm, wobei dynamisches und statisches quenching beobachtet wurden. Die Auswertung erfolgte wie in Kapitel 2.6.1 beschrieben. Rechts: Bestimmung der Dissoziationskonstanten für ThDP nach einer Gleichung für eine Bindungskurve aus dem Signal bei 335 nm nach Korrektur um den dynamischen quench-Anteil.

Als intrinsische Fluorophore wurden 11 im Monomer von Transketolase befindliche Tryptophanreste genutzt, welche nach Anregung bei $\lambda = 295$ nm ein Maximum der Fluoreszenz (mit Ausnahme der Glu⁴¹¹Ala-Variante) bei 335 nm aufwiesen. Das Maximum der Fluoreszenz der Glu⁴¹¹Ala-Variante war um 5 nm bathochrom auf 340 nm verschoben. Die Verwendung von Cofaktoranaloga zeigte keine Verschiebung des Maximums des Fluoreszenzsignals.

				• •	
Transketolase	ThDP (μM)	N3´-Pyridyl-ThDP (µM)	Oxi-ThDP (µM)	Desamino-ThDP (µM)	
ТКА	0,119 ± 0,052	n.b.	n.b.	n.b.	
ТК	0,114 ± 0,013	$0,042 \pm 0,009$	$0,040 \pm 0,008$	0,238 ± 0,027	
Glu ⁴¹¹ Ala*	0,157 ± 0,019	$0,034 \pm 0,008$	n.b.	0,107 ± 0,018	
His ⁴⁷³ Ala	$0,142 \pm 0,009$	n.b.	n.b.	n.b.	
DV	$0,263 \pm 0,032$	n.b.	n.b.	n.b.	
n. b. nicht bestimmt					

Tab. 3.2 Übersicht der mittels Fluoreszenz-*quenching*-Methode bestimmten K_D-Werte für die bakterielle Transketolase A und für ausgewählte Varianten. Das Metallion (Ca²⁺) lag mit 2,5 mM in allen Messungen im Überschuss vor. Die Strukturen der Analoga sind in Kapitel 2.5 gezeigt.

Ein exemplarisches Beispiel der Fluoreszenzspektren für die Titration von ThDP zum Protein und die daraus ermittelte Dissoziationskonstante nach Korrektur um den dynamischen Quenchanteil (Kapitel 2.6) ist in Abb. 3.12 wiedergegeben. Alle weiteren Plots befinden sich im Anhang (Abb. 6.3). Tabelle 3.2 fasst die ermittelten K_D-Werte für ThDP bzw. die Analoga zusammen.

1) Rekombination mit nativem Cofaktor ThDP

Transketolase Wildtyp (TKA und TK)

Die Messungen der Transketolase sowohl mit als auch ohne His_6 -*tag* ergaben denselben K_D -Wert für ThDP (~ 0,12 μ M) und weisen zudem dieselbe Größenordnung wie die Dissoziationskonstanten der yTK und hTK auf. Daher hat die Einführung des His_6 -*tags* auf die Cofaktorbindung keine Auswirkung. Dieses Resultat wird, wie bereits erwähnt, durch die Ergebnisse der Aktivitätsmessungen und CD-spektroskopischen Untersuchungen bestätigt.

Proteinvarianten der TK

Alle untersuchten Proteinvarianten wiesen geringfügig erhöhte Dissoziationskonstanten für ThDP im Vergleich zum Wildtypenzym auf. So erhöhte sich der K_D-Wert für die Glu⁴¹¹Ala-Variante um den Faktor 1,3, was in Übereinstimmung mit dem ermittelten K_D-Wert für die entsprechende Transketolasevariante aus *Saccharomyces cerevisiae* steht. WIKNER *et al.* (1994) konnten dabei für yTK zeigen, dass der K_D-Wert für ThDP um den Faktor 1,8 von 0,5 µM auf 0,9 µM in der yGlu⁴¹⁸Ala-Variante anstieg. Interessanterweise führte der Austausch des Glutamats 411 gegen Alanin zu einem um 5 nm bathochrom verschobenen und stärker gequenchten Fluoreszenzsignal, welches auch unter Verwendung der ThDP-Analoga in der Variante nicht zu einer veränderten Bandenlage führte (Anhang, Abb. 6.3). Als mögliche Ursache der Rotverschiebung lässt sich die Einlagerung eines konservierten Wassermoleküls anstelle des Glutamatrestes (siehe Kapitel 3.5) und die damit veränderte Polarität im aktiven Zentrum diskutieren.

In der Literatur wurde dem Aminosäurerest yGlu⁴¹⁸ eine Funktion bei der Cofaktorbindung Allerdings zugeschrieben (Meshalkina et al., 1991). stehen die ermittelten Dissoziationskonstanten des bakteriellen und des Hefeenzyms in Kontrast zu dieser Annahme. Vielmehr bestätigen diese die Vermutung von SCHELLENBERGER (1998), der dem Aminopyrimidinring des ThDP generell nur sekundäre Bindungseigenschaften bei der Rekombination des Apoproteins mit dem Cofaktor zuschrieb. Jedoch ist die essentielle Beteiligung des Glutamatrestes an der Katalyse aller ThDP-abhängigen Enzyme, mit Ausnahme der Glyoxylat-Carboligase (GCL), gezeigt worden.

Die Variante His⁴⁷³Ala zeigte ebenfalls nur gering veränderte Bindungseigenschaften unter Einsatz des Cofaktors ThDP. Dies war auch zu erwarten, da diesem Aminosäurerest eine

Funktion bei der Substraterkennung und -bindung zugeschrieben werden kann, wie die röntgenkristallographische Untersuchung zur Bindung von Donorintermediaten zeigte (Kapitel 3.5).

In der Doppelvariante (His²⁶Ala/His²⁶¹Ala) ließ sich ein etwa 2,3fach höherer K_D-Wert für ThDP im Vergleich zum Wildtypenzym finden. Die Verschlechterung der Cofaktoraffinität lässt sich bei der Doppelvariante insbesondere auf den Austausch des Histidins 261 gegen Alanin zurückführen. Anhand der Struktur der TKA nach LITTLECHILD *et al.* (1995) bzw. ISUPOV *et al.* (1999) lässt sich nachweisen, dass His²⁶¹ durch eine Wasserstoffbrücke an der Bindung des Diphosphatrestes und somit an der Cofaktorbindung beteiligt ist (Abb. 3.13). Eine entsprechende Interaktion des Histidins 263 der yTK wurde ebenfalls von LINDQVIST *et al.* (1992) bzw. NIKKOLA *et al.* (1994) beschrieben. Weitere strukturelle Analysen der Doppelvariante sind im Kapitel 3.5. dargelegt.



Abb. 3.13 Wechselwirkung des His²⁶¹ der TKA mit der endständigen Phosphatgruppe des ThDP. Der Abstand des Histidins zum Sauerstoff des Phosphatrestes beträgt 2,57 Å und liegt somit im Bereich einer Wasserstoffbrücke.

2) Rekombination mit ThDP-Analoga

Die Rekombination von N3´-Pyridyl-ThDP oder Oxi-ThDP mit der Wildtyptransketolase oder der Glu⁴¹¹Ala-Variante zeigte, dass diese Analoga einen circa 3-4fach geringeren K_D-Wert im Vergleich zu ThDP aufwiesen. Durch die höhere Affinität der Analoga zum aktiven Zentrum und ihre katalytische Inaktivität eignen sich diese daher als kompetitive Inhibitoren für die Transketolase aus *Escherichia coli*. Eine generell inhibitorische Wirkung von Coenzymanaloga wurde bereits in den Arbeiten von HEINRICH *et al.* (1972), GOLBIK *et al.* (1991) und USMANOV *et al.* (1985) für die Hefetransketolase bzw. andere ThDP-abhängige Enzyme (Mann *et al.*, 2004) beschrieben. So ermittelte HEINRICH *et al.* (1972) für Oxi-ThDP eine Inhibitorkonstante von 0,035 µM. GOLBIK *et al.* (1991) bestimmten einen K₁ von 0,01 µM für N3´-Pyridyl-ThDP. Diesbezüglich können die ermittelten Werte der bakteriellen TK in guter Übereinstimmung zur Hefetransketolase gesehen werden.

Erstaunlicherweise zeigte das Analogon Desamino-ThDP beim Wildtypenzym eine Erhöhung der Dissoziationskonstante (~ 0,24 μ M) im Vergleich zu ThDP, während in der Glu⁴¹¹Ala-Variante ein geringerer K_D-Wert gefunden wurde. Einen ähnlichen Wert unter Einsatz dieses Analogons fanden GOLBIK *et al.* (1991) mit 0,26 μ M für das Hefeenzym. Möglicherweise führt der Verlust der

Aminogruppe zu einer veränderten Basizität des Pyrimidinringsystems (aufgrund fehlender induktiver und/oder mesomerer Effekte), welche eine verschlechterte Bindung des Analogons im Wildtypenzym verursacht. Beim zusätzlichen Entfernen des essentiellen Glutamatrestes 411 in der Variante zeigte sich diese Wirkung auf die Bindungseigenschaften nicht mehr.

3.4.2. Enzymatische Aktivität

1) Oxidativer Test (Ferricyanidtest)

Der Ferricyanidtest nach CHRISTEN *et al.* (1980) bzw. USMANOV *et al.* (1981) kam zur Bestimmung der enzymkinetischen Parameter des für Synthesezwecke häufig verwendeten Substrats HPA zur Anwendung. Außerdem stellt dieser Test eine preiswerte Alternative zum gekoppelten optischen Test nach KOCHETOV *et. al.* (1982) dar. Da der oxidative Test für die Transketolase aus *Saccharomyces cerevisiae* bereits zur Anwendung kam (Golbik *et al.*, 2005), konnten die Ergebnisse des bakteriellen Enzyms mit diesen Studien verglichen werden. Ein relativ breites pH-Optimum der Transketolase zwischen 7,5 und 8,5 war bekannt (Schörken, 1997).

Aktivität des Wildtypenzyms mit und ohne His6-tag

Abbildung 3.14 gibt die v/S-Charakteristiken der TKA und TK wieder. Deutlich zu erkennen ist eine Substratüberschusshemmung, welche für beide Enzyme gefunden wurde. Anhand der v/S-Charakteristiken wurden die enzymkinetischen Parameter (Kapitel 2.6.3.1) ermittelt und in Tab. 3.3 zusammengefasst.



Abb. 3.14 v/S-Charakteristiken für TKA (rot) und TK (schwarz). Der Fit erfolgte nach der Gleichung für eine Substratüberschusshemmung (Gl. 2.7); die experimentellen Bedingungen sind in Materialien & Methoden beschrieben.

Für TKA und TK konnten ein v_{opt}-Wert von etwa 0,16 U/mg und ein K_M-Wert von circa 0,023 mM für HPA als Donorsubstrat bestimmt werden. V_{max} errechnete sich zu etwa 0,17 U/mg. Geringe Unterschiede ließen sich für die ermittelten K_I-Werte feststellen. So zeigte das Wildtypenzym

ohne *tag* einen K_I-Wert von 33 mM, während für das Enzym mit *tag* ein Wert von 39 mM ermittelt wurde. Dennoch liegen die Werte in einem Größenordnungsbereich und wurden daher als ähnlich angesehen. Aufgrund der ähnlichen enzymkinetischen Parameter der TKA und TK im oxidativen Test lässt sich kein Einfluss des His₆-*tags* auf die Aktivität nachweisen.

Tab. 3.3 Zusammenfassung der im Ferricyanidtest bestimmten enzymkinetischen Parameter für das Wildtypenzym und die Varianten der bakteriellen Transketolase A. Gleichungen zur Berechnung befinden sich in Materialien & Methoden.

Transketolase	K _M (mM)	K _I (mM)	S _{opt} (mM)	v _{opt} (U/mg)	V _{max} (U/mg)
TKA	$0,022 \pm 0,003$	33,71 ± 7,33	0,861 ± 0,110	0,168 ± 0,006	0,177 ± 0,006
ТК	$0,023 \pm 0,004$	39,39 ± 11,62	0,951 ± 0,160	0,157 ± 0,006	$0,165 \pm 0,006$
His ⁴⁷³ Ala	0,862 ± 0,150	802 (± 696)	26,3 ± 11,6	$0,048 \pm 0,003$	$0,052 \pm 0,003$
DV	15,42 ± 2,65	135,94 ± 41,45	45,79 ± 8,01	0,083 ± 0,010	0,140 ± 0,014
Glu ⁴¹¹ Ala*	n. d.	n. d.			n. d.
* n.d nicht detektierbar im Ferricyanidtest					

Interessanterweise führten CD-spektroskopische Untersuchungen zur Aufklärung des Phänomens der Substratüberschusshemmung der Transketolase A. Dabei wurde für das *Escherichia coli*-Enzym beobachtet, dass bei höheren HPA-Konzentrationen eine AHAS-ähnliche Carboligationsreaktion zweier HPA-Moleküle katalysiert wird (Kapitel 3.7). Diese ist daher als Konkurrenzreaktion zur eigentlichen Messreaktion des Ferricyanidtests zu betrachten, da es hierbei zur Kompetition zwischen [Fe(CN₆)]³⁻ und einem weiteren HPA-Molekül um das gebildete Intermediat DHE-ThDP kommt. Die auftretende Konkurrenzreaktion stellt somit einen Nachteil des artifiziellen Testsystems dar.

Wie bereits erwähnt, wurde der Ferricyanidtest ebenfalls für die Transketolase aus Hefe eingesetzt. Diese zeigte im Vergleich zum bakteriellen Enzym mit 5 U/mg (persönliche Mitteilung PD Dr. R. Golbik) eine deutlich höhere Aktivität und mit einem K_M-Wert von 0,06 mM eine geringere Affinität zum Substrat HPA. Eine Überschusshemmung aufgrund der Carboligasereaktion wurde nicht beschrieben. Daher stehen die gefundene höhere Affinität und die geringere Aktivität aufgrund der Carboligasereaktion der *Escherichia coli*-Transketolase im oxidativen Test im Einklang mit einer geringeren Lebensdauer des zentralen Intermediats DHE-ThDP, wie dies auch mittels schneller kinetischer Messungen gezeigt werden konnte.

Eine Berechnung der apparenten k_{cat} -Werte bzw. der katalytischen Effizienzen aus den Daten des oxidativen Tests wurde durchgeführt. Diese sind jedoch aufgrund der auftretenden Carboligationsreaktion nicht relevant, sodass auf deren Auflistung und Vergleich verzichtet wurde.

Aktivität der His⁴⁷³Ala-Variante

Der Einfluss des Histidins 473 auf die Bindung des Donorsubstrats HPA wurde auf Grundlage der Kristallstrukturen (Kapitel 3.5) mit gebundenem Donorsubstrat (X5P, F6P) vermutet und sollte mittels oxidativem Test enzymkinetisch validiert werden (Abb. 3.15).



Abb. 3.15 v/S-Charakteristik mit dem Fit nach einer Gleichung für eine Substratüberschusshemmung der His⁴⁷³Ala-Proteinvariante von TK. Experimentelle Bedingungen wie im Kapitel Materialen & Methoden beschrieben.

Aus Abb. 3.15 und Tab. 3.3 ist ersichtlich, dass der Austausch des Histidins gegen Alanin zu einem um den Faktor ~ 37 erhöhten K_M-Wert für HPA führte, währenddessen die spezifische Aktivität auf circa 1/3 der Wildtypaktivität fiel. Die Erhöhung des K_M-Wertes lässt auf eine deutliche Verschlechterung der Substrataffinität in der Variante schließen, sodass für das Histidin die vermutete Substraterkennungsfunktion bei der Bindung des Donorsubstrats bestätigt werden konnte. Die reduzierte Aktivität der Variante kann durch das Fehlen der Interaktion mit der Carbonylfunktion des Donorsubstrats (Protonierung des Carbonylsauerstoffs) erklärt werden, was für die Beteiligung des His⁴⁷³ an der Katalyse spricht.

Die Substratüberschusshemmung ist in der Variante geringer ausgeprägt, was in einem deutlich höheren K_I-Wert resultiert⁵. Neben der verschlechterten Bindung des ersten Moleküls HPA unter Ausbildung von DHE-ThDP scheint die für das Wildtypenzym beschriebene AHAS-ähnliche Carboligationsreaktion mit einem zweiten HPA-Molekül zumindest im oxidativen Test verringert zu sein.

Weiterhin ist ebenfalls ein Einfluss auf die Deprotonisierung der intermediären C2α-OH-Gruppe in der Variante zu vermuten, welche zur Ausbildung der Ketofunktion im entstehenden Ketoprodukt notwendig ist. Eine geringere Tendenz der Produktabspaltung spricht ebenfalls für die beobachtete geringere Gesamtaktivität dieser Variante.

⁵ Die in Abb. 3.15 dargestellten Messwerte wurden ebenfalls mit einer Gleichung für eine Bindungskurve nach Michaelis-Menten gefittet. Dieses lieferte jedoch eine schlechtere Anpassung der Daten als der Fit für eine Substratüberschusshemmung. Der dabei auftretende Fehler für K_I (Tab. 3.3) resultiert aus dem Fit und ist auf den gering ausgeprägten Charakter der Überschusshemmung zurückzuführen.

Für die der His⁴⁷³Ala-Variante von TK entsprechenden His⁴⁸¹Ala-Variante der Transketolase aus *Saccharomyces cerevisiae* sind die enzymkinetischen Parameter im oxidativen Test durch die Arbeit von M. KNAPE (2004) bestimmt worden und können daher für einen Vergleich der Resultate mit dem bakteriellen Enzym herangezogen werden. So zeigte die Proteinvariante der Hefetransketolase einen K_M-Wert für HPA von 6,2 mM, welcher deutlich größer ist als der K_M-Wert von 0,86 mM für das bakterielle Enzym. Die spezifische Aktivität des Hefeenzyms wurde mit 0,166 U/mg bestimmt. Tendenziell sind sowohl für das bakterielle, als auch für das Hefeenzym gleiche Effekte (Erhöhung von K_M für HPA, Reduktion der spezifischen Aktivität) durch den Austausch der konservierten Histidine gegen Alanin zu beobachten. Die Wirkungen der Mutationen auf die enzymatischen Parameter scheinen beim Hefeenzym stärker ausgeprägt, was eine erhöhte Toleranz des *Escherichia coli*-Enzyms gegenüber dieser Mutation zeigt.

Aktivität der Doppelvariante (His²⁶Ala/His²⁶¹Ala)

Wie in Abschnitt 3.1 bereits erläutert, sollten die Interaktionen der Histidine 26 und 261 bei der Abspaltung der Aldose aus dem Donorintermediat eine Rolle spielen bzw. an der Erkennung und Deprotonierung der C3-OH-Gruppe im Intermediat beteiligt sein. Die Einzelsubstitutionen der Histidine gegen Alanin sind durch Arbeiten von WIKNER et al. (1997) und FIEDLER et al. (2001) für das Enzym aus Saccharomyces cerevisiae bereits untersucht worden und zeigten, dass die Funktion des yHis³⁰ im Besonderen in der Substratbindung (erhöhter K_M für X5P) liegt, währenddessen für das yHis²⁶³ eine stark verringerte Aktivität (k_{cat}) durch den Austausch beobachtet wurde. Für das bakterielle Enzym war daher der Doppelaustausch der entsprechenden Histidine gegen Alanin interessant, da eine (möglichst vollständige) Unterbindung der Wechselwirkungen mit der C3-OH-Gruppe des Donorsubstrats zwar zu einer reduzierten Affinität führen würde, gleichzeitig aber auch die Geschwindigkeit der Abspaltung der Aldose aus dem enzymgebundenen Intermediat verringern oder vollständig blockieren könnte. Mit einer derartig abspaltungsdefizienten Variante ergäbe sich die Möglichkeit, geeignete Bedingungen zur Kokristallisation von Enzym und Substrat bzw. für Substrat-soaking-Experimente zu finden, die Untersuchungen zu Kristallstrukturen enzymgebundener Intermediate ermöglichen würden.



Abb. 3.16 v/S-Charakteristik der Doppelvariante mit dem Fit nach einer Gleichung für eine Substratüberschusshemmung. Die experimentellen Bedingungen sind im Kapitel Materialen & Methoden zu finden. Die v/S-Charakteristik (Abb. 3.16) für die Doppelvariante zeigt im Ferricyanidtest ebenfalls den Verlauf einer Substratüberschusshemmung. Der K_M-Wert für HPA wurde zu 15,4 mM ermittelt und korrelierte mit einer um den Faktor 670 verschlechterten Bindung des Substrats im Vergleich zum Wildtypenzym. Im Gegensatz dazu wurde eine spezifische Aktivität von 0,14 U/mg berechnet, welche etwa 85 % der Aktivität des Wildtypenzyms entspricht. Diese Resultate sprechen für einen starken Einfluss der Histidine auf die Bindung von HPA, während der Einfluss auf k_{cat} im oxidativen Test nur gering erscheint. Mittels Intermediatanalyse wird jedoch in einem späteren Kapitel nachgewiesen, dass die Histidinsubstitutionen zu einer (partiellen) Änderung des geschwindigkeitsbestimmenden Schritts der Katalyse mit HPA führen (Kapitel 3.4.3).

Bemerkenswert ist vor allem der aus den Ergebnissen für die Doppelvariante ableitbare Rückschluss auf das Wildtypenzym. Der deutlich verschlechterte K_M-Wert (Abb. 3.16) durch Austausch der Histidine gegen Alanin zeigt, dass im Wildtypenzym eine Interaktion zur Carboxylatgruppe des im oxidativen Test eingesetzten Substrats HPA vorhanden sein muss.

Aktivität der Variante Glu⁴¹¹Ala

Für die Variante konnte keine Aktivität im Ferricyanidtest gemessen werden. Dies ist in Übereinstimmung mit den Daten zur äquivalenten Proteinvariante der Hefetransketolase (Golbik *et al.*, 2005). Dennoch kann die Variante nicht als vollständig inaktiv betrachtet werden, da mittels CD-Spektroskopie eine sehr langsame Erythrulosebildung verfolgt werden kann (Daten nicht gezeigt).

2) Gekoppelt optischer Test nach KOCHETOV (1982)

Der Umsatz der nativen Transketolasesubstrate X5P und R5P wurde mit dem Test nach KOCHETOV entsprechend Schema 2.2 (Materialien & Methoden) gemessen. Die doppeltreziproke Auftragung nach Gl. 2.10 sowie die entsprechenden Sekundärplots (Anhang, Abb. 6.7) erlaubten die Bestimmung der enzymkinetischen Parameter für die in dieser Arbeit untersuchten Proteine (zusammengefasst in Tab. 3.4).

Für das Wildtypenzym ließen sich ähnliche kinetische Parameter wie die von SPRENGER *et al.* (1995) veröffentlichten Resultate⁶ finden. Die Ergebnisse der Aktivitätsmessungen der Varianten zeigten weiterhin, dass jede durchgeführte Aminosäuresubstitution im Substratkanal bzw. der Austausch des mit dem N1⁻-Atom des Aminopyrimidinrings interagierenden Glu⁴¹¹-Restes zur Verringerung der maximalen Umsatzgeschwindigkeit führte. So waren für die Glu⁴¹¹Ala-Variante und die Doppelvariante nur etwa 0,25 % Restaktivität messbar, während die His⁴⁷³Ala-Variante circa 5,5 % des k_{cat} -Werts des Wildtypenzyms besaß.

⁶ SPRENGER *et al.* (1995) ermittelten die enzymkinetischen Parameter bei einer Messtemperatur von 30 ℃. Standardgemäß wurde in der vorliegenden Arbeit bei 25 ℃ gemessen.

Transketolase	K _M (X5P) (mM)	K _M (R5P) (mM)	k _{cat} (s⁻¹)	spezifische Aktivität (U/mg)	<i>k</i> _{cat} /K _{M (X5P)} (s ⁻¹ mM ⁻¹)
Wildtyp	0,48	0,98	39,58	32,50	82,46
His ⁴⁷³ Ala	2,66	0,31	2,18	1,80	0,82
DV	0,53	1,19	0,10	0,08	0,19
Glu ⁴¹¹ Ala	0,44	1,08	0,11	0,09	0,25

Tab. 3.4 Enzymkinetische Parameter der bakteriellen Transketolase A und Varianten im gekoppelt optischen Test nach KOCHETOV.

Interessanterweise zeigten die Doppelvariante und die Glu⁴¹¹Ala-Variante ähnliche apparente K_M-Werte für X5P und R5P, wie diese für das Wildtypenzym ermittelt wurden. Für die Glu⁴¹¹Ala-Variante ließ sich ein solches Verhalten erwarten, da diese Aminosäuresubstitution nicht den Substratkanal des Enzyms und somit dessen Substratspezifität betraf. Die beobachtete geringe Umsatzgeschwindigkeit der Variante lässt sich auf die perturbierte Cofaktoraktivierung zurückführen (Diskussion in Kapitel 3.4.4). Im Gegensatz dazu ließe sich durch die Substitutionen der Histidine 26 und 261 gegen Alanin eine verschlechterte Donorsubstratbindung durch Eliminierung der Interaktion zur C3-OH-Gruppe vermuten. Dies wurde jedoch anhand der apparenten K_M-Werte nicht gefunden. Der Einfluss der Histidine auf die Donorsubstratbindung scheint daher relativ gering zu sein, so dass diese hauptsächlich durch andere Aminosäurereste des Substratkanals erfolgt. Zudem lässt sich annehmen, dass die fehlenden Histidininteraktionen zur C3-OH-Gruppe durch die Wechselwirkungen der anderen funktionellen Gruppen des Zuckersubstrats (im Falle von X5P: 4 OH-Gruppen und ein Phosphatrest) mit dem Protein kompensiert werden können und sich daher kaum in einer Änderung des apparenten K_M-Werts niederschlagen. WIKNER et al. (1997) beschrieben diesbezüglich für die Einzelsubstitution His³⁰Ala der Hefetransketolase zwar einen erhöhten K_M-Wert für X5P, gleichzeitig jedoch einen erniedrigten K_M -Wert bei der His²⁶³Ala-Variante. Vermutlich heben sich somit beide Einzelsubstitutionseffekte durch den Austausch der Histidine in der Doppelvariante auf. Die beobachtete dramatische Reduktion des k_{cat} -Werts hingegen lässt die Interpretation einer Säure/Base-Funktion der Histidine 26 und 261 bei der Deprotonierung der C3-OH-Gruppe des Donorintermediats zu, aus welchem die Aldehydfunktion des Aldoseprodukts bei der Donorspaltung resultiert. Die mit der Aldoseabspaltung verbundene Säure/Base-Funktion der interagierenden Histidine korreliert mit den Resultaten von FIEDLER et al. (2001). In Übereinstimmung zur Deprotonierung im Donorsubstrat wäre somit auch die Protonierung der Aldehydfunktion des Akzeptors deutlich reduziert, was ebenfalls zu dem drastisch gesenkten beobachteten k_{cat} -Wert der Doppelvariante beiträgt.

Im Gegensatz zur Doppelvariante weist die His⁴⁷³Ala-Variante bei leicht verringertem apparentem K_M-Wert für R5P einen etwa 5-6fach höheren K_M-Wert für X5P auf, was für eine Beteiligung dieser Aminosäure an der Bindung des Donorsubstrats spricht. Zudem lässt die Abnahme des k_{cat} -Werts auch eine Beteiligung des Histidinrestes an der Katalyse vermuten.

Aus den vorliegenden Daten zur bakteriellen Transketolase A und dem Vergleich der in der Literatur publizierten Mutagenesestudien lassen sich daher zwei Zentren für die Donorsubstratbindung in Transketolase postulieren. Zum einen werden die funktionellen Gruppen der Zuckeratome C1 und C2 von His¹⁰⁰ und His⁴⁷³ fixiert. Von WIKNER *et al.* (1994, 1997) wurden diesbezüglich erhöhte K_M-Werte für X5P für die äquivalenten Varianten His¹⁰³Ala und His⁴⁸¹Ala der Hefetransketolase beschrieben. Auf der anderen Seite scheint der Phosphatrest des Zuckers eine wesentliche Funktion bei der Substratbindung zu besitzen. In Übereinstimmung dazu wurden von SPRENGER *et al.* (1995) und SCHÖRKEN (1997) für unphosphorylierte Substrate deutlich erhöhte K_M-Werte im Vergleich zu den phosphorylierten Substraten gefunden. Zudem wurden von NILSSON *et al.* (1997) durch Mutagenesestudien im Bereich der enzymatischen Bindestelle der Zuckerphosphate für diese ebenfalls erhöhte K_M-Werte gemessen.

Durch die zwei zur nativen Substratbindung notwendigen Zentren lässt sich auch der im oxidativen Test deutlich erhöhte K_M-Wert für HPA der Doppelvariante verstehen. Da bei diesem Substrat der Kettenlänge C3 kein Phosphatrest vorhanden ist, scheinen der Einfluss der Interaktionen der Histidine 26 und 261 zur negativ geladenen Carboxylatgruppe bei der Substratbindung von HPA eine wesentlichere Funktion zu besitzen, als dieses bei den natürlichen Zuckerphosphaten mit Kettenlängen von C5 bis C7 der Fall ist. Die Eliminierung der Interaktionen in der Doppelvariante resultiert daher in einer verschlechterten Bindung von HPA als artifiziellem Donorsubstrat.

3.4.3. Schnelle Kinetiken (¹H-NMR und *stopped-flow-*Absorptionsspektroskopie)

Durch die Arbeiten von TITTMANN *et al.* (2003) wurde eine diskontinuierliche, *rapid-quenched-flow-*¹H-NMR-spektroskopische Methode entwickelt, welche es erlaubt, zu jedem Zeitpunkt der Katalyse von ThDP-abhängigen Enzymen einen Einblick in die Verteilung der auftretenden Intermediate zu erhalten (theoretische Betrachtungen dazu im Methodenteil). Die Methode fand erfolgreich Anwendung bei Enzymen wie POX, PDH, TK und PDC und erlaubt es, Aussagen zu individuellen Reaktionsschritten der Katalyse zu treffen. Weiterhin konnten KOCHETOV *et al.* (1973) zeigen, dass nach Zugabe von HPA als Substrat zur yTK Unterschiede im Absorptionsspektrum bei 300 nm auftreten.

Eleganterweise ermöglicht die Kombination von ¹H-NMR-Methode mit der Absorptionsspektroskopie die Zuordnung kinetisch beobachtbarer Prozesse zu den dabei populierten Intermediatspezies. Für die Hefetransketolase ließ sich zeigen (Golbik *et al.*, 2005; Fiedler, 2002), dass mit der Absorptionsänderung bei 300 nm die Bildung des enzymgebundenen Intermediats DHE-ThDP, wahrscheinlich in der Enaminform, einhergeht.

Für das bakterielle Enzym wurden bisher keinerlei mechanistische Studien auf molekularer Ebene durchgeführt. Deshalb sollte die Intermediatanalyse in Kombination mit *stopped-flow*-Absorptionsmessungen genutzt werden, um elementare Katalyseschritte der *Escherichia coli*-Transketolase A zu charakterisieren und mikroskopische Geschwindigkeitskonstanten zu bestimmen. Die Untersuchungen wurden unter Verwendung von HPA als artifiziellem Donorsubstrat durchgeführt, da die Reaktion aufgrund der Decarboxylierung irreversibel zum Intermediat DHE-ThDP verläuft und deshalb für mechanistische Untersuchungen deutlich von Vorteil ist. Die dem DHE-ThDP nachgeschalteten Reaktionen in Abwesenheit von Akzeptorsubstrat können als unphysiologische Nebenreaktionen betrachtet werden. Für den Fall des *single-turnover* sowie bei Substratüberschuss mit HPA sind die Reaktionen in Schema 3.1 wiedergegeben.



Schema 3.1 Reaktionsschema des Umsatzes von HPA durch Holotransketolase unter 1) *single-turnover*-Bedingungen unter Abspaltung (k_5) von Glycolaldehyd (GA) bzw. unter Substratüberschuss (k_4) von HPA unter Bildung des Carboligationsprodukts Hydroxyaceto-hydroxylactat (HAHL). E kennzeichnet das Holoenzym, ES den Enzym-Substrat-Komplex.

Transketolase Wildtyp (TK)

a) single-turnover-Bedingungen

Die spektroskopischen Untersuchungen der bakteriellen Transketolase zeigten, dass die Zugabe von HPA zum Holoenzym in äquimolarer Konzentration zur Ausbildung des Absorptionssignals bei 300 nm führte, wie dies bereits für die Hefetransketolase beobachtet wurde (Golbik *et al.*, 2005). Die Progresskurve ist in Abb. 3.17 wiedergegeben.



Abb. 3.17 <u>Links:</u> Progresskurve der stopped-flow-Absorptionsmessung unter single-turnover-Bedingungen des Umsatzes von HPA mit bakterieller Wildtyptransketolase A (je 102,8 μ M TK, ThDP und HPA; 2,5 mM CaCl₂; 50 mM Gly-Gly-Puffer (pH 7,6); T = 25 °C; d = 1 cm). *Inset*: Ausschnitt des initialen Bereichs der Progresskurve. <u>*Rechts:*</u> ¹H-NMR-Untersuchungen unter zur Absorptionsmessung identischen single-turnover-Bedingungen. "ThDP" markiert dabei das C6´-H-Signal der Fraktion von nicht reagiertem, enzymgebundenem Cofaktor, "DHE-ThDP" das C6´-H-Signal des enzymgebundenen Intermediats.

Die schnelle Zunahme der Absorption bei 300 nm (*Inset* Abb. 3.17) lässt sich innerhalb eines Zeitraums von ~ 2 - 3 s unter den gegebenen experimentellen Bedingungen verfolgen, wobei der initiale Teil der Progresskurve durch die Totzeit des *stopped-flow*-Spektrometers (~ 1 ms) limitiert ist. Der separate Fit der ersten Phase nach einer einfach-exponentiellen Gleichung 1. Ordnung ergab eine Geschwindigkeitskonstante k_{obs1} von 2,98 ± 0,01 s⁻¹. Der anschließende Abfall des Absorptionssignals lässt sich ebenfalls nach einer einfach-exponentiellen Gleichung 1. Ordnung fitten und ergab k_{obs2} von 0,007 ± 8,4·10⁻⁶ s⁻¹.

Anhand der Kinetik wurden Zeitpunkte für entsprechende Intermediatanalysen mittels ¹H-NMR festgelegt. Diese zeigten nach 200 ms Reaktionszeit die Bildung von etwa 20 % des DHE-ThDP Intermediats an, welches im weiteren Verlauf nach 3 s mit 75 % seinen Maximalwert erreichte. Anschließend fiel der Anteil an DHE-ThDP, sodass nach 200 s etwa 30 % und nach 1000 s Reaktionszeit kein DHE-ThDP mehr gefunden wurde. Ein weiteres Reaktionsintermediat trat nicht auf. Zieht man den mittels oxidativen Tests (Ferricyanidtest) ermittelten K_M-Wert für HPA von 23 μM in Betracht, so ergäbe sich ein Belegungsgrad von über 90 % DHE-ThDP zum Zeitpunkt des beobachteten Absorptionsmaximums.

Anhand der zeitabhängigen Intermediatverteilungen ließ sich schlussfolgern, dass die beobachtete Absorptionsänderung bei 300 nm mit k_{obs1} auf die Bildung von DHE-ThDP zurückzuführen war, wobei sehr wahrscheinlich die Enaminstruktur des Intermediats den

Chromophor darstellt. Da durch die ¹H-NMR-Messungen außerdem kein HL-ThDP detektiert wurde, muss die Decarboxylierung (k_3 in Schema 3.1) sehr viel schneller als die Bildung von HL-ThDP (k_2) ablaufen. Für diesen Fall kann die absorptionsspektroskopisch bestimmte Geschwindigkeitskonstante k_{obs1} der mikroskopischen Geschwindigkeitskonstante k_2 (Schema 3.1) zugeordnet werden, welche der C-C-Bindungsbildung in der enzymatischen Reaktion des Cofaktors mit HPA entspricht.

In der zweiten Phase der Reaktion fiel der NMR-spektroskopisch bestimmte DHE-ThDP-Anteil ab, was auf die Protonierung des Enamin/Carbanions und die Abspaltung von GA aus dem Intermediat zurückzuführen ist (*single-turnover*-Bedingungen). Somit kann die absorptionsspektroskopisch bestimmte Geschwindigkeitskonstante kobs2 mit einer Halbwertszeit von $t_{1/2} \approx 100$ s dem mikroskopischen Schritt k_5 (Schema 3.1) zugeordnet werden. Dieses Resultat ist nicht analog zu den Messungen an Hefetransketolase (Golbik et al., 2005), für welche zwar auch eine Abnahme des Absorptionssignals bei 300 nm beobachtet und eine Geschwindigkeitskonstante von 0,02 s⁻¹ (T = $25 \,^{\circ}$ C) bestimmt wurde, die Intermediatanalyse jedoch einen konstanten Anteil an DHE-ThDP für längere Reaktionszeiten aufwies. Der absorptionsspektroskopisch bedingte Signalabfall wurde hier als Protonierung des DHE-ThDP interpretiert, jedoch ohne eine schnelle nachfolgende GA-Abspaltung. Dies lässt möglicherweise auf eine unterschiedliche Lebensdauer des DHE-ThDP-Intermediats in Transketolasen verschiedener Organismen schließen.

Die mittels Intermediatanalyse gezeigte Belegung der aktiven Zentren der Transketolase mit 75 % DHE-ThDP (unter Berücksichtigung des K_M-Werts von HPA etwa 90 %) spricht gegen eine Halbseitenreaktivität der TK, wie dies durch KOCHETOV (2001) für die Hefetransketolase bzw. von FRANK *et al.* (2007) als generelles Prinzip für ThDP-abhängige Enzyme vorgeschlagen wurde.

b) Substratüberschuss-Bedingungen

Neben den *single-turnover*-Bedingungen konnte eine Abhängigkeit der Absorptionsänderung bei 300 nm durch Variation der eingesetzten Substratkonzentration an HPA untersucht werden. Die dabei gemessenen transienten Kinetiken sowie die apparenten Geschwindigkeitskonstanten sind in Abb. 3.18 wiedergegeben.

Die schnellen kinetischen Messungen ergaben, dass bei Zugabe von steigenden Konzentrationen an HPA eine schnellere Bildung des Absorptionssignals bei 300 nm beobachtet wurde. Die Amplituden des Signals streben einem Endwert entgegen und entsprechen somit dem Belegungsgrad der aktiven Zentren mit dem Intermediat DHE-ThDP. Die aus den nach einer einfach-exponentiellen Gleichung 1. Ordnung gewonnenen Geschwindigkeitskonstanten ließen sich gegen die eingesetzte Substratkonzentration auftragen und nach Michaelis-Menten fitten (Abb. 3.18, rechts). Der daraus bestimmte apparente k_{max} -Wert beträgt 393 ± 10 s⁻¹ bei 25 °C

(Hanes-Plot: 391 s⁻¹; Eadie-Plot: 343 s⁻¹). Wie auch unter *single-turnover*-Bedingungen gezeigt, wird mittels der *stopped-flow*-Absorptionsmethode aufgrund der schnellen enzymatischen Decarboxylierung von HPA die C-C-Bindungsbildung des Substrats mit enzymgebundenem ThDP detektiert. Somit spiegelt der k_{max} -Wert die maximale Geschwindigkeitskonstante der C-C-Bindungsbildung von HPA im Wildtypenzym der Transketolase wider. Zudem lässt sich aus Abb. 3.18 (rechts) ein K_D-Wert für HPA von 12,4 ± 0,6 mM (Hanes-Plot: 12,8 mM, Eadie-Plot: 10,9 mM) berechnen.

Die hohe, aus dem Fit berechnete Geschwindigkeitskonstante wirft die Frage auf, ob die Cofaktoraktivierung limitierend für die C-C-Bindungsbildung ist. H/D-Austauschexperimente zur Bestimmung der Deprotonierungsgeschwindigkeit des C2-Atoms des enzymgebundenen ThDP nach KERN *et al.* (1997) zeigten, dass die C2-Deprotonierung bei gleicher Temperatur (T = 25 °C) in derselben Größenordnung liegt und somit eine Limitierung der C2-Deprotonierung bei der Substratbindung von HPA nicht ausgeschlossen werden kann (Kapitel 3.4.4).



Abb. 3.18 <u>Links</u>: Stopped-flow-Absorptionsmessungen an TK bei variierenden HPA-Konzentrationen. Ausgewählte Progresskurven für 18,5 μ M (1), 27,7 μ M (2), 37 μ M (3), 185 μ M (4) und 370 μ M (5) HPA, jeweils mit 2 mg/ml TK, 2,5 mM CaCl₂, 0,3 mM ThDP in 50 mM Gly-Gly-Puffer (pH 7,6), d = 1 cm, λ = 300 nm, T = 25 °C. Die Progresskurven wurden mittels einer einfach-exponentiellen Gleichung 1. Ordnung ausgewertet und zwecks Vergleichbarkeit auf einen gleichen Startwert normiert. <u>Rechts</u>: Plot der apparenten Geschwindigkeitskonstanten der Progresskurven mit dem Fit einer Michaelis-Menten-Auftragung.

Proteinvariante His⁴⁷³Ala

a) single-turnover-Bedingungen

Wie durch die Untersuchungen der Aktivität im oxidativen Test (Kapitel 3.4.2) gezeigt, lässt sich eine Funktion des His⁴⁷³ auf die Katalyse vermuten. His⁴⁷³ interagiert mit der Carbonylgruppe des Donorsubstrats bzw. der C2α-OH-Gruppe des Intermediats (Kapitel 3.5) und sollte deshalb einen Einfluss auf die Ausrichtung bzw. auf die Protonierung/Deprotonierung des Carbonylsauerstoffs
bei der Bindung des Donorsubstrats haben. Durch direkten Vergleich zum Wildtypenzym sollte dieser Einfluss bestimmt werden können.

Die absorptionsspektroskopischen Messungen wiesen auch für diese Proteinvariante eine zweiphasige Progresskurve bei 300 nm auf (Abb. 3.19, links). Die erste Phase erstreckt sich hierbei über einen Zeitraum von circa 180 s, wobei die aus einem einfach-exponentiellen Fit 1. Ordnung ermittelte Geschwindigkeitskonstante k_{obs1} etwa $0,019 \pm 3,7\cdot10^{-5} \text{ s}^{-1}$ betrug. Der separate Fit der zweiten Phase ergab einen Wert für k_{obs2} von $0,002 \pm 1\cdot10^{-4} \text{ s}^{-1}$.

Die entsprechenden Intermediatanalysen zu verschiedenen Zeiten anhand der Progresskurve wiesen ausschließlich das Intermediat DHE-ThDP nach, wobei folgende Belegungen gefunden wurden: nach 205 ms und 1 s - keine kovalenten Intermediate. Nach 30 s Reaktionszeit ließen sich 8 % DHE-ThDP und nach 180 s 18 % DHE-ThDP messen. Im weiteren Verlauf der Progresskurve wurde eine Abnahme der Intermediatspezies gefunden, die nach 1000 s Inkubationszeit noch mit etwa 5 % DHE-ThDP detektierbar war (Abb. 3.19 rechts). Die geringen Belegungsgrade mit DHE-ThDP in der Intermediatanalyse korrelieren mit der entsprechend geringen Amplitude der Absorption der Progresskurve und können durch den hohen K_M-Wert für HPA aus dem Ferricyanidtest (0,862 mM) erklärt werden, welcher keine vollständige Belegung der aktiven Zentren unter den gewählten *single-turnover*-Bedingungen zulässt.



Abb. 3.19 <u>Links:</u> Stopped-flow-Absorptionsmessung bei 300 nm des Umsatzes von HPA durch die Proteinvariante His⁴⁷³Ala unter *single-turnover*-Bedingungen (je 102,9 μ M His⁴⁷³Ala, ThDP und HPA; 1,25 mM CaCl₂; 50 mM Gly-Gly-Puffer (pH 7,6); T = 25 °C; d = 1 cm). Der Fit nach einer doppelt-exponentiellen Gleichung 1. Ordnung ist zur verbesserten Visualisierung der 1000 s-Messung zusätzlich eingezeichnet. <u>Rechts:</u> ¹H-NMR-Untersuchungen unter zur Absorptionsmessung identischen *single-turnover*-Bedingungen. "ThDP" markiert dabei das C6´-H-Signal der Fraktion von nicht reagiertem, enzymgebundenem Cofaktor, "DHE-ThDP" das C6´-H-Signal des enzymgebundenen Intermediats.

Anhand der Daten lässt sich für die HPA-Reaktion dieser Variante schlussfolgern, dass hierbei die Decarboxylierung (k_3) des Substrats nicht geschwindigkeitsbestimmend ist, da kein HL-ThDP gefunden wurde. Jedoch ist die C-C-Bindungsbildung k₂ um den Faktor 157 im Vergleich zum Wildtypenzym deutlich verschlechtert. Die verminderte Bildung des Intermediats kann durch einen erhöhten k_{-1} -Wert oder durch einen verringerten k_1 -Wert (Schema 3.1) bedingt sein, was in beiden Fällen zu einem erhöhten K_M-Wert für das Substrat führt, der auch im Aktivitätstest beobachtet wurde. Eine mögliche Perturbation der Substratbindung durch eine verringerte C2-Deprotonierung des Cofaktors, wie von LINDQVIST et al. (1992) vermutet, kann ausgeschlossen werden, da diese in der Variante unbeeinflusst ist (Kapitel 3.4.4). Eine endgültige Aussage bezüglich der molekularen Ursachen der verlangsamten Intermediatbildung kann jedoch anhand dieser Resultate nicht gegeben werden, da zwischen *i*) einer verschlechterten Substratbindung per se (erhöhter k_1 bei konstantem k_1 und k_2) durch die fehlende Wechselwirkung mit dem Histidin und *ii*) einer schlechteren Protonierung des Carbonylsauerstoffs des Substrats (erniedrigter k2-Wert) im Sinne einer Säure/Base-Katalyse nicht unterschieden werden kann. Dennoch wäre eine Säurefunktion des His⁴⁷³ für den Carbonylsauerstoff des Donorsubstrats und der damit verbundenen Erhöhung der Carbonylaktivität am entsprechenden Carbonylkohlenstoff sehr wahrscheinlich, was durch Messungen im Substratüberschuss bestätigt werden konnte.

Für die Abspaltung von GA aus DHE-ThDP in der Variante wurde eine Geschwindigkeitskonstante (k_5 in Schema 3.1) von etwa 0,002 s⁻¹ ($t_{1/2}$ = 346 s) ermittelt, welche um den Faktor 3,5 geringer als beim Wildtypenzym ist und somit auf einen Einfluss des His⁴⁷³ auf Protonierungs- und Deprotonierungsschritte der Intermediate hindeutet.

Interessanterweise wurde für die His⁴⁸¹Ala-Variante der Hefetransketolase durch Intermediatanalyse beobachtet (M. Knape, Diplomarbeit), dass unter *single-turnover*-Bedingungen neben DHE-ThDP auch geringer Anteil an HL-ThDP gefunden wurde. Dies ließ sich für die bakterielle Transketolasevariante nicht zeigen.

b) Substratüberschuss-Bedingungen

Wird HPA in höheren Konzentrationen zur Proteinvariante gegeben, lässt sich, wie bereits für das Wildtypenzym beobachtet, eine Abhängigkeit der apparenten Geschwindigkeitskonstanten von der eingesetzten Substratkonzentration an HPA feststellen (Abb. 3.20). Die steigenden Amplituden bei steigenden HPA-Konzentrationen stellen ein Maß für die erhöhte Belegung der aktiven Zentren mit DHE-ThDP dar. Bei Einsatz von Substratkonzentrationen > 40 mM war die optische Durchlässigkeit zu gering; eine Reduktion der Weglänge hingegen lieferte kaum ein Signal.

Der Plot der apparenten Geschwindigkeitskonstanten ergab einen k_{max} -Wert von 0,62 ± 0,05 s⁻¹ und einen K_D-Wert für HPA von 9,75 ± 2,12 mM. Der Vergleich zum Wildtypenzym zeigte, dass

 k_{max} in der Variante um den Faktor 633 reduziert ist, während der K_D-Wert innerhalb des experimentellen Fehlers leicht erniedrigt vorliegt. Diese Gegenüberstellungen lassen den Schluss zu, dass die Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes in der *docking-site* der Variante ähnlich erfolgt wie im Wildtypenzym (K_D-Werte), wohingegen die katalytische Interaktion (allgemeine Säure/Base-Funktion) zum Carbonylsauerstoff des Substrats durch den Austausch des Histidins gegen Alanin deutlich verschlechtert ist. Entsprechend Schema 3.1 konnte deshalb der Einfluss des Histidins auf den mikroskopischen Schritt k_2 aufgrund seiner Protonierungsfunktion (und die damit verbundene Erhöhung der Carbonylaktivität des entsprechenden Substrats) gezeigt werden, was zu der deutlich verlangsamten C-C-Bindungsbildung führte. Diese Resultate stehen in Korrelation mit dem erhöhten K_M-Wert für HPA der Variante, welcher nun auf die Verringerung des k_2 -Werts durch die fehlende Wechselwirkung der Aminosäure mit dem Substrat unter den *steady-state*-Bedingungen des Aktivitätstests zurückgeführt werden kann.



Abb. 3.20 <u>Links</u>: Stopped-flow-Absorptionskurven des Umsatzes verschiedener HPA-Konzentrationen durch die Proteinvariante His⁴⁷³Ala (2 mg/ml His⁴⁷³Ala; 0,3 mM ThDP; 2,5 mM CaCl₂ in 50 mM Gly-Gly-Puffer (pH 7,6); d = 1 cm, λ = 300 nm, T = 25 °C). Ausschnitt ausgewählter Progresskurven bei 1: 150 µM; 2: 500 µM; 3: 2,5 mM; 4: 10 mM; 5: 40 mM HPA. Die Kurven wurden zur besseren Vergleichbarkeit auf einen einheitlichen Startwert normiert. <u>Rechts</u>: Plot der apparenten Geschwindigkeitskonstanten der Progresskurven mit der Anpassung nach einer Michaelis-Menten-Auftragung.

Proteindoppelvariante His²⁶Ala/His²⁶¹Ala

Durch das Sequenz*alignment* (Abb. 3.1) wurden die konservierten Histidine 26 und 261 der *E. coli* Transketolase als funktionsäquivalente Aminosäuren zu den Histidinen 30 und 263 der Hefetransketolase identifiziert. Die Arbeit von NILSSON *et al.* (1997) zeigte, das diese Histidine in Wechselwirkung mit der Aldehydgruppe des Akzeptors E4P stehen. Daher ließ sich vermuten, dass diese Histidine potentielle Interaktionspartner zur C3-OH-Gruppe von Donorsubstraten darstellen und durch Protonierung/Deprotonierung an der Bindung/Abspaltung der Akzeptoraldose beteiligt sind. Ausgehend von einem *ping-pong*-Mechanismus der TK, würde

durch eine abspaltungsdefiziente Variante die Möglichkeit der Kristallisation von enzymgebundenen Intermediaten gegeben sein.

Im Ferricyanidtest wurde bereits gezeigt, dass die Doppelvariante einen deutlich schlechteren K_M-Wert für HPA (15,4 mM) im Vergleich zum Wildtyp (0,023 mM) aufweist. Aufgrund dessen konnten die schnellen kinetischen *pre-steady-state*-Messungen nur unter Substratüberschussbedingungen durchgeführt werden (Abb. 3.21).



Abb. 3.21 <u>Links</u>: Progresskurven für den Umsatz von HPA durch die Doppelvariante (2 mg/ml DV; 0,3 mM ThDP; 2,5 mM CaCl₂ in 50 mM Gly-Gly-Puffer (pH 7,6); d = 1 cm, λ = 300 nm, T = 25 °C). HPA-Konzentrationen 1: 0,5 mM, 2: 2,5 mM, 3: 4,8 mM, 4: 9,3 mM, 5: 13,6 mM; 6: 17,6 mM, 7: 28,3 mM, 8: 37,1 mM. Die zweigeteilte Zeitskala dient der besseren Visualisierung der initialen *burst*-Phase. <u>*Rechts*</u>: Hanes-Plot der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten k_{app1} (1. Phase) und k_{app2} (2. Phase) mit den entsprechenden Geradengleichungen.

Hohe Konzentrationen an HPA verursachten hierbei ebenfalls die absorptionsspektroskopische Änderung bei 300 nm. Die Bildung des Signals nahm mit steigender Substratkonzentration zu. Bemerkenswert war, dass bei der Doppelvariante eine zusätzliche Phase (*burst*, Abb. 3.21) bei höheren Konzentrationen auftrat, währenddessen diese bei niedrigen Substratkonzentrationen (Kurve 1 und 2) nicht beobachtbar war. Die zweiphasigen Progresskurven ließen sich nach einer doppelt-exponentiellen Gleichung 1. Ordnung anpassen. Aus der Sekundärauftragung nach HANES ergaben sich für die initiale *burst*-Phase ein k_{app1} von 0,41 ± 0,02 s⁻¹ und für die zweite langsamere Phase ein k_{app2} von 0,013 ± 4·10⁻⁴ s⁻¹. Zur Klärung der Ursache der auftretenden Phasierung sollte die Intermediatanalyse einen Einblick über die Verteilung der Intermediate geben (Abb. 3.22).

Bei 10 mM HPA trat nach einer Reaktionszeit von 2 s neben DHE-ThDP (9 %) das Intermediat HL-ThDP zu 16 % als dominante Population auf. Der Großteil des enzymgebundenen ThDP (75 %) lag nicht umgesetzt vor. Im Gegensatz dazu waren die Intermediate im Maximum der Absorption nach 320 s mit einem DHE-ThDP-Anteil von 62 %, einem HL-ThDP-Anteil von 19 % und unsubstituiertem ThDP von 19 % verteilt. Zum zeitlichen Verlauf der Reaktion lässt sich daher festhalten, dass mit abnehmendem (unsubstituiertem) ThDP-Anteil die Fraktion an DHE-

ThDP zunimmt. Jedoch muss dabei das Intermediat HL-ThDP durchlaufen werden (Schema 3.1), welches in etwa zu gleichen Verhältnissen nach 2 s und 320 s vorlag. Aufgrund des zusätzlich populierten Intermediats HL-ThDP muss die Geschwindigkeitskonstante des Decarboxylierungsschritts (k_3 in Schema 3.1) für HPA in der Doppelvariante in der gleichen Größenordnung liegen wie die Geschwindigkeitskonstante der HL-ThDP-Bildung.



Abb. 3.22 Intermediatverteilungen des Umsatzes von 10 mM HPA mit der Doppelvariante nach 2 s (oben) und 320 s (unten) Reaktionszeit. Experimentelle Bedingungen: 103 μ M DV und ThDP; 2,5 mM CaCl₂; 50 mM Gly-Gly-Puffer (pH 7,6); T = 25 °C.

Zusammenhängend lässt sich aus den Daten postulieren, dass die zusätzliche initiale burst-Phase der absorptionsspektroskopisch beobachtbaren Progresskurve auf das Auftreten eines weiteren Intermediats hindeutet, obwohl die Chromophorzuordnung für HL-ThDP nur vermutet werden kann. Modellstudien von L-ThDP und HE-ThDP zeigten im UV-Absorptionsspektrum eine geringe Änderung im Bereich um 300 nm (Ullrich et al., 1967; Crosby et al., 1970_{a. b}; Kluger et al., 1981). Eine weitere Interpretationsmöglichkeit wurde von JORDAN und Mitarbeitern (Nemeria et al., 2007) gegeben, welche im Bereich von 300-310 nm im CD die 1´,4´-iminotautomere Form für jedes kovalente ThDP-Intermediat postulieren. Um dies am Beispiel der Doppelvariante zu testen, wurden parallel stopped-flow-Absorptions- und stopped-flow-CD-Messungen bei 300 nm durchgeführt (Abb. 3.23). Dabei zeigte sich, dass im CD dieselben Phasierungen mit identischen Geschwindigkeitskonstanten gefunden wie auch wurden, diese mit der absorptionsspektroskopischen Methode messbar waren. Dies lässt den Schluss zu, dass durch beide Methoden derselbe molekulare Prozess bei der Bildung der (chiralen) Intermediate verfolgt werden kann.

Unter der Annahme, dass durch die *burst*-Phase das Intermediat HL-ThDP beobachtet wird, kann k_{app1} mit der C-C-Bindungsbildung k_2 (Schema 3.1) gleichgesetzt werden. Nach etwa 6 s (Abb.

3.21, links) liegt HL-ThDP dabei maximal populiert vor. Im weiteren Verlauf der Reaktion lässt sich spektroskopisch der langsamere Prozess k_{app2} der Decarboxylierung (k_3) von HL-ThDP zu DHE-ThDP verfolgen. Ein möglicher Einfluss der Histidinsubstitutionen auf die Cofaktoraktivierung wurde mittels H/D-Austauschmessungen ausgeschlossen (Kapitel 3.4.4).



Abb. 3.23 Progresskurven der *stopped-flow*-Absorptions- (links) und CD-Messungen (rechts) für den Umsatz von HPA durch die Doppelvariante. Die doppelt-exponentiellen Fits 1. Ordnung sowie die aus den Fits erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten sind für die jeweilige Phase eingezeichnet. Experimentelle Bedingungen (nach Mischung gleicher Volumina): 2 mg/ml DV; 0,3 mM ThDP; 2,5 mM CaCl₂; 5,25 mM HPA; 50 mM Gly-Gly-Puffer (pH 7,6); T = 25 °C; d = 1 cm. Absorptionsspektrometer SX 18 MV und CD-Spektropolarimeter π^* -180 (Applied Photophysics; UK).

Generell lässt sich anhand der Daten für die Histidine 26 und 261 eine stereoelektronische Kontrollfunktion bei der Ausrichtung der Carboxylatgruppe (im Falle von HPA) bzw. der C3-OH-Gruppe (der natürlichen Donorsubstrate) ableiten. Allgemein wurde für ThDP-abhängige Enzyme eine optimale Orientierung der Abgangsgruppe perpendikular zum Thiazoliumring postuliert (Kluger, 1987), da diese Stellung die Konjugation des durch Abspaltung von CO₂ (oder Aldose) freiwerdenden Elektronenpaars am C2 α mit dem positiven π -Elektronensystem des Thiazoliumrings ermöglicht. WILLE et al. (2006) gelang durch Kristallographie der Nachweis dieser bevorzugten Orientierung für decarboxylierende Enzyme. Übertragen auf die Transketolase lässt sich daher eine senkrechte Stellung der Carboxylatgruppe im Fall von HPA vermuten, welche im Wildtypenzym optimal für die Decarboxylierung ausgerichtet ist. Die Decarboxylierung stellt nicht den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Reaktion dar. Aus diesem Grund ließ sich HL-ThDP als kovalentes Intermediat im Wildtypenzym nicht detektieren. Im Gegensatz dazu erfährt die Doppelvariante durch die fehlenden Interaktionen der Histidine eine Perturbation bei der Ausrichtung der Carboxylatgruppe, was zu einer reduzierten enzymatischen Decarboxylierungsgeschwindigkeit und dem Auftreten von HL-ThDP als Intermediat führt. Unter Einbeziehung des 670fach erhöhten K_{M} -Werts für HPA der Doppelvariante im Aktivitätstest lassen sich daher für die Histidine 26 und 261 eine Funktion bei der Substratbindung und eine stereoelektronische Funktion bei der Ausrichtung der Abgangsgruppe zuordnen.

3.4.4. Untersuchungen zur C2-Deprotonierung des enzymgebundenen Cofaktors ThDP

Ein anerkanntes Prinzip aller ThDP-abhängigen Enzyme ist die Aktivierung von ThDP als initialen Schritt zur Bildung der reaktiven C2-Ylid-Spezies. Nachdem durch Arbeiten von BRESLOW (1957, 1958, 1959) das C2-Atom als Reaktionsort im Thiamindiphosphat identifiziert und der von LANGENBECK (1935) vorgeschlagene Mechanismus der Ausbildung einer Schiff'schen Base der 4'-Aminogruppe des Aminopyrimidinrings mit dem Substrat ausgeschlossen wurde, stellte sich nun die Frage nach dem Mechanismus zur Protonenabstraktion in den enzymatischen Systemen. Für Thiamin und diverse Thiazoliumsalze wurde durch mehrere Autoren (Kemp & O'Brien, 1970; Crosby et al., 1970_{a, b}; Washabaught & Jencks, 1988) ein pK_A-Wert von 17-19 für das C2-H in wässriger Lösung unter Berücksichtigung der diffusionskontrollierten Protonierung des Ylids mit k_{Prot} von 10¹⁰-10¹¹ M⁻¹ s⁻¹ (Eigen, 1964) gefunden. Anhand dieser Befunde war es jedoch nicht möglich, die hohen Umsatzraten enzymatischer Systeme zu erklären. Röntgenkristallstrukturen von freiem Thiamindiphosphat (Plechter & Sax, 1966; Shin et al., 1993) demonstrierten eine Variabilität des Cofaktors (F-, S-Konformationen), wobei eine Wechselwirkung der 4'-Aminogruppe zum C2-H als möglich erachtet wurde. 1967 gelang es SCHELLENBERGER & HÜBNER (Schellenberger et al., 1967a), eine konformationell bevorzugte Ausrichtung (später als V-Konformation bezeichnet) der beiden aromatischen Ringe des ThDP anhand von ThDP-Analogastudien im enzymatischen System der PDC zu postulieren. Durch Untersuchungen mit N1'-Pyridyl-, N3'-Pyridyl- und Desamino-ThDP wurde zusätzlich eine Beteiligung des Aminopyrimidinrings, speziell des N1⁻ und der exozyklischen 4⁻-NH₂-Gruppe durch GOLBIK et al. (1991) bewiesen. Durch die später gelösten Röntgenkristallstrukturen diverser ThDP-abhängiger Enzyme (z.B. Lindqvist et al., 1992; Muller et al., 1993_{a, b}; Dyda et al., 1993; Littlechild et al., 1995) bestätigten sich diese Annahmen und zeigten in allen Strukturen die V-Konformation für den Cofaktor. Durch diese enzymatisch erzwungene, energiereiche Konformation des Cofaktors wird dessen 4'-NH2-Gruppe in räumliche Nähe (~ 3 Å Abstand) zum C2-Atom des Thiazoliumrings gebracht, sodass für die 4'-Aminogruppe eine katalytische Funktion bei der initialen Abstraktion des C2-H vermutet wurde. Außerdem wurde in allen Strukturen verschiedener ThDP-abhängiger Enzyme ein konserviertes Glutamat⁷ identifiziert, welches in direkter Wechselwirkung mit dem N1'-Atom des Aminopyrimidinrings steht. Durch eine Protonierung des N1'-Atoms kommt es zur Ausbildung einer delokalisierten positiven Ladung im Aminopyrimidinring, was anhand von N1'methylierten Thiaminen und Pyrimidinen als Modellkomponenten chemisch untersucht wurde (Jordan & Mariam, 1978). Später wurde die Protonierung des N1´-Atoms mit der Ausbildung einer iminotautomeren Form der exozyklischen Aminogruppe in Verbindung gebracht, welche als intramolekulare Base an der Protonenabstraktion des C2-H involviert sein könnte. Durch die Arbeiten von KERN et al. (1997) und HÜBNER et al. (1998) gelang es schließlich für enzymatische

⁷ Chipman & Tittmann (unveröffentlichte Daten) konnten nun erstmalig am Beispiel der Glyoxylat-Carboligase (GCL) zeigen, dass das konservierte Glutamat gegen einen Valinrest substituiert vorliegen kann.

Systeme, die C2-Deprotonierung des Cofaktors durch H/D-Austauschexperimente direkt zu bestimmen und den Einfluss einzelner Strukturelemente (konserviertes Glutamat, 4'-NH₂-Gruppe) zu untersuchen. Daraus ließ sich eine kinetische Stabilisierung des C2-Ylids durch schnelle Dissoziation ableiten, wohingegen andere vorgeschlagene Mechanismen, wie die Stabilisierung eines diskreten Ylids nach Bindung des Cofaktors an die Proteinkomponente (Kemp & O'Brien, 1970) oder ein konzertierter Mechanismus (Crane *et al.*, 1993) ausgeschlossen werden konnten. Eine kinetische Kontrolle der Cofaktoraktivierung wurde schließlich durch ¹H-¹⁵N korrelierte NMR-Spektroskopie gezeigt, welche auf ein Absenken der Aktivierungsbarriere der Deprotonierung durch sterischen Zwang zurückgeführt wurde (Tittmann *et al.*, 2005). Eine ausführliche Diskussion zur Cofaktoraktivierung ist auch in TITTMANN (2000) zu finden.

Da für die bakterielle Transketolase A bisher keinerlei Daten zur Cofaktoraktivierung vorlagen, wurde dies mittels der Methode nach KERN *et al.* (1997) untersucht.

Transketolase Wildtyp & Varianten

Das Wildtypenzym, die Varianten His⁴⁷³Ala und Glu⁴¹¹Ala sowie die Doppelvariante His²⁶Ala/His²⁶¹Ala waren von Interesse für die H/D-Austauschmessungen. Abbildung 3.24 gibt exemplarisch die Plots der C2-Deprotonierung für das Wildtypenzym und die Glu⁴¹¹Ala-Variante wieder (Doppelvariante und His⁴⁷³Ala im Anhang, Abb. 6.4). Alle ermittelten H/D-Austauschgeschwindigkeitskonstanten sind in Tab. 3.5 zusammengefasst.



Abb. 3.24 Diagramme mit den Fits nach einer Gleichung pseudo-1. Ordnung zur Bestimmung der H/D-Austauschgeschwindigkeitskonstanten nach KERN *et al.* (1997) für Wildtyptransketolase (links) und Glu⁴¹¹Ala-Variante (rechts). Experimentelle Bedingungen (nach Mischung gleicher Volumina): 7,5 mg/ml Enzym; äquimolar ThDP; 2,5 mM CaCl₂; 5 mM Gly-Gly-Puffer (pH 7,6); T = 25 °C.

Die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten des H/D-Austauschs (Tab. 3.5) zeigen, mit Ausnahme der Glu⁴¹¹Ala-Variante, für alle untersuchten Proteine einen schnellen Austausch des

C2-Protons gegen Deuteron. Interessant ist, dass für die Varianten His⁴⁷³Ala und die Doppelvariante im Vergleich zum Wildtypenzym ein erhöhter $k_{H/D}$ gefunden wurde, was sich durch eine bessere Lösungsmittelzugänglichkeit zum C2-H durch die Mutationen der im Substratkanal lokalisierten Aminosäuren erklären lässt. Insbesondere kommt dabei dem His⁴⁷³ die bedeutendere Rolle zu, da sich dieses in direkter Nachbarschaft zum C2-Atom des Thiazoliumrings bzw. zur 4'-NH₂-Gruppe befindet und deshalb die Mutation einen stärkeren Effekt auf die Zugänglichkeit zum C2-Atom erwarten lässt.

Für die His⁴⁷³ äquivalente Aminosäure der Hefetransketolase yHis⁴⁸¹ postulierten LINDQVIST *et al.* (1992) bzw. SCHNEIDER *et al.* (1993) eine intramolekulare Basenfunktion zur Abstraktion des C2-H bei der Cofaktoraktivierung. Eine derartige Funktion des Histidins konnte durch die Ergebnisse zum H/D-Austausch der bakteriellen Variante jedoch nicht nachgewiesen werden und bestätigen damit die Resultate von KERN *et al.* (1997).

Tab. 3.5 Ermittelte Geschwindigkeitskonstanten des H/D-Austauschs für Transketolase A und ausgesuchter Varianten, rekombiniert mit dem Cofaktor ThDP.

Transketolase	k _{H/D} (s⁻¹)			
freies ThDP*	$(3,0\pm0,1) \ge 10^{-3}$			
Wildtyp	313 ± 42			
Glu ⁴¹¹ Ala	$11,2 \pm 3,6$			
His ⁴⁷³ Ala	492 ± 6			
DV	349 ± 2			
* Daten aus HÜBNER et al. (1998) entnommen				

Im Gegensatz dazu führt die Substitution des konservierten Glu⁴¹¹-Rests gegen Ala zu einer deutlichen Reduktion der Geschwindigkeitskonstante des C2-H-Austauschs. Aufgrund der perturbierten Wechselwirkung zum N1´-Atom des Aminopyrimidinrings konnte somit für diese Interaktion eine Funktion bei der Cofaktoraktivierung in der bakteriellen Transketolase A gezeigt und mit der Perturbation des Protonenrelais-Systems erklärt werden. Die Resultate zur *E. coli*-Variante bestätigen damit die generell konservierte Funktion des Glutamats bei der Cofaktoraktivierung, welche bereits für eine Vielzahl weiterer ThDP-abhängiger Enzyme (mit Ausnahme der GCL, siehe oben) gezeigt worden ist (z.B. Hübner *et al.*, 1998; Bar-Ilan *et al.*, 2001; Schütz, 2004).

Der Vergleich der Ergebnisse des H/D-Austauschs mit den k_{cat} -Werten der enzymatischen Aktivitäten im *steady-state* (~ 40 s⁻¹) zeigt keine Limitierung der enzymatischen Umsätze durch die Cofaktoraktivierung und steht damit in Übereinstimmung zu Messungen anderer ThDP-abhängiger Enzyme wie aktivierte PDC, POX, Hefetransketolase und AHAS.

An dieser Stelle sei kurz angemerkt, dass für das Wildtypenzym (TK) mittels *stopped-flow*-Absorptionsmessungen mit HPA als artifiziellem Donorsubstrat (Abb. 3.18) ein k_{C-C} von 393 s⁻¹ für die C-C-Bindungsbildung bestimmt wurde. Dieser Wert ist in der gleichen Größenordnung wie die Geschwindigkeitskonstante des H/D-Austauschs ($k_{H/D} = 313 \text{ s}^{-1}$) und würde eine Limitierung der Cofaktoraktivierung als Interpretation implizieren. Die Messungen zum H/D-Austausch wurden aus Gründen der Vergleichbarkeit der Methoden bei einer Temperatur von 25 °C und damit an der zeitlichen Auflösungsgrenze der *rapid-quenched-flow*-Apparatur durchgeführt. Messungenauigkeiten, besonders der ersten Messpunkte bei 5 ms, führen hierbei zu einem größeren Fehler. Dennoch kann ein substratassistierter Mechanismus (Crosby *et al.*, 1970_{a, b}) mit Einfluss des Substrats auf die Cofaktoraktivierung nicht ausgeschlossen werden, wobei dies aufgrund der Untersuchungen auch mit anderen ThDP-abhängigen Enzymen jedoch sehr unwahrscheinlich ist. Die Bestimmung der ersten Kristallstruktur eines ThDP-abhängigen Enzyms gelang durch Arbeiten an der Transketolase aus *Saccharomyces cerevisiae* von SCHNEIDER *et al.* (1989), LINDQVIST *et al.* (1992) und NIKKOLA *et al.* (1994). In den folgenden Jahren wurden weitere Strukturen, wie POX aus *Lactobacillus plantarum* (Muller *et al.*, 1993_b) und PDC aus *Saccharomyces uvarum* (Dyda *et al.*, 1993) aufgeklärt. Interessanterweise zeigte der Vergleich der einzelnen Primärstrukturen dieser Enzyme nur geringe Sequenzidentitäten (9-16 %), wohingegen jedoch Aminosäuren der aktiven Zentren der Enzyme aufgrund der Cofaktorbindung durch MULLER *et al.* (1993_a) und LINDQVIST *et al.* (1993) als hoch konserviert identifiziert wurden. Zudem wurde durch die Strukturen das von HAWKINS *et al.* (1989) postulierte Bindemotiv für den Diphosphatanker des ThDP validiert. Außerdem zeigte der strukturelle Vergleich, dass die aromatischen Ringsysteme des ThDP eine konformationell konservierte Ausrichtung in der V-Konformation im jeweiligen Holoenzym erfahren. Diese wurde bereits von SCHELLENBERGER & HÜBNER (1967_{a. b}) durch Studien mit ThDP-Analoga prognostiziert.

Trotz der Vielzahl der heute verfügbaren Kristallstrukturen von ThDP-abhängigen Enzymen, konnten bisher jedoch nur wenige enzymgebundene Intermediate kristallisiert und in ihrer Struktur aufgeklärt werden (z.B. DHE-ThDP nach Fiedler *et al.* (2002); PL-ThDP in der E1-Komponente der PDH durch Arjunan *et al.*, 2006). Bisher gelang es nur in der durch POX katalysierten oxidativen Decarboxylierung von Pyruvat, alle während der Katalyse auftretenden kovalenten Intermediate strukturell zu bestimmen (Wille *et al.*, 2006). Aus diesem Grund waren die in dieser Arbeit durchgeführten strukturellen Untersuchungen auf die Bestimmung der Röntgenkristallstrukturen solcher enzymgebundener Intermediate ausgerichtet.

Kristallisation

Alle Kristalle wurden nach einem modifizierten Protokoll von SCHNEIDER *et al.* (1989) mittels der Methode der Gasphasendiffusion im hängenden Tropfen innerhalb von 4-6 Wochen bei 8 °C erhalten. Die praktischen Handhabungen der Schockgefriermethode und der Substrat-*soaking*-Experimente sind im entsprechenden Kapitel des "Materialien & Methoden"-Teils aufgeführt. Einige typische Kristalle sind in Abb. 3.25 wiedergegeben. Die Kristalle wuchsen hauptsächlich in Form von Nadelbüscheln, wobei einzelne, klar getrennte Nadeln nach circa 6 Wochen eine Größe von 1-2 mm Länge, 0,5-1 mm Breite und 0,5 mm Dicke erreichen konnten. Etwa jeder fünfte Kristall eignete sich zur Datensammlung und lieferte geeignete Streumuster, wobei durch Testen mehrerer Positionen der Kristallnadeln im Strahlfokus teilweise deutliche Unterschiede der Qualität der Reflexe beobachtet werden konnten.



Abb. 3.25 Transketolasekristalle nach 2 Wochen (links) und 6 Wochen (rechts).

Datensammlung und -auswertung

Die Datensammlung erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Georg Wille (Frankfurt) oder Dr. Christoph Parthier (Halle/Saale) an zwei verschiedenen Messplätzen (BW7B, Deutsches Elektronen Synchrotron Hamburg oder hauseigene Drehanode, AG Stubbs, Halle). Die methodischen Aspekte der Auswertung (Skalierungen, Indizierungen, *molecular replacement*, Modellierung, Verfeinerung) sind im Kapitel Materialen & Methoden wiedergegeben. Die 3D-Struktur des Holoenzyms der bakteriellen Transketolase (Isupov *et al.*, 1999; Datenbankeintrag: 1QGD) diente als Suchmodell für das *molecular replacement*, wobei pro asymmetrischer Einheit ein TK-Dimer gefunden wurde. Alle Kristalle gehörten zur Raumgruppe P2₁2₁2₁. Eine Zusammenfassung zu den bestimmten Strukturen ist in Tabelle 3.6 gegeben, die Statistiken befinden sich im Anhang.

Protein/ Cofaktor bzw. Intermediat	Maximale Auflösung (Á)	Raumgruppe	Zelldimension (Á)			
			а	b	С	
WT/ ThDP*	1,90	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	74,60	125,60	151,00	
WT/ C5-ThDP	1,47	P212121	90,14	101,95	133,26	
WT/ C6-ThDP	1,65	P212121	90,21	101,86	133,35	
WT/ ThDP, R5P	1,60	P212121	89,97	101,74	132,86	
WT/ N3´-Pyridyl-ThDP	1,90	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	89,81	101,81	132,90	
His ⁴⁷³ Ala/ ThDP	2,25	P212121	90,26	101,54	133,52	
DV/ ThDP	1,80	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	89,25	101,91	133,04	
Glu ⁴¹¹ Ala/ ThDP	2,00	P212121	90,27	101,54	133,22	
* Daten aus LITTLECHILD <i>et al.</i> (1995)						

Tab. 3.6 Zusammenfassung der Kristallstrukturen zur bakteriellen Transketolase. Die ausführlichen kristallographischen Statistiken zur Datensammlung und zur Verfeinerung befinden sich im Anhang.

3.5.1. Donorintermediatstrukturen der bakteriellen Transketolase A

Für die Holoenzymkomplexe mit D-Xylulose-5-phosphat und D-Fructose-6-phosphat als natürliche Donorsubstrate konnten Datensätze mit 1,47 Å- und 1,65 Å-Auflösung aufgenommen werden (Asztalos *et al.*, 2007), welche jeweils zusätzliche positive Elektronendichte in den aktiven Zentren aufwiesen.

Ein erstes *refinement* mit den Strukturen der Donorsubstrate in der *docking-site* ließ sich durchführen, zeigte aber deutliche Abweichungen von der gefundenen Elektronendichte zwischen dem Cofaktor und den Zuckern. Daher wurden kovalente Intermediatstrukturen modelliert (Kapitel 2.7) und die Strukturmodelle anhand der Elektronendichte verfeinert. Es zeigte sich, dass diese kovalenten Modelle der beobachteten Elektronendichte besser entsprachen, sodass die Bindung von Substrat und Cofaktor im Kristall abgeleitet werden konnte. Die freien Fits ohne sterische Vorgaben führten zudem zur verbesserten Anpassung der Modelle der Komplexe der Donorintermediate im Vergleich zu den Fits mit vorgegebener Planarität der C2-C2α-Bindung in der Ebene des Thiazoliumrings.

Im Folgenden werden die kristallographischen Resultate vorgestellt, wobei die Strukturen der enzymgebundenen Intermediate einige überraschende Befunde aufwiesen.

1) In den Donorintermediatstrukturen für X5P (C5-ThDP) und F6P (C6-ThDP) wurde ein Winkel von 25-30° für die Bindung vom C2 α -Atom der jeweils gebundenen Ketose zum planaren (aromatischen) Thiazoliumringsystem gefunden (Abb. 3.26). Daraus ergab sich für das C2 α -Atom des Zuckers mit einem fast idealen Tetraederwinkel von ungefähr 114° eine *sp*³-Hybridisierung. Im Zusammenhang mit der bestimmten Bindungslänge von 1,5-1,6 Å spricht dies für eine Einfachbindung.

Die Ausbildung der energiereichen, gespannten Intermediate lässt sich durch die Vielzahl der produktiven Wechselwirkungen bei der Bindung der Zucker im Enzym (Abb. 3.27) und der dabei freiwerdenden Bindungsenergie verstehen (Jencks, 1975, 1987; Fersht, 2003). Für die Abspaltung der Aldose aus dem Donorintermediat (C2 α -C3-Bindungsspaltung, Schema 1.2) im nächsten Schritt der Katalyse kann der Abbau der Spannung als mögliche Triebkraft der Reaktion postuliert werden, wobei das entstehende DHE-ThDP in das planare sp^2 -hybridisierte Enaminsystem relaxieren kann. Die planaren Enaminstrukturen des DHE-ThDP bzw. des HE-ThDP sind bereits von FIEDLER *et al.* (2002) und WILLE *et al.* (2006) gezeigt worden.

Neben dem Auslenkungswinkel lässt sich weiterhin eine etwa senkrechte Ausrichtung der C2α-C3-Bindung zur Ebene des Thiazoliumsystems in den Strukturen beobachten. Dies ist in Übereinstimmung mit dem von KLUGER (1987) vorgeschlagenem Modell der *least-motion-* *maximum-overlap*-Theorie für Pyruvat-umsetzende Enzyme, wobei der sich abspaltende Rest perpendikular zum Thiazoliumringsystem ausgerichtet ist. Dadurch kann das freie Elektronenpaar am C2 α -Atom nach Spaltung der C2 α -C3-Bindung optimal mit dem π -System des Thiazoliumrings überlappen. Das positive Thiazoliumsystem fungiert dabei als Elektronen-*sink*. Um energetisch aufwendige Molekülbewegungen zu verhindern, wurde außerdem eine konformationelle Ausrichtung des Proteins in einem übergangsähnlichen Zustand postuliert, welche geringere Anforderungen an das enzymatische System stellt und die Bindung eines energiereichen Intermediats (*transition-state-binding*) erlaubt (Kluger, 1987).



Abb. 3.26 Strukturen des C5-ThDP- (linkes Bild) und des C6-ThDP-Intermediats (rechtes Bild), gebunden in der bakteriellen Wildtyptransketolase. Die C2-Atome der Thiazoliumringe sowie die C2 α -und C3-Atome der Zucker sind gekennzeichnet. Der Auslenkungswinkel von 25-30° für die Bindung zwischen dem C2-Atom des planaren Thiazoliumringsystems und dem C2 α -Atom des Zuckers ist am Beispiel des C5-ThDP eingezeichnet, wobei dieser leicht verzerrt durch die räumliche Darstellung erscheint. Die Abbildungen wurden mit dem Programm PyMol (DeLano, 2006) dargestellt, wobei die Konturniveaus der 2F₀-F_c-Elektronendichtekarten für C5-ThDP auf 1,0 σ bzw. für C6-ThDP, aufgrund des geringeren Belegungsgrades (siehe Intermediatanalyse), auf 0,8 σ eingestellt wurden. B-Faktoren der Zuckerreste: 11,9 (X5P) und 15,7 (F6P).

Bezüglich der gefundenen Auslenkung sei noch erwähnt, dass bisher nur deutlich geringere Auslenkungen von 5-12° für die C2-C2 α -Bindung gefunden wurden (Lactyl-ThDP bei POX (Wille *et al.*, 2006) und das inaktive Phosphonolactyl-ThDP in der PDH-E₁-Komponente (Arjunan *et al.*, 2006)). Die hierbei auftretende Auslenkung wurde, neben der elektrostatischen Repulsion der geladenen Carboxylatgruppe des Lactyl-ThDP durch einen Glutamatrest bzw. durch das hydrophobe Mikromilieu des aktiven Zentrums als Triebkraft für die Decarboxylierung von Pyruvat verantwortlich gemacht. Zudem wurde ebenfalls eine perpendikulare Ausrichtung der Abgangsgruppe CO₂ bzw. des Phosphonatrestes beschrieben, welche bis dahin nur durch theoretische Betrachtungen vermutet wurde (Kluger, 1987; Lobell & Crout, 1996; Friedemann & Breitkopf, 1996). Im Falle der TK lässt sich ein hydrophobes Mikromilieu im aktiven Zentrum als Triebkraft der Abspaltung des polaren Zuckerrests aufgrund der polaren Seitenketten einiger Histidine sowie Serin- und Aspartatreste nicht vermuten, was die Bedeutung des starken Auslenkungswinkels der C2-C2α-Bindung und dessen Funktion bei der C-C-Bindungsspaltung unterstreicht.

2) Beide Donorintermediate werden in den aktiven Zentren in der offenkettigen Form des entsprechenden Zuckers populiert. Dies wurde aus mechanistischen Gründen zwar angenommen, dennoch konnte dies bisher nicht bewiesen werden. Der Befund ist deshalb von besonderem Interesse, weil Zuckersubstrate in freier Lösung stets nur in einem geringen Anteil an offenkettiger Aldehyd- bzw. Ketoform vorliegen. So wurde die freie Ketoform von F6P mit einem Anteil von 2-2,5 % (Pierce *et al.*, 1985; Swenson *et al.*, 1971; Avigad *et al.*, 1970; Angyal, 1969) und von X5P mit 8-19,6 % (Wu *et al.*, 1990; Hayward *et al.*, 1977) in Lösung bestimmt. Dies stellt die Transketolase vor die Herausforderung, entweder den geringen Anteil an offenkettiger Form der Substrate in Lösung selektiv zu binden, oder nach Bindung der ringförmigen Substratstrukturen diese in die offenkettige Form umzuwandeln.

Eine mögliche Unterscheidung des enzymatischen Bindungsmodus (offenkettige *vs.* ringförmige Struktur) durch Einsatz von inaktiven Analoga des Thiamindiphosphats oder in der Ringform fixierten Analoga der Zuckersubstrate wurde im Rahmen der Promotion nicht durchgeführt. Diese stellen aber interessante Folgeprojekte dar. Die Umgebung des aktiven Zentrums führt jedoch scheinbar zu einer stärkeren Stabilisierung des übergangsähnlichen Zustands als zur Stabilisierung des Zustands der Reaktanden.



Abb. 3.27 Superposition des aktiven Zentrums der TK mit kovalent gebundenem C5-Intermediat (grün) und des Holoenzyms (gelb). Die produktiven Wechselwirkungen der Seitenketten des Proteins mit dem Intermediat wurden durch gestrichelte Linien gekennzeichnet (~ 3 Å). Das Arg⁵²⁰ befindet sich ebenfalls in einem Abstand von 3 Å zum Zuckerphosphatrest und könnte daher an der Bindung beteiligt sein. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf das Arg⁵²⁰ und den Diphosphatrest des Cofaktors in der Abbildung verzichtet. Nicht markierte bzw. unterstrichene Reste beschreiben jeweils unterschiedliche Untereinheiten der Transketolase.

Interessanterweise wurde für Transketolase eine teilweise Stabilisierung des Zustands der Reaktanden bereits von SCHOWEN (1998) vorgeschlagen. Daher lässt sich für die TK postulieren, dass die Ringstrukturen der Ketozucker gebunden und durch produktive Wechselwirkungen mit dem aktiven Zentrum jeweils in die entsprechend aktive, offenkettige Struktur übergehen. Die gespannten Intermediatstrukturen stellen demnach, wie bereits oben diskutiert, einen übergangsähnlichen Zustand dar, welcher durch die Präorganisation des aktiven Zentrums stabilisiert wird. Dieser Aspekt wird auch durch den Befund gestützt, dass für das aktive Zentrum des Holoenzyms und das mit Intermediat besetzte aktive Zentrum keine signifikanten Konformationsänderungen gefunden wurden (Abb. 3.27; siehe Punkt 4). Dabei werden typische Abstände für Wasserstoffbrücken zwischen der C1-OH-Gruppe des Zuckers und dem His¹⁰⁰ bzw. der C2α-OH-Gruppe des Zuckers mit dem His⁴⁷³ gefunden. Interessanterweise ließ sich auch der Abstand des Sauerstoffs des C2a-OH-Rests zur 4'-Aminogruppe des ThDP zu etwa 3 Å bestimmen, sodass eine Protonierung des Carbonylsauerstoffs der Ketosubstrate durch die Aminogruppe möglich erscheint. Weiterhin wechselwirken die Histidine 26 und 261 mit der C3-OH-Gruppe, wobei für das His²⁶, zusammen mit dem Asp⁴⁶⁹ eine Interaktion mit der Hydroxylgruppe des C4-Atoms des Zuckersubstrats gefunden wurde. Im Falle des kovalent gebundenen F6P erscheint eine Wasserstoffbrücke zwischen der C5-OH-Gruppe des Zuckers und dem Ser³⁸⁵ als möglich (Abb. 3.28). Der Phosphatrest des Substrats wird durch Wasserstoffbrücken und/oder ionische Bindungen zu Arg³⁵⁸, Ser³⁸⁵ und His⁴⁶¹ stabilisiert.

3) Die dritte interessante Beobachtung spiegelt sich in der vom Enzym akzeptierten Kettenlänge der Donorsubstrate wider, wobei für die natürlichen Ketosen Kettenlängen von C5 bis C7 und mit dem artifiziellen Donorsubstrat HPA ein C3-Molekül toleriert werden (Sprenger *et al.*, 1995). Wie aus Abb. 3.28 (links) ersichtlich, nehmen sowohl die Kohlenstoffketten, als auch die Hydroxylgruppen der kovalent gebundenen Zuckerreste bis zum C4 des Intermediats fast identische Positionen ein. Eine geringe Flexibilität lässt sich nur am Phosphatanker der Substrate aufgrund der unterschiedlichen Kettenlängen beobachten. Die Überlagerung der aktiven Zentren des C5- und C6-Intermediats (Abb. 3.28, rechts) zeigt ebenfalls kaum strukturelle Unterschiede, sodass für die Bindung von Zuckern verschiedener Kettenlängen Konformationsänderungen des Enzyms unwahrscheinlich sind. Die Stabilisierung der Substrate erfolgt dabei über eine Reihe von Wasserstoffbrücken und/oder elektrostatischen Interaktionen.

4) Aus dem Vergleich von Abb. 3.27 und 3.28 lässt sich für das aktive Zentrum der TK im Holoenzym bzw. im intermediatgebundenen Zustand eine hohe Rigidität feststellen, welche sich durch eine sehr geringe strukturelle Flexibilität des Proteins bei der Substratbindung äußert. Um die für die enzymatische Katalyse bedingte Absenkung der Aktivierungsenergie zu erreichen, sollte deshalb eine hohe Komplementarität des aktiven Zentrums zur Struktur des Übergangszustands ausgebildet sein. Daher kann bereits für das Holoenzym (ohne Substrat) vermutet werden, dass dieses konformationell so ausgerichtet ist, dass der übergangsähnliche Zustand stabilisiert und die Bindungsenergie der Anlagerung des Substrats partiell zur Formierung des energiereichen, gespannten Intermediats genutzt wird. Eine solche Verknüpfung von Rigidität aktiver Zentren und Komplementarität ist bereits von JENCKS (1975, 1987) und FERSHT (2003) beschrieben worden.



Abb. 3.28 Superposition der Intermediatstrukturen. <u>Links</u>: Überlagerung des kovalenten C5- (grün) und des C6-ThDP-Intermediats (gelb). Das Phosphoratom des C6-Zuckerrestes ist in Magenta dargestellt. <u>Rechts</u>: Überlagerung der entsprechend an der Substratbindung beteiligten Aminosäuren der jeweiligen aktiven Zentren. C6-ThDP-spezifische Interaktionsmöglichkeiten sind durch blau gestrichelte Linien dargestellt. Nicht gekennzeichnete bzw. unterstrichene Reste markieren jeweils die unterschiedlichen TK-Untereinheiten.

¹H-NMR basierte Intermediatanalyse nach TITTMANN *et al.* (2003)

Die Validierung der mittels Röntgenkristallographie erhaltenen Ergebnisse erfolgte durch Intermediatanalysen unter identischen Bedingungen zu den Substrat-*soaking*-Experimenten (8 °C, 25 mM Donorsubstrat; siehe Materialien & Methoden). Da in Anwesenheit der Donorsubstrate ohne zusätzliche Akzeptoraldose nur die erste Halbreaktion (= Einsubstrat-Reaktion) der TK abläuft (Schema 1.2), war eine Intermediatverteilung von C5- bzw. C6-ThDP, DHE-ThDP und nicht reagiertem ThDP zu erwarten.

Es wurde für X5P nach 10 s jedoch ausschließlich das C5-ThDP-Intermediat mit über 90 % Belegungsgrad gefunden (Abb. 3.29, links). Die restlichen 10 % lagen als unreagiertes ThDP vor. DHE-ThDP, welches durch Abspaltung der Aldose G3P aus dem C5-ThDP-Intermediat entsteht, wurde nicht detektiert. Um Gleichgewichtsbedingungen nach 10 s Reaktionszeit zu garantieren, wurde eine Kontrolle nach 1 min Inkubationszeit unter identischen Bedingungen durchgeführt, wobei diese keine Veränderung der beobachteten Intermediatverteilung (Abb. 3.29, rechts) offenbarte und damit das schnelle Einstellen des Gleichgewichts in Lösung bestätigte. Aus diesem Resultat lässt sich ableiten, dass das Intermediat C5-ThDP entweder nicht (oder nur sehr langsam) gespalten wird, oder die Rückreaktion von G3P mit DHE-ThDP zum C5-Addukt signifikant schneller verläuft. Dabei ist jedoch zu beachten, dass die Konzentration der aktiven Zentren im Experiment etwa 102 µM betrug und deshalb die Konzentration des abgespaltenen G3P ebenfalls nur einen solchen Betrag annehmen kann. Ein weiteres Akzeptorsubstrat war im Experiment nicht zugesetzt worden.



Abb. 3.29 <u>Links</u>. ¹H-NMR-Analyse der Intermediatverteilung der Einsubstrat-Reaktion (= ohne zusätzliches Akzeptorsubstrat) von jeweils 25 mM X5P und F6P in der Wildtyptransketolase A nach 10 s Reaktionszeit. <u>Rechts:</u> Gleiche Reaktion für X5P wie im linken Teil abgebildet mit 60 s Reaktionszeit. Experimentelle Bedingungen: 102,5 μ M TK und ThDP, 2,5 mM CaCl₂, 50 mM Gly-Gly-Puffer (pH 7,6), T = 8 °C.

Für F6P als Donorsubstrat ergab sich ähnliches Bild unter schnellen ein Gleichgewichtsbedingungen. Das C6-ThDP-Intermediat wurde mit einem etwas geringeren Belegungsgrad von 75 % und nicht reagiertes ThDP mit 20 % nachgewiesen. Interessanterweise ließ sich hier ein Anteil DHE-ThDP mit einer geringen Belegung von etwa 5 % detektieren, was auf eine im Vergleich zur Reaktion mit X5P geänderte Partitionierung der mikroskopischen Geschwindigkeitskonstanten der einzelnen Katalyseschritte zurückzuführen ist. Insgesamt betrachtet kann daher vermutet werden, dass die C5- und C6-Zuckerintermediate in Abwesenheit des Akzeptors durch das Enzym kinetisch stabilisiert werden könnten und somit dem Akzeptorsubstrat eine trigger-Funktion bei der Abspaltung der Aldose aus dem Donorintermediat zukommen würde.

Eine kinetische Stabilisierung der Donorintermediate ergäbe auch aus physiologischer Sicht einen Sinn, da eine spontane Abspaltung der Aldosen aus dem Donor-ThDP-Addukt in Abwesenheit eines Akzeptors eine "Verschwendung" des Zuckers darstellt und das dabei gebildete DHE-ThDP durch Protonierung des α-Carbanions als GA abspaltbar wäre (Kapitel

3.4.3). Das Enzym scheint das Donorintermediat vor unerwünschten Nebenreaktionen zu schützen, indem die Ausbildung des reaktiven α -Carbanions erst durch die Anwesenheit des Akzeptors erfolgt. Die enzymatische Stabilisierung hochenergetischer Intermediatszustände wurde bereits von KLUGER *et al.* (1987) vermutet.

DFT-Rechnungen

Quantenchemische Berechnungen eines gespannten (*out-of-plane*) Intermediatzustands im Vergleich zu einem planaren System (*in-plane*-Zustand, das C2α-Atom des Zuckerintermediats ist in der Ebene des Thiazoliumrings) wurden in Zusammenarbeit mit PD Dr. R. Friedemann (Institut für Organische Chemie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle/Saale) durchgeführt. Die Berechnungen der Totalenergien der konformeren Zustände von C5-Thiamin ohne Geometrieoptimierung (*single-point*-Berechnungen) wiesen einen um 75 kJ/mol energiereicheren *in-plane*-Zustand im Vergleich zu einem gespannten *out-of-plain*-Zustand nach. Als Ursache kann der geringe van-der-Waals-Abstand zwischen der C1-OH-Gruppe des Zuckers in Bezug auf die dem Modell vorgegebene 4'-Iminogruppe herangezogen werden. Dieser beträgt lediglich 2,2 Å (Abb. 3.30, links).

Eine vollständig optimierte Struktur von C5-Thiamin (Abb. 3.30, rechts) ergab eine um 517 kJ/mol energieärmere Konformation im Vergleich zur gespannten Intermediatstruktur ohne Optimierung. Diese weist jedoch eine von der enzymatischen V-Konformation abweichende Anordnung des 4'-Iminopyrimidinrings in Bezug zum Thiazoliumteil auf, welche möglicherweise auf die Repulsion mit der Iminogruppe zurückzuführen ist. Die dihedralen Winkel ϕ_T (C5'-C3,5'-N3-C2) und ϕ_P (N3-C3,5'-C5'-C4') ändern sich dabei von 100° und -65° in der V-Konformation zu ϕ_T von 122° und ϕ_P von -41°. Zudem erfährt vor allem der Phosphatrest der Zuckerkomponente eine konformationelle Änderung, welche zu einer Wasserstoffbrücke mit der C4-OH-Gruppe führt. Hervorzuheben sind jedoch die Befunde, dass ebenfalls in der vollständig optimierten Struktur keine planare Geometrie zwischen dem C2- und dem C2 α -Atom gefunden und ein Auslenkungswinkel von etwa 10° ermittelt wurde. Weiterhin lässt sich eine perpendikulare Ausrichtung der zu spaltenden C2-C3-Bindung in Bezug auf den Thiazoliumring feststellen.

Um zu testen, ob die 10°-Auslenkung auf repulsive Wechselwirkungen mit der vorgegebenen 4'-Iminogruppe zurückzuführen sind, wurde ein C5-Thiazoliummodell partiell und vollständig optimiert. Hierbei ergaben sich ebenfalls eine C2-C2 α -Winkelauslenkung von etwa 9° sowie eine perpendikulare Ausrichtung der C2 α -C3-Bindung (Abb. 6.9, Anhang). Zudem ist die C2 α -C3-Bindung leicht auf 1,58-1,60 Å aufgeweitet, welche eine erleichterte Abspaltung der Aldose ermöglichen sollte.



Abb. 3.30 <u>Links:</u> Überlagerung der *in-plane*- (grün) und *out-of-plane*- (orange) C5-Thiaminstrukturen ohne Optimierung. Die Abstände der C1-OH- und C2α-OH-Gruppe zur 4´-Iminofunktion des *in-plane*-Zustands sind eingezeichnet. Das Thiamin liegt in der enzymatischen V-Konformation vor. <u>Rechts:</u> Struktur des vollständig optimierten C5-Thiaminmodells. Der Thiaminteil weist eine von der V-Konformation abweichende Struktur auf (siehe Text), wobei der Thiazoliumring in Analogie zur linken Abbildung ausgerichtet ist. Die Abstände der C1-OH- und C2α-OH-Gruppen sowie der Auslenkungswinkel des vollständig optimierten C5-Thiaminmodells sind eingezeichnet.

Die Resultate zu den DFT-Rechnungen erlauben die Schlussfolgerung, dass eine gespannte Intermediatstruktur gegenüber einer relaxierten *in-plane*-Struktur energetisch begünstigt ist. Zudem scheint eine Winkelauslenkung von etwa 9-10° bereits ein Resultat von elektronischen bzw. chemischen Eigenschaften des Thiazoliumsystems zu sein, welche zu dem beobachteten *strain* von 25-30° im *sp*³-hybridisierten C5-Intermediat im enzymgebundenen Zustand beiträgt. Wie bereits erwähnt, ließen sich auch in den ThDP-abhängigen Enzymen POX und PDH geringe Auslenkungen der C2-C2 α -Bindung von 5-12° ausmachen.

3.5.2. Struktur des Komplexes von Transketolase A mit Akzeptorsubstrat

Wie bereits angedeutet, lässt sich eine Funktion des Akzeptorsubstrats bei der Abspaltung der Aldose aus dem kovalenten Donorintermediat vermuten. Daher war der Erhalt einer Röntgenkristallstruktur eines enzymassoziierten Akzeptorsubstrats von Interesse, um die Ausrichtungen im Substratkanal zu ermitteln und die Konformation zu untersuchen, in welcher die Aldose vom Enzym gebunden wird.

Eine Literaturrecherche ergab, dass für D-Ribose-5-phosphat (R5P) in freier Lösung unter Gleichgewichtsbedingungen etwa folgendes konformationelle Verhältnis vorliegt: 62-64 % β -Furanoseform, 35-38 % α -Furanoseform, circa 0,5 % Hydratform und 0,1-0,3 % offenkettige Aldoform (Pierce *et al*, 1985; Snyder *et al.*, 1988; Serianni *et al.*, 1979). Die Geschwindigkeitskonstante der Anomerisierung im Sinne einer Oxo-Cyclo-Tautomerie wurde mit

20 s⁻¹ (pH 7,5 und 28 °C) bestimmt (Pierce *et al.*, 1985) und ist stark Temperatur- und pH-Wert abhängig. Ein geschwindigkeitsbestimmender Einfluss der Mutarotation von R5P im enzymatischen System war daher nicht zu erwarten.

Um geeignete Sättigungsbedingungen für die Kristallisation zu finden, sollte der K_D-Wert des Akzeptorsubstrats R5P in Abwesenheit von Donorsubstrat bestimmt werden. Dazu wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Martin Kleinschmidt (Probiodrug AG, Halle/Saale) eine Titrationskurve unter den Bedingungen des Substrat-*soaking*-Experiments mittels ITC aufgenommen (Kapitel 2.8). Die Ergebnisse ließen sich nach einem *one-site-binding*-Modell mit einer Stöchiometrie von einem Molekül R5P pro aktivem Zentrum (Gl. 2.12) fitten, woraus für R5P ein K_D-Wert von 714 μM bestimmt werden konnte (Anhang, Abb. 6.5). Der mittels ITC-Messung ermittelte K_D-Wert für R5P entspricht derselben Größenordnung wie dem mittels gekoppelten optischen Test nach KOCHETOV bestimmten K_M-Wert für R5P von 0,98 mM. Generell war aus dem ITC-Experiment zu schließen, dass die zum Substrat-*soaking* verwendete Konzentration von 25 mM für R5P Substratsättigung bedeutete.



Abb. 3.31 R5P-Strukturmodelle. <u>Links</u>: Darstellung der ringförmigen C2-*exo*- β -D-Furanosestruktur von R5P und ausgewählte Seitenketteninteraktionen (~ 3 Å) der *docking-site* der TK. Das Konturniveau für R5P ist auf 1 σ der F_o-F_c-omit-Karte (vor Berücksichtigung des Zuckers beim *refinement*) eingestellt. Für Ser³⁸⁵ wurden alternative Konformationen gefunden. <u>*Rechts*</u>: Überlagerung der offenkettigen und ringförmigen R5P-Modelle. Für die zyklische R5P-Struktur (nach *refinement*) ist hierbei das Konturniveau als 1 σ der 2F_o-F_c-Karte, für die lineare R5P-Struktur ist das Konturlevel als 3,5 σ der F_o-F_c-Differenzelektronendichtekarte dargestellt.

Es konnten Datensätze bis 1,6 Å-Auflösung (Tab. 3.6) für den Holoenzym-R5P-Komplex aufgenommen werden. Die Kristallform entsprach erneut der Raumgruppe P2₁2₁2₁. Während für die Proteinkomponente eine eindeutig definierte Elektronendichte aller Aminosäuren beobachtet wurde, erwies sich die Interpretation der zusätzlichen positiven Elektronendichte im Substratkanal des Enzyms als nicht trivial.

In Abb. 3.31 (links) ist ein aktives Zentrum mit der Struktur vor dem refinement für die β-D-Furanoseform von R5P (C2-exo-Konformation) in der docking-site abgebildet. Dabei ist zu erkennen, dass eine sehr gut definierte Elektronendichte für den Zuckerphosphatrest gefunden wurde und dieser durch Wechselwirkung mit den konservierten Resten Arg³⁵⁸, His⁴⁶¹ bzw. Ser³⁸⁵ positioniert wird. Weiterhin befindet sich das Arg⁵²⁰ im Abstand einer Wasserstoffbrückenbindung. Die Hydroxylgruppen der Zuckerkohlenstoffe C2 und C3 interagieren jeweils mit den Resten His²⁶ und His²⁶¹ bzw. His²⁶ und Asp⁴⁶⁹. Interessanterweise ließ sich für die halbacetalische OH-Gruppe des C1-Atoms keine Elektronendichte beobachten, was auf eine Flexibilität dieser Gruppe oder eine Mischung mit dem α -Anomer hindeutet. Zudem wurde eine leichte Auslenkung der Briefumschlagkonformation des Zuckers beobachtet. Im Idealfall der C2-*exo*-Briefumschlagkonformation sollten die Kohlenstoffatome C1, C3, C4 und der Ringsauerstoff planar vorliegen. Die beste Anpassung der beobachteten Elektronendichte an ein Strukturmodell wurde jedoch bei einem um 10-14° aus der Ebene gehobenen C1-Atom gefunden, was auf eine enzymverursachte, partielle Ringöffnung im Zucker hindeuten könnte.

Diese Hypothese wurde durch eine auftretende, positive Differenzelektronendichte einer scheinbar linearen Form des Zuckers unterstützt (Abb. 3.31, rechts), welche sich von der Elektronendichte eingelagerter Wassermoleküle unterschied. Eine azyklische Struktur von R5P kann durch "Umklappen" des C1-Atoms um circa 180° nach der Ringöffnung gebildet werden und stellt somit die offenkettige *aldo*-Form dar. Die Aldehydfunktion der linearen R5P-Form kann durch die Interaktion mit dem in 3 Å entfernt liegenden His⁴⁷³ stabilisiert werden. Außer der Bewegung der C1-Gruppe des Zuckers wären somit keine größeren konformationellen Änderungen des restlichen Zuckermoleküls zur Bildung der *aldo*-Struktur notwendig.

Die zusätzlich beobachtbare Differenzelektronendichte einer linearen Form macht deutlich, dass der Anteil an offenkettiger Form durch die Interaktionen mit der *docking-site* signifikant erhöht sein muss und daher überhaupt detektierbar ist. Eine Stabilisierung der Aldoform im Enzym ist deshalb sehr wahrscheinlich und aus mechanistischer Sicht auch zwingend notwendig, da die Übertragung des cofaktorgebundenen Ketolrests auf die C1-Aldehydgruppe des Akzeptors erfolgt. Bei einer Übertragung des Ketolrests auf das C1-Atom der zyklischen Akzeptorstruktur müsste eine Distanz von mehr als 5 Å überwunden werden, was deutliche Konformationsänderungen des Proteins, des cofaktorgebundenen Intermediats, oder beider Komponenten voraussetzt und in einem erhöhten Energieaufwand resultieren würde. Eine Interaktion von Enzym durch Bindung

des nichtreaktiven Teils eines Substrats und der dadurch erzwungenen Ausrichtung der reaktiven Gruppe im Substratmolekül ist von JENKS (1975) als *Circe-Effekt* beschrieben bzw. von WU *et al.* (2000) für die Orotidin-5´-monophosphat-Decarboxylase gezeigt worden.

Zusammenfassend muss anhand der vorliegenden Daten für R5P jedoch festgehalten werden, dass die beobachtete Elektronendichte nicht vollständig interpretierbar ist, solange nur eine Zuckerkonformation angenommen wird. Vielmehr entspricht die Dichte eher einer Mischung von mindestens zwei Konformeren, sodass keine endgültige Aussage zur Akzeptorbindung in der *docking-site* getroffen werden kann. In beiden aktiven Zentren wurde eine ähnliche konformationelle Verteilung des Zuckers gefunden. In Anbetracht der schnellen Anomerisierung (Pierce *et al.*, 1985) und der langen *soaking-*Zeit von 1 min ist es fraglich, ob bessere Resultate mit R5P als Akzeptorsubstrat erzielt werden können. Möglicherweise erlaubt die Anwendung von 4-Desoxyribose-5-phosphat einen höheren Belegungsgrad mit linearer Aldoform, da eine Zyklisierung zur Furanose hier nicht möglich ist.

Modellierung von DHE-ThDP in die Struktur des TK-Akzeptorsubstrat-Komplexes

Wie zuvor erwähnt, wäre der Abstand zum in der *docking-site* befindlichen Akzeptorsubstrat in der ringförmigen Struktur zu groß (> 5 Å), um eine Übertragung des Ketolrests ohne größere konformationelle Änderungen zu ermöglichen. Aus diesem Grund wurde die Struktur des cofaktorgebundenen Intermediats DHE-ThDP der Hefetransketolase (Fiedler *et al.*, 2002) in die Struktur der bakteriellen Transketolase mit der offenkettigen Akzeptorform von R5P modelliert (Abb. 3.32).



Abb. 3.32 Modell des DHE-ThDP-Intermediats (grün) in der Struktur der bakteriellen Transketolase A mit der offenkettigen Form des Akzeptors R5P (gelb),

Hierbei zeigte sich, dass der Abstand des planaren C2α-Atoms des Enamins zum C1-Atom der Zuckeraldehydgruppe etwa 1,6 Å-2 Å und der Winkel zwischen C2-C2α-C1 (R5P) rund 112° betragen. Somit wäre der Zucker im Sinne eines *near-attack-conformers* (Garcia-Viloca *et al.*,

2004; Schowen, 2003; Hur *et al.*, 2003; Lau *et al.*, 2000) fast optimal zum DHE-ThDP ausgerichtet, um die C-C-Bindungsbildung zwischen DHE-ThDP und R5P zu S7P im nächsten Katalyseschritt ohne größere konformationelle Änderungen durchführen zu können. Lediglich die Änderung der Hybridisierung der Kohlenstoffatome C2 α und C1(R5P) von sp^2 zu sp^3 zur Bildung der Einfachbindung erscheint notwendig. Modellstudien und theoretische Betrachtungen haben eine derartige Orientierung der Reaktanden für die Carbonyladdition/-eliminierung ("Bürgi-Dunitz"-Winkel) bereits postuliert (Bürgi *et al.*, 1973 und 1974).

Schlussfolgerung für den Katalysemechanismus der Transketolase A

Anhand der Röntgenkristallstrukturen der Donorintermediate im Zusammenhang mit den ¹H-NMR-spektroskopischen Daten der Intermediatanalyse konnte geschlussfolgert werden, dass die an dem C2-Atom des ThDP gebundenen Donorsubstrate in einem gespannten Zustand vorliegen (Auslenkungswinkel der C2-C2 α -Bindung um 25-30 °), welcher durch das Enzym stabilisiert zu sein scheint und eine Form der "energetischen Speicherung" darstellen. Die Spannung und die anschließende Relaxation in den planaren *sp*²-Hybridisierungszustand des Enamins wurden als mögliche Triebkraft zur C-C-Bindungsspaltung im Ketoseintermediat angenommen, wobei für den Akzeptor dabei eine *trigger*-Funktion bei der Abspaltung des Aldoseprodukts vermutet wurde.

ITC-Messungen und die Enzymstruktur mit R5P zeigen die Belegung der aktiven Zentren mit dem Akzeptor in Abwesenheit eines Donorsubstrats. Dabei wurde für das Akzeptorsubstrat ein signifikant erhöhter Anteil an azyklischer gegenüber der zyklischen Form im Vergleich zur freien Lösung gefunden, welcher durch produktive Interaktionen mit der *docking-site* erklärt wurde (*Circe-Effekt*). Eine Winkelauslenkung der Briefumschlagkonformation für R5P deutet auf eine sterische Spannung im R5P-Molekül hin, die durch das Enzym verursacht ist und welche scheinbar zur vereinfachten Ringöffnung beiträgt. Die enzymatische Ausrichtung der azyklischen Form von R5P lässt diese als *near-attack-conformer* vermuten.

Die Superposition von Donor- und Akzeptorsubstrat (Abb. 3.33) zeigt, dass eine partielle Überlappung der OH-Gruppen an den Positionen C2 und C3 von R5P mit den Positionen C3 und C4 des Donorintermediats beobachtet wird. Das bedeutet, dass diese Hydroxylgruppen durch gleiche Interaktionen im Enzym in Abwesenheit des entsprechend anderen Substrats stabilisiert werden können. Die Ausübung von sterischem Stress durch Zugabe von Akzeptor zum Donorintermediat und die Konkurrenz um dieselben Bindungsplätze im Enzym könnten daher als Ursache einer *trigger*-Funktion zur Abspaltung der Aldose aus dem Donorintermediat diskutiert werden.



Abb. 3.33 <u>Links:</u> Superposition der Strukturen von C5-ThDP (grün) und R5P (gelb) in der zyklischen Form. Eine leichte Flexibilität des Thiazoliumrings und des Phosphatrests wurde in der C5-Intermediatstruktur beobachtet. <u>Rechts:</u> Darstellung in der Oberflächenansicht des Substratkanals. Die Untereinheiten der TK sind farblich unterschieden. Es werden ähnliche Bindungstellen in Abwesenheit des jeweils anderen Substrats im Enzym besetzt. Weitere Erklärungen im Text.

Um die Hypothese des Akzeptoreinflusses auf die Destabilisierung der Donorintermediate zu überprüfen, wurde eine Intermediatanalyse unter steady-state-Bedingungen in Anwesenheit von Donor- (X5P, F6P) und Akzeptorsubstrat (R5P) durchgeführt und mit den Ergebnissen der Einsubstrat-Reaktion (Abb. 3.29) verglichen. Dabei ließ sich eine Abnahme der jeweiligen Donorintermediatspezies (C5-ThDP von ca. 90 % auf etwa 65 %; C6-ThDP von etwa 75 % auf 40 %) und ein erhöhter Anteil an nicht reagiertem ThDP (C5-ThDP von 10 % auf 35 %; C6-ThDP von 20 % auf 60 %) detektieren (Abb. 3.34). Diese Resultate sprechen für die Destabilisierung des gebundenen Donorintermediats durch den Akzeptor. Interessanterweise ließ sich für beide Donorsubstrate kein DHE-ThDP und/oder C7-ThDP detektieren. Dies deutet darauf hin, dass die Anlagerung der Ketose (Schritt 1, Schema 1.2) und die Abspaltung der Aldose (z.B. G3P) aus dem Donorintermediat (Schritt 2, Schema 1.2) unter steady-state-Bedingungen partiell geschwindigkeitsbestimmend sind, während die Ligation von DHE-ThDP mit Akzeptorsubstrat und die sich anschließende Produktabspaltung (Schritt 3 und 4, Schema 1.2) nicht limitieren⁸. Unterstützt wird dieser Befund ebenfalls durch den Versuch, das C7-ThDP mittels Reaktion von HPA und R5P durch die Intermediatanalyse zu detektieren. Hierbei konnte kein kovalentes Intermediat gefunden werden (Daten nicht gezeigt), was auf die schnelle, nicht geschwindigkeitsbestimmende Übertragung der cofaktorgebundenen Ketoleinheit auf R5P schließen lässt. Eine Limitierung durch die Decarboxylierung von HPA ($K_M = 23 \mu M$) konnte ausgeschlossen werden (Kapitel 3.4.3).

⁸ Es sei angemerkt, dass SCHOWEN (1998) an den Beispielen der PDC´s aus Hefe und *Zymomonas mobilis* die Addition von Pyruvat an ThDP als den Schritt mit der höchsten Aktivierungsbarriere identifizierte.





vorliegenden strukturellen und ¹H-NMR-spektroskopischen Aus den Befunden der Wildtyptransketolase ergibt sich jedoch die Fragestellung der Interpretation der Daten im Sinne eines ping-pong-Mechanismus, welcher bisher für diese Enzymklasse angenommen wurde. Ein Theorell-Chance-Mechanismus wäre mit den vorgestellten Resultaten ebenfalls vereinbar, bei welchem allgemein die Abspaltung des ersten Reaktionsprodukts aus einem Ternärkomplex synchron mit der Bindung des zweiten Substrats erfolgt (Schellenberger, 1989; Fersht, 2003). Für die bakterielle TK wäre in diesem Fall sterischer Stress als Ursache der Abspaltung des ersten Produkts (z.B. G3P aus dem C5-Intermediat) durch Anlagerung der Aldose an das energiereiche Donorintermediat denkbar.

Eine Unterscheidung zwischen einem sequenziellen und einem *ping-pong*-Mechanismus ließ sich durch kinetische Messungen realisieren, wie diese in Kapitel 3.4.2 durch den Test nach KOCHETOV (1982) beschrieben sind. Die doppelt-reziproken Auftragungen der gemessen Geschwindigkeiten gegen die eingesetzten Substratkonzentrationen würden hierbei für einen sequenziellen Mechanismus schneidende Geraden ergeben, welche für eine kinetische Stabilisierung der Donorintermediate (C5-, C6-) sprechen würden. Im Gegensatz dazu ließe sich durch Parallelen im Plot ein *ping-pong*-Mechanismus (Schellenberger *et al.*, 1989; Bisswanger, 2002) bestätigen.

Wie die Auftragungen (Anhang, Abb. 6.7) verdeutlichen, kann der aus strukturellen und ¹H-NMRspektroskopischen Daten vermutete Theorell-Chance-Mechanismus und eine kinetische Stabilisierung der kovalenten C5- und C6-Intermediate ausgeschlossen werden. Im Sinne des *ping-pong*-Mechanismus bedeutet dieses Resultat in Kombination mit den ¹H-NMRspektroskopischen Ergebnissen, dass sich ein schnelles Gleichgewicht durch die Rückreaktion von abgespaltenem Akzeptor mit DHE-ThDP einstellen kann und die Detektion der kovalenten C5- und C6-Donorintermediate erlaubt. Eine derartige Funktion ergibt ebenfalls aus physiologischer Sicht Sinn, da mögliche Nebenreaktionen (Protonierung, Oxygenierung) mit dem reaktiven α-Carbanion unterbunden wären. Ein Kontrollexperiment zur Intermediatanalyse in Anwesenheit der Hilfsenzyme Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase und Triosephosphat-Isomerase, welche das während der TK-Reaktion abgespaltene G3P aus dem Gleichgewicht entziehen und zu Glycerin-3-phosphat umsetzen, sollte neben dem kovalenten Donorintermediat von X5P zur Detektion des zentralen Intermediats DHE-ThDP führen. In Abwesenheit der Hilfsenzyme trat dieses Intermediat nicht auf (Abb. 3.34).



Abb. 3.35 Intermediatanalysen zum Einsubstrat-Umsatz von X5P in An- und Abwesenheit der Hilfsenzyme TPI und G3P-DH.

Das Experiment (Abb. 3.35) bestätigte die oben ausgeführten Aspekte durch die Detektion von DHE-ThDP und bekräftigt das Argument der schnellen Gleichgewichtseinstellung von C2-Intermediat/G3P mit dem C5-ThDP-Addukt.

Aus diesem Resultat lässt sich für die Auswahl der von der Transketolase genutzten Akzeptorsubstrate in physiologischer Umgebung schlussfolgern, dass diese durch die im Medium vorhandene Konzentration der Aldosen erfolgt und somit die Richtung der Reaktion als "Akzeptorkompetition" verstanden werden kann. Dies bedeutet, dass die TK-katalysierten Schritte im nichtoxidativen Teil des Pentosephosphatwegs auf die Parameter "K_M" und "Konzentration der akzeptierten Metabolite" festgemacht werden kann.

3.5.3. Strukturen der Holoenzymkomplexe von TK-Varianten mit ThDP sowie des Holoenzymkomplexes vom Wildtypenzym mit N3´-Pyridyl-ThDP

1) Röntgenkristallstruktur der Variante His⁴⁷³Ala mit ThDP

Für die Proteinvariante His⁴⁷³Ala konnten Kristalle unter denselben Bedingungen und ähnlicher Form wie beim Wildtypenzym erhalten werden. Die orthorhombische Kristallform der Raumgruppe P2₁2₁2₁ wurde mit einer Auflösung von 2,25 Å für das Holoenzym bestimmt. Alle Aminosäuren der Monomere sowie die Mutation des His⁴⁷³ gegen Ala ließen sich anhand der Elektronendichte interpretieren. Abbildung 3.36 (links) gibt die Superposition der Variantenstruktur mit der C5-Donorintermediatstruktur im Wildtypenzym wieder.



Abb. 3.36 <u>Links</u>: Superposition der His⁴⁷³Ala-Holoenzymstruktur (grün) mit der C5-ThDP-gebundenen Holoenzymstruktur der bakteriellen Wildtyptransketolase (cyan). Ausgewählte Abstände zur C2α-OHbzw. zur 4´-Aminogruppe wurden in die Abbildung eingefügt. <u>Rechts</u>: Modellierte Struktur des Lactyl-ThDP (cyan, PDB-Datenbankeintrag: 2EZ8) und der Interaktion des His⁴⁷³ (grün) mit der C2α-OH-Gruppe. Die Überlagerungen wurden mit der *alignment*-Funktion des Programms PyMol (V 0.99) durchgeführt.

Aus der Abbildung wird ersichtlich, dass der Abstand der Aminosäureseitenkette zur C2α-OH-Gruppe von 2,7 Å auf 5,7 Å wie erwartet um etwa 3 Å vergrößert ist und damit eine Stabilisierung bzw. die Ausrichtung des Donorsubstrats/-intermediats perturbiert ist. Anstelle des Imidazolrests wird ein Molekül Wasser im Kristall gefunden.

Im rechten Teil der Abbildung ist die modellierte Struktur des Lactyl-ThDP als Ersatz für die vom HPA abgeleitete Struktur des HL-ThDP dargestellt. Ein Austausch des His⁴⁷³ gegen Ala führt ebenfalls zu dem um 3 Å erhöhten Abstand zur C2α-OH-Gruppe. Dieses Strukturmodell stützt die Auswertung des Aktivitätstests mit HPA, wobei eine verlangsamte Bindung des Donorsubstrats um den Faktor 37 und eine verringerte spezifische Aktivität (1/3 der Wildtypaktivität) gefunden wurden. Außerdem zeigte die Intermediatanalyse in Kombination mit *stopped-flow*-Absorptionsmessungen, dass der mikroskopische Schritt der C-C-Bindungsbildung in der Variante um den Faktor 158 verschlechtert vorliegt (Kapitel 3.4.3). Die katalytischen Funktionen

des His⁴⁷³ liegen daher in der deutlich besseren Substratbindung, der Ausrichtung der C2α-OH-Gruppe und der Säure/Base-Funktion bei der Protonierung des Carbonylsauerstoffs des Donorsubstrats bzw. der Deprotonierung der C2α-OH-Gruppe im Intermediat bei der Abspaltung der Aldose.

2) Röntgenkristallstruktur der Doppelvariante His²⁶Ala/His²⁶¹Ala mit ThDP

Mit der DV sollte ein Protein generiert werden, welches in der Abspaltung der Aldose aus dem Donorintermediat perturbiert ist, um somit möglicherweise Intermediatstrukturen aufzuklären. Nachdem jedoch die Aufklärung der Kristallstrukturen der Komplexe der höheren Donorsubstrate im Wildtypenzym gelang, wurde auf Substrat-*soaking*-Experimente mit der DV verzichtet. Dennoch bot die Kristallstruktur des Holoenzyms der DV mit 1,8 Á-Auflösung die Möglichkeit, einen strukturellen Beitrag zum Verständnis der beobachteten kinetischen Daten mit HPA als artifiziellem Donorsubstrat zu liefern. Aus diesem Grunde wurde die Struktur des Lactyl-ThDP der POX (Wille *et al.*, 2006) in die Strukturen der DV und der Wildtyptransketolase als Ersatz für das HL-ThDP modelliert (Abb. 3.37).

Aus Abb. 3.37 wird deutlich, dass die perpendikulare Orientierung der Carboxylatgruppe zum Thiazoliumringsystem durch Wechselwirkung zu den Histidinen 26 und 261 erfolgt, wobei das Modell das His²⁶ mit einem Abstand von 2,8 Å favorisiert. Nach der *least-motion-maximum-overlap*-Theorie nach KLUGER (1987) ergäbe sich daher für HPA als Substrat nach der Decarboxylierung eine optimale Ausrichtung des mit dem freien Elektronenpaar besetzten *p*-Orbitals am C2 α -Atom und dessen Konjugation mit dem π -Elektronensystem des Thiazoliumrings unter Stabilisierung zum Enamin. Bei den Strukturen der natürlichen Donorintermediate von X5P und F6P wurde ebenfalls eine äquivalente Ausrichtung der C2 α -C3-Bindung nachgewiesen, wobei für beide Histidine ein Abstand von ~ 3 Å zur C3-OH-Gruppe gefunden wurde.

Durch Austausch der Histidine gegen Alanin in der DV vergrößert sich die Distanz zur COOH-Gruppe um 3-4 Å (Abb. 3.37), wodurch eine Perturbation der Orientierung der Carboxylatgruppe aufgrund von erhöhter Flexibilität postuliert werden kann. Dies ist konsistent zu den Beobachtungen der Intermediatanalyse, bei der die Verwendung des Substrats HPA erstmals die Detektion von HL-ThDP in der bakteriellen Transketolase zuließ. Der Anteil des Intermediats wurde mit 19 % bestimmt⁹ und ließ den Schluss zu, dass die Decarboxylierung von HL-ThDP zu DHE-ThDP in der Doppelvariante partiell geschwindigkeitsbestimmend ist (Kapitel 3.4.3). Dies bestätigte außerdem die ursprüngliche Annahme, dass durch Austausch der beiden Histidine gegen Alanin eine abspaltungsdefiziente Variante generiert werden kann.

⁹ Aufgrund des geringen Intermediatanteils an HL-ThDP in der Variante wurde auf Substrat-*soaking*-Experimente mit HPA verzichtet, da eine Mischelektronendichte von HL- und DHE-ThDP zu erwarten wäre.



Abb. 3.37 Modellierung von L-ThDP (cyan, PDB-Datenbankeintrag: 2EZ8) in die Strukturen der Wildtyptransketolase (links, PDB-Datenbankeintrag: 1QGD) und der DV (rechts). Die Überlagerung wurde mittels der *alignment*-Option im Programm PyMol durchgeführt. Die Diphosphatreste der Cofaktoren wurden nicht mit in das *alignment* einbezogen und sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht abgebildet.

3) Röntgenkristallstruktur der Glu⁴¹¹Ala-Variante mit ThDP

Die Proteinvariante Glu⁴¹¹Ala zeigt spektroskopisch deutliche Unterschiede im Vergleich zum Wildtypenzym bzw. zu anderen Varianten der TK. Außerdem wird dem konservierten Glutamat bei der Ausbildung der 1´,4´-iminotautomeren Form des ThDP eine essentielle Rolle zugeschrieben, wobei die molekulare Ursache in der Literatur kontrovers diskutiert (Kapitel 3.6) wird. Eine Kristallstruktur der Variante sollte daher klären, ob strukturelle Änderungen als Grund für die spektroskopischen Unterschiede verantwortlich zu machen sind.

Die Struktur der Variante wurde mit einer Auflösung von 2,0 Å gelöst. Die orthorhombische Kristallform der Raumgruppe P2₁2₁2₁ wurde ebenfalls gefunden (Tab. 3.6). Die Elektronendichte aller Aminosäuren der Monomere und der Cofaktoren konnte interpretiert werden. Durch den Austausch des Glu⁴¹¹ gegen Ala vergrößert sich der N1^{\prime} \rightarrow CH₃-Abstand von 2,6 Å auf 5,7 Å (Abb. 3.38). Anstelle der Carboxylatgruppe wird ein zusätzliches Wassermolekül detektiert (B-Faktor = 13,91). Weitere konformationelle Änderungen des Proteins oder des Cofaktors wurden nicht gefunden. Damit kann eine strukturelle Änderung als Ursache für die beobachteten spektroskopischen Unterschiede ausgeschlossen werden.



Abb. 3.38 Überlagerung der Strukturen von Glu⁴¹¹ (cyan; Datenbankeintrag: 1QGD) und Ala⁴¹¹ (grün) der Variante. Anstelle der Glutamatseitenkette wird in der Variante ein Wassermolekül gefunden (nicht dargestellt). Das *alignment* wurde mittels des Programms PyMol durchgeführt.

4) Röntgenkristallstruktur der Wildtyptransketolase TK mit N3'-Pyridyl-ThDP

Neben der Glu⁴¹¹Ala-Variante auf der Proteinseite ist vor allem das N3´-Pyridyl-ThDP-Analogon auf der Cofaktorseite für Untersuchungen zur möglichen Ausbildung einer 1´,4´-iminotautomeren Form des Cofaktors (Kapitel 3.6) von Interesse. Um strukturelle Änderungen durch die Bindung des Analogons auszuschließen, sollte die Kristallstruktur des Wildtypenzym-Analogon-Komplexes aufgeklärt werden.



Abb. 3.39 Superposition der Interaktionen von Glu⁴¹¹ mit dem N1´-Atom des ThDP (cyan, Datenbankeintrag: 1QGD) bzw. mit dem äquivalenten Kohlenstoff des Analogons des N3´-Pyridyl-ThDP (grün). Das *alignment* wurde mittels des Programms PyMol durchgeführt.

Es konnten Kristalle erhalten und die Struktur mit 1,90 Å (Raumgruppe P2₁2₁2₁) gelöst werden (Tab. 3.6). Für das Analogon und die Proteinkomponente ließen sich die Elektronendichten in beiden aktiven Zentren interpretieren.

In Abb. 3.39 ist durch die Überlagerung der Struktur des Komplexes von Holoenzym mit Analogon und der Struktur des nativen Holoenzyms zu erkennen, dass kaum strukturelle Unterschiede gefunden werden. Eine geringe Konformationsänderung des Diphosphatrests wird beobachtet. Der Glutamatrest weist in der Struktur des Holoenzymkomplexes mit dem Analogon einen um etwa 0,6 Å vergrößerten Abstand (Distanz ~ 3,2 Å) im Vergleich zum äquivalenten Abstand der nativen Holoenzymstruktur mit ThDP (Distanz ~ 2,6 Å) auf. Möglicherweise ist dieser durch das Einbringen des mit dem Kohlenstoff verknüpften Wasserstoffs zu erklären, wobei für die C-H-Bindung eines Aromaten etwa eine Bindungslänge von 1,09 Å (Fox & Whitesell, 1994) angenommen werden kann. Für die weiteren Aminosäuren des aktiven Zentrums werden nur geringste Konformationsunterschiede detektiert. Generell ist daher festzuhalten, dass die Bindung des Analogons im aktiven Zentrum in ähnlicher Weise wie die Bindung des nativen Cofaktors erfolgt. Eine Rotation des Aminopyridinrings des N3'-Pyridyl-ThDP im aktiven Zentrum der Transketolase, welche als mögliche Ursache der CD-Bande bei 320 nm spekuliert wurde, kann somit ausgeschlossen werden (Kapitel 3.6). Dieses Resultat steht in Korrelation zu Ergebnissen der Hefetransketolase (König *et al.*, 1994).

3.6. Untersuchungen zur Existenz einer 1´,4´-iminotautomeren Form des Cofaktors ThDP in der Transketolase A durch Nah-UV-CD-Spektroskopie

Durch Arbeiten von KOCHETOV *et al.* (1970_c, 1973) bzw. HEINRICH *et al.* (1971_b) wurde bewiesen, dass die Zugabe von ThDP zum Apoenzym der Hefetransketolase zur Ausprägung einer Bande im Nah-UV-CD-Bereich mit negativer Elliptizität bei 320 nm führt. Es ließ sich weiterhin nachweisen, dass die Ausprägung dieser Bande abhängig von der eingesetzten Cofaktorkonzentration ist und deshalb zur Bestimmung von Dissoziationskonstanten verwendet wurde (Heinrich *et al.*, 1973; Fiedler *et al.*, 2002). Ähnliche negative CD-Banden bei unterschiedlichen Wellenlängen treten auch bei anderen ThDP-abhängigen Enzymen, wie humane PDH-E1, POX und PDC (Nemeria *et al.*, 2007; Killenberg-Jabs *et al.*, 1996, 1997) auf.

Generell werden im CD im Bereich von 260 bis 320 nm die aromatischen Aminosäuren als chromophore Gruppen erwartet, wobei auch eine Vielzahl von Cofaktoren über einen weiten Wellenlängenbereich im CD absorbieren. So wurden beispielsweise für Pyridoxal-5´-phosphat um 330 nm, für Flavine in Abhängigkeit vom Oxidationszustand im Bereich von 300-500 nm oder für Häm-Gruppen im Bereich von 350-650 nm CD-Signale beschrieben (Kelly *et al.*, 2005). Außerdem ist die Entstehung von induzierten CD-Signalen durch Einführung prochiraler Verbindungen in eine asymmetrische Umgebung (z.B. Proteine) möglich.



Abb. 3.40 Minimalschema der Interkonversion der Amino- zur Iminoform des Cofaktors (schwarz) sowie die substituierten Gruppen (rot) der ThDP-Analoga bzw. des Apoproteins. So wurde auf der Cofaktorseite einerseits das N1'-Atom des Aminopyrimidinrings gegen CH substituiert (N3'-Pyridyl-ThDP). Andererseits konnte die 4'-NH₂-Gruppe eliminiert (DA-ThDP) oder gegen eine OH-Gruppe ersetzt sein (Oxi-ThDP). Eine Lactim-Lactam-Tautomerisierung der OH-Gruppe zum Pyridonsystem ist möglich, wobei das Gleichgewicht in Lösung hauptsächlich auf der Seite des Lactams liegt (Eppendorfer, 1991; Beyer & Walter, 2004). Dadurch kann Oxi-ThDP (3',4'-iminotautomere Form des Cofaktors) als Analogon der 1',4'-iminotautomeren Form betrachtet werden.

Die Natur der Banden im CD-Spektrum für ThDP-abhängige Enzyme ist bisher nicht eindeutig geklärt und daher Gegenstand der folgenden spektroskopischen Untersuchungen. Hierzu wurden verschiedene Analoga des ThDP (Schellenberger *et al.*, 1997) verwendet, welche als molekulare

Sonden innerhalb des Enzyms fungieren und jeweils die Beiträge einzelner funktioneller Gruppen des Cofaktors bzw. des Proteins aufzeigen sollten. Die für die Diskussion relevanten Substitutionen sind in Abb. 3.40 dargestellt; die entsprechenden Dissoziationskonstanten sind in Tabelle 3.2 angegeben.

1) Transketolase Wildtyp (TK)

Die Rekombination des Wildtypenzyms mit verschiedenen Cofaktoranaloga ergab deutliche Änderungen im Nah-UV-CD-Bereich (Abb. 3.41). So wurde für die Rekombination der bakteriellen Transketolase A mit ThDP ein positives CD-Signal im Bereich zwischen 260-300 nm sowie ein negatives CD-Signal im Bereich um 320 nm gemessen. Neben den ermittelten Bandenlagen ließen sich außerdem zwei isodichroische Punkte bei 260 und 300 nm beobachten.



Abb. 3.41 Nah-UV-CD-Spektren der Titrationen verschiedener Cofaktoranaloga (siehe Beschriftung im Bild) zum Wildtypenzym der bakteriellen Transketolase A. Die Spektren sind um die Grundlinie (siehe Materialien & Methoden) korrigiert. Eingezeichnete Pfeile und Wellenlängen geben steigende Cofaktorkonzentrationen sowie die ermittelten isodichroischen Punkte an. Experimentelle Bedingungen: 3 mg/ml TK; Cofaktor (0-380 μ M ThDP, 0-195 μ M N3[′]-Pyridyl-ThDP, 0-328 μ M DA-ThDP; 0-201 μ M Oxi-ThDP); 2,5 mM CaCl₂; 50 mM Gly-Gly-Puffer pH 7,6; T = 25 °C; d = 4 mm; 12 Akkumulationen).

Das negative CD-Signal bei 320 nm diente in der Literatur zur Bestimmung von K_D-Werten für die Bindung des Cofaktors bzw. der Analoga (Heinrich *et al.*, 1973; Fiedler *et al.*, 2002). Für die bakterielle Transketolase A erwies sich eine K_D-Wert-Bestimmung mittels CD als nicht geeignet, da hierbei aufgrund der hohen Affinität aktive-Zentren-Titrationen vorlagen (Anhang, Abb. 6.6). Die beobachteten CD-spektroskopischen aktive-Zentren-Titrationen stehen in Übereinstimmung mit den durch die Fluoreszenz-*quenching*-Methode bestimmten geringen Dissoziationskonstanten der entsprechenden Cofaktoren (Tab. 3.2).

Die Rekombination mit N3⁻Pyridyl-ThDP ergab ein identisches Bild wie die Rekombination mit nativem Cofaktor, wobei eine etwas geringere Amplitude des CD-Signals im Aromatenbereich unter 300 nm beobachtet wurde. Die isodichroischen Punkte waren leicht hypsochrom zu 297 und 252 nm verschoben. Das Extremum der negativen Bande erschien bei 319 nm.

Der Cofaktor DA-ThDP hingegen lieferte ein deutlich verändertes Spektrum der Titration. Eine negative CD-Bande > 300 nm wurde nicht gefunden, wohingegen eine geringes positives Signal um 300 nm erschien. Weiterhin trat teilweise eine Umkehr des beobachteten CD-Signals für den Aromatenbereich im Vergleich zum ThDP auf. Während bei steigender Cofaktorkonzentration eine Zunahme des positiven Signals bei 260 nm gemessen wurde, ließ sich für den Bereich um 280 nm eine Abnahme des positiven CD-Signals mit einem weiteren isodichroischen Punkt bei 265 nm zeigen.

Das Oxi-ThDP ergab eine dem DA-ThDP ähnliche Abhängigkeit der Spektren bei der Titration des Analogons. Eine CD-Bande mit negativer Elliptizität bei 320 nm wurde nicht gefunden, jedoch eine geringe Zunahme des Signals um 300 nm beobachtet. Die Analogonzugabe führte zur Erhöhung des Signals bei 260 nm und zur Abnahme der Elliptizität im Bereich zwischen 267 bis 291 nm. Die isodichroischen Punkte wurden bei 246, 267 und 291 nm ermittelt.

2) Proteinvariante Glu⁴¹¹Ala

Aus mechanistischer Sicht ist eine CD-spektroskopische Charakterisierung der Glu⁴¹¹Ala-Variante mit den Analoga von Interesse (Abb. 3.42), da das Glutamat eine essentielle Funktion des Protonenrelais-Systems bei der Cofaktoraktivierung darstellt (Kern *et al.*, 1997) und in der Literatur als notwendige Gruppierung für die Bildung einer Iminoform angesehen wird (Nemeria *et al.*, 2007; Baykal *et al.*, 2006_a).

Die Rekombination der Variante mit ThDP ließ deutlich eine hypsochrome Verschiebung der negativen CD-Bande um circa 25 nm in den Bereich um 295 nm erkennen, während im Bereich um 260 nm die Ausprägung eines positiven Signals erfolgte. Eine derartige Verschiebung ist

auch für das Hefeenzym von WIKNER *et al.* (1994) beschrieben worden. Zwei isodichroische Punkte bei 250,7 und 272 nm wurden beobachtet. Auch für die Variante wurde aufgrund hoher Affinität eine aktive-Zentren-Titration beobachtet, sodass eine K_D-Wert-Bestimmung mittels CD-Spektroskopie nicht möglich war.

Der Einsatz von N3´-Pyridyl-ThDP bei der Variante zeigte im CD-Spektrum die Ausprägung einer breiten positiven Bande im Bereich unter 300 nm und die Bildung einer negativen Bande bei 318 nm. Die isodichroischen Punkte wurden bei 253,4 und 294,4 nm gefunden. Die Verwendung des DA-ThDP mit der Variante hingegen zeigte eine allgemeine Erhöhung der Amplitude im Bereich des positiven CD-Signals < 310 nm, wobei jedoch die Bildung einer minimalen positiven Bande um 300 nm auftrat. Ein isodichroischer Punkt war bei 248 nm bestimmbar.



Abb. 3.42 Nah-UV-CD-Spektren der Titrationen verschiedener Cofaktoranaloga (siehe Beschriftung im Bild) zur Glu⁴¹¹Ala-Variante der TK. Die Spektren sind um die Grundlinie korrigiert (siehe Materialien & Methoden). Eingezeichnete Pfeile geben steigende Cofaktorkonzentrationen, eingetragene Wellenlängen geben die gefundenen isodichroischen Punkte an. Experimentelle Bedingungen: 3 mg/ml Glu⁴¹¹Ala; Cofaktor (0-380 μ M ThDP, 0-328 μ M N3[′]-Pyridyl-ThDP, 0-460 μ M DA-ThDP; 0-201 μ M Oxi-ThDP); 2,5 mM CaCl₂; 50 mM Gly-Gly-Puffer pH 7,6; T = 25 °C; d = 4 mm; 12 Akkumulationen).

Wie bereits beim Wildtypenzym gefunden, zeigte auch die Zugabe von Oxi-ThDP zur Variante ein dem DA-ThDP ähnliches Verhalten im CD-Spektrum. Generell wurde eine Zunahme der positiven

Elliptizität der Spektren mit etwas erhöhter Amplitude beobachtet. Der isodichroische Punkt wurde bei 249 nm bestimmt.

3) weitere Varianten der Transketolase A

Für die Varianten His⁴⁷³Ala und His²⁶Ala/His²⁶¹Ala wurden CD-Spektren mit dem nativem Cofaktor ThDP aufgenommen (Abb. 3.43).

Für die Proteinvariante His⁴⁷³Ala wurde die Ausprägung der positiven CD-Bande unterhalb von 300 nm sowie eine negative CD-Bande bei 320 nm beobachtet. Beide isodichroischen Punkte verschoben sich im Vergleich zum Wildtypenzym um 2 nm hypsochrom auf 258 und 298 nm.

Die Doppelvariante zeigte einen breiten positiven Signalanstieg hauptsächlich im Bereich um 270 nm. Die negative CD-Bande war im Vergleich zum Wildtypenzym um 7 nm hypsochrom auf 313 nm verschoben. Die isodichroischen Punkte lagen bei 259 und 287,8 nm.



Abb. 3.43 Nah-UV-CD-Spektren der Titrationen von ThDP (0-380 μM) zu der His⁴⁷³Ala-Variante (links) und der Doppelvariante (rechts). Eingezeichnete Pfeile, Wellenlängen und experimentelle Bedingungen wie in Abb. 3.41.

Diskussion & Schlussfolgerungen der Nah-UV-CD-spektroskopischen Untersuchungen

1) Der deutlichste Effekt auf die Lage der CD-Bande war durch die Rekombination mit DA-ThDP zu erkennen, bei welchem die Aminogruppe entfernt wurde. Im Wildtypenzym (Abb. 3.41) und der Glu⁴¹¹Ala-Variante (Abb. 3.42) wurde keine Ausprägung des negativen CD-Signals bei 320 nm gemessen. Daraus kann abgeleitet werden, dass die negative CD-Bande bei 320 nm nur bei Vorliegen der 4´-Aminofunktion des Cofaktors im enzymatischen System der Transketolase vorhanden ist. Zudem wird dieses Resultat durch die nach Rekombination mit N3´-Pyridyl-ThDP erhaltenen Spektren bestätigt. Im Gegensatz dazu führen Änderungen der Proteinkomponente (Glu⁴¹¹Ala, Doppelvariante) lediglich zu unterschiedlichen Verschiebungen
der Lage der negativen CD-Bande im Vergleich zum CD-Spektrum des mit ThDP rekombinierten Wildtypenzyms.

GOLBIK *et al.* (2005) konnten nachweisen, dass die Methylierung an der 4´-Aminofunktion (Analogon 4´-Methylamino-ThDP) ebenfalls zur Ausbildung der negativen CD-Bande in der Hefetransketolase führt, welche jedoch bathochrom um 20 nm auf 340 nm verschoben vorliegt. Als Ursache lässt sich der +I - Effekt der zusätzlichen Methylgruppe auf die Aminogruppe diskutieren. Dies unterstützt in Übereinstimmung mit den Befunden zur bakteriellen TK die Aussage, dass die Anwesenheit der Aminogruppe für die Bande bei 320 nm verantwortlich ist.

NEMERIA *et al.* (2004, 2007) und JORDAN *et al.* (2005) postulierten für die Bande bei 320-330 nm eine Reporterfunktion des Michaelis-Komplexes durch die Bindung von Phosphonolactyl-ThDP (PL-ThDP) an die *Escherichia coli*-PDH-E1-Komponente und PDC aus Hefe. Für Transketolase kann eine solche Funktion definitiv ausgeschlossen werden, da die beobachtete CD-Bande bei 320 nm bereits in Abwesenheit von Substrat auftritt.

2) Für das Oxi-ThDP als Analogon einer iminotautomeren Form des Cofaktors wäre die Ausprägung einer deutlichen Bande im enzymgebundenen Zustand für den Fall zu erwarten, dass eine Iminoform *ursächlich* für eine CD-Bande verantwortlich ist. Jedoch wird für Oxi-ThDP keine negative Bande um 320 nm beobachtet, wie dies bereits für das DA-ThDP beschrieben wurde (Abb. 3.41 und 3.42). Damit lässt sich die Iminoform als molekulare Ursache der Bande bei 320 nm ausschließen, wie dies von KOCHETOV (2005) und KOVINA *et al.* (2004, 2002) diskutiert wurde.

Verschiedene Autoren (Nemeria *et al.*, 2007; Baykal *et al.*, 2006_a; Jordan *et al.*, 2003_b, 2005) ordnen eine auftretende positive CD-Bande um 300-310 nm verschiedener ThDP-abhängiger Enzyme der 1′,4′-Iminoform des Cofaktors zu. Dabei wird allgemein für *sp*³-hybridisierte C2α-Intermediate die Iminoform bzw. für *sp*²-hybridisierte C2α-Intermediate die Amino- oder die N1′- protonierte Aminopyrimidiniumform des Cofaktors vorgeschlagen (Nemeria *et al.*, 2007). Die Differenzierung der Imino- von der Aminoform des Cofaktors wurde durch Modellstudien mit N1-Methyl-4-aminopyrimidinium-triflat und DBU (1,8-Diazabicyclo[5.4.0]-undec-7-en) als Base mittels ¹H-NMR-Spektroskopie postuliert (Jordan *et al.*, 2002). Der pK_A-Wert der exozyklischen Aminogruppe des Modellsystems wurde mit > 12 beschrieben. Dieser pK_A-Wert zur Generierung der iminotautomeren Form der Modellsubstanzen liegt um 7 Größenordnungen höher als der mittels ¹H-¹⁵N-korrelierter NMR-Spektroskopie bestimmte pK_A-Wert für ¹⁵N-markiertes ThDP im enzymatischen System der PDC (Tittmann *et al.*, 2005), sodass die Generierung einer iminotautomeren Form des Cofaktors im Gleichgewicht in diesem Enzym als möglich erscheint. Interessanterweise setzte jedoch die Ausbildung der CD-Bande bei 300-310 nm in enzymatischen Systemen (Jordan *et al.*, 2002, 2003_b, 2005; Nemeria *et al.*, 2004) den Einsatz

von Substraten wie Pyruvat oder dessen Strukturanaloga (Methylacetylphosphonat (MAP) oder Acetylphosphinat (AcP) voraus, welche durch Bindung an den Cofaktor zu kovalenten, tetrahedralen C2α-Intermediaten führten. Diese können daher potentiell selbst als Ursache für die im CD beobachtete Bande bei 300-310 nm vermutet werden, wobei dabei der Zustand des 4'-Aminopyrimidinrings (Amino-, Aminopyrimidinium- oder Iminoform) im Intermediat unerheblich wäre. Das Enamin als primäre Ursache der positiven CD-Bande bei 300-310 nm wurde durch die Untersuchungen unter Einsatz der Substratanaloga MAP und AcP⁻ mit jeweils einer enzymatisch nicht spaltbaren C-P-Bindung von den Autoren ausgeschlossen. Im Kontrast dazu demonstrierten dieselben Autoren für das Enaminmodell Thiamin-2-thiothiazolondiphosphat (ThTThDP) die Ausprägung einer positiven CD-Bande bei 330 nm (Jordan, 2003a). Vergleicht man nun die zwei unterschiedlichen Substitutionen am C2-Atom des Thiazoliumrings (MAP/AcP⁻ versus ThTThDP) miteinander, lässt sich lediglich die Verschiebung der positiven CD-Bande diskutieren, wobei in beiden Fällen eine iminotautomere Form des Cofaktors nach dem JORDAN schen Modell möglich wäre, jedoch die Aminoform nicht ausgeschlossen werden kann. Eine eindeutige Zuordnung der Bande bei 300-310 nm zur iminotautomeren Form eines C2-Intermediats erscheint daher fragwürdig.

Für die bakterielle und die Hefetransketolase ist eine ähnliche Bandenausprägung bei 310 nm durch Inversion der negativen CD-Bande bei Einsatz von HPA als Donorsubstrat gefunden worden (Abb. 3.44). Die Zugabe von Akzeptorsubstrat (G3P) führte zur Wiederherstellung des Holoenzymspektrums (Fiedler, 2002).



Abb. 3.44 <u>Links</u>: Nah-UV-CD-Spektren der bakteriellen Transketolase A in 50 mM Gly-Gly-Puffer (pH 7,6), 2,5 mM CaCl₂, T = 25 °C, d = 4 mm, 200 nm/min, 6 Akkumulationen; 1: 2 mg/ml Apo-TK; 2: wie 1) + 0,2 mM ThDP nach 12 min Rekombinationszeit; 3: wie 2) + 1 mM HPA nach 3,5 min. Spektrum 3 stellte sich innerhalb der manuellen Mischzeit (~ 10 s) ein und zeigte während der Spektrenakkumulation keine Veränderungen. <u>*Rechts:*</u> Differenzspektrum bestimmt aus Spektrum 3 und 2 der linken Abbildung. Das Maximum des CD-Signals ist eingezeichnet.

Da die Bande bei 310 nm (Abb. 3.44) möglicherweise für die iminotautomere Form des Cofaktors in der Transketolase nach dem Modell von NEMERIA & JORDAN sprechen könnte, lassen sich mittels Analogastudien nachfolgende Betrachtungen erörtern.

Generell verfügen Oxi-ThDP¹⁰ (als Modell einer 3',4'-iminotautomeren Form) und DA-ThDP (vollständige Eliminierung der 4'-Aminogruppe) über ein ähnliches Spektrum im gesamten gemessenen Wellenlängenbereich im CD. Aus diesem Grund lassen sich für beide Analoga ähnliche elektronische Verhältnisse im enzymgebundenen Zustand postulieren. Beide Analoga zeigen ein geringes Signal im Bereich um 300-310 nm (Abb. 3.41 und 3.42), welches jeweils im verwendeten Konzentrationsbereich abgesättigt werden konnte. Für das Oxi-ThDP könnte daher eine Iminoform des Cofaktors postuliert werden. Da jedoch das DA-ThDP, bei welchem keine Iminoform möglich ist, im Enzym zu einem ähnlichen CD-Signal um 300-310 nm wie das Oxi-ThDP führte, kann geschlossen werden, dass diese CD-Bande nicht auf eine Iminoform des Cofaktoren mit dem asymmetrischen aktiven Zentrum diskutieren.

Unterstützt wird dies durch den in der Literatur beschriebenen Einsatz des N1'-methylierten ThDP-Analogons, welches durch die eingeführte Methylgruppe eine pseudoprotonierte Form des Cofaktors darstellt. Die permanente Pseudoprotonierung führt zur Azidifizierung der Aminogruppe und sollte deshalb zur verstärkten Verschiebung des Gleichgewichts in Richtung 1',4'-Iminoform des Cofaktors unter physiologischen Bedingungen (pH-Wert) führen. Daher wurde das N1'methylierte ThDP in der Literatur ebenfalls als Strukturmodell der 1,4-Iminoform des Cofaktors verwendet. Außerdem wurde durch Modellstrukturen (Pyrimidiniumsalze) im wässrigen System ein Absenken des pK_A-Werts der 4'-Aminogruppe von 18,5 auf 12,5 (für N1'-CH₃) bzw. 7,8 (für N1'-H) beschrieben (Jordan & Mariam, 1978; Jordan et al., 1982; Zusammenfassung in Tittmann, 2000). Interessanterweise ließ sich jedoch unter Verwendung des N1'-methylierten Analogons in der Hefetransketolase darlegen, dass für das Wildtypenzym und die Glu⁴¹⁸Ala-Variante keine spektralen Änderungen im CD im Vergleich zum nativen Cofaktor auftraten. Es wurden die negative CD-Bande um 320 nm bzw. keine weitere zusätzliche Bande im Bereich zwischen 300-310 nm gefunden (Golbik et al., 2005; Fiedler, 2002). Dies bedeutet, dass die elektronischen Verhältnisse des nativen Cofaktors und eine durch die Pseudoprotonierung erzwungene 1',4'-Iminoform im CD-Spektrum nicht zu unterscheiden sind. Auch dieser Befund unterstützt die Aussage, dass dem N1'-Atom des Cofaktors bei der Interpretation der Ursache der CD-Banden keine Bedeutung zukommt, wie dies unter Punkt 3) erörtert wird.

Weiterhin wird eine 1´,4´-iminotautomere Form des Cofaktors durch röntgenkristallographische und NMR-spektroskopische Messungen ausgeschlossen. So fand Fiedler (2002) bei der Kristallisation von Hefetransketolase mit 4´-Methylamino-ThDP, dass der Cofaktor zwar korrekt gebunden, die zusätzliche Methylgruppe an der exozyklischen Aminogruppe als Elektronendichte jedoch nicht zu beobachten war. Daraus wurde geschlossen, dass die Substituenten der Aminogruppe flexibel sind und daher die C4´-N4´-Bindung zur Rotation befähigt sein muss. Eine

¹⁰ Die Zugabe von HPA zu mit Oxi-ThDP rekombinierter TK führt zu keiner beobachtbaren Veränderung des CD-Spektrums des Holoenzyms (Daten nicht gezeigt).

derartige Rotation der Aminogruppe ist allerdings nur durch eine Einfachbindung erklärbar und steht damit in Widerspruch zu einer Iminoform. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen TITTMANN *et al.* (2005), welche durch ¹H-¹⁵N-korrelierte NMR-Studien nachweisen konnten, dass zwar eine leicht erhöhte Elektronendichte der ¹⁵N-markierten Aminogruppe in PDC gefunden wurde, jedoch im zeitlichen Mittel zwei Protonen an der Aminogruppe vorlagen. Außerdem wurde eine intrinsische Mobilität der Aminogruppe beschrieben, welche auf eine C4´-N4´-Einfachbindung deutete. Weiterhin ließ sich zeigen, dass ein vergleichbarer elektronischer Zustand des 4´-Aminostickstoffs des freien und des enzymgebundenen Cofaktors in der N1´-protonierten bzw. deprotonierten Form vorlag.

3) Eine dritte Implikation lässt sich durch den Einsatz des N3'-Pyridyl-ThDP betrachten. Hierbei konnte demonstriert werden, dass der Einsatz des Analogons sowohl im Wildtypenzym¹¹ (Abb. 3.41) als auch in der Glu⁴¹¹Ala-Variante (Abb. 3.42) nur geringste spektrale Änderungen im CD-Spektrum hervorrief. Vergleicht man diese Spektren mit denen des Wildtypenzyms (rekombiniert mit nativem ThDP, Abb. 3.41), so hat dies ein ähnliches Bild zur Folge, wobei nur geringe Unterschiede in den Amplituden der positiven CD-Bande um 260 nm und eine Verschiebung um 1-2 nm der negativen CD-Bande bei 320 nm beobachtet wurden. Aus diesen Daten lässt sich daher schlussfolgern, dass diese drei Spektren durch ähnliche elektronische Verhältnisse zustande kommen und das dem Austausch des N1'-Atoms des Aminopyrimidinrings gegen CH keine Bedeutung bei der Ausprägung der CD-Banden bei 260 und 320 nm zukommt. Dies ist besonders bemerkenswert, da dem N1⁻-Atom in der Literatur eine essentielle Rolle zur Bildung der iminotautomeren Form in Bezug auf die CD-Banden zugeschrieben wurde (Nemeria et al., 2007; Baykal et al., 2006a). Zusammenfassend kann daher festgehalten werden, dass das N1'-Stickstoffatom keine Bedeutung für die Ausbildung der negativen CD-Bande hat, die Aminogruppe des Aminopyrimidinrings jedoch für das Entstehen der Bande bei 320 nm in TK notwendig ist. Höchstwahrscheinlich induziert die "V-Konformation" des Cofaktors in der asymmetrischen Umgebung des aktiven Zentrums die Bildung des chiralen CD-Signals. Diese Ergebnisse stehen in Korrelation mit NEMERIA et al. (2004), welche den Cofaktor selbst als Ursache der CD-Banden aus Mutagenese- und Substratanalogastudien schlussfolgerten ("Intra-ThDP-Effekt"). Jedoch kann eine distinkte 1´,4´-Iminoform des Cofaktors nach dem Modell von NEMERIA & JORDAN per se nicht als Ursache der Banden bei 320 nm bzw. bei 300-310 nm in TK angenommen werden, da der Einsatz von iminotautomeren Modellanaloga (Oxi-ThDP und N1'-Methyl-ThDP) in TK diese Interpretation nicht zulässt. Aus diesem Grund lassen sich die erhaltenen Effekte am wahrscheinlichsten als "Wechselwirkungsbanden" zwischen Cofaktor und Protein verstehen, bei der eine mögliche charge-transfer-Komplexbildung zwischen dem 4'-Aminopyrimidinring und der Thiazoliumkomponente (Nemeria et al., 2004) als Bandenursache nicht auszuschließen ist.

¹¹ Der Austausch des zweiten Stickstoffs in Position 3´ des Aminopyrimidinrings (N1´-Pyridyl-ThDP-Analogon) führt zu identischen Spektren wie für das N3´-Pyridyl-ThDP beobachtet (Golbik *et al.*, 1991).

3.7. Nachweis einer AHAS-ähnlichen Reaktion der Transketolase A

Aus der Literatur war bekannt, dass Transketolasen diverser Organismen aufgrund ihrer hohen Stereospezifität für Synthesen organischer Verbindungen zur Anwendung kamen. So werden vom Enzym jeweils nur Donorsubstrate in D-Konfiguration akzeptiert, was bereits zur Racematspaltung genutzt wurde (Effenberger *et al.*, 1992). Nach Übertragung der C2-Ketoleinheit auf den Akzeptor wird im Produkt stets eine 3*S*,4*R*-Konfiguration (= D-*threo*) gefunden (Schema 3.2).



Schema. 3.2 Darstellung der von der Transketolase katalysierten Übertragung einer C2-Ketoleinheit von einem Donorsubstrat (hier HPA) auf eine Akzeptoraldose. Die im Produkt gebildeten Chiralitätszentren in D-*threo*-Konfiguration sind markiert.

Für Synthesezwecke zeichnete sich insbesondere die Anwendung von β-HPA als Donorsubstrat aus, da die enzymatische Reaktion praktisch irreversibel in Produktrichtung verläuft, währenddessen die Umsätze der natürlichen Zuckersubstrate Gleichgewichtsreaktionen darstellen. Beispielhaft sei auf die Verwendung des Enzyms zur Synthese von building blocks diverser Glycosidase- und Xylosidaseinhibitoren (Charmantray et al., 2006; Zimmermann, 1999; Asano et al., 1994; Ziegler et al., 1988), von potentiellen Inhibitoren (Reimer et al., 1986) oder als Werkzeug (Drahts et al., 1990, 1992) zur aromatischen Aminosäurebiosynthese hingewiesen. Zudem konnten Stereozentren bei der Synthese des Pheromons (+)-exo-Brevicomin (Myles et al., 1991) mittels des Enzyms eingeführt werden. Weiterhin wurde die Verwendung einer Vielzahl von phosphorylierten sowie unphosphorylierten Akzeptorsubstraten (Demuynck et al., 1991; Kobori et al., 1992; Effenberger et al., 1992) nachgewiesen, wobei auch Desoxyketosen und aromatische Aldehyde vom Enzym umgesetzt wurden (Demuynck et al., 1991). KOBORI et al. (1992) nutzten das Enzym zudem zur kinetischen Auflösung racemischer α -Hydroxyaldehydgemische. Allgemein lässt sich daher zusammenfassen, dass eine hohe Spezifität hinsichtlich der Donorsubstrate und eine geringere Spezifität in Bezug auf die genutzten Akzeptoren gefunden wurden (Turner, 2000; Sprenger et al., 1999; Schörken et al., 1998; Pohl et al., 2004 und 2002).

Bei der bisher untersuchten Vielzahl an Akzeptoren erschien jedoch stets deren Aldehydgruppe zur Ketolübertragung auf den Aldozucker als notwendig, wie dies aufgrund des Mechanismus zu erwarten ist. Daher war es umso interessanter, dass eine kontinuierliche Produktbildung bei Verwendung von HPA als Substrat der bakteriellen Transketolase im CD-Spektrum in Abwesenheit eines zusätzlichen Akzeptorsubstrats beobachtet werden konnte (Abb. 3.45). Nach 2 h Reaktionszeit ließ sich deutlich ein chirales Produkt bei 297 nm detektieren. Bemerkenswert ist außerdem, dass zu Beginn der Reaktion eine positive Startelliptizität der Progresskurve (Abb. 3.45, rechts) gefunden wurde, welche sich jedoch durch die beobachtete Inversion des CD-Signals nach Zugabe des Substrats HPA (Abb. 3.44) erklären lässt.

BYKOVA *et al.* (2001) und SOLOV´EVA *et al.* (2001) formulierten für die *Saccharomyces cerevisiae* Transketolase eine *futile-cycle*-Reaktion, bei welcher nach enzymatischer Decarboxylierung von HPA die Protonierung des DHE-ThDP Intermediats erfolgt und der C2-Ketolrest als GA abgespalten wird. Dieser wiederum fungiert in einem neuen Katalysezyklus als Akzeptorsubstrat für einen weiteren DHE-ThDP-Rest, was zur Bildung von Erythrulose führt.



Abb. 3.45 <u>Links</u>: Nah-UV-CD-Spektren von Holotransketolase (1) vor HPA-Zugabe und nach 2 h Reaktionszeit mit 10 mM HPA (2). <u>Rechts</u>: Progresskurve der Produktbildung von 10 mM HPA (schwarz) sowie die entsprechende Blindreaktion für HPA in Abwesenheit von Apoenzym (rot). Beobachtete Inversion siehe Text. Die Kinetik wurde bei 300 nm leicht versetzt zum Maximum des Produktsignals aufgenommen, da dessen genaue Position zu diesem Zeitpunkt nicht bekannt war. Experimentelle Bedingungen: 1 mg/ml TK, 2,5 mM CaCl₂, 200 μ M ThDP, 50 mM Gly-Gly-Puffer (pH 7,6), T = 25 °C, d = 4 mm. Die Spektren sind 6fach akkumuliert und mit einer Meßgeschwindigkeit von 200 nm/min aufgenommen.

KOCHETOV *et al.* (1978) wiesen die Produktbildung von Erythrulose bei 275 nm mittels CD-Spektroskopie nach. Um die beobachtete Akkumulation des Produkts der bakteriellen Transketolase A mit HPA bei 297 nm einem neuen Produkt oder der *futile-cycle*-Reaktion zuzuordnen, wurde der enzymatische Umsatz von HPA und GA getestet (Abb. 3.46).

Wie erwartet, ließ sich die enzymatische Erythrulosebildung¹² durch ein positives CD-Signal bei 275 nm finden. Daher konnte die *futile-cycle*-Reaktion als Ursache der beobachteten Produktbildung bei 297 nm ausgeschlossen werden, sodass die Bildung eines neuen Produkts angenommen werden musste.

¹² Interessanterweise ließ sich die enzymatische Bildung von Erythrulose auch durch Umsatz von GA in hohen Konzentrationen in Abwesenheit eines Donorsubstrats nachweisen. Dies impliziert, dass GA vom Enzym ebenfalls als Donorsubstrat akzeptiert werden kann und zur Bildung des DHE-ThDP befähigt ist. Eine entsprechende Intermediatanalyse nach TITTMANN *et al.* (2003) bestätigte die Bildung dieses Intermediats aus GA (Daten nicht gezeigt).



Abb. 3.46 <u>Links</u>: Nah-UV-CD-Spektren von Holoenzym (1) der bakteriellen Transketolase A und nach Zugabe von je 5 mM HPA und GA (2). <u>*Rechts*</u>: Progresskurve des enzymatischen Umsatzes von 5 mM HPA und GA. Experimentelle Bedingungen: 1 mg/ml TK; 2,5 mM CaCl₂; 200 μ M ThDP; 50 mM Gly-Gly-Puffer (pH 7,6); T = 25°C; d = 4 mm. Die Spektren sind 6fach akkumuliert und mit einer Geschwindigkeit von 200 nm/min aufgenommen.

Eine Erklärung der beobachteten Reaktion lässt sich möglicherweise durch die Carboligationsreaktion zweier Moleküle HPA in Analogie zum Umsatz von Pyruvat durch Acetohydroxysäure-Synthasen (Chipman *et al.*, 2005 und 1998) und der Synthese von Acetolactat (AL) geben. In diesem Zusammenhang war darüber hinaus für Acetohydroxysäuren bekannt, dass diese im sauren Milieu zur Decarboxylierung neigen (Nemeria *et al.*, 2005; Epelbaum *et al.*, 1990; Singh *et al.*, 1988), was mittels CD-Spektroskopie durch Racemisierung beobachtet werden kann.

Um das Verhalten der Transketolaseprodukte unter aziden Bedingungen zu untersuchen, wurden entsprechende Produktproben deproteinisiert (Kapitel 2.6.2) und anschließend durch Zugabe von HCI auf pH 2-3 eingestellt. Abbildung 3.47 gibt die zeitabhängigen Spektren wieder.

Es ließ sich demonstrieren, dass für Erythrulose unter aziden Bedingungen keine CDspektroskopische Änderung beobachtet werden konnten. Im Gegensatz dazu kann zeitabhängig für das bei 297 nm detektierbare Produkt mit HPA als Substrat eine Racemisierung durch Änderung des CD-Signals unter den experimentellen Bedingungen beobachtet werden. Durch Vergleich mit der in der Literatur beschrieben Bandenlage von Acetolactat (AL) bei 300 nm im CD-Spektrum und dessen Racemisierung unter sauren Bedingungen ließ sich daher schlussfolgern, dass es sich bei dem detektierten Transketolaseprodukt um ein hydroxyliertes Derivat von Acetolactat, dem Hydroxyaceto-hydroxylactat (HAHL), handeln könnte. Weiterhin sind durch VINOGRADOV *et al.* (2005) und NEMERIA *et al.* (2005) die absoluten Konfigurationen der Acetolactatenantiomere bestimmt und den CD-Signalen zugeordnet worden.



Abb. 3.47 Nah-UV-CD-Spektren deproteinisierter Produktproben bei pH 2-3. <u>Links</u>: Carboligationsprodukt bei 297 nm vor HCI-Zugabe (1), 1 h (2) nach und 19,5 h (3) nach Azidifizierung. *Inset*: Zeitabhängigkeit der beobachteten CD-Änderung bei 297 nm nach Azidifizierung ($\Delta \Theta_{297 \text{ nm}}/\text{min} = 0,076 \text{ mdeg} \cdot \text{min}^{-1}$). <u>Rechts</u>: Erythrulose vor (schwarz), 1 h (rot) nach und 21 h (blau) nach Azidifizierung. *Inset*: Es wird keine Zeitabhängigkeit der beobachteten CD-Änderung bei 275 nm nach Azidifizierung gefunden.

Das (*S*)- bzw. (*R*)-Enantiomer zeigte dabei ein positives bzw. negatives CD-Signal, wobei für das TK-Produkt aufgrund der negativen Elliptizität die (*R*)-Konfiguration geschlussfolgert wurde. Aus mechanistischer Sicht lässt sich daher in Analogie zur AHAS-Reaktion folgendes Schema (Schema 3.3) für die TK-katalysierte Produktbildung aus HPA erstellen:



Schema 3.3 Postulierte Reaktion der Transketolase A mit HPA in Abwesenheit eines zusätzlichen Akzeptorsubstrats zu (*R*)-HAHL. Zum Vergleich ist die Strukturformel von (*R*)-Acetolactat (AL) dem Schema beigefügt. Weiterhin ist die postulierte Stabilisierung des Produkts durch Laktonringbildung zu einem Tetronsäurederivat dargestellt.

Um die Existenz des postulierten Produkts (*R*)-HAHL zu validieren, sollte durch die Methode von TITTMANN *et al.* (2003) ein entsprechendes C5-Intermediat nachgewiesen werden. Es zeigte sich

jedoch, dass hierbei nur ein C4-Intermediat auftrat. Daher wurde vermutet, dass das C5-Intermediat säurelabil ist und die methodisch bedingte starke Azidifizierung zur Decarboxylierung und zur Bildung des beobachteten C4-Intermediats führte. Diese wäre in Analogie zur Decarboxylierung des Produkts in Lösung (Abb. 3.47) zu verstehen. Deshalb wurde in Zusammenarbeit mit Frank Brettschneider (Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie, Halle/Saale) versucht, mit Hilfe von GC/MS-Technik eine Identifizierung der Substanz durchzuführen.

Für das Produkt HAHL war nach dem derzeitigen Stand kein Standard verfügbar. Daher wurden die Ausgangssubstanzen und Erythrulose als Kontrollen eingesetzt. Die Elutionsprofile und m/z-Spektren sind im Anhang (Abb. 6.8) zu finden. Unter den angewendeten Bedingungen (siehe Materialen & Methoden) wurden für HPA zwei dominante Peaks detektiert (10,18 min und 10,83 min). Erythrulose ergab ein Signal bei 12,75 min, während GA unter den Bedingungen in Wasser und Puffer nicht detektiert werden konnte. Die Puffersubstanz Gly-Gly selbst zeigte drei dominante Signale bei 12,01 min, 14,99 min und 16,75 min. Für das putative Produkt HAHL ließ sich ein neuer Peak mit einer Retentionszeit von 10,03 min finden.



Abb. 3.48 GC-Elutionsprofil und m/z-Spektrum des putativen Produkts HAHL im Gleichgewicht mit dem Laktonringderivat (Tetronsäure m/z = 218 bei 10,03 min Retentionszeit.

Abbildung 3.48 gibt das Elutionsprofil der GC-Untersuchung sowie das m/z-Spektrum des vermuteten Produkts HAHL wieder. Alle beobachteten Massenfragmente konnten durch (teilweise) Derivatisierung und/oder Decarboxylierung (Baykal *et al.*, 2006_b) der putativen Substanz erklärt werden. Eine Ausnahme bildete jedoch das Fragment mit m/z = 218, welches zunächst nicht zugeordnet werden konnte. Erst die Annahme einer Zyklisierung des HAHL nach Wasserabspaltung unter Ausbildung eines Laktonringsystems (Schema 3.3) aufgrund der zusätzlichen OH-Gruppe an Position C5 ergab ein Massenfragment der beobachteten Größe von 218.

Interessanterweise ist eine Laktonringbildung der Produkte der Acetohydroxysäure-Synthasen bisher nicht beschrieben, da die Bildung des inneren Esters aufgrund der fehlenden OH-Gruppe nicht möglich erscheint. Die Transketolase-katalysierte Reaktion aus HPA stellt demnach einen möglichen interessanten Zugang zur *one-pot*-Synthese des Tetronsäurederivats dar, während die chemische Synthese von Tetronsäure aus Hydroxycarbonsäuren oder α - und β -Allenylsäuren bisher als Mehrschrittsynthese durchgeführt wurde (Schöllkopf *et al.*, 1979; Crandall *et al.*, 1990; Bly *et al.*, 1969). Für Tetronsäure wurden außerdem eine antikonvulsante Wirkung (Köhr *et al.*, 1990), der Einsatz als Pestizid und Insektizid sowie weitere inhibitorische Wirkungen (Sodeoka *et al.*, 2001) beschrieben.

Abschließend sei angemerkt, dass es sich bei den vorgestellten Daten um vorläufige Ergebnisse handelt und eine vollständige Charakterisierung zur eindeutigen Produktidentifizierung notwendig ist. Dazu sollten eine Produktisolierung, eine ¹H- und ¹³C-NMR-spektroskopische Analyse der gereinigten Substanz und die Bestimmung des Enantiomerenüberschusses (*ee*) durch chirale Gaschromatographie realisiert werden.

Somit kann zusammengefasst werden, dass in Analogie zu Acetolactat, aufgrund der Bandenlage des negativen CD-Signals des Produkts und dessen Säurelabilität, die Bildung von (*R*)-HAHL mittels CD-Spektroskopie detektiert wurde. Während bisher für Transketolase stets die Ketolübertragung auf Zuckersubstrate bzw. Aldehyde beschrieben wurde, konnte durch den TK-katalysierten Umsatz von HPA die Carboligation zweier Moleküle der β -Hydroxysäure gezeigt werden. Erste GC/MS-Analysen deuten auf die spontane Produktstabilisierung zu einem Derivat der Tetronsäure durch Laktonringbildung hin. Die vollständige Produktidentifizierung steht noch aus.

4. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden molekularbiologische, kinetische, strukturelle und spektroskopische Untersuchungen zur Transketolase A aus *Escherichia coli* und einiger *active-site*-Varianten dieses Enzyms vorgestellt.

Anhand von ortsgerichteter Mutagenese war es möglich, das Gen für die Wildtyptransketolase aus dem Gen der Leu⁶²Pro-Variante zu gewinnen, auf dessen Grundlage die weitere Generierung von sechs *active-site*-Varianten erfolgte. Zudem wurde C-terminal ein Hexahistidin*tag* eingeführt, um eine schnelle und effiziente Reinigungsvorschrift der Proteine mittels chromatographischer Methoden (Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie, Gelfiltration) zu etablieren. Neben dem Wildtypenzym konnten so ausgewählte Varianten zur Homogenität gereinigt werden. Die erwarteten Molekulargewichte wurden mittels denaturierender SDS-PAGE und Massenspektrometrie bestätigt; ein Einfluss des His₆-*tags* auf die Sekundärstruktur der Apoproteine, die ThDP-Bindung und die Katalyse konnte ausgeschlossen werden.

Durch das *quenching* der intrinsischen Fluoreszenz der Enzyme war die Bestimmung der Dissoziationskonstanten für ThDP sowie einiger katalytisch inaktiver Cofaktoranaloga möglich. Die Varianten wiesen hierbei geringfügig verschlechterte Bindungseigenschaften im Vergleich zum Wildtypenzym auf, währenddessen für die Cofaktoranaloga (mit Ausnahme des Desamino-ThDP im Wildtypenzym) geringere Dissoziationskonstanten gefunden wurden.

Die enzymkinetischen Parameter für die natürlichen Substrate X5P und R5P wurden mit Hilfe des gekoppelt optischen Tests nach KOCHETOV (1982) ermittelt. Hierbei hatte His⁴⁷³ eine essentielle Funktion bei der Bindung und Protonierung der Carbonylgruppe des Donorsubstrats. Für die Histidine 26 und 261 konnte in einer Doppelvariante die stärkste Reduktion des k_{cat} -Wertes beobachtet werden, was auf deren Säure/Base-Funktion bei der Abspaltung der Aldose aus dem Donorintermediat zurückgeführt wurde. Zudem wurde eine auf zwei Zentren beruhende Bindung der Zuckerphosphate (Donorsubstrate) im Enzym vorschlagen. Für das zu Synthesezwecken häufig verwendete β -HPA als artifiziellem Donorsubstrat kam der oxidative Ferricyanidtest für die enzymatische Charakterisierung zur Anwendung und ergab deutlich verschlechterte Bindungseigenschaften und reduzierte Aktivitäten der Varianten im Vergleich zum Wildtypenzym.

Durch die Methode nach KERN *et al.* (1997) wurde der Einfluss der Aminosäuresubstitutionen auf die initiale Abstraktion des C2-Protons im enzymgebundenen Cofaktor bestimmt. Während die Mutationen der Histidine 26, 261 und 473 keine Funktion bei der C2-Deprotonierung des Cofaktors aufwiesen, konnte für den hochkonservierten Glu⁴¹¹-Rest eine Protonenrelais-Funktion zur Cofaktoraktivierung nachgewiesen werden, welche, mit Ausnahme der GCL, bei allen bisher untersuchten Vitamin B₁-abhängigen Enzymen beobachtet wurde.

Durch Anwendung der ¹H-NMR-Methode nach TITTMANN et al. (2003) in Kombination mit stopped-flow-Absorptionsspektroskopie war eine Zuordnung des während der TK-Reaktion auftretenden absorptionsspektroskopischen Signals bei 300 nm zu distinkten Intermediatspezies konnte zur Bestimmung mikroskopischer Geschwindigkeitskonstanten möglich und herangezogen werden. Die Verwendung von β-HPA als artifiziellem Donorsubstrat, welches eine irreversible Reaktion durch Decarboxylierung gestattet, erlaubte zum einen die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten der C-C-Bindungsbildung unter Bedingungen der Substratsättigung und zum anderen die Bestimmung der Stabilität des zentralen Intermediats DHE-ThDP unter single-turnover-Bedingungen sowohl für das Wildtypenzym als auch die His⁴⁷³Ala-Variante. Zudem war es durch Einsatz der Doppelvariante gelungen, HL-ThDP als enzymgebundenes Intermediat neben DHE-ThDP ¹H-NMR-spektroskopisch nachzuweisen und die Decarboxylierung von HPA als (partiell) geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Variante zu zeigen. Die Gegenüberstellung der mittels stopped-flow-Absorptionsspektroskopie und stopped-flow-CD erhaltenen Progresskurven offenbarten identische Phasierungen bei der Ausprägung des Signals bei 300 nm. Daraus ließ sich für beide Methoden derselbe molekulare Prozess der Bildung chiraler Intermediate von HL-ThDP und DHE-ThDP als Ursache annehmen. Anhand der Resultate wurde eine stereoelektronische Kontrollfunktion der Histidine 26 und 261 bei der Ausrichtung der Carboxylatgruppe des HPA beziehungsweise der C3-OH-Gruppe der natürlichen Donorsubstrate abgeleitet.

Durch Kristallisation nach der Methode der Gasphasendiffusion im hängenden Tropfen ließen sich Kristalle für das Wildtypenzym und die Varianten als Holoenzymkomplexe mit ThDP oder N3'-Pyridyl-ThDP erhalten und die Röntgenkristallstrukturen dazu aufklären. Dabei wurde für N3'-Pyridyl-ThDP eine identische Ausrichtung im aktiven Zentrum des Wildtypenzyms wie für den nativen Cofaktor ThDP gefunden. Der Abstand des Glutamatrests 411 zum 1'-C-Atom des Analogons ist um 0,6 Å im Vergleich zum N1'-Atom des ThDP vergrößert. Die Varianten zeigten die erwarteten Substitutionen gegen Alanin, wodurch beobachtete Effekte der kinetischen Untersuchungen erklärt werden konnten.

Durch Substrat-*soaking*-Experimente waren die Kristallstrukturen des Wildtypenzyms nach Reaktion mit den natürlichen Donorsubstraten X5P und F6P sowie dem Akzeptorsubstrat R5P mit Auflösungen zwischen 1,47-1,65 Å zugänglich. Die dabei entstandenen kovalenten ThDP-Intermediate wiesen eine starke C2-C2α-Winkelauslenkung zum planaren Thiazoliumring auf. Der durch die Auslenkung um etwa 25-30° verursachte Spannung im Intermediat wurde als mögliche Triebkraft der Abspaltung der Aldose aus dem Donorintermediat unter Ausbildung des planaren Enaminsystems diskutiert. DFT-Berechnungen bestätigten diesbezüglich, dass ein gespanntes Intermediat insgesamt um 75 kJ/mol energieärmer ist als ein relaxiertes, planares C5-Thiaminsystem. Zudem ließ sich zeigen, dass etwa 9-10° der Winkelauslenkung auf

Eine perpendikulare Ausrichtung der zu spaltenden C2α-C3-Bindung im Intermediat ließ sich ebenfalls nachweisen, welche zu einer erleichterten Abspaltung der Aldose aus dem intermediären Zustand führen sollte.

Der Vergleich der Strukturen der Holoenzyme mit und ohne gebundene Donorintermediate ergab nur sehr geringe konformationelle Unterschiede im Proteinbereich, so dass für Transketolase eine Präorganisation des aktiven Zentrums interpretiert wurde.

Die Kristallstruktur des Holoenzyms in Komplex mit dem Akzeptorsubstrat R5P zeigte zusätzliche positive Elektronendichte im aktiven Zentrum, welche als Mischelektronendichte von offenkettiger und ringförmiger Struktur des Zuckers interpretiert wurde. Der signifikant erhöhte Anteil an offenkettiger Form von R5P ließ vermuten, dass das Enzym diese Form aus dem Gleichgewicht heraus akkumuliert und somit für die effektive Übertragung des C2-Ketolrest positioniert (Circe-Effekt). Eine leichte Abweichung von einer C2-*exo*-Briefumschlagkonformation von R5P deutete auf die partielle Öffnung des Furanoserings des Zuckers hin. Durch Modellierung des DHE-ThDP in die Röntgenkristallstruktur des Wildtypenzyms mit Akzeptorsubstrat ließ sich zudem für dieses eine Ausrichtung als *near-attack-conformer* postulieren.

Anhand strukturellen Kombination ¹H-NMR-spektroskopischen der Daten in mit Intermediatanalysen wäre eine mechanistische Interpretation der Daten als Theorell-Chance-Mechanismus denkbar, welcher jedoch durch kinetische Messungen zur Aktivität beziehungsweise durch Intermediatanalyse in Anwesenheit von Hilfsenzymen ausgeschlossen werden konnte. Vielmehr wiesen diese Messungen die Existenz eines schnellen Gleichgewichts zwischen C5-Intermediat und DHE-ThDP/Aldose nach, welches vermutlich das reaktive C2α-Carbanion vor unerwünschten Nebenreaktionen, wie Protonierung, schützt. Außerdem konnte daraus für die enzymatische Übertragung der Ketoleinheit auf den Akzeptor unter physiologischen Bedingungen im Stoffwechsel die Steuerung der Reaktionsrichtung durch eine Abhängigkeit von der vorhandenen Konzentration des Akzeptorsubstrats beziehungsweise von der Affinität zur Aldose postuliert werden.

Mit Hilfe verschiedener ThDP-Analoga als molekulare Sonden ließen sich die Einflüsse einzelner Strukturkomponenten von Cofaktor und Protein auf die Ausprägung charakteristischer Banden im Nah-UV-CD-Bereich studieren. Dabei konnte die 1´,4´-iminotautomere Form des Cofaktors als Ursache für die bei Transketolasen charakteristische negative CD-Bande um 320 nm ausgeschlossen werden, wie dies von KOVINA *et al.* (2004, 2002) und KOCHETOV (2005) vermutet wurde.

NEMERIA *et al.* (2007, 2004) und JORDAN (2005) postulieren eine positive CD-Bande um 300-310 nm als 1´,4´-iminotautomere Form des Cofaktors. Diese Bande konnte zwar in Anwesenheit von HPA für Transketolase erhalten werden, die Modellsubstanzen DA-ThDP und Oxi-ThDP schließen jedoch wiederum die iminotautomere Form als Bandenursache aus. Ebenfalls konnte eine Reporterfunktion des Michaelis-Komplexes (Nemeria *et al.*, 2004) als Ursache für die CD-Bande bei 320 nm ausgeschlossen werden, da diese in Transketolase bereits in Abwesenheit von Substrat erscheint. Aus den spektroskopischen Befunden wurde daher die Wechselwirkung des Cofaktors im asymmetrischen aktiven Zentrum des Enzyms als Ursache der CD-Bande vorgeschlagen, wobei die exozyklische 4´-Aminogruppe des Pyrimidinrings bei deren Ausprägung essentiell zu sein scheint, während dem N1´-Atom des Pyrimidinrings bei der Interpretation der Bande keine Bedeutung zukommt.

Für die bakterielle Transketolase A konnte zudem eine bisher nicht beschriebene AHAS-ähnliche Carboligationsreaktion zweier Moleküle HPA spektroskopisch im CD-Spektrum bei 297 nm nachgewiesen und als putatives Produkt (*R*)-Hydroxyaceto-hydroxylactat bestimmt werden. Erste GC/MS-Untersuchungen wiesen zudem auf eine spontane Laktonringbildung zur Stabilisierung von HAHL hin, welche zu einem Tetronsäurederivat führt.

4.1. Ausblick

Durch die vorliegenden Resultate ergaben sich weitere interessante Anschlussprojekte, welche kurz dargelegt werden sollen.

Um den Katalysezyklus der Transketolase aus kristallographischer Sicht zu komplettieren, wäre eine Kristallstruktur des letzten fehlenden Intermediats (C7-ThDP) wünschenswert. Dazu wären Substrat-*soaking*-Experimente entweder direkt mit S7P oder indirekt durch Auswahl geeigneter Reaktionsbedingungen von HPA und R5P zur Problemlösung heranzuziehen.

Durch die Röntgenkristallstrukturen der enzymgebundenen Donorintermediate wäre nun zudem die strukturelle Charakterisierung des vorgelagerten ES-Komplexes von Interesse, welche den enzymatischen Bindungsmodus der *docking-site* für die in freier Lösung hauptsächlich im zyklischen Zustand vorliegenden Zuckersubstrate offenbaren würde. Dies ließe sich möglicherweise durch Einsatz inaktiver Cofaktoren wie N3[′]-Pyridyl-ThDP oder DA-ThDP bei der Kristallisation realisieren.

Um eine eindeutigere Kristallstrukur für den Komplex des Holoenzyms mit dem Akzeptorsubstrat R5P in offenkettiger Form zu erhalten, bietet sich die Kokristallisation beziehungsweise das Substrat-*soaking*-Experiment mit 4-Desoxyribose-5-phosphat an, welches nicht zur Bildung des Furanoserings befähigt ist und somit die lineare Struktur zu einem signifikant erhöhten Anteil im aktiven Zentrum vorliegen sollte.

Zudem wäre die weiterführende Charakterisierung des AHAS-ähnlichen Carboligationsprodukts (*R*)-HAHL wünschenswert. Hierbei interessieren vor allem zuerst synthetische Aspekte zur Ausbeute, zum Enantiomerenüberschuss (*ee*) und zur effektiven Reinigung der Substanz, bevor möglicherweise dessen Anwendbarkeit/Nutzbarkeit geprüft und ein *upscaling* zur Herstellung des Produkts durchgeführt werden könnte. Eventuell erlaubt ein *enzyme engineering* die Generierung des (*S*)-Enantiomers von HAHL.

5. Referenzen

Angyal, S.J., (1969) Angew Chem Int Ed 8, 157-226. "The composition and conformation of sugars in solution".

Arjunan, P., Sax, M., Brunskill, A., Chandrasekhar, K., Nemeria, N., Zhang, S., Jordan, F. & Furey, W., (2006) *J Biol Chem* 281, 15296-15303. "A thiamin-bound, pre-decarboxylation reaction intermediate analogue in the pyruvate dehydrogenase E1 subunit induces large scale disorder-to-order transformations in the enzyme and reveals novel structural features in the covalently bound adduct".

Asano, N., Oseki, K., Kizu, H. & Matsui, K., (1994) *J Med Chem* 37, 3701-3706. "Nitrogen-in-the-ring pyranoses and furanoses: structural basis of inhibition of mammalian glycosidases".

Asztalos, P., Parthier, C., Golbik, R., Kleinschmidt, M., Hübner, G., Weiss, M.S., Friedemann, R., Wille, G. & Tittmann, K., (2007) *Biochemistry*, akzeptiert zur Publikation, "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".

Avigad, G., Englard, S. & Listowsky, I., (1970) *Carbohydr Res* 14, 365-373. "Evaluation of the proportion of the keto form of D-fructose and related 2-ketohexoses present in aqueos solution".

Bar-Ilan, A., Balan, V., Tittmann, K., Golbik, R., Vyazmensky, M., Hübner, G., Barak, Z. & Chipman, D.M., (2001) *Biochemistry* 40, 11946-11954. "Binding and activation of thiamin diphosphate in acetohydroxyacid synthase".

Baykal, A.T., Kakalis, L. & Jordan, F., (2006_a) *Biochemistry* 45, 7522-7528. "Electronic and nuclear magnetic resonance spectroscopic features of the 1',4'-iminopyrimidine tautomeric form of thiamin diphosphate, a novel intermediate on enzymes requiring this coenzyme".

Baykal, A., Chakraborty, S., Dodoo, A. & Jordan, F., (2006_b) *Bioorg Chem* 34, 380-393. "Synthesis with good enantiomeric excess of both enantiomers of α -ketols and acetolactates by two thiamin diphosphate-dependent decarboxylases".

Bettendorff, L., Wirtzfeld, B., Makarchikov, A.F., Mazzucchelli, G., Frederich, M., Gigliobianco, T., Gangolf, M., De Pauw, E., Angenot, L. & Wins, P., (2007) *Nat Chem Biol* 3, 211-212. "Discovery of a natural thiamine adenine nucleotide".

Beyer, H. & Walter, W. (2004) Buchtitel: "Lehrbuch der Organischen Chemie". Verlag: Hirtzel, Stuttgart. Auflage: 24.

Bisswanger, H. (2002) Buchtitel: "Enzyme Kinetics: Principles and Methods". Verlag: Wiley-VCH.

Blattner, F.R., Plunkett, G., 3rd, Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J.D., Rode, C.K., Mayhew, G.F., Gregor, J., Davis, N.W., Kirkpatrick, H.A., Goeden, M.A., Rose, D.J., Mau, B. & Shao, Y., (1997) *Science* 277, 1453-1474. "The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12".

Bly, R.S. & Koock, S.U., (1969) *J Am Chem Soc* 91, 3292-3298. "Unsaturated neopentyl compounds. The effect of methyl substitution on the acetolysis rates of homoallenic neopentyl-type brosylates".

Booth, C.K. & Nixon, P.F., (1993) *Eur J Biochem* 218, 261-265. "Reconstitution of holotransketolase is by a thiamin-diphosphate-magnesium-complex".

Boros, L.G., Brandes, J.L., Lee, W.N., Cascante, M., Puigjaner, J., Revesz, E., Bray, T.M., Schirmer, W.J. & Melvin, W.S., (1998_a) *Anticancer Res* 18, 595-602. "Thiamine supplementation to cancer patients: a double edged sword".

Boros, L.G., Brandes, J.L., Yusuf, F.I., Cascante, M., Williams, R.D. & Schirmer, W.J., (1998_b) *Med Hypotheses* 50, 501-506. "Inhibition of the oxidative and nonoxidative pentose phosphate pathways by somatostatin: a possible mechanism of antitumor action".

Boros, L.G., Lee, P.W., Brandes, J.L., Cascante, M., Muscarella, P., Schirmer, W.J., Melvin, W.S. & Ellison, E.C., (1998_c) *Med Hypotheses* 50, 55-59. "Nonoxidative pentose phosphate pathways and their direct role in ribose synthesis in tumors: is cancer a disease of cellular glucose metabolism?"

Breslow, R., (1957) J Am Chem Soc 79, 1762-1763. "Rapid deuterium exchange in thiazolium salts".

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

Breslow, R. & McNelis, E., (1959) *J Am Chem Soc* 81, 3080-3082. "Studies on model systems for thiamine action. Synthesis of reactive intermediates, and evidence on the function of the pyrimidine ring".

Brünger, A.T., (1992) *Nature* 355, 472-475. "Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures".

Bürgi, H.B., Dunitz, J.D. & Shefter, E., (1973) *J Am Chem Soc* 95, 5065-5067. "Geometrical reaction coordinates. II. Nucleophilic addition to a carbonyl group".

Bürgi, H.B., Dunitz, J.D., Lehn, J.M. & Wipff, G., (1974) *Tetrahedron* 30, 1563-1572. "Stereochemistry of reaction paths at carbonyl centres".

Bykova, I.A., Solovjeva, O.N., Meshalkina, L.E., Kovina, M.V. & Kochetov, G.A., (2001) *Biochem Biophys Res Commun* 280, 845-847. "One-substrate transketolase-catalyzed reaction".

Cascante, M., Centelles, J.J., Veech, R.L., Lee, W.-N.P. & Boros, L.G., (2000) *Nutr Cancer* 32, 150-154. "Role of thiamin (Vitamin B-1) and transketolase in tumor cell proliferation".

Cavalieri, S.W., Neet, K.E. & Sable, H.Z., (1975) *Arch Biochem Biophys* 171, 527-532. "Enzymes of pentose biosynthesis. The quaternary structure and reacting form of transketolase from baker's yeast".

Charmantray, F., Dellis, P., Helaine, V., Samreth, S. & Hecquet, L., (2006) *Eur J Org Chem*, 5526-5532. "Chemoenzymatic synthesis of 5-thio-D-xylopyranose".

Chenna, R., Sugawara, H., Koike, T., Lopez, R., Gibson, T.J., Higgins, D.G. & Thompson, J.D., (2003) *Nucleic Acids Res* 31, 3497-3500. "Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs".

Chipman, D., Barak, Z. & Schloss, J.V., (1998) *Biochim Biophys Acta* 1385, 401-19. "Biosynthesis of 2-aceto-2-hydroxy acids: acetolactate synthases and acetohydroxyacid synthases".

Chipman, D.M., Duggleby, R.G. & Tittmann, K., (2005) *Curr Opin Chem Biol* 9, 475-481. "Mechanisms of acetohydroxyacid synthases".

Christen, P. & Gasser, A., (1980) *Eur J Biochem* 107, 73-77. "Production of glycolate by oxidation of the 1,2-dihydroxyethyl-thiamin-diphosphate intermediate of transketolase with hexacyanoferrate(III) or H_2O_2 ".

Crandall, J.K. & Rambo, E., (1990) *J Org Chem* 55, 5929-5930. "Allene epoxidation. Oxidative cyclizations of allenyl acids".

Crane, E.J., Vaccaro, J.A. & Washabaugh, M.W., (1993) *J Am Chem Soc* 115, 8912-8917. "Single-turnover studies on brewer's yeast pyruvate decarboxylase: C(2)-proton transfer from thiamin diphosphate".

Crosby, J. & Lienhard, G.E., (1970_a) *J Am Chem Soc* 92, 5707-5716. "Mechanisms of thiaminecatalyzed reactions. A kinetic analysis of the decarboxylation of pyruvate by 3,4dimethylthiazolium ion in water and ethanol".

Crosby, J., Stone, R. & Lienhard, G.E., (1970_b) *J Am Chem Soc* 92, 2891-2900. "Mechanisms of thiamine-catalyzed reactions. Decarboxylation of 2-(1-carboxy-1-hydroxyethyl)-3,4-dimethyl-thiazolium chloride".

Datta, A.G. & Racker, E., (1961_a) *J Biol Chem* 236, 617-623. "Mechanism of action of transketolase I. Properties of the crystalline yeast enzyme".

Datta, A.G. & Racker, E., (1961_b) *J Biol Chem* 236, 624-628. "Mechanism of action of transketolase II. The substrate-enzyme intermediate".

De La Haba, G., Leder, I.G. & Racker, E., (1955) *J Biol Chem* 214, 409-426. "Crystalline transketolase from bakers' yeast: Isolation and properties".

DeLano, W.L. (2006) DeLano Scientific LLC, San Carlos, CA, USA "The PyMOL Molecular Graphics System" Ver. 0.99rc6

Demuynck, C., Bolte, J., Hecquet, L. & Dalmas, V., (1991) *Tetrahedron Lett* 32, 5085-5088. "Enzyme-catalysed synthesis of carbohydrates: synthetic potential of transketolase".

Draths, K.M. & Frost, J.W., (1990) *J Am Chem Soc* 112, 1657-1659. "Synthesis using plasmid-based biocatalysis: Plasmid assembly and 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate production".

Draths, K.M., Pompliano, D.L., Conley, D.L., Frost, J.W., Berry, A., Disbrow, G.L., Staversky, R.J. & Lievense, J.C., (1992) *J Am Chem Soc* 114, 3956-3962. "Biocatalytic synthesis of aromatics from D-glucose: The role of transketolase".

Duggleby, R.G., (2006) *Acc Chem Res* 39, 550-557. "Domain relationships in thiamine diphosphate-dependent enzymes".

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

Edwards, T.E., Klein, D.J. & Ferré-D'Amaré, A.R., (2007) *Curr Opin Struct Biol* 17, 1-7. "Riboswitches: small-molecule recognition by gene regulatory RNAs".

Effenberger, F., Null, V. & Ziegler, T., (1992) *Tetrahedron Lett* 33, 5157-5160. "Preparation of optically pure L-2-hydroxyaldehydes with yeast transketolase".

Egan, R.M. & Sable, H.Z., (1981) *J Biol Chem* 256, 4877-4883. "Transketolase kinetics: The slow reconstitution of the holoenzyme is due to rate-limiting dimerization of the subunits".

Eigen, M., (1964) Angew Chem Int Ed 3, 1-72. "Proton transfer, acid-base catalysis and enzymatic hydrolysis".

Emsley, **P. & Cowtan**, **K.**, (2004) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60, 2126-2132. "Coot: modelbuilding tools for molecular graphics".

Epelbaum, S., Chipman, D.M. & Barak, Z., (1990) *Anal Biochem* 191, 96-99. "Determination of products of acetohydroxy acid synthase by the colorimetric method, Revisited".

Eppendorfer, S. (1991). *Dissertation*, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. "Beiträge zur Affinität definierter Strukturelemente des Thiaminpyrophosphats und der Metallionen zum aktiven Zentrum der Hefe-Pyruvatdecarboxylase".

Farzami, B., Mariam, Y.H. & Jordan, F., (1977) *Biochemistry* 16, 1105-1110. "Solvent effects on thiamin-enzyme model interactions. I. Interactions with tryptophane".

Fersht, A. (2003) Buchtitel: "Structure and mechanism in protein science. Guide to enzyme catalysis and protein folding". Verlag: Palgrave Macmillan. Auflage: 5.

Fiedler, E., Golbik, R., Schneider, G., Tittmann, K., Neef, H., König, S. & Hübner, G., (2001) *J Biol Chem* 276, 16051-16058. "Examination of donor substrate conversion in yeast transketolase".

Fiedler, E. (2002). *Dissertation*, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. "Kinetische und strukturelle Untersuchungen zur Donorsubstrat- und Ligandenbindung an Transketolase aus *Saccharomyces cerevisiae*".

Fiedler, E., Thorell, S., Sandalova, T., Golbik, R., König, S. & Schneider, G., (2002) *Proc Natl Acad Sci U* SA 99, 591-595. "Snapshot of a key intermediate in enzymatic thiamin catalysis: crystal structure of the α -carbanion of (α , β -dihydroxyethyl)-thiamin diphosphate in the active site of transketolase from *Saccharomyces cerevisiae*".

Fox, M.A. & Whitesell, J.K. (1995) Buchtitel: "Organische Chemie". Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland.

Frank, R.A., Leeper, F.J. & Luisi, B.F., (2007) *Cell Mol Life Sci* 64, 892-905. "Structure, mechanism and catalytic duality of thiamine-dependent enzymes".

Friedemann, R. & Breitkopf, C., (1996) Int J Quant Chem 57, 943-948. "Theoretical studies on the decarboxylation reaction in thiamin catalysis".

Frisch, M.J., Trucks, G.W., Schegel, H.B., Scuseria, G.E., Robb, M.A., Cheeseman, J.R., Zakrzewski, V.G., Montgomery, J.A., Stratmann, R.E.J., Burant, J.C., Dapprich, S., Millam, J.M., Daniels, A.D., Kudin, K.N., Strain, M.C., Farkas, O., Tomasi, J., Barone, V., Cossi, M., Cammi, R., Mennucci, B., Pomelli, C., Adamo, C., Clifford, S., Ochterski, J., Peterson, G.A., Ayala, P.Y., Cui, Q., Morokuma, K., Malick, D.K., Raghavachari, K., Foresman, J.B., Cioslowski, J., Ortiz, J.V., Sefanov, B.B., Liu, G., Liashenko, A., Piskorz, P., Komaromi, I., Gomperts, R., Martin, R., Fox, D.J., Keith, T., Al-Laham, M.A., Peng, C.Y., Nanayakkara, A., Gonzalez, C., Chahacombe, M., Gill, P.M.W., Johnson, B.G., Chen, W., Wong, M.W., Andres, J.L., Gonzalez, C., Head-Gordon, M., Replogle, E.S. & Pople, J.A. (1998) "*Gaussian98*" Pittsburgh PA, Gaussian Inc.

Garcia-Viloca, M., Gao, J., Karplus, M. & Truhlar, D.G., (2004) *Science* 303, 186-195. "How enzymes work: analysis by modern rate theory and computer simulations".

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

Gill, S.C. & von Hippel, P.H., (1989) *Anal Biochem* 182, 319-326. "Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data".

Golbik, R. (1986). *Dissertation*, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. "Fluoreszenz-spektroskopische Untersuchungen an Hefe-Pyruvatdecarboxylase".

Golbik, R., Neef, H., Hübner, G., König, S., Seliger, B., Meshalkina, L., Kochetov, G.A. & Schellenberger, A., (1991) *Bioorg Chem* 19, 10-17. "Function of the aminopyrimidine part in thiamine pyrophosphate enzymes".

Golbik, R., Meshalkina, L.E., Sandalova, T., Tittmann, K., Fiedler, E., Neef, H., König, S., Kluger, R., Kochetov, G.A., Schneider, G. & Hübner, G., (2005) *Febs J* 272, 1326-1342. "Effect of coenzyme modification on the structural and catalytic properties of wild-type transketolase and of the variant E^{418} A from *Saccharomyces cerevisiae*".

Hall, T.A., (1999) *Nucleic Acids Symp Ser* 41, 95-98. "BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT."

Hammes, H.P., Du, X., Edelstein, D., Taguchi, T., Matsumura, T., Ju, Q., Lin, J., Bierhaus, A., Nawroth, P., Hannak, D., Neumaier, M., Bergfeld, R., Giardino, I. & Brownlee, M., (2003) *Nat Med* 9, 294-299. "Benfotiamine blocks three major pathways of hyperglycemic damage and prevents experimental diabetic retinopathy". Hawkins, C.F., Borges, A. & Perham, R.N., (1989) *FEBS Lett* 255, 77-82. "A common structural motif in thiamin pyrophosphate-binding enzymes".

Hayward, L.D. & Angyal, S.J., (1977) *Carbohydr Res* 53, 13-20. "A symmetry rule for the circular dichroism of reducing sugars, and the proportion of carbonyl forms in aqueous solutions thereof".

Heinrich, C.P. & Wiss, O., (1971_a) *FEBS Lett* 14, 251-253. "Subunit size of transketolase from baker's yeast".

Heinrich, P.C., Noack, K. & Wiss, O., (1971_b) *Biochem Biophys Res Commun* 44, 275-279. "A circular dichroism study of transketolase from baker's yeast".

Heinrich, P.C., Steffen, H., Janser, P. & Oswald, W., (1972) Eur J Biochem 30, 533-541. "Studies on the reconstitution of apotransketolase with thiamine pyrophosphate and analogs of the coenzyme".

Heinrich, C.P. & Schmidt, D., (1973) *Experientia* 29, 1226-1227. "Determination of the binding constant of thiamine diphosphate in transketolase from baker's yeast by circular dichroism titration".

Hong, J., Sun, S., Derrick, T., Larive, C., Schowen, K.B. & Schowen, R.L., (1998) *Biochim Biophys Acta* 1385, 187-200. "Transition-state theoretical interpretation of the catalytic power of pyruvate decarboxylases: the role of static and dynamical considerations".

Horecker, B.L., Smyrniotis, P.Z. & Hurwitz, J., (1956) *J Biol Chem* 223, 1009-1019. "The role of xylulose 5-phosphate in the transketolase reaction".

Horecker, B.L., (2002) J Biol Chem 277, 47965-71. "The pentose phosphate pathway".

Hosomi, S., Tara, H., Terada, T. & Mizoguchi, T., (1989) *Biochem Med Metab Biol* 42, 52-59. "Inhibitory effect of 5-phosphoribosyl 1-pyrophosphate and ADP on the nonoxidative pentose phosphate pathway activity".

Hübner, G., Schellenberger, A., Stelmashchuk, V.Y. & Kiselev, N.A., (1975_a) *Acta Biol Med Germ* 34, 699-701. "Electron microscopic investigation of the subunit structure of yeast pyruvate decarboxylase".

Hübner, G., Neef, H., Fischer, G. & Schellenberger, A., (1975_b) Z Chem 15, 221. "Kinetischer ¹⁵N-Isotopieeffekt als direkter Beweis für die unmittelbare Beteiligung der Aminogruppe von Thiaminpyrophosphat an der enzymatischen Decarboxylierung von α -Ketosäuren durch Hefe-Pyruvatdecarboxylase".

Hübner, G., Tittmann, K., Killenberg-Jabs, M., Schaffner, J., Spinka, M., Neef, H., Kern, D., Kern, G., Schneider, G., Wikner, C. & Ghisla, S., (1998) *Biochim Biophys Acta* 1385, 221-8. "Activation of thiamin diphosphate in enzymes".

Hur, S. & Bruice, T.C., (2003) *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 12015-12020. "The near attack conformation approach to the study of the chorismate to prephenate reaction".

Hurwitz, J. & Horecker, B.L., (1956) *J Biol Chem* 223, 993-1008. "The purification of phosphoketopentoepimerase from *Lactobacillus pentosus* and the preparation of xylulose 5-phosphate".

lida, A., Teshiba, S. & Mizobuchi, K., (1993) *J Bacteriol* 175, 5375-83. "Identification and characterization of the *tktB* gene encoding a second transketolase in *Escherichia coli* K-12".

Isupov, M.N., Rupprecht, M.P., Wilson, K.S., Dauter, Z. & Littlechild, J.A., (1999) to be published. "Crystal structure of *Escherichia coli* transketolase".

Jencks, W.P., (1975) Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol 43, 219-410. "Binding energy, specificity, and enzymic catalysis: the circe effect".

Jencks, W.P. (1987) Buchtitel: "Catalysis in Chemistry and Enzymology". Verlag: Dover Publications Inc., New York. Dover Ed.

Jordan, F. & Mariam, Y.H., (1978) *J Am Chem Soc* 100, 2534-2541. "N1'-methylthiaminium diiodide. Model study on the effect of a coenzyme bound positive charge on reaction mechanisms requiring thiamin pyrophosphate".

Jordan, F., Chen, G., Nishikawa, S. & Wu, B.S., (1982) Ann N Y Acad Sci 378, 14-31. "Potential roles of the aminopyrimidine ring in thiamin catalyzed reactions".

Jordan, F., Zhang, Z. & Sergienko, E., (2002) *Bioorg Chem* 30, 188-198. "Spectroscopic evidence for participation of the 1',4'-imino tautomer of thiamin diphosphate in catalysis by yeast pyruvate decarboxylase".

Jordan, F., (2003_a) *Nat Prod Rep* 20, 184-201. "Current mechanistic understanding of thiamin diphosphate-dependent enzymatic reactions".

Jordan, F., Nemeria, N.S., Zhang, S., Yan, Y., Arjunan, P. & Furey, W., (2003_b) *J Am Chem Soc* 125, 12732-12738. "Dual catalytic apparatus of the thiamin diphosphate coenzyme: Acid-Base via the 1',4'-iminopyrimidine tautomer along with its electrophilic role".

Jordan, F. & Nemeria, N.S., (2005) *Bioorg Chem* 33, 190-215. "Experimental observation of thiamin diphosphate-bound intermediates on enzymes and mechanistic information derived from these observations".

Jung, I.L., Phyo, K.H. & Kim, I.G., (2005) *Curr Microbiol* 50, 314-318. "RpoS-mediated growth-dependent expression of the *Escherichia coli tkt* genes encoding transketolases isoenzymes".

Kato, N., Higucchi, T., Sarazawa, C., Nishizawa, T., Tani, Y. & Yamada, H., (1982) *Biochim Biophys Acta* - *General Subjects* 715, 143-150. "Purification and properties of a transketolase responsible for formaldehyde fixation in a methanol-utilizing yeast, *Candida boidinii* (*Kloeckera sp.*) No. 2201".

Kelly, S.M., Jess, T.J. & Price, N.C., (2005) *Biochim Biophys Acta* 1751, 119-139. "How to study proteins by circular dichroism".

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

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

Killenberg-Jabs, M., König, S., Eberhardt, I., Hohmann, S. & Hübner, G. (1996). "Investigation of the cofactor-protein interaction in pyruvate decarboxylase". In *Biochemistry and Physiology of Thiamin Diphosphate Enzymes*, Seiten: 141-150. A.u.C. Intemann, Prien.

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

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

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

Knape, M. (2004). *Diplomarbeit*, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. "Mechanistische Untersuchungen an Transketolase H⁴⁸¹A aus *Saccharomyces cerevisiae*".

Kobori, Y., Myles, D.C. & Whitesides, G.M., (1992) *J Org Chem* 57, 5899-5907. "Substrate specifity and carbohydrate synthesis using transketolase".

Kochetov, G.A. & Philippov, P.P., (1970_a) *Biochem Biophys Res Commun* 38, 930-933. "Calcium: cofactor of transketolase from baker's yeast".

Kochetov, G.A. & Philippov, P.P., (1970_b) *FEBS Letters* 6, 49-51. "The function of calcium - cofactor of transketolase from baker's yeast".

Kochetov, G.A., Usmanov, R.A. & Merzlov, V.P., (1970_c) *FEBS Letters* 9, 265-266. "Thiamine pyrophosphate induced changes in the optical activity of baker's yeast transketolase".

Kochetov, G.A., Usmanov, R.A. & Mevkh, A.T., (1973) *Biochem Biophys Res Commun* 54, 1619-1626. "The role of the charge transfer complex in the transketolase catalyzed reaction".

Kochetov, G.A., Usmanov, R.A. & Mevkh, A.T., (1978) *Anal Biochem* 88, 296-301. "A new method of determination of transketolase activity by assymetric synthesis reaction".

Kochetov, G.A., (1982) *Methods Enzymol* 90, 209-223. "Transketolase from yeast, rat liver, and pig liver".

Kochetov, G.A., (2001) *Biochemistry (Mosc)* 66, 1077-1085. "Functional flexibility of the transketolase molecule".

Kochetov, G.A. & Sevostyanova, I.A., (2005) *IUBMB Life* 57, 491-497. "Binding of the coenzyme and formation of the transketolase active center".

Köhr, G. & Heinemann, U., (1990) *Neurosci Lett* 112, 43-47. "Anticonvulsant effects of tetronic acid derivatives on picrotoxin induced epileptiform activity in rat hippocampal slices".

König, S., Schellenberger, A., Neef, H. & Schneider, G., (1994) *J Biol Chem* 269, 10879-10882. "Specificity of coenzyme binding in thiamin diphosphate-dependent enzymes. crystal structures of yeast transketolase in complex with analogs of thiamin diphosphate".

Kovina, M.V., Bykova, I.A., Solovjeva, O.N., Meshalkina, L.E. & Kochetov, G.A., (2002) *Biochem Biophys Res Commun* 294, 155-160. "The origin of the absorption band induced through the interaction between apotransketolase and thiamin diphosphate".

Kovina, M.V., De Kok, A., Sevostyanova, I.A., Khailova, L.S., Belkina, N.V. & Kochetov, G.A., (2004) *Proteins* 56, 338-345. "The molecular origin of the thiamine diphosphate-induced spectral bands of thDP-dependent enzymes".

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

Langenbeck, W. (1935) Buchtitel: "Die Organischen Katalysatoren". Verlag: Julius Springer, Berlin.

Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S. & Thornton, J.M., (1993) *J Appl Crystallogr* 26, 283-290. "Procheck: a program to check stereochemical quality of protein structures".

Lau, E.Y., Kahn, K., Bash, P.A. & Bruice, T.C., (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 9937-9942. "The importance of reactant positioning in enzyme catalysis: a hybrid quantum mechanics/molecular mechanics study of a haloalkane dehalogenase".

Leslie, A.G.W. (1992) Joint CCP4 + ESF-EAMCB Newsletter on Protein Crystallography, "Recent changes to the MOSFLM package for processing film and image plate data" Ver. 26

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

Lindqvist, Y. & Schneider, G., (1993) *Curr Opin Struct Biol* 3, 896-901. "Thiamin diphosphate dependent enzymes: transketolase, pyruvate oxidase and pyruvate decarboxylase".

Littlechild, J., Turner, N., Hobbs, G., Lilly, M., Rawas, A. & Watson, H., (1995) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 51, 1074-1076. "Crystallization and preliminary X-ray crystallographic data with *Escherichia coli* transketolase".

Lobell, M. & Crout, D.H.G., (1996) *J Am Chem Soc* 118, 1867-1873. "Pyruvate decarboxylase: A molecular modeling study of pyruvate decarboxylation and acyloin formation".

Lohkamp, B., Emsley, P. & Cowtan, K. (2005) CCP4 Newsletter on Protein Crystallography, "WinCoot" Ver. April 2006

Mann, S., Perez Melero, C., Hawksley, D. & Leeper, F.J., (2004) Org Biomol Chem 2, 1732-1741. "Inhibition of thiamin diphosphate dependent enzymes by 3-deazathiamin diphosphate".

Martin, P.R., McCool, B.A. & Singleton, C.K., (1995) *Metab Brain Dis* 10, 45-55. "Molecular genetics of transketolase in the pathogenesis of the Wernicke-Korsakoff syndrome".

Martinez-Torres, R.J., Aucamp, J.P., George, R. & Dalby, P.A., (2007) *Enzyme Microb Technol*, im Druck. "Structural stability of *E. coli* transketolase to urea denaturation".

McCool, B.A., Plonk, S.G., Martin, P.R. & Singleton, C.K., (1993) *J Biol Chem* 268, 1397-1404. "Cloning of human transketolase cDNAs and comparison of the nucleotide sequence of the coding region in Wernicke-Korsakoff and non-Wernicke-Korsakoff individuals".

Meshalkina, L., Usmanov, R.A. & Kochetov, G.A. (1991). "The role of the amino group and pyrimidine ring nitrogen atoms of thiamine pyrophosphate in the transketolase reaction". In *Biochemistry and Physiology of Thiamin Diphosphate Enzymes*, Seiten: 343-352. VCN Verlagsgesellschaft, Weinheim.

Meshalkina, L., Wikner, C., Nilsson, U., Lindqvist, Y. & Schneider, G. (1996). "CD spectra of recombinant wild-type and mutant transketolase". In *Biochemistry and Physiology of Thiamin Diphosphate Enzymes*, Seiten: 532-542. A.u.C. Intemann, Prien.

Meshalkina, L., Nilsson, U., Wikner, C., Kostikowa, T. & Schneider, G., (1997) *Eur J Biochem* 244, 646-652. "Examination of the thiamin diphosphate binding site in yeast transketolase by site-directed mutagenesis".

Monographie, (2006) Alt Med Rev 11, 238-242. "Benfotiamine".

Mülhardt, C. (2003) Buchtitel: "Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics". Spektrum Akademischer Verlag. Auflage: 4.

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

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

Murshudov, G.N., Vagin, A.A. & Dodson, E.J., (1997) *Acta Cryst D* 53, 240-255. "Refmac: "Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method"".

Myles, D.C., Andrullis III, P.J. & G.M., W., (1991) *Tetrahedron Lett* 32, 4835-4838. "A transketolase-based synthesis of (+)-*exo*-brevicomin".

Neef, H.-H. (1970). *Dissertation*, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. "Synthese und biochemische Eigenschaften einiger 2'-, 4'- und S-variierter Coenzymanaloger der Hefe-Pyruvat-Decarboxylase".

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

Nemeria, N., Tittmann, K., Joseph, E., Zhou, L., Vazquez-Coll, M.B., Arjunan, P., Hübner, G., Furey, W. & Jordan, F., (2005) *J Biol Chem* 280, 21473-21482. "Glutamate 636 of the *Escherichia coli* pyruvate dehydrogenase-E1 participates in active center communication and behaves as an engineered acetolactate synthase with unusual stereoselectivity".

Nemeria, N., Chakraborty, S., Baykal, A., Korotchkina, L.G., Patel, M.S. & Jordan, F., (2007) *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 78-82. "The 1',4'-iminopyrimidine tautomer of thiamin diphosphate is poised for catalysis in asymmetric active centers on enzymes".

Nikkola, M., Lindqvist, Y. & Schneider, G., (1994) *J Mol Biol* 238, 387-404. "Refined structure of transketolase from *Saccaromyces cerevisiae* at 2.0 Å resolution".

Nilsson, U., Meshalkina, L., Lindqvist, Y. & Schneider, G., (1997) *J Biol Chem* 272, 1864-1869. "Examination of substrate binding in thiamin diphosphate-dependent transketolase by protein crystallography and site-directed mutagenesis".

Nilsson, U., Hecquet, L., Gefflaut, T., Guerard, C. & Schneider, G., (1998) *FEBS Lett* 424, 49-52. "Asp⁴⁷⁷ is a determinant of the enantioselectivity in yeast transketolase".

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

Pang, S.S., Duggleby, R.G. & Guddat, L.W., (2002) *J Mol Biol* 317, 249-262. "Crystal structure of yeast acetohydroxyacid synthase: a target for herbicidal inhibitors".

Paoletti, F., Mocali, A. & Tombaccini, D., (1997) *J Cell Physiol* 172, 63-68. "Cysteine proteinases are responsible for characteristic transketolase alterations in alzheimer fibroblasts".

Pierce, J., Serianni, A.S. & Barker, R., (1985) *J Am Chem Soc* 107, 2448-2456. "Anomerization of furanose sugars and sugar phosphates".

Pletcher, J. & Sax, M., (1966) *Science* 154, 1331-1333. "Thiamine pyrophosphate hydrochloride: Stereochemical aspects from an x-ray diffraction study".

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

Pohl, M., Lingen, B. & Müller, M., (2002) *Chem Eur J* 8, 5288-5295. "Thiamin-diphosphate-dependent enzymes: New aspects of asymmetric C-C bond formation".

Pohl, M., Sprenger, G.A. & Müller, M., (2004) Curr Opin Biotechnol 15, 335-342. "A new perspective on thiamine catalysis".

Potterton, E., Briggs, P., Turkenberg, M. & Dodson, E.J., (2003) Acta Cryst D 59, 1131-1137. "A graphical user interface to the CCP4 program suite".

Racker, E., De La Haba, G. & Leder, I.G., (1953) *J Am Chem Soc* 75, 1010-1011. "Thiamine pyrophosphate, a coenzyme of transketolase".

Reimer, L.M., Conley, D.L., Pompliano, D.L. & Frost, J.W., (1986) *J Am Chem Soc* 108, 8010-8015. "Construction of an enzyme-targeted organophosphonate using immobilized enzyme and whole cell synthesis".

Rossmann, M.G. & Blow, D.M., (1962) Acta Cryst 15, 24-31. "The detection of sub-units within the crystallographic asymmetric unit".

Schaaff-Gerstenschlager, I., Mannhaupt, G., Vetter, I., Zimmermann, F.K. & Feldmann, H., (1993) *Eur J Biochem* 217, 487-492. "*TKL2*, a second transketolase gene of *saccharomyces cerevisiae*. cloning, sequence and deletion analysis of the gene".

Schellenberger, A. & Hübner, G., (1965) *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 343, 189-192. "Über die Trennung der Phosphorsäureester von Thiamin und seinen Analogen durch Gradientenelution".

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

Schellenberger, A., Heinroth, I. & Hübner, G., (1967_b) *Hoppe-Seyler´s Z Physiol Chem* 348, 506-511. "Die Bedeutung des Konformationsverhältnisses zwischen Pyrimidin- und Thiazolring für die Coenzym-Wirkung von Thiamin-Pyrophosphat in der Hefe-Pyruvatdecaboxylase".

Schellenberger, A. (1989) Buchtitel: "Enzymkatalyse: Einführung in die Chemie, Biochemie und Technologie der Enzyme". Gustav-Fischer-Verlag, Jena, Deutschland.

Schellenberger, A., Hübner, G. & Neef, H., (1997) *Methods Enzymol* 279, 131-146. "Cofactor designing in functional analysis of thiamin diphosphate enzymes".

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

Schenk, G., Layfield, R., Candy, J.M., Duggleby, R.G. & Nixon, P.F., (1997) *J Mol Evol* 44, 552-572. "Molecular evolutionary analysis of the thiamine-diphosphate-dependent enzyme transketolase".

Schenk, G., Duggleby, R.G. & Nixon, P.F., (1998) Int J Biochem Cell Biol 30, 1297-1318. "Properties and functions of the thiamin diphosphate dependent enzyme transketolase".

Schneider, G., Sundström, M. & Lindqvist, Y., (1989) *J Biol Chem* 264, 21619-20620. "Preliminary crystallographic data for transketolase from yeast".

Schneider, G. & Lindqvist, Y., (1993) *Bioorg Chem* 21, 109-117. "Enzymatic thiamine catalysis: Mechanistic implications from the three-dimensional structure of transketolase".

Schneider, G. & Lindqvist, Y., (1998) *Biochim Biophys Acta* 1385, 387-398. "Crystallography and mutagenesis of transketolase: mechanistic implications for enzymatic thiamin catalysis".

Schöllkopf, U., Hartwig, W., Sprotte, U. & Jung, W., (1979) Angew Chem Int Ed Engl 18, 310-311. "Lactide contraction: A method for the synthesis of α , α '-dihydroxy ketones from α -hydroxy carboxylic acids".

Schörken, **U.** (1997). *Dissertation*, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. "Untersuchungen zu Struktur und Funktion von Transketolase und Transaldolase, sowie biochemische Charakterisierung der Enzyme aus *Escherichia coli*".

Schörken, U. & Sprenger, G.A., (1998) *Biochim Biophys Acta* 1385, 229-243. "Thiamin-dependent enzymes as catalysts in chemoenzymatic syntheses".

Schowen, R.L. (1998). "Thiamin-dependent enzymes". In *Comprehensive Biological Catalysis* (Sinnott, M. L., Ed.), Vol. 2, Seiten: 217-266. Academic Press, London.

Schowen, R.L. (2003) *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 11931-11932. "How an enzyme surmounts the activation energy barrier".

Schütz, A. (2004). *Dissertation*, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. "Untersuchungen zur Struktur und zum Katalysemechanismus der Indolpyruvatdecarboxylase aus *Enterobacter cloacae*".

Selivanov, V.A., Kovina, M.V., Kochevova, N.V., Meshalkina, L.E. & Kochetov, G.A., (2004) *FEBS Lett* 567, 270-274. "Kinetic study of the H¹⁰³A mutant yeast transketolase".

Serganov, A., Polonskaia, A., Phan, A.T., Breaker, R.R. & Patel, D.J., (2006) *Nature* 441, 1167-1171. "Structural basis for gene regulation by a thiamine pyrophosphate-sensing riboswitch".

Serianni, A.S., Pierce, J. & Barker, R., (1979) *Biochemistry* 18, 1192-1199. "Carbon-13-enriched carbohydrates: Preparation of triose, tetrose, and pentose phosphates".

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

Singh, B.K., Stidham, M.A. & Shaner, D.L., (1988) Anal Biochem 171, 173-179. "Assay of acetohydroxyacid synthase".

Singleton, C.K., Wang, J.J., Shan, L. & Martin, P.R., (1996) *Biochemistry* 35, 15865-15869. "Conserved residues are functionally distinct within transketolases of different species".

Snyder, J.R. & Serianni, A.S., (1988) *Carbohydr Res* 184, 13-25. "Furanose ring anomerization: A kinetic study of the 5-deoxypentoses and 5-O-methylpentoses".

Sodeoka, M., Sampe, R., Kojima, S., Baba, Y., Usui, T., Ueda, K. & Osada, H., (2001) *J Med Chem* 44, 3216-3222. "Synthesis of a tetronic acid library focused on inhibitors of tyrosine and dual-specificity protein phosphatases and its evaluation regarding VHR and cdc25B inhibition".

Solov'eva, O.N., Bykova, I.A., Meshalkina, L.E., Kovina, M.V. & Kochetov, G.A., (2001) *Biochemistry* (*Mosc*) 66, 932-936. "Cleaving of ketosubstrate by transketolase and the nature of the products formed".

Sprenger, G.A. (1991). "Cloning and preliminary characterization of the transketolase gene from *Escherichia coli* K-12". In *Biochemistry an Physiology of Thiamin Diphosphate Enzymes* (Bisswanger, H. & Ullrich, J., Edn.), Seiten: 322-326. VCN Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland.

Sprenger, G.A., (1992) *J Bacteriol* 174, 1707-1708. "Location of the transketolase (*tkt*) gene on the *Escherichia coli* physical map".

Sprenger, G.A., (1993) *Biochim Biophys Acta* 1216, 307-310. "Nucleotide sequence of the *Escherichia coli* K-12 transketolase (*tkt*) gene".

Sprenger, G.A., Schörken, U., Sprenger, G. & Sahm, H., (1995) *Eur J Biochem* 230, 525-532. "Transketolase A of *Escherichia coli* K-12: purification and properties of the enzyme from recombinant strains".

Sprenger, G.A. & Pohl, M., (1999) *J Mol Catal B: Enzym* 6, 145-159. "Synthetic potential of thiamin diphosphate-dependent enzymes".

Stumpf, P.K. & Horecker, B.L., (1956) *J Biol Chem* 218, 753-768. "The role of xylulose 5-phosphate in xylose metabolism of *Lactobacillus pentosus*".

Sudarsan, N., Barrick, J.E. & Breaker, R.R., (2003) *RNA* 9, 644-7. "Metabolite-binding RNA domains are present in the genes of eukaryotes".

Sundström, M., Lindqvist, Y. & Scheider, G., (1992) *FEBS* 313, 229-231. "Three-dimensional structure of apotransketolase - Flexible loops at the active site enable cofactor binding".

Sundström, M., Lindqvist, Y., Schneider, G., Hellman, U. & Ronne, H., (1993) *J Biol Chem* 268, 24346-24352. "Yeast TKL1 gene encodes a transketolase that is required for efficient glycolysis and biosynthesis of aromatic amino acids".

Swenson, C.A. & Barker, R., (1971) *Biochemistry* 10, 3151-3154. "Proportion of keto and aldehydo forms in solutions of sugars and sugar phosphates".

Tate, J.R. & Nixon, P.F., (1987) Anal Biochem 160, 78-87. "Measurement of michaelis constant for human erythrocyte transketolase and thiamin diphosphate".

Thore, S., Leibundgut, M. & Ban, N., (2006) *Science* 312, 1208-1211. "Structure of the eukaryotic thiamine pyrophosphate riboswitch with its regulatory ligand".

Tittmann, K. (2000). *Dissertation*, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. "1) Aktivierung von Thiamindiphosphat in Enzymen. 2) Katalysemechanismus der Pyruvatoxidase aus *Lactobacillus plantarum*".

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

Tittmann, K., Neef, H., Golbik, R., Hübner, G. & Kern, D., (2005) *Biochemistry* 44, 8697-8700. "Kinetic control of thiamin diphosphate activation in enzymes studied by proton-nitrogen correlated NMR spectroscopy".

Tombaccini, D., Mocali, A. & Paoletti, F., (1994) *Exp Mol Pathol* 60, 140-6. "Characteristic transketolase alterations in dermal fibroblasts of alzheimer patients are modulated by culture conditions".

Tung, W.L. & Chow, K.C., (1995) *Trends Gen* 11, 128-129. "A modified medium for efficient electrotransformation of *E. coli*".

Turner, N.J., (2000) *Curr Opin Biotechnol* 11, 527-531. "Applications of transketolases in organic synthesis".

Ullrich, J. & Mannschreck, A., (1967) *Eur J Biochem* 1, 110-116. "Studies on the properties of (-)-2- α -hydroxyethyl-thiamin pyrophosphate ("active acetaldehyd")".

Usmanov, R.A. & Kochetov, G.A., (1981) *Biochem Int* 3, 33-39. "Determination of the activity of transketolase by the rate of reduction of hexacyanoferrate(III). A new method of quantitative determination of fructose 6-phosphate and some other ketocompounds."

Usmanov, R.A., Neef, H., Pustynnikov, M.G., Schellenberger, A. & Kochetov, G.A., (1985) *Biochem Int* 10, 479-486. "The effect of thiamine pyrophosphate modification on its coenzyme function in a transketolase-catalyzed reaction".

Vagin, A. & Teplyakov, A., (1997) *J Appl Crystallogr* 30, 1022-1025. "MolRep: An automated program for molecular replacement".

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

Vinogradov, M., Kaplun, A., Vyazmensky, M., Engel, S., Golbik, R., Tittmann, K., Uhlemann, K., Meshalkina, L., Barak, Z., Hübner, G. & Chipman, D.M., (2005) *Anal Biochem* 342, 126-133. "Monitoring the acetohydroxy acid synthase reaction and related carboligations by circular dichroism spectroscopy".

Voet, D. & Voet, J.G. (1995) Buchtitel: "Biochemistry". Verlag: John Wiley & Sons, Inc., New York. Auflage: 2.

Washabaugh, M.W. & Jencks, W.P., (1988) *Biochemistry* 27, 5044-5053. "Thiazolium C(2)-proton exchange: Structure-reactivity correlations and the pK_a of thiamin C(2)-H revisited".

Wikner, C., Meshalkina, L., Nilsson, U., Nikkola, M., Lindqvist, Y., Sundström, M. & Schneider, G., (1994) *J Biol Chem* 269, 32144-32150. "Analysis of an invariant cofactor-protein interaction in thiamin diphosphate-dependent enzymes by site-directed mutagenesis".

Wikner, C., Meshalkina, L., Nilsson, U., Bäckström, S., Lindqvist, Y. & Schneider, G., (1995) *Eur J Biochem* 233, 750-755. "His¹⁰³ in yeast transketolase is required for substrate recognition and catalysis".

Wikner, C., Nilsson, U., Meshalkina, L., Udekwu, C., Lindqvist, Y. & Schneider, G., (1997) *Biochemistry* 36, 15643-15649. "Identification of catalytically important residues in yeast transketolase".

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

Winkler, W., Nahvi, A. & Breaker, R.R., (2002) Nature 419, 952-956. "Thiamine derivatives bind messenger RNAs directly to regulate bacterial gene expression".

Wood, T. (1985) Buchtitel: "The Pentose Phosphate Pathway". Verlag: Academic Press Inc., Orlando, Florida, USA.

Wu, J., Serianni, A.S. & Vuorinen, T., (1990) *Carbohydr Res* 206, 1-12. "Furanose ring anomerization: Kinetic and thermodynamic studies of the D-2-pentuloses by ¹³C-n.m.r. spectroscopy".

Wu, N., Mo, Y., Gao, J. & Pai, E.F., (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 2017-2022. "Electrostatic stress in catalysis: Structure and mechanism of the enzyme orotidine monophosphate decarboxylase".

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

Yanisch-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J., (1985) *Gene* 33, 103-119. "Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequence of the M13mp18 and pUC19 vectors".

Zhao, G. & Winkler, M.E., (1994) *J Bacteriol* 176, 6134-6138. "An *Escherichia coli* K-12 *tktA tktB* mutant deficient in transketolase activity requires pyridoxine (vitamin B_6) as well as the aromatic amino acids and vitamins for growth".

Ziegler, T., Straub, A. & Effenberger, F., (1988) *Angew Chem Int Ed Engl* 27, 716-717. "Enzyme-catalyzed synthesis of 1-deoxymannojirimycin, 1-deoxynojirimycin, and 1,4-dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol".

Zimmermann, F. (1999). *Dissertation*, Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen. "Chemo-enzymatische Synthesen mit der Transketolase aus *Escherichia coli*".

6. Anhang

Plasmidkarte

Abb. 6.1 Die Plasmidkarte für pGSJ427 wurde freundlicherweise von Professor Georg Sprenger (Stuttgart) zur Verfügung gestellt. Es stehen dabei "*tktA*" für das Gen der *Escherichia coli*-Transketolase A und "*bla*" für das Gen der β -Lactamase (Ampicillin-Resistenzgen) als Selektionsmarker (Sprenger, 1991; Sprenger *et al.*, 1995; Schörken, 1997).



Primärsequenz-alignment

ecTKA (663 AS) 1 ----MSSRKE LANAIRALSM DAVOKAKSGH PGAPMGMADI AEVLWRDFLK HNPONPSWAD RDRFVLSNGH GSMLIYSLLH ectKB (666 AS) 1 -----SRKD LANAIRALSM DAVQKANSGH PGAPMGMADI AEVLWNDFLK HNPTDPTWYD RDRFILSNGH ASMLLYSLLH yTKA (680 AS) 1 MTQFTDIDKL AVSTIRILAV DTVSKANSGH PGAPLGMAPA AHVLWS-QMR MNPTNPDWIN RDRFVLSNGH AVALLYSMLH YTKB (681 AS) 1 MAQFSDIDKL AVSTLRLLSV DQVESAQSGH PGAPLGLAPV AHVIFK-QLR CNPNNEHWIN RDRFVLSNGH SCALLYSMLH Consensus Κ R L D V A SGH PGAP G A ΑV NP W RDRF LSNGH L YS LH 77 LTGYDLPMEE LKNFRQLHSK TPGHPEVGYT AGVETTTGPL GQGIANAVGM AIAEKTLAAQ FNRPGHDIVD HYTYAFMGDG ecTKA (663 AS) ectkb (666 AS) 75 LTGYDLPLEE LKNFRQLHSK TPGHPEIGYT PGVETTTGPL GQGLANAVGL AIAERTLAAQ FNQPDHEIVD HFTYVFMGDG vTKA (680 AS) 80 LTGYDLSIED LKQFRQLGSR TPGHPEF-EL PGVEVTTGPL GQGISNAVGM AMAQANLAAT YNKPGFTLSD NYTYVFLGDG yTKB (681 AS) 80 LLGYDYSIED LRQFRQVNSR TPGHPEF-HS AGVEITSGPL GQGISNAVGM AIAQANFAAT YNEDGFPISD SYTFAIVGDG Consensus 35 L GYD E L FRQ S TPGHPE GVE T GPL GQG NAVG A A AA N D GDG Т ectka (663 AS) 157 CMMEGISHEV CSLAGTLKLG KLIAFYDDNG ISIDGHVEGW FTDDTAMRFE AYGWHVIRDI DG-HDAASIK RAVEEARAVT ecTKB (666 AS) 155 CLMEGISHEV CSLAGTLGLG KLIGFYDHNG ISIDGETEGW FTDDTAKRFE AYHWHVIHEI DG-HDPOAVK EAILEAOSVK 159 CLOEGISSEA SSLAGHLKIG NITATYDDNK ITIDGATSIS FDEDVAKRYE AYGWEVLYVE NGNEDLAGIA KATAOAKLSK VTKA (680 AS) yTKB (681 AS) 159 CLOEGVSSET SSLAGHLOLG NLITFYDSNS ISIDGKTSYS FDEDVLKRYE AYGWEVMEVD KGDDDMESIS SALEKAKLSK Consensus 75 C EG S E SLAG L LG LI YD N I IDG FD REAYWV G D A A ecTKA (663 AS) 236 DKPSLLMCKT IIGFGSPNKA GTHDSHGAPL GDAEIALTRE OLGWK-YAPF EIPSEIYAOW DAK--EAGOA KESAWNEKFA ecTKB (666 AS) 234 DKPSLIICRT VIGFGSPNKA GKEEAHGAPL GEEEVALARQ KLGWH-HPPF EIPKEIYHAW DAR--EKGEK AQQSWNEKFA ytka (680 AS) 239 DKPTLIKMTT TIGYGS-LHA GSHSVHGAPL KADDVKQLKS KFGFNPDKSF VVPQEVYDHY QKTILKPGVE ANNKWNKLFS yTKB (681 AS) 239 DKPTIIKVTT TIGFGS-LQQ GTAGVHGSAL KADDVKQLKK RWGFDPNKSF VVPQEVYDYY KKTVVEPGQK LNEEWDRMFE G Consensus 108 DKP T IG GS G HG L G F P E Y W F 313 AYAKAYPQEA AEFTRRMKGE MPSDFDAKAK EFIAKLQANP AKIASRKASQ NAIEAFGPLL PEFLGGSADL APSNLTLWSG ecTKA (663 AS) ecTKB (666 AS) 311 AYKKAHPQLA EEFTRRMSGG LPKDWEKTTQ KYINELQANP AKIATRKASQ NTLNAYGPML PELLGGSADL APSNLTIWKG ytka (680 AS) 318 EYQKKFPELG AELARRLSGQ LPANWESKLP TYTAKDSA-- --VATRKLSE TVLEDVYNQL PELIGGSADL TPSNLTRWKE vTKB (681 AS) 318 EYKTKFPEKG KELQRRLNGE LPEGWEKHLP KFTPDDDA-- --LATRKTSQ QVLTNMVQVL PELIGGSADL TPSNLTRWEG E RR G P L PE GGSADL PSNLT W Consensus Y P A A RK S 393 SKAINE---- --DAAGNYIH YGVREFGMTA IANGISLHGG -FLPYTSTFL MFVEYARNAV RMAALMKORO VMVYTHDSIG ecTKA (663 AS) ecTKB (666 AS) 391 SVSLKE---- --DPAGNYIH YGVREFGMTA IANGIAHHGG -FVPYTATFL MFVEYARNAA RMAALMKARO IMVYTHDSIG yTKA (680 AS) 394 ALDFOPPSSG SGNYSGRYTR YGTREHAMGA IMNGISAFGA NYKPYGGTFL NEVSYAAGAV RISALSGHPV IWVATHDSIG yTKB (681 AS) 394 AVDFOPPITO LGNYAGRYIR YGVREHGMGA IMNGISAFGA NYKPYGGTFL NFVSYAAGAV RLAALSGNPV IWVATHDSIG Consensus G YI YG RE M A I NGI G PY TFL FV YA A R AL V THDSIG 466 LGEDGPTHQP VEQVASLRVT PNMSTWRPCD QVESAVAWKY GVERQDGPTA LILSRQNLAQ QERTEEQLAN IARGGYVLKD ecTKA (663 AS) ecTKB (666 AS) 464 LGEDGPTHQA VEQLASLRLT PNFSTWRPCD QVEAAVGWKL AVERHNGPTA LILSRQNLAQ VERTPDQVKE IARGGYVLKD VTKA (680 AS) 474 VGEDGPTHQP IETLAHFRSL PNIQVWRPAD GNEVSAAYKN SLESKHTPSI IALSRQNLPQ LE--GSSIES ASKGGYVLQD YTKB (681 AS) 474 LGEDGPTHQP IETLAHLRAI PNMHVWRPAD GNETSAAYYS AIKSGRTPSV VALSRQNLPQ LE--HSSFEK ALKGGYVIHD Consensus GEDGPTHQ E A R PN WRP D E Ρ LSRQNL Q E GGYV D ecTKA (663 AS) 546 CAGQPELIFI ATGSEVELAV AAYEKL-TAE GVKARVVSMP STDAFDKQDA AYRESVLPKA VTARVAVEAG IADYWYKYVG ecTKB (666 AS) 544 SGGKPDIILI ATGSEMEITL QAAEKL-AGE GRNVRVVSLP STDIFDAQDE EYRESVLPSN VAARVAVEAG IADYWYKYVG yTKA (680 AS) 552 VA-NPDIILV ATGSEVSLSV EAAKTL-AAK NIKARVVSLP DFFTFDKQPL EYRLSVLPDN VP-IMSVEVL ATTCWGKYAH 552 VE-NPDIILV STGSEVSISI DAAKKLYDTK KIKARVVSLP DFYTFDRQSE EYRFSVLPDG VP-IMSFEVL ATSSWGKYAH VTKB (681 AS) TGSE RVVS P FD O YR SVLP V Consensus ΡI A L E W KY ecTKA (663 AS) 625 INGAIVGMTT EGESAPAELL FEEFGETVDN VVAKAKELL- ------ ----623 LKGAIVGMTG YGESAPADKL FPFFGFTAEN IVAKAHKVLG V-KGA----ecTKB (666 AS) ytka (680 AS) 629 OS---FGIDR FGASGKAPEV FKFFGFTPEG VAERAQKTIA FYKGDKLISP LKKAF yTKB (681 AS) 630 QS---FGLDE FGRSGKGPEI YKLFDFTADG VASRAEKTIN YYKGKQLLSP MGRAF F FT Consensus G G S A

Abb. 6.2 Alignment der Primärsequenzen der Isoenzyme der Transketolasen aus Escherichia coli und Saccharomyces cerevisiae (Beschriftung wie Abb. 3.1).

Abb. 6.3 Plots zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten von ThDP oder Analoga in der Wildtyptransketolase A und in ausgewählten Proteinvarianten mittels Fluoreszenz-*quenching*-Methode. Die zugehörigen Spektren entsprechen der Darstellung in Abb. 3.12 und sind aus Gründen der Redundanz nicht abgebildet (Ausnahme: exemplarisches Beispiel einer Titration der Glu⁴¹¹Ala-Variante mit λ_{max} bei 340 nm). Experimentelle Bedingungen wie in Abb. 3.12 beschrieben.



TK rekombiniert mit DA-ThDP



TK rekombiniert mit Oxi-ThDP



TK rekombiniert mit N3´-Pyridyl-ThDP



TK-Varianten:



Glu⁴¹¹Ala rekombiniert mit N3´-Pyridyl-ThDP sowie die entsprechenden Fluoreszenzspektren ohne Korrektur um den dynamischen *quench*-Anteil



DV (His²⁶Ala/His²⁶¹Ala) rekombiniert mit ThDP





Untersuchungen zur C2-Deprotonisierung des Cofaktors (H/D-Austausch)

Abb. 6.4 Plots zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten des H/D-Austauschs für die Transketolasevarianten His⁴⁷³Ala (links) und die DV (rechts). Experimentelle Bedingungen entsprechen denen der Abb. 3.24.

Kristallographische Parameter

R-Faktor: Kristallographischer R-Faktor (*residual factor*), welcher die Übereinstimmung zwischen F_{obs} und F_{calc} angibt und damit ein Maß für die Korrektheit des Modells ist.

$$R = \frac{\sum_{hkl} \left\| F_{obs} \right\| - k \left| F_{calc} \right\|}{\sum_{hkl} \left| F_{obs} \right|}$$

$$F_{calc}: berechnete Strukturfaktoramplitude des Modells$$

$$F_{obs}: beobachtete Strukturfaktoramplitude$$

$$k : Skalierungsfaktor$$

$$h,k,l: Millersche Indizes$$

R_{free}: Freier R-Faktor, der von der Verfeinerung unbeeinflusst ist. Ein zufällig ausgewählter Teil der Daten (z.B. 5% der Reflexe) wird von der Verfeinerung ausgeschlossen und zur R_{free}-Berechnung nach BRÜNGER (1992) genutzt.

$$R_{free} = \frac{\sum_{hkl \subset T} \left\| F_{obs} \right| - k \left| F_{calc} \right\|}{\sum_{hkl \subset T} \left| F_{obs} \right|} \qquad hkl \subset T : \text{ Millersche Indizes der Einzelreflexe,} \\ \text{ die zu Testset T gehören}$$

B-Faktor: Kristallographischer Temperaturfaktor, der die Fehlordnung eines Atoms/einer Gruppe von Atomen als Schwingung beschreibt und ein Maß für die Abweichung der Elektronendichte darstellt.

 $B_i = 8 \cdot \pi^2 \cdot U_i^2$ U_i^2 Durchschnittsabweichung der Schwingung des *i*-ten Atoms (*mean square displacemaent*)

Die Elektronendichtekarte ρ an jedem Punkt (x,y,z) definieren sich wie folgt:

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum F(h, k, l) \cdot e^{i\alpha(h, k, l)} \cdot e^{-2\pi i/(hx + ky + lz)}$$

- F(h,k,l) : Strukturfaktoramplituden der Einzelreflexe (h,k,l)
- $\alpha(h,k,l)$: Phasewinkel
- V: Volumen der Einheitszelle

Differenzelektronendichtekarte:

F_o-F_c-Karte: Es werden die fehlenden Teile des Strukturmodells als negative, die überschüssigen Teile als positive Elektronendichte hervorgehoben.

$$\rho(x, y, z,) = \frac{1}{V} \sum_{hkl} \left(\left| F_{obs} \right| - \left| F_{calc} \right| \right) \cdot e^{-2\pi i (hx + ky + lz) + i\alpha_{calc}} \qquad \alpha_{calc} : Modellphasen$$

Elektronendichte:

2F_o-F_c-Karte: Das gesamte Strukturmodell wird gewichtet repräsentiert.

$$\rho(x, y, z,) = \frac{1}{V} \sum_{hkl} \left(2 \left| \mathcal{F}_{obs} \right| - \left| \mathcal{F}_{calc} \right| \right) \cdot e^{-2\pi i (hx + ky + lz) + i\alpha_{calc}}$$

Statistiken zur Datensammlung und Verfeinerung

Datensammlung	TK + X5P	TK + F6P	TK + R5P
Wellenlänge (Å)	0.8423 0.8423		1.5418
Röntgenquelle	BW7B EMBL Hamburg	BW7B EMBL Hamburg	Drehanode
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P212121	$P2_{1}2_{1}2_{1}$
Zelldimensionen			
a (Å)	90.14	90.21	89.97
b (Å)	101.95	101.86	101.74
c (Å)	133.26	133.35	132.86
Auflösung (Å) (äußerste Auflösungsschale) (Å)	1.47 (1.49–1.47)	1.65 (1.67–1.65)	1.60 (1.69–1.60)
R _{merge}	0.067 (0.318)	0.083 (0.535)	0.109 (0.66)
Ι/σ(<i>I</i>)	36.8 (8.1)	29.8 (6.1)	18.7 (3.8)
Vollständigkeit (%)	99.8 (99.2)	99.5 (98.0)	99.3 (97.5)
Redundanz	11.3	7.2	12.7
B-Faktor aus Wilson-Plot (Ų)	9.7	10.9	16.7
Verfeinerung			
Auflösung (Å)	27.14–1.47	39.87–1.65	80.85–1.60
(äußerste Auflösungsschale) (Å)	(1.51–1.47)	(1.69–1.65)	(1.64–1.60)
Reflexe (<i>work/test set</i>)	205 708 / 2094	144 818 / 2182	151 746 / 8028
R _{work}	0.150	0.156	0.163
R _{free}	0.164	0.179	0.196
Atome	11582	11278	12009
Protein	10251	10201	10235
Liganden	126	122	146
Wasser	1205	955	1628
Durchschn. B-Faktoren			
Protein	7.9	7.7	10.5
ThDP	8.4	8.4	13.0
Zucker	X5P: 11.9	F6P: 15.7	R5P: 11.7
1,2-Ethandiol	18.3	17.5	22.0
Wasser	18.3	14.7	23.4
R.m.s-Abweichung			
Bindungslängen (Å)	0.008	0.010	0.010
Bindungswinkel (°)	1.280	1.348	1.230
Ramachandran Plot (%)			
favorisiert	90.0	90.0	90.0
erlaubt	10.0	10.0	10.0
großzugig erlaubt	0.0	0.0	0.0
nicht enaubt	0.0	0.0	0.0

Bei den nachfolgenden Strukturen der Holoenzymkomplexe der TK und TK-Varianten handelt es sich um vorläufige Modelle, welche für die Proteinketten und den Cofaktor angepasst sind, jedoch die abschließende Interpretation der Wasser- und Ethylenglycolmoleküle noch aussteht.

Datensammlung	TK / N3´- Pyridyl ThDP	Glu ⁴¹¹ Ala	His ⁴⁷³ Ala	Doppelvariante
Wollonlänge (Å)	1 5/19	1 5419	1 5419	1 5419
Röntgonguollo	Drobanodo	Drobanodo	Drobanodo	Drobanodo
Poumaruppo				
Zalldimonoionon	FZ12121	FZ12121	FZ12121	FZ12121
	00.01	00.07	00.26	90.25
a (A) b (Å)	09.01	90.27	90.26	09.20
D (A)	101.01	101.54	101.54	101.91
C (A)	132.82	133.22	133.52	133.04
Auflosung (A) (äußerste	1.90	2.00	2.25	1.80
Auflösungsschale) (Å)	(1.97-1.90)	(2.07-2.00)	(2.33-2.25)	(1.86-1.80)
R _{merge}	0.13 (0.53)	0.14 (0.43)	0.11 (0.47)	0.09 (0.17)
Ι / σΙ	6.5 (2.4)	7.0 (2.6)	13.1 (3.6)	13.5 (7.1)
Vollständigkeit (%)	99.4 (91.3)	98.8 (98.0)	98.08 (97.0)	99.7 (99.9)
Redundanz	3.2 (2.8)	3.1 (2.7)	6.3 (5.3)	5.4 (5.2)
Verfeinerung				
(äußerste	80.85 - 1.93	80.85 - 2.00	80.85 - 2.30	30.00 - 1.80
Àuflösungsschale) (Å)	(1.99 – 1.94)	(2.05 – 2.00)	(2.36 – 2.30)	(1.85 – 1.80)
Reflexe (work/test set)	86349	82278	51364	107534
R _{work}	0.196	0.164	0.173	0.148
R _{free}	0.243	0.213	0.259	0.183
Atome				
Protein	10181	10223	10181	10333
Cofaktor	52	52	52	52
Wasser	412	811	412	1449
Durchs. B-Faktoren				
Protein	22.51	13.24	22.51	11.39
Cofaktor	23.27	14.06	23.27	14.05
Wasser	21.72	17.72	21.72	13.04
R.m.s Abweichung				
Bindungslänge (Å)	0.019	0.017	0.027	0.012
Bindungswinkel (°)	1.64	1.58	2.16	1.28
Ramachandran Plot (%)				
bevorzugt	89.5	89.7	88.4	89.7
erlaubt	10.5	10.3	11.6	10.3
großzügig erlaubt	0	0	0	0
nicht erlaubt	0	0	0	0
Isothermale Titrationskalorimetrie

Anhand von Gleichung 2.12 wurde aus den integrierten Peakintensitäten ein K_A -Wert bestimmt; der K_D -Wert von R5P beträgt 0,714 mM.



Abb. 6.5 ITC-Messung zur Bestimmung des K_A-Werts für R5P in Transketolase A (TK). <u>Links:</u> Energieänderungen jeweils nach Injektion von 10 μ I R5P-Lösung (25 mM R5P in 50 mM Gly-Gly-Puffer, 1 mM ThDP, 5 mM CaCl₂, pH 7,9) zu Holoenzym (100 μ M TK; 1 mM ThDP; 5 mM CaCl₂; 50 mM Gly-Gly-Puffer, pH 7,9). <u>Rechts:</u> Auftragung der integrierten Peakintensitäten gegen das Verhältnis von Ligand zu aktiven Zentren der TK und dem Fit nach einem *one-site-binding*-Modell (Gl. 2.12).

Circulardichroismus



Abb. 6.6 Aktive-Zentren-Titration am Beispiel der Zugabe von ThDP zum Wildtypenzym der Transketolase A. Experimentelle Bedingungen wie in Abb. 3.41 beschrieben.



Gekoppelt optischer Test nach KOCHETOV (1982)

Abb. 6.7 Primär- und Sekundärplots zur Bestimmung der enzymkinetischen Parameter am Beispiel des Wildtypenzyms der Transketolase A (TK). Für die Varianten wurden dieselben Auftragungen durchgeführt. Alle enzymkinetischen Parameter sind in Tab. 3.4 zusammengefasst.

GC/MS-Untersuchungen



Abb. 6.8 Elutionsprofile der GC/MS-Untersuchungen der Kontrollsubstanzen. Die m/z-Spektren der dominanten Peaks von β-HPA in H₂O (links), Erythrulose in H₂O (mitte) und Gly-Gly-Puffer bei pH 7,6 (rechts) sind in der unteren Reihe abgebildet.



Abb. 6.9 Optimierte Strukturmodelle für das C5-Thiazoliumsystem. <u>Links</u>: Partielle Optimierung mit Vorgabe der experimentell beobachteten Winkel für die C2-C2 α -Bindung und der Winkel des kovalent gebundenen Zuckerrests. Die dabei beobachtete Bindungslänge für die C2 α -C3-Bindung ist gekennzeichnet. <u>Rechts</u>: Vollständig optimiertes Modell mit Angabe der C2 α -C3-Bindunglänge sowie dem von der Planarität abweichenden Auslenkungswinkel der C2-C2 α -Bindung von etwa 9°.

DANKESWORTE

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei denjenigen bedanken, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Bei Herrn Professor Dr. Gerhard Hübner bedanke ich mich, dass er mir die Gelegenheit zur Bearbeitung des Themas in seiner Arbeitsgruppe gab. Die Diskussionen und kritischen Anmerkungen zu bestimmten Phasierungen sowie sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit führten nicht zuletzt zur Aufklärung der Punktmutation und zur Interpretation der kinetischen Daten.

Herrn Juniorprofessor Dr. Kai Tittmann danke ich recht herzlich für die ¹H-NMRspektroskopischen Messungen, durch welche ein Einblick in die mikroskopischen Schritte der Transketolase ermöglicht wurde. Zudem waren die vielfältigen Diskussionen zu den Strukturen, den Intermediaten und den CD-Banden stets eine Bereicherung, welche zu neuen Denkanstößen anregten.

Bei Herrn PD Dr. Ralph Golbik bedanke ich mich ebenso recht herzlich für die intensive Zusammenarbeit der letzten Jahre, der Vielzahl an privaten und fachlichen Gesprächen sowie der begleitenden Schritte auf den Gebieten der spektroskopischen Methoden und der Chemie. Zudem danke ich ihm und Herrn Dr. Holger Neef für die Bereitstellung der Cofaktoranaloga, welche die Untersuchungen zur 1´,4´-iminotautomeren Form von ThDP erlaubten.

Herrn Professor Dr. Georg Sprenger danke ich für die Überlassung des Plasmids pGSJ427, aus welchem die Generierung der Gene für das Wildtypenzym und die Varianten erfolgte.

Den Doktoren Georg Wille und Christoph Parthier danke ich für die Einführung in die Methode der Röntgenkristallstrukturanalyse und ihr Engagement bei den Kristallstrukturen der Donor- und Akzeptorsubstrate. Besonders danke ich Christoph auch für die vielen Gespräche und Stunden im "Generatorraum" bei den Aufnahmen einer Vielzahl von Datensätzen. Diesbezüglich möchte ich ebenso Professor Dr. Milton T. Stubbs meinen Dank für den unkomplizierten Zugang und die Nutzung der Gerätschaften aussprechen.

Herrn PD Dr. Rudolf Friedemann danke ich für die Durchführung der DFT-Berechnungen bezüglich der gespannten Strukturen der Donorintermediate, welche die mittels Röntgenkristallographie beobachteten Daten quantenchemisch bestätigten.

Herrn Dr. Martin Kleinschmidt danke ich für die ITC-Messung zum R5P-Enzymkomplex.

Der Arbeitsgruppe "Enzymologie" danke ich für das angenehme Arbeitsklima und die ständige Diskussionsbereitschaft, vor allem zu Fragen, Tipps und Tricks rund um den Laboralltag. Diesbezüglich möchte ich mich auch bei Frau Johanna Brauer bedanken, durch welche ein unkompliziertes Arbeiten im Labor ermöglicht wurde.

Mein besonderer Dank gilt Frau Diplom-Biochemikerin Manuela Knape. Du warst mir in allen Lebenslagen stets eine große Stütze und brachtest mich auf andere Gedanken, um "die Dinge auch mal aus einer anderen Perspektive zu betrachten". Auch meiner Familie und meinen Freunden gilt dieser besondere Dank für Ihre Art der persönlichen Unterstützung und für die Ablenkungen vom Laboralltag.

Die Durchführung der Promotion wäre nicht ohne die Unterstützung der Degussa-Stiftung und der Graduiertenförderung des Landes Sachsen-Anhalt möglich gewesen. Deshalb bedanke ich mich recht herzlich bei den Stipendiengebern für ihre finanzielle und ideelle Hilfe.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

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

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Peter Asztalos

LEBENSLAUF

Persönliche Angaben

Name:	Peter Asztalos
Geburtsdatum, -ort:	18.08.1978, Halle (Saale)
Familienstand:	ledig
Anschrift:	Am Jägerplatz 8
	06108 Halle/Saale
Email:	peter.asztalos@biochemtech.uni-halle.de
Telefon:	0177-8773598

Schulbildung

1989	Polytechnische	Oberschule	"Otto-Gotsche"	in
	Wippra/Harz			
1989 – 1991	Polytechnische	Oberschule	"August-Bebel"	in
	Lutherstadt Witte	enberg		
1991 – 1997	Gymnasium "Pł	nilipp-Melanch	thon" in Lutherst	adt
	Wittenberg, Abs	chluss: Abitur		

Bundeswehr

Universitäre Ausbildung

1998 – 2002	Biochemiestudium an der Martin-Luther-Universität
	Halle-Wittenberg
2002	mündliche Diplomprüfungen
2002 - 2003	Anfertigung der Diplomarbeit
	Abschluss: Diplom (Note: sehr gut)
seit 10/2003	Promotion zum Thema: "Untersuchungen zu
	molekularen, strukturellen und biokatalytischen
	Aspekten des Vitamin B1-abhängigen Enzyms
	Transketolase A aus Escherichia coli " am Institut für
	Biochemie und Biotechnologie/Abteilung Enzymologie
	der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg unter
	Leitung von Prof. Dr. Gerhard Hübner
Weitere Angaben	
07-10/2001	vierteljährlicher Aufenthalt in Australien (Sprachreise)

Stipendien

10/2003 -12/2005	Promotionsstipendium der Graduiertenförderung
	des Landes Sachsen-Anhalt
seit 01/2006	Promotionsstipendium der Degussa-Stiftung