

Beziehungen zwischen Struktur und Funktion Thiamindiphosphat-abhängiger Enzyme

## **H a b i l i t a t i o n s s c h r i f t**

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium habitatus (Dr. rer. nat. habil.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Herrn Dr. rer. nat. Stephan König

geboren am 29. 03. 1956 in Markneukirchen

Gutachter

1. Prof. Dr. rer. nat. habil. Gregor Damaschun

2. Prof. Dr. rer. nat. habil. Georg E. Schulz

3. Prof. Dr. Milton T. Stubbs

Tag der Verteidigung

27. April 2005

**urn:nbn:de:gbv:3-000008637**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000008637>]

*Der vernünftige Mensch passt sich der Welt an,  
der unvernünftige besteht auf dem Versuch,  
die Welt sich anzupassen.*

*Deshalb hängt aller Fortschritt vom unvernünftigen Menschen ab.*

*nach George Bernard Shaw*

## Inhaltsverzeichnis

Vorwort	4
Einleitung	5
Substrataktivierung von Pyruvatdecarboxylasen	8
Effekte von Liganden auf Struktur und Funktion Thiamindiphosphat-abhängiger Enzyme	19
Zusammenfassung	27
Zitierte Literaturquellen	30
Eigene zitierte Publikationen	37
Danksagung	39
Lebenslauf einschließlich Publikationslisten	43
Erklärung	52

## **Vorwort**

In dieser Habilitationsschrift werden experimentelle Ergebnisse zu dem im Titel umrissenen Themenkreis zusammenfassend dargestellt. Obwohl aus separaten funktionellen und strukturellen Studien hervorgegangen, wird der Versuch unternommen, die Einzelresultate unter dem Aspekt der funktionellen Dynamik von Proteinen, hier im speziellen von Thiamindiphosphat-abhängigen Enzymen, im Zusammenhang zu diskutieren. Zu diesem Zweck werden funktionelle Effekte in strukturelle Studien, die sowohl mit den Methoden der Proteinkristallographie (PX) als auch der Röntgenkleinwinkelstreuung mit Synchrotronstrahlung in Lösung (SAXS) durchgeführt worden sind, einbezogen. Ein Vergleich der aus den beiden Strukturaufklärungsmethoden erhaltenen Modelle sollte dabei die Nachteile beider Methoden relativieren, um so zu möglichst objektiven Aussagen zu gelangen.

Eigene hier zitierte Publikationen werden im Text mit Zahlen nachgewiesen und sind chronologisch geordnet. Originalarbeiten anderer Autoren werden im Text namentlich angegeben und sind alphabetisch geordnet.

Die zugrunde liegenden experimentellen Arbeiten wurden entweder von mir selbst oder im Rahmen von Diplom- und Doktorarbeiten durchgeführt, an deren Betreuung ich beteiligt gewesen bin, und umfassen den Zeitraum 1992-2003.

## Einleitung

Die Gewährleistung der Funktion von Enzymen im Organismus bedarf auf der einen Seite einer gewissen Starrheit der Struktur ihrer Proteinkomponente, um die jeweiligen spezifischen chemischen Reaktionen unter energetisch günstigen Bedingungen ablaufen lassen zu können. Andererseits ist eine gewisse Mobilität der Proteinkomponente Voraussetzung für die Bindung von Liganden und die Freisetzung von Produkten der katalysierten Reaktion. Funktion und Struktur eines Makromoleküls sind ursächlich miteinander verbunden. Ähnliche Funktionen können aber auch durch ganz unterschiedliche Strukturen bzw. verschiedene Funktionen durch einander ähnliche Strukturen realisiert werden. Die Funktion von Enzymen ist immer an eine strukturelle Dynamik der Makromoleküle gekoppelt. Durch die Bindung von Liganden sind Strukturänderungen auf verschiedenen Ebenen möglich. Neben der hohen Flexibilität von *loop*-Regionen werden auch Bewegungen ganzer Domänen beobachtet. Die Änderung äußerer Bedingungen kann bei oligomeren Enzymen auch die Wechselwirkungen zwischen den Untereinheiten bzw. deren Assoziationsgrad beeinflussen.

Im Mittelpunkt der hier dargestellten Ergebnisse stehen funktionsbedingte Strukturänderungen der Proteinkomponenten verschiedener Thiamindiphosphat-abhängiger Enzyme auf allen oben erwähnten Ebenen, verursacht durch die Wechselwirkung mit niedermolekularen, nichtproteinogenen Liganden, unter denen im folgenden vorwiegend Substrate, Kofaktoren, Aktivatoren und Inhibitoren verstanden werden. Alle hier untersuchten Thiamindiphosphat-abhängigen Enzyme besitzen eine oligomere Quartärstruktur aus zwei bis acht meist identischen Untereinheiten.

In dieser Arbeit wird der Versuch unternommen, eigene und von anderen Autoren veröffentlichte Ergebnisse zu funktionellen Aspekten der Katalyse und Regulation Thiamindiphosphat-abhängiger Enzyme strukturell zu unterlegen, um auf diese Weise Struktur-Funktionsbeziehungen abzuleiten. Den Effekten verschiedener Liganden, wie denen von Substraten, vom Kofaktor Thiamindiphosphat bzw. davon abgeleiteten synthetischen Derivaten und des pH-Wertes auf die Tertiär- und Quartärstruktur solcher Enzyme, wird das Phänomen der Substrataktivierung von Pyruvatdecarboxylasen, das sowohl aus funktioneller als auch aus struktureller Sicht eine besonders interessante Form der allosterischen Kooperativität verkörpert, in der Abhandlung gegenübergestellt.

Grundlegende Ideen zur Induktion von allosterischen Wechselwirkungen durch Ligandenbindung, das heißt, der indirekten Vermittlung von Wechselwirkungen von Liganden über den Raum durch die Flexibilität der Proteinkomponente, sind in den alternativen Vorschlägen eines konzertierten Modells von Monod *et al.* (1965) und dem *induced-fit*-Modell von Koshland *et al.* (1966) dargelegt. Die definitiv festgelegten Eigenschaften beider Modelle beschränken deren Aussagekraft bei der Analyse von experimentellen Daten allosterischer Systeme. Im Falle des Monod-Modells ist das vor allem die Symmetriebedingung und die damit in Zusammenhang stehende wechselnde Affinität der Liganden. Dem steht die progressive Änderung der Ligandenwechselwirkung im Koshland-Modell gegenüber. Ein wesentlich allgemeineres Modell für allosterische Enzyme wurde 1992 von Ackers *et al.* präsentiert. Obwohl auch hier im wesentlichen nur zwei verschiedene Quartärstrukturen existieren, werden die Bindungsaffinitäten der Liganden durch einen hierarchischen Code von Tertiär-Quartär-Strukturübergängen beschrieben, in denen die beiden klassischen allosterischen Modelle aufgehen. Während Ackers *et al.* und Koshland *et al.* ihre Modelle ausschließlich auf Hämoglobinspezies anwendeten, beschrieben Monod *et al.* die Eigenschaften einer ganzen Reihe von allosterischen Enzymen. Die Anwendbarkeit der verschiedenen Modellvorstellungen auf das Phänomen der Substrataktivierung von Pyruvatdecarboxylasen wird diskutiert.

Die funktionsbeschreibenden Experimente umfassen vor allem kinetische und spektroskopische Studien im UV/Vis-Bereich, zum Teil mit *stopped-flow*-Technik. Bei den Experimenten zur strukturellen Charakterisierung von Enzymen konnte auf eine langjährige wissenschaftliche Zusammenarbeit mit der Gruppe „Nichtkristalline Systeme“ (NCS) der Außenstelle des Europäischen Molekularbiologischen Laboratoriums (EMBL) in Hamburg c/o Desy unter Leitung von Dr. Michel H. J. Koch und PD Dr. Dmitri I. Svergun bei der Durchführung der Experimente mit Röntgenkleinwinkelstreuung mit Synchrotronstrahlung (SAXS) und der Arbeitsgruppe von Prof. Gunter Schneider in der Abteilung Molekulare und Strukturelle Biologie des Bereiches Medizinische Biochemie & Biophysik am Karolinska Institut Stockholm (vor 1995 am Biomedizinischen Zentrum Uppsala) bei den Röntgenkristallstrukturanalysen (PX) verschiedener Enzyme zurückgegriffen werden.

Die Anzucht, Reinigung und grundlegende proteinchemische Charakterisierung der hier beschriebenen Enzyme wurde mit eigenen Mitteln in unseren Laboratorien realisiert und ist in den jeweiligen Originalarbeiten beschrieben. Auf diese Experimente wird im Rahmen dieser Arbeit nicht eingegangen. Rekombinante Wild- und Mutantenstämme bzw. entsprechende

Plasmide wurden uns von Ines Eberhardt (Universität Gent, Belgien), Dr. Stefan Hohmann (Universität Göteborg, Schweden), Prof. Ron G. Duggleby (Queensland Universität Brisbane, Australien), PD Dr. Martina Pohl (Universität Düsseldorf), Dr. Jinichiro Koga (Meiji Seika Kaisha Ltd., Sakado, Japan), Prof. Gunter Schneider (Karolinska Institut Stockholm, Schweden) und Prof. Rainer Rudolph (Institut für Biotechnologie) zur Verfügung gestellt.

Struktur-Funktionsbeziehungen folgender Enzyme werden beschrieben:

Pyruvatdecarboxylasen aus *Saccharomyces cerevisiae* (Brauhefe, Brauhefestamm sowie rekombinanter Wildtyp und einige Varianten, ScPDC<sup>1</sup>),

Pyruvatdecarboxylase aus keimenden Erbsensamen (*Pisum sativum* cv. Miko, PsPDC),

Pyruvatdecarboxylase aus *Zymomonas mobilis* (rekombinanter Wildtyp, ZmPDC)

Pyruvatdecarboxylase aus *Kluyveromyces lactis* (KIPDC),

Indolpyruvatdecarboxylase aus *Enterobacter cloacae* (rekombinanter Wildtyp, EcIPDC),

Transketolase aus *Saccharomyces cerevisiae* (rekombinanter Wildtyp und einige Varianten, ScTK) und

Pyruvatoxidase aus *Lactobacillus plantarum* (rekombinanter Wildtyp, LpPOX).

---

<sup>1</sup> Wegen der nicht signifikanten funktionellen Unterschiede und bisher nicht bekannter struktureller Differenzen dieser Spezies werden diese im weiteren als ScPDC bezeichnet.

## Substrataktivierung von Pyruvatdecarboxylasen

### *Das Phänomen der Substrataktivierung*

Substrataktivierung als eine Form der positiven homotropen Kooperativität ist für kein anderes Enzym so eingehend untersucht worden wie für ScPDC. Dieses Phänomen wurde 1967 erstmals durch Davies beim Umsatz des Substrates Pyruvat beschrieben und konnte drei Jahre später durch mehrere Autoren bestätigt werden (Boiteux & Hess, 1970, Ullrich & Donner, 1970, Hübner *et al.*, 1970). Der für positive Kooperativität typische sigmoide Kurvenverlauf der Abhängigkeit der Katalysegeschwindigkeit von der Substratkonzentration (im weiteren als  $v/S$ -Plot bezeichnet) ist für das Enzym ScPDC erst bei Pyruvatkonzentrationen unterhalb der Halbsättigungskonzentration ( $S_{0.5}$ ) zu beobachten. Diese Tatsache erklärt vielleicht, warum fast 60 Jahre seit der ersten Charakterisierung des Enzyms durch Neuberg und Karczag (1911) vergehen mussten, bevor dieser Effekt entdeckt worden ist. Eine Besonderheit der Substrataktivierung von ScPDC ist der relativ langsame Verlauf. Dieser Umstand ermöglichte die kinetische Beschreibung dieses Prozesses auf der Grundlage von Experimenten mit schnellen Meßmethoden (Hübner *et al.*, 1978). Als strukturelle Ursache der Substrataktivierung wurden von den meisten Autoren Konformationsänderungen des Proteinmoleküls angenommen. Über das Ausmaß dieser Änderungen (ob nur das aktive Zentrum oder ganze Untereinheiten betreffend) gab es keine präzisen Aussagen. Ein aus diesen Studien abgeleiteter kinetischer Mechanismus für die Substrataktivierung enthält ebenfalls einen langsamen, sogenannten Isomerisierungsschritt (Hübner *et al.*, 1978, Alvarez *et al.*, 1991, Huhta *et al.*, 1992). Alvarez *et al.* und Sun *et al.* veröffentlichten 1995 die Hypothese, dass das aktive Zentrum von PDC durch eine Art ausschwingenden Deckel während der Katalyse vom umgebenden Medium abgeschirmt wird. Experimentelle Daten, die die dafür relevanten strukturellen Änderungen beschreiben, lagen bisher nicht vor. Durch Studien zur Aktivierung des Kofaktors Thiamindiphosphat in ScPDC konnte jedoch gezeigt werden, dass die Enzymaktivierung mit einer Erhöhung der Dissoziationsgeschwindigkeit der C2-H-Bindung des Kofaktors verbunden ist (Kern *et al.*, 1997).

### *Substrataktivierung bei anderen PDC-Spezies*

Die bisher erwähnten Studien wurden ausnahmslos an ScPDC durchgeführt. Interessant war nun die Fragestellung, inwieweit Pyruvatdecarboxylasen aus anderen Spezies ein vergleichbares Aktivierungsverhalten gegenüber ihrem nativen Substrat Pyruvat aufweisen. Untersu-



chungen an PDC aus einem Brauhefe-Reinzuchtstamm (Brauerei Wernesgrün), haploiden Stämmen mit Deletionen kompletter PDC-Strukturgene (5, Dörte Adolph, unveröffentlichte Ergebnisse) und dem rekombinanten Wildtyp von *Saccharomyces cerevisiae* in *Escherichia coli* ergaben keine signifikanten Unterschiede im Substrataktivierungsverhalten, weder in den entsprechenden v/S-Plots noch in den Progresskurven des Substratumsatzes (8).

Quantitative Unterschiede konnten zwischen ScPDC und PsPDC nachgewiesen werden (6). Die aus den Progresskurven berechnete Anfangsaktivität war im Falle der PsPDC mit 20-30 % der Umsatzgeschwindigkeit des aktivierten Enzyms deutlich detektierbar, während ScPDC dagegen als praktisch inaktive Spezies mit weniger als 5 % Anfangsaktivität vorliegt (Hübner & Schellenberger, 1986). Ein Zusammenhang mit der komplexeren Oligomerstruktur von PsPDC (Oktamer und höher) gegenüber dem Tetrameren der ScPDC ist denkbar, aber noch nicht nachgewiesen. Studien am rekombinanten Wildtyp von PsPDC erwiesen sich als unerwartet schwierig.

Eine umfassende Charakterisierung des Substrataktivierungsverhaltens gelang auch im Falle der PDC aus *Kluyveromyces lactis* (15). Aus den Messungen zur Substrataktivierung konnte ein Reaktionsmechanismus abgeleitet werden, der dem für ScPDC postulierten entspricht. Das spezielle Verhältnis der für KIPDC bestimmten Dissoziationskonstanten für die Substratbindung am katalytischen bzw. regulatorischen Zentrum und für die Isomerisierung der Proteinkomponente und die hohe Präzision der experimentellen Daten ermöglichten in diesem Fall zum ersten Mal den Nachweis eines Minimums im Plot der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten der Aktivierung gegen die Substratkonzentration. Bei allen bisher untersuchten PDC-Spezies wurde ein hyperboler Verlauf dieser Abhängigkeit angenommen (Hübner *et al.*, 1978, 6). Über strukturelle Hintergründe dieses Phänomens kann aufgrund der bisher fehlenden experimentellen Daten nur spekuliert werden.

Bisher ist nur eine einzige Pyruvatdecarboxylase beschrieben, die keiner Substrataktivierung unterliegt: PDC aus dem gram-negativen Bakterium *Zymomonas mobilis*. Bei diesem Organismus handelt es sich um einen obligaten Gärer mit einer ausgesprochen hohen Konzentration des Enzyms in der Zelle von bis zu 4 % der Gesamtmenge an löslichem Protein und einer katalytischen Aktivität, die das 3-4fache der PDC anderer Organismen erreicht (Bringer-Meyer *et al.*, 1986).

### ***Cystein und Substrataktivierung***

Bereits in früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Seitengruppen von Cysteinen eine gewisse funktionelle Bedeutung für die katalytische Aktivität von ScPDC besitzen (Schellenberger & Hübner, 1968, Brauner & Ullrich, 1972, Damerau *et al.*, 1976). Modifizierungsexperimente mit verschiedenen SH-Gruppen-spezifischen Reagenzien führten stets zu einer starken Erniedrigung der katalytischen Aktivität. Bei der Modifizierung mit 4-Hydroxymercuribenzoat (HMB) blieb allerdings eine Restaktivität von 5-10 % erhalten (Hübner *et al.*, 1988). Ein vergleichbares Ergebnis konnte durch Modifizierung mit dem Substratsurrogat 3-Brompyruvamid erzielt werden, allerdings bei erheblich höherem molaren Überschuss. HMB-modifizierte ScPDC zeichnete sich durch einen hyperbolen  $v/S$ -Plot und das Fehlen der für die Substrataktivierung typischen *lag*-Phase in der Produktbildung aus (Hübner *et al.*, 1988). Dieser durch die HMB-Modifizierung hervorgerufene Aktivierungseffekt war bei PsPDC und KIPDC weniger stark ausgeprägt als bei ScPDC (6, 15). Mit *stopped-flow*-Technik gelang es, die HMB-modifizierbaren SH-Gruppen kinetisch zu klassifizieren, das heißt, sie entsprechend ihrer Reaktivität in verschiedene Gruppen einzuteilen. Entsprechend der Nukleotidsequenz des am stärksten exprimierten Strukturgens *PDC1* (Hohmann & Cederberg, 1990) sind vier Cysteinreste pro Untereinheit vorhanden, maximal die Hälfte konnte durch HMB modifiziert werden.

Da keine vergleichenden Untersuchungen mit anderen SH-Gruppen-spezifischen Reagenzien durchgeführt wurden, kann ein sterischer Nebeneffekt der Modifizierung durch HMB nicht ausgeschlossen werden. Dieser sterische Einfluss konnte in Langzeitinaktivierungsexperimenten wahrscheinlich gemacht werden (12). Diese Studie zeigte, dass mit fortlaufender Inkubation die katalytische Aktivität parallel zur SH-Gruppenmodifizierbarkeit verloren ging, die Substrataktivierung aber davon völlig unbeeinflusst bis zum Ende der Inkubation erhalten blieb. Das ist als deutlicher Hinweis dafür zu werten, dass sterische Effekte eine größere Rolle bei der Aktivierung von ScPDC spielen als die kovalente Modifizierung der SH-Gruppen selbst.

Die Arbeitsgruppe um Prof. Frank Jordan (*Rutgers University Newark*) postulierte auf der Grundlage der oben erwähnten Ergebnisse zu Effekten der Cysteinmodifizierung von ScPDC eine Arbeitshypothese für einen direkten Signalübertragungsweg vom regulatorischen Zentrum, dem C221, zum aktiven Zentrum. Dieser Weg führt über die drei Aminosäureseitenketten E91, H92, W412 und Teile eines *loops* zum Thiamindiphosphat (TDP) und damit zum aktiven Zentrum des Enzyms. Zur Verifizierung dieser Hypothese wurden entsprechende Enzymvarianten hergestellt und kinetisch charakterisiert (Zeng *et al.*, 1993, Baburina *et al.*,

1994, 1996, 1998, Guo *et al.*, 1998, Li & Jordan, 1999, Li *et al.*, 1999, Wang *et al.*, 2001, Liu *et al.*, 2001, Sergienko & Jordan, 2001, 2002, Wei *et al.*, 2002). Ein eindeutiger Nachweis für die Richtigkeit der Hypothese konnte durch diese Studien nicht erbracht werden, da in den meisten Fällen nur  $v/S$ -Plots analysiert wurden, um die vollständige Beseitigung der Substrataktivierung durch die Aminosäureaustausche in den verschiedenen Varianten nachzuweisen. Die in einem Fall dokumentierten *lag*-Phasen in den Progresskurven (Wang *et al.*, 2001) wurden von den Autoren primär der *pre-steady-state*-Phase zugeschrieben, ohne allerdings Substrataktivierung als Ursache völlig auszuschließen.

### ***Fixierung inaktiver und aktiver Enzymformen von ScPDC***

Erste Versuche der Stabilisierung von verschiedenen Konformationszuständen von ScPDC (im Idealfall die völlig inaktive und die vollständig aktivierte Enzymform) wurden mit der Methode der Immobilisierung an festen Phasen, der sogenannten Trägerfixierung, unternommen (Nafe *et al.*, 1972, Beitz & Schellenberger, 1979, Beitz *et al.*, 1980). Ein Nachteil dieser Methode bestand, zumindest bei TDP-abhängigen Enzymen, im großen Aktivitätsverlust als Folge der Immobilisierung am Träger. Dieser Umstand erschwerte eine genaue Analyse der jeweiligen Zustände und verhinderte eine Charakterisierung mit anderen als kinetischen Methoden.

Es war deshalb in eigenen Arbeiten versucht worden, die verschiedenen Enzymformen in Lösung durch chemische Quervernetzung mit Bisimidoestern zu fixieren und kinetisch zu charakterisieren. Die Optimierung der Kettenlänge der verwendeten Bisimidate und der Inkubationsbedingungen führte schließlich zu der Möglichkeit, bei sehr niedrigen Ionenstärken und in Abwesenheit von Substrat einen völlig inaktiven Zustand und in Anwesenheit sehr hoher Substratkonzentrationen einen aktiven Zustand zu fixieren und kinetisch zu charakterisieren. Der Vorteil der Quervernetzung gegenüber der Immobilisierung am Träger lag in der hohen katalytischen Aktivität der aktivierten quervernetzten ScPDC von ca. 90 % der Ausgangsaktivität (König *et al.*, 1990). Eine analoge Fixierung eines aktivierten Zustandes in Gegenwart des künstlichen Aktivators Pyruvamid (Hübner *et al.*, 1978) gelang hingegen nicht. Die Vernetzung verlief unter den gewählten Bedingungen hauptsächlich intramolekular. Als primärer Angriffspunkt der Modifizierung wurden  $\epsilon$ -Aminogruppen von Lysinresten bestimmt (Schellenberger *et al.*, 1989). HMB-Modifizierungskinetiken der verschiedenen quervernetzten Enzymformen wiesen auf strukturelle Änderungen in der Umgebung der Cysteinreste

durch die Substrataktivierung hin, da sich die kinetische Klassifizierung der SH-Gruppen gegenüber dem nativen Zustand änderte.

### ***Struktureller Nachweis unterschiedlicher Enzymformen durch SAXS***

SAXS-Streudaten von Enzymproben, die in An- bzw. Abwesenheit des Aktivators Pyruvamid (PA) aufgenommen wurden, zeigten Unterschiede in ihren Streumassenradien ( $R_G$ ), die als eine Aufweitung des Enzymmoleküls interpretiert wurden (Hübner *et al.*, 1990). Die extrapolierte Streuintensität  $I(0)$  als Maß für die molekulare Masse des Enzyms blieb davon unbeeinflusst. Das heißt, die Quartärstruktur von ScPDC änderte sich durch die PA-Aktivierung nicht. Die Qualität der Streudaten konnte durch eine verbesserte Reinigungsprozedur für ScPDC erhöht werden. So war die Berechnung erster Strukturmodelle für diese Enzymspezies als *ab initio* Abschätzung der äußeren Molekülform bei Auflösungen von bis zu 2.5 nm möglich (Programm SASHA, Svergun *et al.*, 1996). ScPDC erschien so in seiner katalytisch aktiven Form als Dimer von Dimeren in einer tetrameren Quartärstruktur (1, König *et al.*, 1992, 1994). Der Vergleich dieser Enzymmodelle niedriger Auflösung mit der kurze Zeit später publizierten Kristallstruktur von ScPDC (Dyda *et al.*, 1993) bestätigte zum einen die Richtigkeit der Lösungsstrukturmodelle und bewies zum anderen die prinzipielle Anwendbarkeit der Programme zur Berechnung von dreidimensionalen Strukturmodellen aus SAXS-Daten (zu diesem Zeitpunkt SASHA). Ähnliche Lösungsstrukturmodelle niedriger Auflösung konnten aus Streudaten von PsPDC und ZmPDC berechnet werden (9). Interessant ist der Vergleich dieser Strukturmodelle mit denen von ScPDC. Während PsPDC als Oktamer mit sehr elongierter Form (Linearkombination von Tetrameren) und ScPDC als relativ abgeflachter Ellipsoid beschrieben werden konnten, ergab sich aus den ZmPDC-Daten ein kugelähnliches, sehr kompaktes Modell mit dem kleinsten Streumassenradius aller untersuchten tetrameren PDC-Spezies.

Fasst man die strukturellen Hinweise für die Substrataktivierung aus den Modellrechnungen der SAXS-Daten bis zu diesem Zeitpunkt zusammen, so ergibt sich der scheinbare Widerspruch, dass zum einen die Aktivierung von ScPDC mit Pyruvamid zu einer Volumenvergrößerung führt, andererseits ZmPDC, die keiner Substrataktivierung unterliegt, eine kompaktere Tetramerstruktur besitzt als ScPDC. Inwieweit der höhere Oligomerisierungsgrad von PsPDC zu den beschriebenen Unterschieden in der Anfangsaktivität führt, bleibt zu klären.

### ***Kristallstrukturmodelle von ZmPDC und PA-aktivierter ScPDC (PA-ScPDC)***

Die entscheidenden Informationen über die strukturellen Grundlagen der Substrataktivierung erbrachten Arbeiten zur Aufklärung der Kristallstrukturen von ZmPDC (10) und PA-ScPDC (7, 12). Ausgehend vom Kristallstrukturmodell der nativen (also inaktiven) ScPDC von Dyda *et al.* (1993) lässt sich der strukturelle Aspekt der Substrataktivierung folgendermaßen beschreiben. Die Sekundärstrukturen von PA-ScPDC und ScPDC sind identisch. Die Monomere bestehen aus 3 Domänen (N-terminale PYR-, mittlere R- und C-terminale PP-Domäne<sup>2</sup>). Die Superposition der Ketten der C $\alpha$ -Atome nativer und PA-aktivierter ScPDC zeigt ein hohes Maß an Übereinstimmung für die PYR- bzw. PP-Domäne und signifikante Abweichungen für die mittlere R-Domäne, in der sich auch C221 befindet.

Trotz der geringen Sequenzidentität von etwa 28 % zwischen den Strukturgenen von ZmPDC (Code P06672) und ScPDC (Code P06169) besteht eine erstaunlich hohe Ähnlichkeit der Tertiärstrukturen beider Enzyme (10). Die Anzahl der Sekundärstrukturelemente ist in ZmPDC etwas höher. Wiederum treten die größten strukturellen Unterschiede in der R-Domäne auf. Aufgrund der Symmetrieverhältnisse überträgt sich die hohe Ähnlichkeit zwischen den drei Kristallstrukturen auch auf die Dimerebene. Die Bindungsverhältnisse für die beiden Kofaktoren Thiamindiphosphat und Magnesium-(II)-Ion im aktiven Zentrum von ScPDC und ZmPDC sind nahezu gleich, da 20 der 28 Aminosäureseitenketten in unmittelbarer Nähe der Kofaktoren identisch sind. In allen Fällen sind Aminosäureseitenketten beider Untereinheiten eines Dimers an der Kofaktorbindung beteiligt, was nach Ansicht von Perutz (1990) einen Selektionsvorteil gegenüber oligomeren Enzymen darstellt, bei denen nur Reste einer Untereinheit den Kofaktor binden. Der Hauptunterschied zwischen den Kristallstrukturen von ScPDC, PA-ScPDC und ZmPDC manifestiert sich erst auf der Ebene ihrer Quartärstrukturen im katalytisch aktiven Tetramer. ScPDC und ZmPDC zeichnen sich durch eine Pseudo-222-Symmetrie aus. Die relative Orientierung der Dimeren zueinander ist aber unterschiedlich. Während die Dimeren in nativer ScPDC im Prinzip planar zueinander angeordnet sind, stehen sie in ZmPDC fast rechtwinklig (78°) aufeinander (10). Daraus resultieren große Unterschiede in den Kontaktflächen der Dimeren. Sie sind im Tetramer von ZmPDC dreimal so groß wie in ScPDC.

---

<sup>2</sup> Diese Nomenklatur wurde von Muller *et al.* (1993) eingeführt und bezeichnet den Anteil der drei Domänen an der Bindung des Kofaktors TDP über den PYRimidin- und den DiPhosPhatrest bzw. an der Bindung des Aktivators im Regulatorischen Zentrum.

Diese strukturellen Unterschiede werden neben der Tatsache, dass es sich bei ZmPDC um die einzige bisher bekannte PDC handelt, die nicht durch ihr Substrat aktiviert wird, auch in anderen funktionellen Unterschieden zwischen beiden Spezies widerspiegelt. Im Falle von ZmPDC konnte keine pH-abhängige Dissoziation der Oligomerstruktur gefunden werden, wie sie typisch für alle anderen Pyruvatdecarboxylasen ist (siehe Teil 2 dieser Arbeit). Die Stabilität wässriger Enzymlösungen ist für ZmPDC (Pohl *et al.*, 1995, Ronja Tasler, unveröffentlichte Ergebnisse) - ähnlich wie für PsPDC - wesentlich höher als für ScPDC (3). Die Kristallstrukturen von ZmPDC und ScPDC bestätigten auch die bereits früher veröffentlichten SAXS-Modelle niedriger Auflösung dieser Enzyme in Lösung (9, König, 1998).

Die Dimerorientierung im Tetramer der Kristallstruktur von PA-ScPDC liegt zwischen der von ScPDC und ZmPDC. Die für diese beiden Spezies in der Kristallstruktur gefundene charakteristische Pseudo-222-Symmetrie geht durch die Pyruvamidbindung verloren. Die Dimere werden um 30° gegeneinander verdreht, was zumindest auf einer Seite des Moleküls neue Dimer-Dimer-Wechselwirkungen induziert, die zu einer Strukturierung von zwei *loop*-Regionen (Aminosäurereste 104-113 und 290-304) führen, die im Kristallstrukturmodell von ScPDC ungeordnet vorliegen. Diese beiden *loop*-Regionen verschließen nun im Tetramer zwei der vier aktiven Zentren, die in ScPDC relativ offen gegenüber dem äußeren Milieu erscheinen.

Interessanterweise wurden nur in den Untereinheiten mit geschlossenen aktiven Zentren am Protein gebundene Aktivator-moleküle gefunden. Eines konnte im aktiven Zentrum ganz in der Nähe des Substratbindungsortes, dem C2-Atom von TDP, in Wasserstoffbrückenabstand zu H115, D28 und E477 detektiert werden. Diese drei Aminosäurereste sollten damit auch die entscheidende Rolle bei der Bindung und katalytischen Umsetzung des Substrates im aktiven Zentrum spielen. Das konnte durch Charakterisierung der entsprechenden Proteinvarianten (Wu *et al.*, 2001, Huang *et al.*, 2001, Liu *et al.*, 2001, Sergienko & Jordan, 2001, Ronja Tasler, unveröffentlichte Ergebnisse) bzw. durch Intermediatanalysen mit Hilfe von <sup>1</sup>H-NMR (Tittmann *et al.*, 2003) wahrscheinlich gemacht werden. Ein weiteres Molekül Pyruvamid befindet sich in einer Spalte zwischen R- und PYR-Domäne und dem die beiden Domänen verbindenden *loop* in Wasserstoffbrückenabstand zu Y157 und dem Hauptketten-Sauerstoff von R224. Der Abstand zum Aminosäurerest C221, dem durch die Arbeitsgruppe Jordan postulierten regulatorischen Zentrum, beträgt 10 Å (12). Die Bindung dieses zweiten Aktivator-moleküls stabilisiert die gegenseitige Orientierung der R- und PYR-Domäne zueinander

und führt somit zu den lokalen Konformationsänderungen, die die globale Änderung der Tertiärstruktur von PA-ScPDC im Zuge der Substrataktivierung bewirken.

Die fehlende Bindung von Pyruvamid direkt am postulierten regulatorischen Zentrum C221 steht zunächst nicht in Einklang mit unseren Ergebnissen zur HMB-Modifizierung von SH-Gruppen (Hübner *et al.*, 1988). Die strukturellen Verhältnisse legen aber nahe, dass ein an C221 gebundenes HMB-Molekül eine ähnliche gegenseitige Stabilisierung der R- und PYR-Domäne hervorruft, wie das in räumlicher Nähe, etwas tiefer in der Spalte zwischen den beiden Domänen gebundene Molekül Pyruvamid. Somit könnte die Bindung beider Liganden ähnliche strukturelle Änderungen im Prozess der Substrataktivierung bewirken.

Im Zusammenhang mit Studien zur Autoregulation der Expression der Strukturgene von ScPDC (Hohmann & Cederberg, 1990) wurden auch Mutantenallemle und Suppressormutanten untersucht (Eberhardt *et al.*, 1999). In drei Fällen wurden Proteine mit den für native ScPDC typischen molekularen Massen der Untereinheiten exprimiert. Diese ScPDC-Varianten besaßen nur noch eine sehr geringe katalytische Aktivität. Die Sequenzanalyse der Strukturgene zeigte, dass sich die Mutationen in zwei Varianten in einer der *loop*-Regionen befinden, die für die Substrataktivierung entscheidend sind.

Begründet durch die unterschiedliche Dimeranordnung im Tetramer von ScPDC und ZmPDC, verschließt eine C-terminale Helix das aktive Zentrum von ZmPDC gegenüber dem umgebenden Medium. Eine analoge Helixstruktur liegt auch in ScPDC vor, sie umfasst allerdings nur halb so viele Aminosäurereste. Wechselwirkungen zwischen den Untereinheiten sind für ein Öffnen und Schließen des aktiven Zentrums bei ZmPDC - im Gegensatz zu ScPDC - wahrscheinlich nicht nötig. Auch aus entsprechenden SAXS-Studien (9) gibt es keine Hinweise auf spezifische Untereinheitswechselwirkungen während der Katalyse. Es genügt hier wahrscheinlich das Ausschwingen der C-terminalen Helix, um das katalytische Zentrum zu öffnen und zu schließen. Die Charakterisierung von ZmPDC-Varianten mit schrittweiser Deletion von Aminosäureresten des C-Terminus bestätigte die Bedeutung der C-terminalen Helix erstmals auch funktionell (Chang *et al.*, 2000).

Auch mit dem vorhandenen umfangreichen Material zur Struktur von nativer (und damit praktisch inaktiver) und PA-aktivierter ScPDC auf der einen Seite und nicht-substrataktivierbarer ZmPDC auf der anderen Seite bleiben noch Fragen zur Korrelation von Struktur und Funktion während der Substrataktivierung offen. Die entscheidende ist, ob die Kristallstruktur

von PA-ScPDC die einzig mögliche Struktur eines aktivierten Enzyms repräsentiert oder ob es eine von mehreren möglichen teilweise oder vollständig aktivierten Enzymformen ist. Genaue quantitative Analysen der Aktivierungskinetiken in Gegenwart hoher Pyruvamidkonzentrationen (bis 400 mM), die mit KIPDC durchgeführt worden sind, zeigten, dass dieses Substratsurrogat nicht in der Lage ist, das Enzym vollständig zu aktivieren (15). Die Progresskurven des Substratumsatzes wiesen alle Anfangsanstiege auf, die deutlich unter 100 % lagen. Es gelang ebenso wenig, eine aktivierte Enzymform von ScPDC durch Quervernetzung in Gegenwart des Aktivators Pyruvamid zu fixieren (König *et al.*, 1990). Die Kristallisation von ScPDC in Gegenwart des Substrates Pyruvat schlug aufgrund der hohen Reaktivität des sich anhäufenden Reaktionsproduktes Acetaldehyd fehl. Die Kristallstruktur des Komplexes aus ScPDC und dem Aktivator Ketomalonat mit einer Auflösung von 3.5 Å (Furey *et al.*, 1996) ist in bezug auf die Dimeranordnung im Tetramer der Kristallstruktur von PA-ScPDC sehr ähnlich. Das deutet darauf hin, dass die veränderte gegenseitige Dimerorientierung im aktivierten Tetramer gegenüber der planaren Anordnung im inaktiven Tetramer ein signifikantes Merkmal aktivierter PDC-Formen ist.

### ***Vergleich von Lösungs- und Kristallstrukturmodellen***

Die Kristallstrukturen von Proteinen können direkt als Vorlage für die Berechnung von Strukturmodellen der gleichen Proteine in Lösung auf der Grundlage experimenteller SAXS-Daten genutzt werden. Ein Paket von Auswerteprogrammen unter dem Namen MASSHA (Konarev *et al.*, 2001) realisiert ein sogenanntes *rigid body refinement* über Translations- und Rotationsbewegungen von Halbmolekülen als starre Körper um eine der Symmetrieachsen, um so die Unterschiede zwischen den experimentellen SAXS-Daten und den aus dem Kristallstrukturmodell generierten Streudaten zu minimieren. Mit diesen Mitteln ist ein Vergleich von Lösungs- und Kristallstruktur eines Makromoleküls möglich (11). Darüber hinaus kann auf dieser Grundlage aber auch der Einfluss von Liganden auf die Proteinkonformation in Lösung untersucht werden, wie das zum Beispiel für den Aktivator Pyruvamid geschehen ist (König *et al.*, 2003). Wie bereits erwähnt, ergeben sich aus den Streukurven von ScPDC in An- bzw. Abwesenheit von Pyruvamid signifikante Unterschiede im Streumassenradius (Hübner *et al.*, 1990). Es sind in den entsprechenden Streukurven auch Unterschiede bei höheren Streuwinkeln zu erkennen, die auf deutliche Änderungen intramolekularer Wechselwirkungen während der PA-Aktivierung hinweisen. Die Anwendung der Verfeinerungsprozedur des Programmpaketes MASSHA auf diese experimentellen Daten mit der Kristallstruktur



nativer ScPDC (Arjunan *et al.*, 1996) als Ausgangsmodell verdeutlichte dann auch signifikante Unterschiede zwischen den resultierenden Lösungsstrukturmodellen. Die planare Anordnung der Dimeren im Tetramer der Kristallstruktur nativer ScPDC ging bereits in der Lösungsstruktur in Abwesenheit von Pyruvamid verloren. Die Dimeren wiesen einen relativen Winkel von  $12^\circ$  zueinander auf und der Abstand zwischen beiden Dimeren verringerte sich um  $6 \text{ \AA}$  gegenüber dem in der Kristallstruktur. Die Anwesenheit von Pyruvamid führte zu einer deutlichen Aufweitung der Lösungsstruktur um wiederum  $6 \text{ \AA}$ , so dass in der Lösungsstruktur von PA-ScPDC der gleiche Dimerabstand wie in der Kristallstruktur von ScPDC vorliegt, zusätzlich erhöht sich der Winkel zwischen den Dimeren auf bis zu  $70^\circ$ . Somit entspricht die Dimeranordnung von PA-ScPDC in Lösung im Prinzip der von ZmPDC im Kristall.

Unabhängig davon, wie man die Aussagekraft der Lösungsstrukturmodelle auf Grund der geringeren Auflösung einschätzt, wird hier jedoch deutlich, dass der bestimmende strukturelle Effekt der Aktivierung von ScPDC die Änderung der Dimerorientierung im Tetramer ist, wobei die Ähnlichkeit des Kristallstrukturmodells von ZmPDC mit dem Lösungsstrukturmodell von PA-ScPDC bemerkenswert ist und darauf hindeutet, dass die Aktivierung von ScPDC letztendlich zu einer ZmPDC-ähnlichen Struktur führt.

Interessant in diesem Zusammenhang ist die erst kürzlich veröffentlichte Kristallstruktur von EcIPDC (17). Auch dieses Enzym besitzt eine tetramere Quartärstruktur. Es ergaben sich aber weder aus *stopped-flow*- noch aus *steady-state*-Messungen mit dem nativen und einer Reihe künstlicher Substrate Hinweise auf eine Substrataktivierung von EcIPDC (16). Ähnlich wie in ZmPDC sind die Dimeren nahezu rechtwinklig im Tetramer angeordnet, allerdings mit wesentlich kleineren Kontaktflächen (10, 17).

Das allosterische Verhalten von ScPDC wird durch die Resultate struktureller und funktioneller Studien gut beschrieben. Wenn man einen T- und einen R-Zustand definieren will, so entspricht wohl das Lösungsstrukturmodell von ScPDC mit einer gegenseitigen Rotation der Dimeren um ca.  $12^\circ$  am besten dem sogenannten T-Zustand und die nahezu rechtwinklige Anordnung der Dimeren in der Kristallstruktur von ZmPDC mit vergrößertem Abstand zwischen den Dimeren bzw. das Lösungsstrukturmodell von PA-ScPDC am besten dem sogenannten R-Zustand. Allerdings ist die von Monod *et al.* 1965 festgelegte ursprüngliche Bedeutung von *Tense* und *Relaxed* zur Charakterisierung inaktiver und aktiver Enzymzustände

nur noch symbolisch und diese Bezeichnung wird, wie auch Perutz (1990) betonte, nur noch aus Bequemlichkeit in dieser Art verwendet.

Die Frage nach einer Zuordnung substrataktivierter PDC zu einem der allosterischen Modelle erscheint überflüssig, da der 1978 von Hübner *et al.* aufgestellte und durch weitere Studien vervollkommnete Mechanismus der Substrataktivierung (Alvarez *et al.*, 1991, 1995, Huhta *et al.*, 1992, Sun *et al.*, 1995, Wang *et al.*, 2001, 15) den Prozess gemeinsam mit den postulierten Struktur-Funktionsbeziehungen sehr viel detaillierter und exakter beschreibt, als die auf Verallgemeinerung angelegten allosterischen Modelle verschiedener Autoren, bei denen die Ligandenbindung im Vordergrund steht.

## Effekte von Liganden auf Struktur und Funktion Thiamindiphosphat-abhängiger Enzyme

### *Bestimmung von Quartärstrukturen Thiamindiphosphat-abhängiger Enzyme*

Ähnlich wie das Phänomen der Substrataktivierung war auch der native Oligomierzustand von ScPDC lange unklar. Bis Ende der 60er Jahre des vergangenen Jahrhunderts ging man von einer dimeren Struktur mit einer Molmasse von 170-190 kDa aus (Ullrich *et al.*, 1966). Unter alkalischen Bedingungen ( $\text{pH} > 8.0$ ) fand man sowohl eine Dissoziation der Proteinkomponente in Halbmoleküle als auch die Abtrennung des Kofaktors Thiamindiphosphat (Ullrich *et al.*, 1966, Gounaris *et al.*, 1975). Die Bestimmung des TDP-Gehaltes von ScPDC und neuere Gelfiltrationsstudien ließen dann erstmals auf eine tetramere Holoenzymstruktur und eine dimere Apoenzymstruktur schließen (Gounaris *et al.*, 1975).

In diesem Abschnitt werden Ergebnisse diskutiert, die hauptsächlich mit der SAXS-Methode erhalten wurden und sich auf die Beschreibung von Oligomierzuständen von Enzymen und deren Beeinflussung durch Liganden wie Kofaktoren, Substrate, Effektoren, pH-Wert und durch die Proteinkonzentration selbst beziehen. Die bei diesen Experimenten eingesetzte energiereiche Synchrotronstrahlung führt zu Strahlenschäden am Protein, denen aber durch ein spezielles Mess- und Auswerteregime Rechnung getragen wird (Gabriel & Dauvergne, 1982, Koch & Bordas, 1983, Boulin *et al.*, 1986, 1988). SAXS-Messungen sind in einem großen Proteinkonzentrationsbereich möglich, der in Richtung niedriger Konzentrationen ( $< 1 \text{ mg/mL}$ ) nur durch das Streuverhalten des Untergrundes (hier Pufferlösung) begrenzt wird. In Richtung hoher Konzentrationen gibt es hingegen keine prinzipiellen Beschränkungen.

### *Der Einfluss des pH-Wertes auf die Quartärstruktur*

Die Enzyme ScPDC (einschließlich der Spezies aus Brauhefe, dem Brauhefestamm, den haploiden Stämmen aus *Saccharomyces cerevisiae*, sowie der entsprechende rekombinante Wildtyp und die Varianten E51Q, E51A und G413W), PsPDC und EcIPDC zeigten ein pH-abhängiges Gleichgewicht ihrer Untereinheitsstruktur. Das heißt, bei pH-Werten um 6, dem Aktivitätsmaximum dieser Spezies, lagen ausschließlich bzw. überwiegend Tetramere (bei PsPDC Oktamere) vor. Das ist diejenige Quartärstruktur, die man als nativen Zustand auch mit anderen Methoden der Molmassenbestimmung erhalten konnte (3-5). Mit der Abnahme

der Protonenkonzentration in der Lösung sank der Anteil des nativen Oligomerzustandes zugunsten von Dimeren. Mit Hilfe spezieller SAXS-Auswerteprogramme (OLIGOMER, Sokolova, Volkov & Svergun, unveröffentlicht) ließen sich die Volumenfraktionen der verschiedenen Oligomerzustände für jeden beliebigen pH-Wert innerhalb der Messreihe bestimmen, sofern Referenzdaten für die Grenzstrukturen definiert werden konnten (1, 9, 16). Ein signifikanter Anteil an Monomeren war im pH-Bereich 5-9 nur im Falle von EcIPDC nachweisbar. Innerhalb dieses Bereiches konnten für die hier untersuchten Enzyme irreversible Schädigungen ihrer Proteinkomponenten durch pH-Änderungen ausgeschlossen werden. Der pH-Bereich, in dem ein Dimer-Tetramergleichgewicht vorlag, war für alle genannten Enzyme der gleiche, pH 6.0-8.5. Ausnahmen davon bildeten EcIPDC, die in einem sehr engen pH-Bereich von 6.5-7.5 dissoziierte (16) und PsPDC aufgrund ihrer komplexen nativen Oligomerstruktur (4). Mit Gelfiltration war keine Bestimmung der molekularen Masse von PsPDC möglich, da das Protein im Ausschlussvolumen eluierte (3). Im Elektronenmikroskop zeigten sich tubuläre Strukturen bis weit in den alkalischen pH-Bereich. Die Auswertung der SAXS-Daten von PsPDC wurde anfangs durch den polydispersen Charakter der Lösungen erschwert (9). Optimierte Reinigungsprozeduren führten schließlich zu gut interpretierbaren Streumustern und dem Resultat, dass native PsPDC bei pH-Werten um 6 am besten als Linearkombination von zwei Tetrameren im Oktamer und im stark alkalischen Milieu (pH 8-9) als Tetramer beschrieben werden kann (9). Bei allen untersuchten Enzymen verschob sich in Anwesenheit hoher Konzentrationen von Kofaktoren die Oligomerdissoziation zu höheren pH-Werten. Andere Effektoren, wie Substrate, Aktivatoren (Pyruvamid) oder Inhibitoren (Phosphat) hatten keinen Einfluss auf die Gleichgewichtslage.

Die native Quartärstruktur von ScTK, die im Gegensatz zu allen anderen hier betrachteten Enzymen dimer ist, und die von ZmPDC dissoziierte im untersuchten pH-Bereich nicht. Dementsprechend sind die aus den Kristallstrukturmodellen berechneten Kontaktflächen zwischen den Untereinheiten gegenüber anderen, dissoziierenden Enzymen größer (Lindqvist *et al.*, 1992, Nikkola *et al.*, 1994, 10). Während in ScTK die Kofaktoren reversibel, aber mit hoher Affinität gebunden werden, sind sie in ZmPDC sehr fest verankert. Wie bei allen anderen bisher untersuchten TDP-abhängigen Enzymen war auch im Falle von ZmPDC eine Abspaltung der Kofaktoren im alkalischen Milieu möglich. Der Einbau der Kofaktoren erfolgte bei ZmPDC und ScTK aber ohne Dissoziation des nativen Oligomerzustandes (Sundström *et al.*, 1992, 9).

Die Abspaltung der Kofaktoren Thiamindiphosphat und Flavinadeninindinukleotid (FAD) vom Enzym LpPOX ist ohne irreversible Enzymaggregation nur im stark sauren pH-Bereich möglich (Sedewitz *et al.*, 1984). Hier ist es mit SAXS-Experimenten erstmals gelungen, den Oligomerisierungsgrad von Apo-LpPOX und den Effekt von FAD und TDP auf die Untereinheitenassoziation zu bestimmen. Apo-LpPOX lag ausschließlich monomer vor, FAD verschob das Oligomergleichgewicht nur geringfügig in Richtung Dimer, TDP erzeugte neben Dimeren auch Tetramere und erst die Gegenwart beider Kofaktoren ergab überwiegend den tetrameren Zustand (unveröffentlichte Ergebnisse).

### ***Der Einfluss der Proteinkonzentration auf die Quartärstruktur***

Es existieren relativ wenige Untersuchungen zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen in lebenden Zellen. Aus der Bilanzierung der Reinigung von Proteinen aus dem natürlichen Wirt resultieren zumindest Hinweise auf die Konzentration von Enzymen *in vivo*. Für ScPDC ergibt sich ein Wert von 0.5 % des löslichen Proteins der Zelle (Sieber *et al.*, 1983, Van Hoek *et al.*, 1998). Mit bis zu 4 % des löslichen Gesamtproteins wurden für ZmPDC noch höhere Werte gefunden (Bräu & Sahn, 1986). Berücksichtigt man die Kompartimentierung der Zelle, so sind Enzymkonzentrationen von 50-100 mg/mL durchaus vorstellbar (Van Hoek *et al.*, 1998).

SAXS-Studien zum Einfluss der Enzymkonzentration auf die Quartärstruktur der TDP-abhängigen Enzyme LpPOX, ScTK, ZmPDC, ScPDC und EcIPDC in Lösung wurden im Bereich von 1-50 mg/mL realisiert (unveröffentlichte Ergebnisse). Bei allen untersuchten Spezies gab es selbst bei Proteinkonzentrationen von 50 mg/mL keinerlei Anzeichen für unspezifische Aggregationen. Die katalytisch aktive Quartärstruktur blieb erhalten. Ein konzentrationsabhängiger pH-kontrollierter Übergang zwischen verschiedenen Quartärstrukturen, wie er zum Beispiel für PDC aus *Neurospora crassa* gefunden wurde (Alvarez *et al.*, 1993), konnte für keines der hier untersuchten Enzyme beobachtet werden. Aufgrund der zunehmenden repulsiven Kräfte zwischen den Makromolekülen und dem wachsenden Einfluss des Strukturfaktors auf die experimentellen Streudaten (Koch *et al.*, 2003) ist in allen Fällen mit steigenden Proteinkonzentrationen eine leichte Abnahme der berechneten Parameter  $I(0)$  und  $R_G$  zu beobachten. Diese Änderungen liegen für die Enzyme ScTK, LpPOX, ZmPDC und EcIPDC alle auf ähnlichem Niveau, nur bei ScPDC kommt es zu einer deutlichen Abnahme besonders von  $I(0)$  bei hohen Proteinkonzentrationen. Dieser Effekt könnte wiederum durch

die gegenüber allen anderen Enzymspezies weniger kompakte Quartärstruktur von ScPDC verursacht werden. Aus Kristallisationsexperimenten ist bekannt, dass die Salzkonzentration die Proteinsättigungskonzentration in Lösung entscheidend beeinflusst. Hohe Salzkonzentrationen führen zu attraktiven Wechselwirkungen zwischen den Proteinmolekülen. Derartige SAXS-Studien stehen noch aus.

Mit den SAXS-Experimenten zur Proteinkonzentrationsabhängigkeit konnte gleichzeitig bestätigt werden, dass Aminosäureaustausche im aktiven Zentrum von LpPOX (V265A), ScPDC (E51A, E51Q, G413W) und ScTK (E418A, H481A) die Quartärstrukturen dieser Enzyme nicht beeinflussen (unveröffentlichte Ergebnisse).

### ***Effekte von TDP-Derivaten auf funktionelle und strukturelle Eigenschaften von ScPDC und ScTK***

Die Studien zum Einfluss des pH-Wertes auf Struktur und Funktion TDP-abhängiger Enzyme werden ergänzt durch die Charakterisierung der Effekte anderer Liganden auf diese Enzymklasse. Im Mittelpunkt standen dabei zunächst der Kofaktor TDP selbst und einige seiner chemischen Derivate.

Der Vergleich der Bindung von TDP und den Derivaten N1'-Pyridyl- und N3'-Pyridyl-TDP an ScPDC und ScTK ergab erste Hinweise auf die Rolle der beiden Pyrimidinstickstoffatome des Kofaktors für dessen Bindung im Protein und die Katalyse (Golbik *et al.*, 1991). Die Bindung der beiden Pyridylderivate von TDP an ScPDC, kinetisch indirekt gemessen über die Verdrängung der Derivate aus dem aktiven Zentrum des Enzyms durch den natürlichen Kofaktor TDP, erfolgte mit vergleichbarer Geschwindigkeit. Während N1'-Pyridyl-TDP-ScPDC dabei noch 65 % der katalytischen Aktivität des nativen Enzyms erreichte, war für N3'-Pyridyl-TDP-ScPDC keine katalytische Aktivität nachweisbar.

Molekulardynamische Simulationsstudien am aktiven Zentrum von ScPDC (von Fircks *et al.*, 1996) wiesen in die gleiche Richtung. Für TDP und N1'-Pyridyl-TDP ergab sich die in allen Kristallstrukturen gefundene, sogenannte V-Konformation als bevorzugte Anordnung des Kofaktors im Enzym, für N3'-Pyridyl-TDP konnte dagegen keine bevorzugte Konformation des Kofaktors berechnet werden.

Ein Vergleich der Bindungsaffinität von TDP mit Diphosphat und Derivaten, die einen schrittweisen Aufbau der Pyrimidinkomponente simulieren (Eppendorfer *et al.*, 1993), zeigte ähnliche inhibitorische Effekte für alle untersuchten Derivate, woraus man schlussfolgern kann, dass für die stabile Bindung des Kofaktors besonders die Verankerung über das Diphosphat entscheidend ist.

Die Kristallstrukturanalysen von Komplexen aus ScTK mit den Kofaktorderivaten N1'- bzw. N3'-Pyridyl-TDP und 6'-Methyl-TDP illustrierten eine zu TDP räumlich identische Bindung aller drei Derivate im aktiven Zentrum des Enzyms (2). Das bedeutet aber, dass keine der Wasserstoffbrücken, die die Aminopyrimidinkomponente des TDP im aktiven Zentrum von ScTK fixieren, essentiell ist und dass auch andere, zum Beispiel hydrophobe Wechselwirkungen an der Kofaktorbindung beteiligt sind. Die räumlich identische Bindung der beiden Pyridylderivate und die katalytische Inaktivität von N3'-Pyridyl-TDP unterstreichen die Hypothese von der entscheidenden Rolle des N1'-Atoms für die Aktivierung der 4'-Aminogruppe und damit für die Katalyse (Schellenberger, 1990, 1992, 1998).

### ***Die Kristallstruktur des zentralen Reaktionsintermediates von ScTK***

Für die Aufklärung des Katalysemechanismus' als wichtigste Struktur-Funktionsbeziehung sind strukturelle Studien zur Substratbindung im aktiven Zentrum erstrebenswert. Nur so können die aus der Charakterisierung von Proteinvarianten mit Aminosäureaustauschen im aktiven Zentrum postulierten Mechanismen strukturell bestätigt werden. Für TDP-abhängige Enzyme gibt es von anderen Autoren bisher Ergebnisse aus Studien zur Bindung von Fructose-6-phosphat an ScTK (Nilsson *et al.*, 1997) und die im ersten Teil dieser Arbeit diskutierten eigenen Ergebnisse der Bindung der künstlichen Aktivator Pyruvamid (7, 12) bzw. Ketomalonat an ScPDC (Furey *et al.*, 1996). Eine Akkumulation von Substraten bzw. der daraus gebildeten Addukte und Intermediate im aktiven Zentrum von Enzymen ist nur möglich, wenn die katalytische Umsetzung an einer Stelle des Katalysemechanismus unterbrochen werden kann. Das ist bei Enzymen, die mehrere Substrate binden, um ihre katalytische Aktivität zu realisieren, im Prinzip möglich. Im Falle der hier untersuchten Enzyme trifft dieser Umstand auf LpPOX und ScTK zu. Bei Ein-Substrat-Reaktionen ist eine solche Akkumulation bisher noch nicht gelungen. Selbst beim Einsatz von Enzymvarianten, bei denen Aminosäurereste, die für die Katalyse entscheidend sind, ausgetauscht wurden, kann man keine vollständige Inaktivität garantieren. Niedrigste Restaktivitäten solcher Varianten reichen aus, um

die eingesetzten Substrate über die relativ langen Zeiträume, die für die Kristallisation benötigt werden, zu spalten. Nilsson *et al.* (1997) fanden so in ihrer Struktur nur das Reaktionsprodukt der ersten Halbreaktion (Erythrose-4-phosphat) statt des eingesetzten Substrates Fructose-6-phosphat.

Mit der Einführung der Tieftemperaturtechnik bei der PX-Datensammlung und des damit verbundenen Schockgefrierens von Proteinkristallen ist eine nachträgliche Inkubation von Proteinkristallen mit Substraten, das sogenannte *soaking*, möglich. Aus kinetischen und spektroskopischen Untersuchungen an ScTK war bekannt, dass Reaktionsintermediate im aktiven Zentrum mit dem künstlichen Substrat 3-Hydroxypyruvat aufgrund seiner irreversiblen Decarboxylierung (Kochetov *et al.*, 1973) besser akkumuliert werden können als mit den natürlichen Donorsubstraten Xylulose-5-phosphat bzw. Fructose-6-phosphat. Diese Resultate konnten in einer kinetischen Studie am ScTK-Wildtyp und der Variante H263A bestätigt werden (13). Die Strukturanalyse von ScTK-Kristallen, die mit 3-Hydroxypyruvat für verschiedene Zeiten inkubiert worden waren, ergab, dass mit dieser Technik das zentrale Reaktionsintermediat der TDP-Katalyse, das  $\alpha$ -Carbanion/Enamin des TDP, im Falle von Transketolase das 2-(1,2-Dihydroxyethyl)-TDP (DHETDP), im Kristall akkumuliert und so die erste Struktur eines Intermediates der TDP-Katalyse bis zu einer Auflösung von 1.9 Å bestimmt werden konnte (14). Etwa zeitgleich gelang die Bestimmung des analogen Intermediats, des 2-Acetyl-TDP-Radikals im Enzym Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase (Chabrierie *et al.*, 2001) mit der gleichen Auflösung. Das Intermediat lag hier allerdings in einer radikalischen und nicht in einer ionischen Struktur vor. Die gefundene Elektronendichte im aktiven Zentrum von mit 3-Hydroxypyruvat inkubierter ScTK ließ sich am besten durch eine planare Anordnung des Dihydroxyethylrestes relativ zur Ebene des Thiazoliumrings beschreiben. Das entspricht der mesomeren Grenzstruktur des Enamins in der E-Konfiguration. Das Intermediat wird durch Wasserstoffbrücken zu den Aminosäureseitenketten von H103, H481 und über ein Wassermolekül indirekt zu H69 und dem Hauptkettensauerstoffatom von G116 stabilisiert. Die besondere Rolle dieser Reste für die Katalyse konnte bereits durch die Charakterisierung der entsprechenden Enzymvarianten gezeigt werden (Wikner *et al.*, 1995, 1997). Die für die Katalyse essentielle 4'-Aminogruppe von TDP (Schellenberger & Winter, 1960, 1966, Schellenberger *et al.*, 1964, Schellenberger, 1982, 1990, 1998, Hübner *et al.*, 1975) befindet sich in einem 3 Å-Abstand zur  $\alpha$ -Hydroxylgruppe von DHETDP, allerdings in einem für eine feste Wasserstoffbrücke ungünstigen Winkel von 74°.



### ***Effekte von Liganden auf die Lösungsstruktur von LpPOX, ScTK und ScPDC***

Mit der SAXS-Methode ist eine direkte Messung des Einflusses von Substraten auf die Enzymstruktur ohne die für die Kristallisation kritischen Einschränkungen der langen Inkubationszeiten und den damit notwendigen hohen Stabilitäten von Enzym-Substrat-Komplexen für alle TDP-Enzyme möglich. Die kurzen Messzeiten von 1 min (gewöhnlich werden zur statistischen Absicherung 10-15 solcher Datensätze akkumuliert) ermöglichen trotz des stattfindenden Substratumsatzes die Erfassung signifikanter Unterschiede, allerdings mit der Einschränkung einer geringeren als der atomaren Auflösung (maximal ca. 10 Å). Ligandenbindungsexperimente mit SAXS erlauben also keine Aussagen über den spezifischen Bindungs-ort sondern nur über den durch die Ligandenbindung ausgelösten Effekt auf die Struktur des Enzyms. Treten signifikante Unterschiede zwischen den Streukurven von ligandiertem und freiem Enzym auf, können die Unterschiede qualitativ in Lösungsstrukturmodellen niedriger Auflösung unter Anwendung der Programme SASHA (Svergun *et al.*, 1996), DAMMIN (Svergun, 1999) oder GASBOR (Svergun *et al.*, 2001) sichtbar gemacht werden, wie es für die Pyruvamidaktivierung von ScPDC gezeigt werden konnte (9). Die veränderte Orientierung der Dimeren von PA-ScPDC innerhalb eines Tetramers wurde dann durch die Kristallstrukturanalyse von PA-ScPDC bestätigt (7, 12).

Der Einfluss von Substraten auf die Enzymstruktur wurde mit SAXS ebenfalls für die Enzyme ScTK und LpPOX untersucht. Die vorhandenen Kristallstrukturen dieser Enzyme wurden auch in diesen Fällen als Vorlage für das sogenannte *rigid body refinement* mit dem Programmpaket MASSHA (Konarev *et al.*, 2001) verwendet. Um den Effekt des Substrats auf die Struktur in Lösung abschätzen zu können, war zunächst ein Vergleich von Kristall- und Lösungsstruktur der freien Enzyme Voraussetzung. Entsprechende Studien wurden an LpPOX, ScPDC, ZmPDC und ScTK durchgeführt (11). Bei allen Vertretern, außer bei ZmPDC, waren signifikante Unterschiede zwischen Kristall- und Lösungsstruktur zu beobachten, die sich in Translations- und Rotationsbewegungen der Halbmoleküle zueinander darstellen und quantifizieren ließen. Bei LpPOX und ScTK waren relativ geringe Änderungen (jeweils 3° Rotation und Translationen von 0.34 nm und 0.42 nm) nötig, um die beste Übereinstimmung experimenteller und berechneter Daten zu erzeugen. Bei ScPDC waren die notwendigen Änderungen im Vergleich zu den anderen Enzymen relativ groß (11° Rotation und -0.76 nm Translation). ScPDC war auch das einzige Enzym, für das die Lösungsstruktur kompakter war als die Kristallstruktur. Diese Studie verdeutlichte zum einen die gute Übereinstimmung von Kristall- und der daraus abgeleiteten Lösungsstruktur TDP-abhängiger Enzyme. Es wird zum anderen deutlich, dass die Unterschiede zwischen Kristall- und Lösungsstruktur um so geringer aus-

fallen, je kompakter die Quartärstruktur des Enzyms ist. Für ZmPDC mit der größten Wechselwirkungsfläche zwischen Untereinheiten aller untersuchten Enzyme (10) war durch die Verfeinerungsprozedur keine Verbesserung der Übereinstimmung von experimentellen und berechneten Daten möglich (11).

Auf der Grundlage dieser Ergebnisse konnte nun der Einfluss von Substraten auf die Enzymkonformation in Lösung untersucht werden (König *et al.*, 2003). Pyruvat führt nach diesen Ergebnissen zu keiner mit der verwendeten Methode feststellbaren Änderung der Oligomerstruktur von LpPOX. Rotations- und Translationsbewegungen sind für das freie und das mit dem Substrat Pyruvat gesättigte Enzym gleich. Als Liganden von ScTK wurden neben den beiden natürlichen Donorsubstraten in Analogie zu den Kristallisationsexperimenten das künstliche Substrat 3-Hydroxypyruvat und das chemisch synthetisierte zentrale Reaktionsintermediat DHETDP eingesetzt. Alle Substrate führten im Vergleich zum freien Enzym zu keiner Änderung im Abstand der Untereinheiten zueinander, der Winkel zwischen den Monomeren erhöhte sich durch alle Substrate leicht um 1-4°, in Anwesenheit von DHETDP um 10°. In der entsprechenden Analyse der Kristallstruktur wurden dagegen keine signifikanten Änderungen der Quartärstruktur durch die Bindung von 3-Hydroxypyruvat beobachtet (14). Die Fehlerabweichungen liegen für beide Analysen allerdings im gleichen Bereich und die auftretenden Unterschiede in den Lösungsstrukturen ligandierter ScTK können durch Kristallkontakte durchaus verhindert werden. Die signifikanten Unterschiede zwischen den Lösungsstrukturen von ScPDC und PA-ScPDC wurden bereits im ersten Teil dieser Arbeit diskutiert.

## Zusammenfassung

Im Rahmen der hier diskutierten Ergebnisse wurde versucht, Struktur-Funktionsbeziehungen verschiedener Thiamindiphosphat-abhängiger Enzyme mit verschiedenen experimentellen Ansätzen darzustellen. Dabei wurde das Spektrum der bearbeiteten Enzyme ständig erweitert, um einerseits Vertreter aus allen Enzymklassen einzubeziehen und andererseits gleiche Spezies aus verschiedenen Organismen vergleichend untersuchen zu können. Die kinetische Charakterisierung von Varianten mit Aminosäureaustauschen im aktiven Zentrum und von Komplexen aus Apoenzymen und chemisch synthetisierten Kofaktorderivaten diente schließlich der funktionellen Zuordnung einzelner Aminosäureseitengruppen zu entsprechenden Reaktionsschritten innerhalb der komplexen Mechanismen von Katalyse und Regulation. Im Mittelpunkt der experimentellen Arbeiten stand die strukturelle Hinterlegung funktioneller Aspekte der Enzymkatalyse und der Regulation der katalytischen Aktivität. Strukturelle Studien wurden mit zwei sowohl in den Anforderungen an die Probe als auch in der Aussagekraft sehr unterschiedlichen Methoden - Proteinkristallographie (PX) und Röntgenkleinwinkelstreuung mit Synchrotronstrahlung (SAXS) - durchgeführt. Während PX die Methode der Wahl ist, um Proteinstrukturen mit atomarer Auflösung zu bestimmen, ist die Berechnung detaillierter Strukturmodelle mit einer Auflösung bis zu 10 Å aus SAXS-Daten erst in jüngerer Vergangenheit dank der besonderen Bemühungen der Gruppe um PD Dr. D. I. Svergun durch die Bereitstellung anwenderfreundlicher Auswertprogramme möglich geworden (für eine Übersicht siehe <http://www.embl-hamburg.de/ExternalInfo/Research/Sax/>).

Auch wenn die Kombination der beiden Methoden SAXS und PX mit experimentellen Daten im eindimensionalen Raum und geringer Auflösung auf der einen Seite und Daten hoher (atomarer) Auflösung im zweidimensionalen Raum auf der anderen Seite auf den ersten Blick zum Studium von Struktur-Funktionsbeziehungen wenig sinnvoll erscheint, demonstrieren die hier dargelegten Ergebnisse, dass sich die aus den einzelnen Methoden gewonnenen Aussagen durchaus ergänzen und zu neuen Einsichten führen können. Durch den Vergleich von Lösungs- und Kristallstrukturmodellen TDP-abhängiger Enzyme konnte zum Beispiel der Effekt der Bindung spezifischer Liganden auf die Quartärstruktur von Enzymen gezeigt und mit entsprechenden Funktionen der Enzyme korreliert werden. Im Falle der Substrataktivierung konnte die erhaltene Kristallstruktur Pyruvamid-aktivierter ScPDC als eine von möglichen aktivierten Strukturen verstanden werden.

Aber auch aus den Einzelergebnissen beider Methoden konnten sinnvolle Beiträge zum Verständnis von Struktur-Funktionsbeziehungen TDP-abhängiger Enzyme gewonnen werden. So ermöglichte die Aufklärung der atomaren Struktur der Enzyme ScPDC im Komplex mit Pyruvamid als aktivierte Enzymform und ZmPDC und EcIPDC als Vertreter nichtallosterischer Enzyme Einblicke in den strukturellen Hintergrund der Substrataktivierung. Die Kristallstrukturanalyse von Komplexen aus ScTK und verschiedenen Kofaktorderivaten erhöhte das Verständnis über die Bindung des Coenzym TDP im aktiven Zentrum und die funktionelle Rolle der Stickstoffatome des Aminopyrimidinteils. Im Falle der Strukturanalyse des zentralen Reaktionsintermediates der TDP-Katalyse, des  $\alpha$ -Carbanion/Enamins von TDP, konnte am Beispiel des Enzyms ScTK dessen Bindung im aktiven Zentrum detailliert beschrieben und damit ein weiterer Beitrag zum Verständnis des Gesamtkatalysemechanismus geleistet werden.

Aber auch mit SAXS sind Einsichten in die Liganden-induzierte Dynamik der Quartärstruktur gelungen, die durch Anwendung anderer Methoden nicht oder nur schwer möglich gewesen wären, wie zum Beispiel die detaillierte Beschreibung der pH-Abhängigkeit der Assoziation/Dissoziation der Quartärstrukturen verschiedener PDC, LpPOX und EcIPDC bis hin zur Bestimmung der einzelnen Oligomeranteile und des Einflusses der Kofaktoren und der Proteinkonzentration auf diesen Prozess.

Im Rahmen der hier vorgestellten Ergebnisse wurde versucht, die funktionelle Dynamik der zu charakterisierenden TDP-abhängigen Enzyme durch parallele Funktions- und Strukturstudien zu erfassen, wobei besonderer Wert auf möglichst identische Versuchsbedingungen gelegt wurde. Im Idealfall konnten zum Beispiel kinetische, biochemische, SAXS- und PX-Experimente mit ein und derselben Enzymcharge durchgeführt werden. Es ist bisher nur in wenigen Fällen gelungen, die funktionelle Dynamik von Enzymen mit einer Methode allein vollständig zu erfassen. Vielversprechende Experimente sind auf diesem Gebiet mit NMR-Relaxationsmethoden an katalytisch aktiven Enzymen bei atomarer Auflösung realisiert worden (Volkman *et al.*, 2001, Eisenmesser *et al.*, 2002). Die für die Proteindynamik gefundenen mikroskopischen Geschwindigkeitskonstanten lagen dabei im gleichen Bereich wie die für die Katalyse. Auch wenn in dieser Richtung weitere wertvolle Beiträge für das Verständnis der funktionellen Dynamik von Proteinen zu erwarten sind, so bleiben diese Studien auch in der ferneren Zukunft auf Objekte mit relativ kleinen molekularen Massen bis 40 kDa beschränkt.

Welche prinzipiellen Fortschritte sind in Zukunft für das Verständnis von Struktur-Funktionsbeziehungen von Enzymen zu erwarten?

Für Enzyme mit komplexeren Quartärstrukturen, wozu die hier behandelten TDP-abhängigen Enzyme durchaus zu zählen sind, wird meiner Meinung nach auch in absehbarer Zukunft nur eine separate Charakterisierung von Struktur und Funktion möglich sein. Die Kombination von verschiedenen Methoden, die strukturelle Beiträge leisten können, wie PX, SAXS, NMR und Elektronenmikroskopie, wird dabei zu ähnlichen synergistischen Effekten führen, wie sie hier für die beiden Methoden PX und SAXS demonstriert worden sind. Der dynamische Aspekt der Funktion sollte in den Mittelpunkt des Interesses rücken. Die Weiterentwicklung der entsprechenden Gerätetechnik - insbesondere die fortschreitende Automatisierung der Probenbehandlung unter dem Gesichtspunkt des sogenannten *high throughput* - und die weltweit zunehmenden Möglichkeiten der Nutzung von hochbrillanten Synchrotronstrahlungsquellen der dritten Generation werden ebenfalls dazu beitragen, die funktionelle Dynamik von Enzymen besser verstehen zu können.

## Zitierte Literaturquellen

- Ackers, G.K., Doyle, M.L., Myers, D., Daugherty, M.A. (1992) Molecular code for cooperativity in hemoglobin. *Science* 255, 54-63.
- Alvarez, F.J., Ermer, J., Hübner, G., Schellenberger, A., Schowen, R.L. (1991) Catalytic power of pyruvate decarboxylase. Rate-limiting events and microscopic rate constants from primary carbon and secondary hydrogen isotope effects. *J. Am. Chem. Soc.* 113, 8402-8409.
- Alvarez, F.J., Ermer, J., Hübner, G., Schellenberger, A., Schowen, R.L. (1995) The linkage of catalysis and regulation in enzyme action, solvent isotope effects as probes of protonic sites in the yeast pyruvate decarboxylase mechanism. *J. Am. Chem. Soc.* 117, 1678-1683.
- Alvarez, M.E., Rosa, A.L., Temporini, E.D., Wolstenholme, A., Panzetta, G., Patrito, L., Maccioni, H.J.F. (1993) The 59-kDa polypeptide constituent of 8-10-nm cytoplasmic filaments in *Neurospora crassa* is a pyruvate decarboxylase. *Gene* 130, 253-258.
- Arjunan, P., Umland, T., Dyda, F., Swaminathan, S., Furey, W., Sax, M., Farrenkopf, B., Gao, Y., Zhang, D., Jordan, F. (1996) Crystal structure of the thiamin diphosphate-dependent enzyme pyruvate decarboxylase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* at 2.3 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 256, 590-600.
- Baburina, I., Gao, Y., Hu, Z., Jordan, F., Hohmann, S., Furey, W. (1994) Substrate activation of brewer's yeast pyruvate decarboxylase is abolished by mutation of cysteine 221 to serine. *Biochemistry* 33, 5630-5635.
- Baburina, I., Li, H., Bennion, B., Furey, W., Jordan, F. (1998) Interdomain information transfer during substrate activation of yeast pyruvate decarboxylase: the interaction between cysteine 221 and histidine 92. *Biochemistry* 37, 1235-1244.
- Baburina, I., Moore, D.J., Volkov, A., Kahyaoglu, A., Jordan, F., Mendelsohn, R. (1996) Three of four cysteines, including that responsible for substrate activation, are ionized at pH 6.0 in yeast pyruvate decarboxylase: Evidence from Fourier transform infrared and isoelectric focusing studies. *Biochemistry* 35, 10249-10255.
- Beitz, J., Schellenberger, A. (1979) Einfluß der chemischen Oberflächenstruktur funktionalisierter Polystyrole auf die kinetischen Eigenschaften von immobilisierter Hefe-Pyruvatdecarboxylase. *Acta Biol. Med. Germ.* 37, 1399-1411.
- Beitz, J., Schellenberger, A., Lasch, J., Fischer, J. (1980) Catalytic properties and electrostatic potential of charged immobilized enzyme derivatives. Pyruvate decarboxylase attached to cationic polystyrol beads of different charge densities. *Biochim. Biophys. Acta* 612, 451-454.
- Boiteux, A., Hess, B. (1970) Allosteric properties of yeast pyruvate decarboxylase. *FEBS Lett.* 9, 293-296.
- Boulin, C., Kempf, R., Koch, M.H.J., McLaughlin, S.M. (1986) Data appraisal, evaluation and display for synchrotron radiation experiments: hardware and software. *Nucl. Instrum. Methods* A249, 399-407.

- Boulin, C.J., Kempf, R., Gabriel, A., Koch, M.H.J. (1988) Data acquisition systems for linear and area X-ray detectors using delay line readout. *Nucl. Instrum. Methods* A269, 312-320.
- Bräu, B., Sahm, H. (1986) Cloning and expression of the structural gene for pyruvate decarboxylase of *Zymomonas mobilis* in *E. coli*. *Arch. Microbiol.* 144, 296-301.
- Brauner, T., Ullrich, J. (1972) Yeast pyruvate decarboxylase. Number and reactivity of mercapto groups. *Hoppe-S. Z. Physiol. Chem.* 353, 825-831.
- Bringer-Meyer, S., Schimz, K.L., Sahm, H. (1986) Pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis*. Isolation and partial characterization. *Arch. Microbiol.* 146, 105-110.
- Chabriere, E., Vernede, C., Guigliarelli, B., Charon, M.H., Hatchikian, E.C., Fontecilla-Camps, J.C. (2001) Crystal structure of the free radical intermediate of pyruvate : ferredoxin oxidoreductase. *Science* 294, 2559-2563.
- Chang, A.K., Nixon, P.F., Duggleby, R.G. (2000) Effects of deletions at the carboxyl terminus of *Zymomonas mobilis* pyruvate decarboxylase on the kinetic properties and substrate specificity. *Biochemistry* 39, 9430-9437.
- Damerau, W., Hübner, G., Schwarz, D., Lassmann, G., Schellenberger, A. (1976) Konformationsuntersuchungen an Hefe-Pyruvatdecarboxylase mittels Spinmarkierung. *Stud. Biophys.* 59, 107-116.
- Davies, D.D. (1967) Glyoxylate as a substrate for pyruvic decarboxylase. *Proc. Biochem. Soc.* 104, 50P.
- Dyda, F., Furey, W., Swaminathan, S., Sax, M., Farrenkopf, B., Jordan, F. (1993) Catalytic centers in the thiamin diphosphate dependent enzyme pyruvate decarboxylase at 2.4 Å resolution. *Biochemistry* 32, 6165-6170.
- Eberhardt, I., Cederberg, H., Li, H., König, S., Jordan, F., Hohmann, S. (1999) Autoregulation of yeast pyruvate decarboxylase gene expression requires the enzyme but not its catalytic activity. *Eur. J. Biochem.* 262, 191-201.
- Eisenmesser, E.Z., Bosco, D.A., Akke, M., Kern, D. (2002) Enzyme dynamics during catalysis. *Science* 295, 1520-1523.
- Eppendorfer, S., König, S., Golbik, R., Neef, H., Lehle, K., Jaenicke, R., Schellenberger, A., Hübner, G. (1993) Effects of metal ions, thiamine diphosphate analogues and subunit interactions on the reconstitution behaviour of pyruvate decarboxylase from brewer's yeast. *Biol. Chem. Hoppe-S.* 374, 1129-1134.
- Furey, W., Arjunan, P., Chen, L., Dyda, F., Umland, T., Swaminathan, S., Sax, M., Jordan, F., Farrenkopf, B., Gao, Y., Zhang, D. (1996) Multiple modes of tetramer assembly and insight into allosteric activation revealed by X-ray crystal structures of pyruvate decarboxylase. *Biochemistry and Physiology of Thiamin Diphosphate Enzymes, Proc. 4th Int. Meet. 1996 (H. Bisswanger, A. Schellenberger, eds.)* A.u.C. Intemann Wiss. Verl. Prien, 103-124.
- Gabriel, A. & Dauvergne, F. (1982) The localisation method used at EMBL. *Nucl. Instrum. Methods* 201, 223-224.

- Golbik, R., Neef, H., Hübner, G., König, S., Seliger, B., Meshalkina, L., Kochetov, G.A., Schellenberger, A. (1991) Function of the aminopyrimidine part in thiamine pyrophosphate enzymes. *Bioorg. Chem.* 19, 10-17.
- Gounaris, A.D., Turkenkopf, I., Civerchia, L.L., Greenlie, J. (1975) Pyruvate decarboxylase. III. Specificity restrictions for thiamine pyrophosphate in the protein association step, sub-unit structure. *Biochim. Biophys. Acta* 405, 492-499.
- Guo, F.S., Zhang, D.Q., Kahyaoglu, A., Farid, R.S., Jordan, F. (1998) Is a hydrophobic amino acid required to maintain the reactive V conformation of thiamin at the active center of thiamin diphosphate-requiring enzymes? Experimental and computational studies of isoleucine 415 of yeast pyruvate decarboxylase. *Biochemistry* 37, 13379-13391.
- Hohmann, S., Cederberg, H. (1990) Autoregulation may control the expression of yeast pyruvate decarboxylase structural genes PDC1 and PDC5. *Eur. J. Biochem.* 188, 615-621.
- Huang, C.Y., Chang, A.K., Nixon, P.F., Duggleby, R.G. (2001) Site-directed mutagenesis of the ionizable groups in the active site of *Zymomonas mobilis* pyruvate decarboxylase - Effect on activity and pH dependence. *Eur. J. Biochem.* 268, 3558-3565.
- Hübner, G., Fischer, G., Schellenberger, A. (1970) Zur Theorie der Thiaminpyrophosphatwirkung. XI. Über den Einfluß von Carbonylverbindungen auf die Geschwindigkeit der Hefe-PDC-Reaktion. *Z. Chem.* 10, 436-437.
- Hübner, G., König, S., Schellenberger, A. (1988) The functional role of thiol groups of pyruvate decarboxylase from brewer's yeast. *Biomed. Biochim. Acta* 47, 9-18.
- Hübner, G., König, S., Schellenberger, A., Koch, M. (1990) An X-ray solution scattering study of the cofactor and activator induced structural changes in yeast pyruvate decarboxylase (PDC). *FEBS Lett.* 266, 17-20.
- Hübner, G., Neef, H., Fischer, G., Schellenberger, A. (1975) Kinetischer 15-N Isotopieeffekt als direkter Beweis für die unmittelbare Beteiligung der Aminogruppe von Thiaminpyrophosphat an der enzymatischen Decarboxylierung von  $\alpha$ -Ketosäuren durch Hefe-Pyruvatdecarboxylase. *Z. Chem.* 15, 221.
- Hübner, G., Schellenberger, A. (1986) Pyruvate decarboxylase - potentially inactive in the absence of the substrate. *Biochem. Intern.* 13, 767-772.
- Hübner, G., Weidhase, R., Schellenberger, A. (1978) The mechanism of substrate activation of pyruvate decarboxylase: a first approach. *Eur. J. Biochem.* 92, 175-181.
- Huhta, W.D., Heckenthaler, T., Alvarez, F.J., Ermer, J., Hübner, G., Schellenberger, A., Schowen, R.L. (1992) The catalytic power of pyruvate decarboxylase. A stochastic model for the molecular evolution of enzymes. *Acta Chem. Scand.* 46, 778-788.
- Kern, D., Kern, G., Neef, H., Tittmann, K., Killenberg-Jabs, M., Wikner, C., Schneider, G., Hübner, G. (1997) How thiamine diphosphate is activated in enzymes. *Science* 275, 67-70.
- Koch, M.H.J., Bordas, J. (1983) X-ray diffraction and scattering on disordered systems using synchrotron radiation. *Nucl. Instrum. Methods* 208, 461-469.



- Koch, M.H.J., Vachette, P., Svergun, D.I. (2003) Small angle scattering: a view on the properties, structures and structural changes of biological macromolecules in solution. *Quart. Rev. Biophys.* 36, 147-227.
- Kochetov, G.A., Usmanov, R.A., Mevkh, A.T. (1973) The role of the charge transfer complex in the transketolase catalyzed reaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 54, 1619-1626.
- Konarev, P.V., Petoukhov, M.V., Svergun, D.I. (2001) MASSHA - a graphics system for rigid-body modelling of macromolecular complexes against solution scattering data. *J. Appl. Cryst.* 34, 527-532.
- König, S. (1998) Subunit structure, function and organisation of pyruvate decarboxylase from various organisms. *Biochim. Biophys. Acta* 1385, 271-286.
- König, S., Hübner, G., Schellenberger, A. (1990) Cross-linking of pyruvate decarboxylase. Characterization of the native and substrate-activated states. *Biomed. Biochim. Acta* 49, 465-471.
- König, S., Spinka, M., Fiedler, E., Wille, G., Brauer, J., Koch, M.H.J., Svergun, D.I. (2003) Ligand-induced conformational changes in thiamine diphosphate-dependent enzymes. Comparison between crystal and solution structures. *Thiamine. Catalytic Mechanisms and Role in Normal and Disease States (F. Jordan, M. Patel, eds.)* Marcel Dekker, Inc., New York, im Druck.
- König, S., Svergun, D., Koch, M.H.J., Hübner, G., Schellenberger, A. (1992) Synchrotron radiation solution X-ray scattering study of the pH-dependence of the quaternary structure of yeast pyruvate decarboxylase. *Biochemistry* 31, 8726-8731.
- König, S., Svergun, D., Koch, M.H.J., Hübner, G., Schellenberger, A. (1994) The influence of the effectors of yeast pyruvate decarboxylase (PDC) on the conformation of the dimers and tetramers and their pH-dependent equilibrium. *J. Physique* 4, 303-307.
- Koshland, D.E. jr., Nemethy, G., Filmer, D. (1966) Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits. *Biochemistry* 5, 365-385.
- Li, H., Furey, W., Jordan, F. (1999) Role of glutamate 91 in information transfer during substrate activation of yeast pyruvate decarboxylase. *Biochemistry* 38, 9992-10003.
- Li, H., Jordan, F. (1999) Effects of substitution of tryptophan 412 in the substrate activation pathway of yeast pyruvate decarboxylase. *Biochemistry* 38, 10004-10012.
- Lindqvist, Y., Schneider, G., Ermler, U., Sundström, M. (1992) Three-dimensional structure of transketolase, a thiamine diphosphate dependent enzyme, at 2.5 Å resolution. *EMBO J.* 11, 2373-2379.
- Liu, M., Sergienko, E.A., Guo, F.S., Wang, J., Tittmann, K., Hübner, G., Furey, W., Jordan, F. (2001) Catalytic acid-base groups in yeast pyruvate decarboxylase. 1. Site-directed mutagenesis and steady-state kinetic studies on the enzyme with the D28A, H114F, H115F, and E477Q substitutions. *Biochemistry* 40, 7355-7368.
- Monod, J., Wyman, J., Changeux, J.P. (1965) On the nature of allosteric transitions: a plausible model. *J. Mol. Biol.* 12, 88-118.

- Muller, Y.A., Lindqvist, Y., Furey, W., Schulz, G.E., Jordan, F., Schneider, G. (1993) A thiamin diphosphate binding fold revealed by comparison of the crystal structures of transketolase, pyruvate oxidase and pyruvate decarboxylase. *Structure* 1, 95-103.
- Nafe, G., Hübner, G., Fischer, G., Neef, H., Schellenberger, A. (1972) Hinweise auf Konformationsänderungen der Proteinkomponente beim Rekombinations- und Regulationsmechanismus der Hefe-Pyruvatdecarboxylase. *Acta Biol. Med. Germ.* 29, 581-594.
- Neuberg, C., Karczag, L. (1911) Über zuckerfreie Hefegärungen IV. Carboxylase ein neues Enzym der Hefe. *Biochem. Z.* 36, 68-75.
- Nikkola, M., Lindqvist, Y., Schneider, G. (1994) Refined structure of transketolase from *Saccharomyces cerevisiae* at 2.0 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 238, 387-404.
- Nilsson, U., Meshalkina, L., Lindqvist, Y., Schneider, G. (1997) Examination of substrate binding in thiamin diphosphate-dependent transketolase by protein crystallography and site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 272, 1864-1869.
- Perutz, M. (1990) *Mechanisms of cooperativity and allosteric regulation in proteins.* Cambridge University Press.
- Pohl, M., Mesch, K., Rodenbrock, A., Kula, M.R. (1995) Stability investigations on the pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 22, 95-105.
- Schellenberger, A. (1982) The amino group and steric factors in thiamin catalysis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 378, 51-62.
- Schellenberger, A. (1990) Die Funktion der 4'-Aminopyrimidin-Komponente im Katalysemechanismus von Thiaminpyrophosphat-Enzymen aus heutiger Sicht. *Chem. Ber.* 123, 1489-1494.
- Schellenberger, A. (1998) Sixty years of thiamin diphosphate biochemistry. *Biochim. Biophys. Acta* 1385, 177-186.
- Schellenberger, A., Hübner, G. (1968) Substratbindung bei der Hefe-Pyruvatdecarboxylase. *Angew. Chem.* 80, 41-49.
- Schellenberger, A., Hübner, G., König, S., Flatau, S., Neef, H. (1989) Substrate activation of pyruvate decarboxylase - mechanistic aspects. *Nova Acta Leopold.* 61, 225-242.
- Schellenberger, A., Rödel, W., Rödel, H. (1964) Untersuchungen zur Funktion der Aminogruppe der Cocarboxylase, II. Darstellung und cocarboxylatische Wirkung von Desaminothiamin und seinen Phosphorsäureestern. *Hoppe-S. Z. Physiol. Chem.* 339, 122-134.
- Schellenberger, A., Winter, K. (1960) Untersuchungen zur Funktion der Aminogruppe in der Cocarboxylase. I. Zur cocarboxylatischen Wirkung von N-Methyl-thiaminpyrophosphat. *Hoppe-S. Z. Physiol. Chem.* 322, 164-172.
- Schellenberger, A., Winter, K. (1966) Untersuchungen zur Funktion der Aminogruppe im Thiaminpyrophosphat (Cocarboxylase). III. Synthese und biochemische Eigenschaften einiger 4'-variiertes Analoges des Thiaminpyrophosphats. *Hoppe-S. Z. Physiol. Chem.* 344, 16-24.
- Sedewitz, B., Schleifer, K.H., Götz, F. (1984) Purification and biochemical characterization of pyruvate oxidase from *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.* 160, 273-278.

- Sergienko, E.A., Jordan, F. (2001) Catalytic acid-base groups in yeast pyruvate decarboxylase. 3. A steady-state kinetic model consistent with the behavior of both wild-type and variant enzymes at all relevant pH values. *Biochemistry* 40, 7382-7403.
- Sergienko, E.A., Jordan, F. (2002) New model for activation of yeast pyruvate decarboxylase by substrate consistent with the alternating sites mechanism: Demonstration of the existence of two active forms of the enzyme. *Biochemistry* 41, 3952-3967.
- Sieber, M., König, S., Hübner, G., Schellenberger, A. (1983) A rapid procedure for the preparation of highly purified pyruvate decarboxylase from brewer's yeast. *Biomed. Biochim. Acta* 42, 343-349.
- Sun, S.X., Duggleby, R.G., Schowen, R.L. (1995) Linkage of catalysis and regulation in enzyme action. Carbon isotope effects, solvent isotope effects, and proton inventories for the unregulated pyruvate decarboxylase of *Zymomonas mobilis*. *J. Am. Chem. Soc.* 117, 7317-7322.
- Sundström, M., Lindqvist, Y., Schneider, G. (1992) Three-dimensional structure of apotransketolase - flexible loops at the active site enable cofactor binding. *FEBS Lett.* 313, 229-231.
- Svergun, D.I. (1999) Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing. *Biophys. J.* 76, 2879-2886.
- Svergun, D.I., Petoukhov, M.V., Koch, M.H.J. (2001) Determination of domain structure of proteins from X-ray solution scattering. *Biophys. J.* 80, 2946-2953.
- Svergun, D.I., Volkov, V.V., Kozin, M.B., Stuhrmann, H.B. (1996) New developments in direct shape determination from small-angle scattering. 2. Uniqueness. *Acta Crystallogr.* A52, 419-426.
- Tasler, R. (2002) Charakterisierung des Wildtyps sowie der Varianten E473D, D27E und delta-11 des Enzyms Pyruvatdecarboxylase aus *Zymomonas mobilis*. *Diplom, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg*.
- Tittmann, K., Golbik, R., Uhlemann, K., Khailova, L., Schneider, G., Patel, M., Jordan, F., Chipman, D.M., Duggleby, R.G., Hübner, G. (2003) NMR analysis of covalent intermediates in thiamin diphosphate enzymes. *Biochemistry* 42, 7885-7891.
- Ullrich, J., Donner, I. (1970) Kinetic evidence for two active sites in cytoplasmic yeast pyruvate decarboxylase. *Hoppe-S. Z. Physiol. Chem.* 351, 1026-1029.
- Ullrich, J., Wittorf, J.H., Gubler, C.J. (1966) Molecular weight and coenzyme content of pyruvate decarboxylase from brewer's yeast. *Biochim. Biophys. Acta* 113, 595-604.
- Van Hoek, P., Flikweert, M.T., Van der Aart, Q.J.M., Steensma, H.Y., Van Dijken, J.P., Pronk, J.T. (1998) Effects of pyruvate decarboxylase overproduction on flux distribution at the pyruvate branch point in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environm. Microbiol.* 64, 2133-2140.
- Volkman, B.F., Lipson, D., Wemmer, D.E., Kern, D. (2001) Two-state allosteric behavior in a single-domain signaling protein. *Science* 291, 2429-2433.
- von Fircks, A., Naumann, S., Friedemann, R., König, S. (1996) Molecular dynamics simulations on the coenzyme thiamin diphosphate in apoenzyme environment. *J. Mol. Model.* 2, 312-318.

- Wang, J., Golbik, R., Seliger, B., Spinka, M., Tittmann, K., Hübner, G., Jordan, F. (2001) Consequences of a modified putative substrate-activation site on catalysis by yeast pyruvate decarboxylase. *Biochemistry* 40, 1755-1763.
- Wei, W., Liu, M., Jordan, F. (2002) Solvent kinetic isotope effects monitor changes in hydrogen bonding at the active center of yeast pyruvate decarboxylase concomitant with substrate activation: The substituent at position 221 can control the state of activation. *Biochemistry* 41, 451-461.
- Wikner, C., Meshalkina, L., Nilsson, U., Bäckström, S., Lindqvist, Y., Schneider, G. (1995) His103 in yeast transketolase is required for substrate recognition and catalysis. *Eur. J. Biochem.* 233, 750-755.
- Wikner, C., Nilsson, U., Meshalkina, L., Udekwu, C., Lindqvist, Y., Schneider, G. (1997) Identification of catalytically important residues in yeast transketolase. *Biochemistry* 36, 15643-15649.
- Wu, Y.G., Chang, A.K., Nixon, P.F., Li, W., Duggleby, R.G. (2000) Mutagenesis at Asp27 of pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis* - effect on its ability to form acetoin and acetolactate. *Eur. J. Biochem.* 267, 6493-6500.
- Zeng, X.P., Farrrenkopf, B., Hohmann, S., Dyda, F., Furey, W., Jordan, F. (1993) Role of cysteines in the activation and inactivation of brewer's yeast pyruvate decarboxylase investigated with a pdc1-pdc6 fusion protein. *Biochemistry* 32, 2704-2709.

## Eigene zitierte Publikationen

1. König, S., Svergun, D., Koch, M.H.J., Hübner, G., Schellenberger, A. (1993) The influence of the effectors of yeast pyruvate decarboxylase (PDC) on the conformation of the dimers and tetramers and their pH-dependent equilibrium. *Eur. Biophys. J.* 22, 185-194.
2. König, S., Schellenberger, A., Neef, H., Schneider, G. (1994) Specificity of coenzyme binding in thiamin diphosphate-dependent enzymes. Crystal structures of yeast transketolase in complex with analogs of thiamin diphosphate. *J. Biol. Chem.* 269, 10879-10882.
3. Mücke, U., König, S., Hübner, G. (1995) Purification and characterisation of pyruvate decarboxylase from pea seeds (*Pisum sativum* cv. Miko). *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 376, 111-117.
4. Mücke, U., Wohlfahrt, T., Fiedler, U., Bäumlein, H., Rücknagel, K.P., König, S. (1996) Pyruvate decarboxylase from *Pisum sativum*. Properties, nucleotide and amino acid sequences. *Eur. J. Biochem.* 237, 373-382.
5. Killenberg-Jabs, M., König, S., Hohmann, S., Hübner, G. (1996) Purification and characterisation of the pyruvate decarboxylase from a haploid strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 377, 313-317.
6. Dietrich, A., König, S. (1997) Substrate activation behaviour of pyruvate decarboxylase from *Pisum sativum* cv. Miko. *FEBS Lett.* 400, 42-44.
7. Lu, G., Dobritsch, D., König, S., Schneider, G. (1997) Novel tetramer assembly of pyruvate decarboxylase from brewer's yeast observed in a new crystal form. *FEBS Lett.* 403, 249-253.
8. Killenberg-Jabs, M., König, S., Eberhardt, I., Hohmann, S., Hübner, G. (1997) Role of Glu51 for cofactor binding and catalytic activity in pyruvate decarboxylase from yeast studied by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* 36, 1900-1905.
9. König, S., Svergun, D.I., Volkov, V.V., Feigin, L.A., Koch, M.H.J. (1998) Small-angle X-ray scattering studies on ligand-induced subunit interactions of the thiamine diphosphate dependent enzyme pyruvate decarboxylase from different organisms. *Biochemistry* 37, 5329-5334.
10. Dobritsch, D., König, S., Schneider, G., Lu, G. (1998) High resolution crystal structure of pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis*. Implications for substrate activation in pyruvate decarboxylases. *J. Biol. Chem.* 273, 20196-20204.
11. Svergun, D.I., Petoukhov, M.V., Koch, M.H.J., König, S. (2000) Crystal versus solution structures of thiamine diphosphate-dependent enzymes. *J. Biol. Chem.* 275, 297-302.
12. Lu, G., Dobritsch, D., Baumann, S., Schneider, G., König, S. (2000) The structural basis of substrate activation in yeast pyruvate decarboxylase - A crystallographic and kinetic study. *Eur. J. Biochem.* 267, 861-868.

13. Fiedler, E., Golbik, R., Schneider, G., Tittmann, K., Neef, H., König, S., Hübner, G. (2001) Examination of donor substrate conversion in yeast transketolase. *J. Biol. Chem.* 276, 16051-16058.
14. Fiedler, E., Thorell, S., Sandalova, T., Golbik, R., König, S., Schneider, G. (2002) Snapshot of a key intermediate in enzymatic thiamin catalysis: Crystal structure of the  $\alpha$ -carbanion of ( $\alpha,\beta$ -dihydroxyethyl)-thiamin diphosphate in the active site of transketolase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 591-595.
15. Krieger, F., Spinka, M., Golbik, R., Hübner, G., König, S. (2002) Pyruvate decarboxylase from *Kluyveromyces lactis* - An enzyme with an extraordinary substrate activation behaviour. *Eur. J. Biochem.* 269, 3256-3263.
16. Schütz, A., Golbik, R., Tittmann, K., Svergun, D.I., Koch, M.H.J., Hübner, G., König, S. (2003) Studies on structure-function relationships of indolepyruvate decarboxylase from *Enterobacter cloacae* - a key enzyme of the indole acetic acid pathway. *Eur. J. Biochem.* 270, 2322-2331.
17. Schütz, A., Sandalova, T., Ricagno, S., Hübner, G., König, S., Schneider, G. (2003) Crystal structure of indolepyruvate decarboxylase from *Enterobacter cloacae*, an enzyme involved in the biosynthesis of the plant hormone indole-3-acetic acid. *Eur. J. Biochem.* 270, 2312-2321.

## Danksagung

Außerordentlich dankbar bin ich meinen beiden akademischen Lehrern Prof. em. Alfred Schellenberger und Prof. Gerhard Hübner, die mir die Richtung für interessante Forschungsprojekte wiesen, mich frühzeitig wissenschaftlich selbstständiges Arbeiten lehrten und mir darüber hinaus die Möglichkeit eröffneten, in ihren Arbeitsgruppen diese Studien ohne Restriktionen zu realisieren. Herrn Prof. Schellenberger verdanke ich auch die Knüpfung von Kontakten zu Arbeitsgruppen, durch die gemeinsame strukturelle Studien überhaupt möglich wurden.

Wissenschaftlich fruchtbare Kooperationen sind nur mit Partnern zu verwirklichen, die sich mit entsprechendem Engagement für die Realisierung der gemeinsamen wissenschaftlichen Projekte einsetzen. Für meine beiden wichtigsten Kooperationspartner Dr. Michel H. J. Koch (Gruppe „Nichtkristalline Systeme“ der Außenstelle des Europäischen Molekularbiologischen Laboratoriums (EMBL) Hamburg c/o Desy) und Prof. Gunter Schneider (Arbeitsgruppe Molekulare Strukturbiologie, Abteilung Medizinische Biochemie & Biophysik (MBB), Karolinska Institut, Stockholm) trifft das glücklicherweise zu. Dank Michel Kochs Hilfe erhielten wir seit 1989 in jedem Jahr Zugang zur EMBL-SAXS-*beam-line* X33 im Hasylab. Dabei gestaltete sich nicht nur die Antragstellung für Messzeit erfreulich unbürokratisch, wir haben die *beam line* auch immer in einem exzellenten Zustand vorgefunden und kein Daten-*frame* hat Hamburg ohne Michel Kochs kritische Begutachtung verlassen. Bei all dem ging sein Interesse an den Forschungsprojekten über die SAXS-Anwendung hinaus und so sind zahlreiche Ideen zu neuen Projekten während interessanter Diskussionen an X33 entstanden.

Die Zusammenarbeit mit Prof. Gunter Schneider begann 1993 mit meinem halbjährigen Forschungsaufenthalt in seinem Labor, damals noch am Biomedizinischen Zentrum in Uppsala. In dieser Zeit hatte ich die Gelegenheit, mich umfassend in alle Methoden der Proteinkristallographie einzuarbeiten und meine ersten praktischen Erfahrungen auf diesem Gebiet zu sammeln. Erfreulicherweise war die Zusammenarbeit nach dem Gastaufenthalt nicht beendet. Es ist uns trotz der großen Entfernung und der permanent abnehmenden Möglichkeiten, weitere Gastaufenthalte zu finanzieren, gelungen, unsere Zusammenarbeit auszubauen. In jedem Jahr konnten seitdem DiplomandInnen und DoktorandInnen aus Halle am Karolinska Institut arbeiten. Für seine Bereitschaft, Laboratorien und Messplätze bzw. Synchrotronmesszeit für unsere gemeinsamen Projekte zur Verfügung zu stellen und die exzellente Betreuung bin ich

Gunter Schneider und mit ihm allen Mitgliedern seiner Arbeitsgruppe zu außerordentlich großem Dank verpflichtet.

Ich hoffe, dass wir auch in unseren zukünftigen Projekten auf diese beiden Kooperationsbeziehungen bauen dürfen.

Die hier vorgestellten Ergebnisse sind nur durch enge und vertrauensvolle Zusammenarbeit in der Arbeitsgruppe und darüber hinaus mit Arbeitsgruppen am Campus ermöglicht worden. Deshalb gilt mein besonderer Dank meiner langjährigen Laborantin Johanna Brauer für die Präparation unvorstellbarer Mengen verschiedener Pyruvatdecarboxylasen und die Übernahme aller organisatorischer Aufgaben zur Aufrechterhaltung des Betriebes eines biochemischen Laboratoriums als Voraussetzung für effektives Arbeiten.

Dr. Holger Neef und Dr. Ralph Golbik danke ich für die zuverlässigen Synthesen einer ganzen Reihe von Kofaktor- und Substratderivaten. Es ist dies ein Service, der originelle experimentelle Ansätze ermöglichte und um den uns viele Laboratorien beneiden.

Dr. Kai Tittmann, Dr. Angelika Schierhorn und Dr. Peter Rücknagel danke ich für kernresonanzspektroskopische, massenspektrometrische und Aminosäuresequenzanalysen, die nicht nur zur Absicherung von Daten dienten, sondern oftmals auch richtungsweisend für die Untersuchungen waren.

Dr. Rudolf Friedemann, Dr. Cornelia Breitkopf und Dr. Mirco Wahab danke ich für ihre Bemühungen, mir Einblicke in die Welt der Moleküldynamik zu verschaffen. Mirco und Dr. Bernd Mathiszik möchte ich dabei besonders für die Geduld und Ausdauer danken, mit der sie meine Fragen zum Innenleben von Computern beantworteten und meine verschiedenen PC-Generationen am Laufen hielten.

Naturgemäß besonders intensiv war und ist die Zusammenarbeit mit den betreuten DiplomandInnen Antje Laß, Astrid Patzlaff, Arndt Dietrich, Sabine Baumann, Florian Krieger, Ronja Tasler, Felix Stehle und Dörte Adolph. Es ist immer wieder erstaunlich, wie innerhalb von neun Monaten aus ständig fragenden sehr selbstständig arbeitende NachwuchswissenschaftlerInnen werden. In den meisten Fällen war es möglich, Ergebnisse aus diesen experimentellen Arbeiten direkt in Publikationen einfließen zu lassen.

Einen entscheidenden Anteil an den vorgestellten Ergebnissen haben DoktorandInnen, an deren Betreuung ich beteiligt gewesen bin: Dr. Udo Mücke, der das System PsPDC als erster in unserer Arbeitsgruppe charakterisierte, Ines Eberhardt (Universität Gent, Belgien), die sich



an der Katholischen Universität Leuven mit Hefe-Genetik befasste, Dr. Margrit Killenberg-Jabs (Analytik Jena GmbH), die rekombinante ScPDC eingehend untersuchte, Dr. Doreen Dobritzsch (*Associate Professor* am Karolinska Institut Stockholm), die maßgeblichen Anteil an der Aufklärung der Kristallstrukturen von Pyruvamid-aktivierter ScPDC und ZmPDC hatte, Dr. Erik Fiedler (Scil Proteins GmbH, Halle), der sich mit funktionellen und strukturellen Studien an ScTK beschäftigte und Anja Schütz, die EcIPDC untersuchte und neben der Kristallstruktur auch funktionelle Aspekte des Enzyms bestimmen konnte.

Bei Georg Wille und Michael Spinka möchte ich mich für die angenehme und fruchtbringende Zusammenarbeit bei SAXS- und PX-Datensammlungen und die zahlreichen Diskussionen und Anregungen zur Auswertung experimenteller Daten bedanken.

Prof. Zhera Sayers (Sabanci Universität Kocaeli) danke ich für die langjährige praktische Unterstützung bei den SAXS-Experimenten und PD Dr. Dmitri I. Svergun für die Einführung in die Programme der Datenbewertung und die zahlreichen kritischen Diskussionen der erhaltenen Ergebnisse. Anna Sokolova, Maxim Petoukhov und Peter Konarev (Staatliche Universität Moskau) bin ich für die Hilfe bei der Einarbeitung in die zahlreichen Programme zur Auswertung von SAXS-Daten zu Dank verpflichtet.

Prof. Hans-Dieter Bartunik (Max-Planck-Arbeitsgruppe für strukturelle Molekularbiologie Hamburg c/o Desy) und Dr. Lothar Jacob (Merck KGaA) danke ich für die Unterstützung bei unseren ersten Gehversuchen auf den Gebieten der Proteinkristallographie und der Proteinreinigung mit FPLC-Technik.

Den ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Gunter Schneider am Biomedizinischen Zentrum Uppsala Dr. Christer Wikner und Dr. Matti Nikkola möchte ich für das Bekanntmachen mit der Biochemie von Transketolase und der inneren Logik von „O“ danken. Dr. Tatyana Sandalova und Dr. Guoguang Lu verdanke ich meine Einsichten in die Prozeduren der Verfeinerung von Kristallstrukturmodellen, bei Tanja muss ich mich für meine Penetranz bei Sonderwünschen entschuldigen und ihr um so herzlicher für die widerspruchslose Erfüllung all meiner Wunschvorstellungen zu den endgültigen Strukturmodellen verschiedener ScTK-Komplexe und EcIPDC danken.

Prof. Rolf Hilgenfeld und Dr. Jeroen Mesters (Universität Lübeck), Dr. Manfred S. Weiss (EMBL Hamburg), Prof. Dr. Yves Muller (Friederich-Alexander-Universität, Erlangen-Nürnberg) und Prof. Dr. Christian Betzel (Universität Hamburg) danke ich für die unkomplizierte Bereitstellung von Messzeit an Diffraktometern am Institut für molekulare Biotechnologie in Jena, am Max-Delbrück-Zentrum Berlin-Buch bzw. an der Konsortiums-*beam-line* X13 im Hasylab.

Ines Eberhardt (Universität Gent), Dr. Stefan Hohmann (Universität Göteborg), Prof. Ron G. Duggleby (Queensland Universität Brisbane), Dr. Jinichiro Koga (Meiji Seika Kaisha Ltd., Sakado), Dr. Christer Wikner (Amersham Biosciences Uppsala) und Prof. Gunter Schneider (Karolinska Institut Stockholm) danke ich für die Überlassung von Stämmen rekombinanter Enzyme bzw. Mutanten.

Diese Arbeit und wohl auch die meisten der darin beschriebenen Ergebnisse wären ohne die Unterstützung meiner Familie nicht möglich gewesen. Für den Zuspruch und die Sorge in schwierigen Zeiten, das Verständnis für die vielen Abende im Labor aber auch für die gemeinsame Freude über Erfolge bin ich meiner lieben Frau Bettina von ganzem Herzen dankbar. Die gleiche Dankbarkeit empfinde ich für meine lieben Eltern, die dem Geschehen zwar mit einigem Abstand aber mit nicht weniger Interesse gegenüberstehen.

Widmen möchte ich diese Arbeit meinen Kindern Susann, Isabell, Lukas und Jakob. Sie machen mir von Zeit zu Zeit klar, dass es im Leben weit wichtigere Dinge als Struktur-Funktionsbeziehungen an Thiamindiphosphat-abhängigen Enzymen gibt, und das ist gut so.

## Lebenslauf

geboren am 29. 03. 1956 in Markneukirchen/Vogtland,

Kinder:

Susann, geboren am 13. 03. 1982,

Isabell, geboren am 12. 09. 1986,

Lukas, geboren am 18. 07. 1997,

Jakob, geboren am 02. 07. 2001,

verheiratet.

### Allgemeine und berufliche Bildung

1962-1970	Allgemeinbildende Polytechnische Oberschule Markneukirchen
1970-1974	Erweiterte Oberschule "Fritz Heckert" Klingenthal
1974	Abitur
1974-1975	Offiziershochschule „Ernst Thälmann“ der Landstreitkräfte der Nationalen Volksarmee Löbau
1975-1977	Dienst in einem Truppenteil der Landstreitkräfte der Nationalen Volksarmee
1977-1982	Biochemiestudium an der Sektion Biowissenschaften der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
1982	Diplomarbeit zum Thema "Elektronenmikroskopische Charakterisierung von nativer Pyruvatdecarboxylase und Untersuchung des Einflusses quervernetzender Reagenzien auf die kinetischen Eigenschaften des Enzyms"
1982-1984	planmäßige Aspirantur am Wissenschaftsbereich Biochemie der Sektion Biowissenschaften
1986	Dissertation zum Thema "Zur Beteiligung der Proteinkomponente von Pyruvatdecarboxylase am Katalyse- und Regulationsmechanismus des Enzyms. Kinetische und proteinchemische Charakterisierung quervernetzter Enzymformen"
1984-1989	befristeter Assistent am Wissenschaftsbereich Biochemie der Sektion Biowissenschaften
seit 09/1989	wissenschaftlicher Mitarbeiter am Wissenschaftsbereich Enzymologie des Biotechnikums der Universität, seit 1990: Institut für Biochemie des Fachbereichs Biochemie/Biotechnologie
03-10/1993	Forschungsaufenthalt am Biomedizinischen Zentrum Uppsala, Schweden.

### Stipendium

1993 Förderpreis der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina

## Publikationsliste 1

### Begutachtete Originalartikel

- Sieber, M., **König, S.**, Hübner, G. & Schellenberger, A. (1983) A rapid procedure for the preparation of highly purified pyruvate decarboxylase from brewer's yeast. *Biomed. Biochim. Acta* 42, 343-349.
- Hübner, G., **König, S.** & Schellenberger, A. (1988) The functional role of thiol groups of pyruvate decarboxylase from brewer's yeast. *Biomed. Biochim. Acta* 47, 9-18.
- König, S.**, Hübner, G. & Schellenberger, A. (1990) Cross-linking of pyruvate decarboxylase. Characterization of the native and substrate-activated states. *Biomed. Biochim. Acta* 49, 465-471.
- Hübner, G., **König, S.**, Schellenberger, A. & Koch, M. (1990) An X-ray solution scattering study of the cofactor and activator induced structural changes in yeast pyruvate decarboxylase (PDC). *FEBS Lett.* 266, 17-20.
- Kriegel, T., Bär, J., Schellenberger, W., **König, S.**, Bielke, J., Hübner, G. & Kopperschläger, G. (1990) Yeast phosphofructokinase: pre-steady-state and stationary kinetic studies on a cross-linked enzyme. *Biomed. Biochim. Acta* 49, 317-325.
- Golbik, R., Neef, H., Hübner, G., **König, S.**, Seliger, B., Meshalkina, L., Kochetov, G.A. & Schellenberger, A. (1991) Function of the aminopyrimidine part in thiamine pyrophosphate enzymes. *Bioorg. Chem.* 19, 10-17.
- König, S.**, Svergun, D., Koch, M. H. J., Hübner, G. & Schellenberger, A. (1992) Synchrotron radiation solution X-ray scattering study of the pH-dependence of the quaternary structure of yeast pyruvate decarboxylase. *Biochemistry* 31, 8726-8731.
- Hübner, G., **König, S.** & Schnackerz, K.D. (1992) Correlation of cofactor binding and the quaternary structure of pyruvate decarboxylase as revealed by 31-P-NMR spectroscopy. *FEBS Lett.* 314, 101-103.
- König, S.**, Svergun, D., Koch, M.H.J., Hübner, G. & Schellenberger, A. (1993) The influence of the effectors of yeast pyruvate decarboxylase (PDC) on the conformation of the dimers and tetramers and their pH-dependent equilibrium. *Eur. Biophys. J.* 22, 185-194.
- Eppendorfer, S., **König, S.**, Golbik, R., Neef, H., Lehle, K., Jaenicke, R., Schellenberger, A. & Hübner, G. (1993) Effects of metal ions, thiamine diphosphate analogues and subunit interactions on the reconstitution behaviour of pyruvate decarboxylase from brewer's yeast. *Biol. Chem. Hoppe-S.* 374, 1129-1134.
- König, S.**, Schellenberger, A., Neef, H. & Schneider, G. (1994) Specificity of coenzyme binding in thiamin diphosphate-dependent enzymes. Crystal structures of yeast transketolase in complex with analogs of thiamin diphosphate. *J. Biol. Chem.* 269, 10879-10882.
- König, S.**, Svergun, D., Koch, M.H.J., Hübner, G. & Schellenberger, A. (1994) The influence of the effectors of yeast pyruvate decarboxylase (PDC) on the conformation of the dimers and tetramers and their pH-dependent equilibrium. *J. Physique* 4, 303-307.

- Mücke, U., **König, S.**, & Hübner, G. (1995) Purification and characterisation of pyruvate decarboxylase from pea seeds (*Pisum sativum* cv. Miko). *Biol. Chem. Hoppe-S.* 376, 111-117.
- Schmidt, B., Fischer, G., **König, S.**, Svergun, D., Volkov, V. & Koch, M.H.J. (1995) Small-angle X-ray scattering study on the dimerisation of the FKBP25mem from *Legionella pneumophila*. *FEBS Lett.* 372, 169-172.
- Hübner, G., **König, S.**, Koch, M.H.J. & Hengstenberg, W. (1995) Influence of phosphoenolpyruvate and magnesium-ions on the quaternary structure of enzyme I of the phosphotransferase system from gram-positive bacteria. *Biochemistry* 34, 15700-15703.
- Mücke, U., Wohlfahrt, T., Fiedler, U., Baumlein, H., Rücknagel, K.P. & **König, S.** (1996) Pyruvate decarboxylase from *Pisum sativum*. Properties, nucleotide and amino acid sequences. *Eur. J. Biochem.* 237, 373-382.
- Killenbergs-Jabs, M., **König, S.**, Hohmann, S. & Hübner, G. (1996) Purification and characterisation of the pyruvate decarboxylase from a haploid strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biol. Chem. Hoppe-S.* 377, 313-317.
- von Fircks, A., Naumann, S., Friedemann, R. & **König, S.** (1996) Molecular dynamics simulations on the coenzyme thiamin diphosphate in apoenzyme environment. *J. Mol. Model.* 2, 312-318.
- Dietrich, A. & **König, S.** (1997) Substrate activation behaviour of pyruvate decarboxylase from *Pisum sativum* cv. Miko. *FEBS Lett.* 400, 42-44.
- Lu, G., Dobritzsch, D., **König, S.** & Schneider, G. (1997) Novel tetramer assembly of pyruvate decarboxylase from brewer's yeast observed in a new crystal form. *FEBS Lett.* 403, 249-253.
- Hirche, F., Koch, M.H.J., **König, S.**, Wadewitz, T. & Ulbrich-Hoffmann, R. (1997) The influence of organic solvents on phospholipid transformations by phospholipase D in emulsion systems. *Enz. Microb. Technol.* 20, 453-461.
- Killenbergs-Jabs, M., **König, S.**, Eberhardt, I., Hohmann, S. & Hübner, G. (1997) Role of Glu51 for cofactor binding and catalytic activity in pyruvate decarboxylase from yeast studied by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* 36, 1900-1905.
- König, S.**, Svergun, D.I., Volkov, V.V., Feigin, L.A. & Koch, M.H.J. (1998) Small-angle X-ray solution scattering studies on ligand induced subunit interactions of the thiamine diphosphate dependent enzyme pyruvate decarboxylase from different organisms. *Biochemistry* 37, 5329-5334.
- Dobritzsch, D., **König, S.**, Schneider, G. & Lu, G. (1998) High resolution crystal structure of pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis*. Implications for substrate activation in pyruvate decarboxylases. *J. Biol. Chem.* 273, 20196-20204.
- Eberhardt, I., Cederberg, H., Li, H., **König, S.** & Jordan, F. (1999) Autoregulation of yeast pyruvate decarboxylase gene expression requires the enzyme but not its catalytic activity. *Eur. J. Biochem.* 262, 191-201.
- Svergun, D. I., Petoukhov, M. V., Koch, M. H. J. & **König, S.** (2000) Crystal versus solution structures of thiamine diphosphate-dependent enzymes. *J. Biol. Chem.* 275 (1), 297-302.

- Lu, G., Dobritzsch, D., Baumann, S., Schneider, G. & **König, S.** (2000) The structural basis of substrate activation in yeast pyruvate decarboxylase - A crystallographic and kinetic study. *Eur. J. Biochem.* 267 (3), 861-868.
- Fiedler, E., Golbik, R., Schneider, G., Tittmann, K., Neef, H., **König, S.** & Hübner, G. (2001) Examination of donor substrate conversion in yeast transketolase. *J. Biol. Chem.* 276, 16051-16058.
- Fiedler, E.; Thorell, S.; Sandalova, T.; Golbik, R.; **König, S.** & Schneider, G. (2002) Snapshot of a key intermediate in enzymatic thiamin catalysis: Crystal structure of the  $\alpha$ -carbanion of ( $\alpha,\beta$ -dihydroxyethyl)-thiamin diphosphate in the active site of transketolase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 591-595.
- Krieger, F.; Spinka, M.; Golbik, R.; Hübner, G. & **König, S.** (2002) Pyruvate decarboxylase from *Kluyveromyces lactis* - An enzyme with an extraordinary substrate activation behaviour. *Eur. J. Biochem.* 269, 3256-3263.
- Schütz, A., Golbik, R., Tittmann, K., Svergun, D.I., Koch, M.H.J., Hübner, G. & **König, S.** (2003) Studies on structure function relationships of indolepyruvate decarboxylase from *Enterobacter cloacae* - a key enzyme of the indole acetic acid pathway. *Eur. J. Biochem.* 270, 2322-2331.
- Schütz, A., Sandalova, T., Ricagno, S., Hübner, G., **König, S.** & Schneider, G. (2003) Crystal structure of indolepyruvate decarboxylase from *Enterobacter cloacae*, an enzyme involved in the biosynthesis of the plant hormone indole-3-acetic acid. *Eur. J. Biochem.* 270, 2312-2321.
- Wille, G., Ritter, M., Weiss, M.S., **König, S.**, Mäntele, W. & Hübner, G. (2005) Role of Valine265 for the binding of FAD in pyruvate oxidase: FTIR, kinetic and crystallographic studies on enzyme variant V265A. *Biochemistry* 44, 5086-5094.
- 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) Effect of coenzyme modification on structural and catalytic properties of transketolase wildtype and the variant E418A from *Saccharomyces cerevisiae*. Contrasting protonation state requirements of ThDP in decarboxylases and transketolases. *FEBS J.* 272, 1326-1342.
- Schütz, A., Golbik, R., **König, S.**, Hübner, G. & Tittmann, K. (2005) Intermediates and transition states in thiamin diphosphate-dependent decarboxylases. A kinetic and NMR study on wild-type indolepyruvate decarboxylase and variants using indolepyruvate, benzoylformate, and pyruvate as substrates. *Biochemistry* 44, 6164-6179.

## Publikationsliste 2

### Übersichtsartikel, Beiträge in Jahresberichten und Tagungsbänden

- Schellenberger, A., Hübner, G., Atanassova, M., Sieber, M. & **König, S.** (1985) Beiträge zum Funktionsmechanismus von Thiaminpyrophosphat-Enzymen. *Wiss. Z. Karl-Marx-Univ. Leipzig, Math.-Naturwiss. R.* 34, S. 151-156.
- Schellenberger, A., Hübner, G., Atanassowa, M., Sieber, M. & **König, S.** (1986) Beiträge zum Funktionsmechanismus von Thiaminpyrophosphat-Enzymen. *Wiss. Z. Univ. Halle XXXV'86 M.*, S. 37-49.
- König, S.** Kinetic behavior of PDC cross-linked with bifunctional reagents. *Thiamin Pyrophosphate Biochemistry, Proc. 2nd Int. Meet. 1984 (A. Schellenberger & R.L. Schowen, eds.)* CRC Press, Boca Raton, Vol. I, S. 123-130.
- Schellenberger, A., Hübner, G., **König, S.**, Flatau, S. & Neef, H. (1989) Substrate activation of pyruvate decarboxylase - mechanistic aspects. *Nova Acta Leopold.* 61, (269 Funct. Regul. Aspects Enzyme Action), S. 225-242.
- Hübner, G., **König, S.**, Schellenberger, A. & Koch, M.H.J. X-ray solution scattering study of the cofactor and activator induced structural changes in yeast pyruvate decarboxylase. *Hasylab Annual Report 1990*, S. 503-504.
- König, S.**, Hübner, G., Schellenberger, A., Svergun, D. & Koch, M.H.J. A synchrotron radiation solution X-ray scattering study of the pH-dependence of the quaternary structure of yeast pyruvate decarboxylase. *Hasylab Annual Report 1991*, S. 441-442.
- Schellenberger, A., Neef, H., Golbik, R., Hübner, G. & **König, S.** Mechanistic aspects of thiamin pyrophosphate enzymes via site-directed substitutions of the coenzyme structure. *Biochem. Physiol. Thiamin Diphosphate Enzymes, Proc. 3rd Int. Meet. 1990 (H. Bisswanger & J. Ullrich, eds.)* VCH Weinheim, S. 3-15.
- König, S.** & Koch, M.H.J. Function-correlated changes of protein structure of pyruvate decarboxylase. *Biochem. Physiol. Thiamin Diphosphate Enzymes, Proc. 3rd Int. Meet. 1990 (H. Bisswanger & J. Ullrich, eds.)* VCH Weinheim, S. 84-89.
- König, S.**, Nolting, H.-F. & Hermes, C. First EXAFS measurements on the thiamine diphosphate metal ion complex - the cofactors of the enzyme pyruvate decarboxylase (EC 4.1.1.1). *Hasylab Annual Report 1992*, S. 503-504.
- König, S.**, Hübner, G., Svergun, D. & Koch, M. H. J. Solution X-ray scattering study of the influence of effectors of pyruvate decarboxylase from brewer's yeast on the pH-dependence of its quaternary structure. *Hasylab Annual Report 1992*, 515-516.
- Hübner, G., **König, S.**, Hengstenberg, W. & Koch, M. H. J. An X-ray solution scattering study on enzyme I of the phosphotransferase system. *Hasylab Annual Report 1993*, S. 697-698.
- Mücke, U., **König, S.** & Koch, M.H.J. Preliminary synchrotron radiation solution X-ray scattering measurements on the aggregation of pyruvate decarboxylase from peas (*Pisum sativum* cv. Miko). *Hasylab Annual Report 1993*, S. 699.

- König, S.**, Hübner, G., Schellenberger, A., Svergun, D. & Koch, M.H.J. The influence of the effectors of yeast pyruvate decarboxylase (PDC) on the conformation of the dimers and tetramers and their pH-dependent equilibrium. *Hasylab Annual Report 1993*, S. 701-702.
- Hirche, F., **König, S.**, Ulbrich-Hofmann, R. & Koch, M.H.J. Small-angle X-ray scattering studies on the influence of the reaction medium on the transformation of phospholipids by enzymatic reaction with phospholipase D in a two-phase system. *Hasylab Annual Report 1994*, S. 805-806.
- Hübner, G., **König, S.**, Hengstenberg, W. & Koch, M.H.J. Influence of phosphoenolpyruvate and magnesium ions on the quaternary structure of enzyme I of the phosphotransferase system from gram-positive bacteria. *Hasylab Annual Report 1994*, S. 803-804.
- Schmidt, B., Fischer, G., **König, S.**, Svergun, D. & Koch, M.H.J. Small-angle X-ray solution scattering study on the aggregation phenomena of the Mip protein (FKBP25mem) from *Legionella pneumophila*. *Hasylab Annual Report 1994*, S. 807-808.
- Mücke, U., **König, S.** & Koch, M.H.J. Synchrotron radiation solution X-ray scattering study of the pH-dependence of the quaternary structure of pyruvate decarboxylase from peas (*Pisum sativum* cv. Miko). *Hasylab Annual Report 1994*, 809-810.
- König, S.**, Killenberg-Jabs, M. & Koch, M.H.J. Small-angle X-ray solution scattering study of the pH-dependence of the quaternary structure of the recombinant enzyme pyruvate decarboxylase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Hasylab Annual Report 1995*, S. 837-838.
- König, S.** & Koch, M.H.J. The quaternary structure of the enzyme transketolase from *Saccharomyces cerevisiae* in solution of high protein concentration studied by small-angle X-ray solution scattering. *Hasylab Annual Report 1995*, 839-840.
- König, S.** & Koch, M.H.J. The influence of the cofactor binding on the subunit association behaviour of the enzyme pyruvate oxidase from *Lactobacillus plantarum*. *Hasylab Annual Report 1995*, S. 841-842.
- König, S.** & Koch, M.H.J. The subunit association behaviour of the enzyme pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis* studied by small-angle X-ray solution scattering. *Hasylab Annual Report 1995*, 843-844.
- Schmidt, B., **König, S.**, Svergun, D., Volkov, V., Fischer, G. & Koch, M.H.J. Small-angle X-ray solution scattering studies of the FK506-binding proteins *Legionella pneumophila* FKBP25mem and human FKBP12. *Hasylab Annual Report 1995*, S. 845-846.
- Killenberg-Jabs, M., **König, S.**, Eberhardt, I., Hohmann, S. & Hübner, G. Investigation of the cofactor-protein interaction in pyruvate decarboxylase. *Biochem. Physiol. Thiamin Diphosphate Enzymes, Proc. 4th Int. Meet. 1996* (H. Bisswanger & A. Schellenberger, eds.) A. u. C. Intemann, Wiss. Verl., Prien, Germany, S. 141-150.
- König, S.**, Svergun, D.I. & Koch, M.H.J. Comparison of subunit interactions of pyruvate decarboxylases from different organisms by small-angle X-ray solution scattering. *Biochem. Physiol. Thiamin Diphosphate Enzymes, Proc. 4th Int. Meet. 1996* (H. Bisswanger & A. Schellenberger, eds.) A. u. C. Intemann, Wiss. Verl., Prien, Germany, S. 160-173.



- Dobritzsch, D., **König, S.** & Hübner, G. Attempts to crystallize chemical modified pyruvate decarboxylase from brewer's yeast. *Biochem. Physiol. Thiamin Diphosphate Enzymes, Proc. 4th Int. Meet. 1996* (H. Bisswanger & A. Schellenberger, eds.) A. u. C. Intemann, Wiss. Verl., Prien, Germany, S. 177-185.
- Dobritzsch, D. & **König, S.** (1996) Reinigung von PDC aus Brauhefe. *Laborpraxis* 11, S. 42.
- König, S.** (1996) Röntgenkristallstrukturanalyse von Proteinen am Beispiel von Komplexen aus dem Enzym Transketolase und verschiedenen Koenzymderivaten. *Nova Acta Leopoldina* S14, S. 77-92.
- König, S.**, Dietrich, A. & Koch, M.H.J. (1996) Small-angle X-ray solution scattering studies on the oligomeric structure of the enzyme pyruvate decarboxylase (PDC) from germinating pea seeds. *Hasylab Annual Report 1996*, S. 131-132.
- König, S.**, Killenberg-Jabs, M. & Koch, M.H.J. Small-angle X-ray solution scattering studies on subunit association and cofactor binding of the mutants E51Q, E51A and G413W of the enzyme pyruvate decarboxylase (PDC) from *Saccharomyces cerevisiae*. *Hasylab Annual Report 1996*, S. 133-134.
- König, S.**, Schäffner, J., Svergun, D. & Koch, M.H.J. Small-angle X-ray solution scattering studies on subunit association of the recombinant enzyme pyruvate decarboxylase (PDC) from *Zymomonas mobilis*. *Hasylab Annual Report 1996*, S. 135-136.
- König, S.**, Wikner, C. & Koch, M.H.J. Small-angle X-ray solution scattering studies on the subunit structure of the mutants E418A and H481A of the enzyme transketolase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Hasylab Annual Report 1996*, S. 137-138.
- König, S.**, Svergun, D.I., Volkov, V.V., Feigin, L.A. & Koch, M.H.J. Small-angle X-ray solution scattering studies on ligand induced subunit interactions of the thiamine diphosphate dependent enzyme pyruvate decarboxylase from different organisms. *Hasylab Annual Report 1997*, S. 111-112.
- König, S.** (1998) Subunit structure, function and organisation of pyruvate decarboxylase from various organisms. *Biochim. Biophys. Acta* 1385, S. 271-286.
- König, S.** & Koch, M.H.J. The effect of high protein concentrations on the pH-dependent scattering behaviour of the enzyme pyruvate decarboxylase from brewer's yeast. *Hasylab Annual Report 1998*, S. 909-910.
- König, S.** & Koch, M.H.J. The effect of high protein concentrations on the SAX scattering behaviour of two different species of pyruvate decarboxylase. *Hasylab Annual Report 1999*, S. 991-992.
- Svergun, D.I., Petoukhov, M.V., Koch, M.H.J. & **König, S.** Thiamine diphosphate dependent enzymes: crystal versus solution structure. *Hasylab Annual Report 1999*, S. 999-1000.
- König, S.**, Krieger, F., Svergun, D.I. & Koch, M.H.J. First preliminary SAXS studies on pyruvate decarboxylase from *Kluyveromyces lactis*. *Hasylab Annual Report 2000*, S. 293-294.
- König, S.**, Schütz, A., Svergun, D.I. & Koch, M.H.J. First SAXS measurements on indolepyruvate decarboxylase. *Hasylab Annual Report 2000*, S. 295-296.

- König, S.**, Fiedler, E., Pethoukov, M., Svergun, D.I. & Koch, M.H.J. SAXS studies on the influence of ligands and protein concentration on the conformation of transketolase from *Saccharomyces cerevisiae* in solution. *Hasylab Annual Report 2000*, S. 317-318.
- König, S.**, Wille, G. & Koch, M.H.J. SAXS studies on the influence of substrate and cofactors on the conformation and oligomeric state of pyruvate oxidase from *Lactobacillus plantarum*. *Hasylab Annual Report 2000*, S. 319-320.
- König, S.**, Spinka, M., Svergun, D. I. & Koch, M. H. J. SAXS studies on the subunit association behaviour of pyruvate decarboxylase from brewer's yeast in its apo- and holo-form. *Hasylab Annual Report 2000*, S. 321-322.
- König, S.**, Spinka, M., Svergun, D.I. & Koch, M. H. J. Visualising the effect of the substrate activation on the conformation of the enzyme pyruvate decarboxylase from yeast in solution. *Hasylab Annual Report 2001*, S. 433-434.
- Thorell, S., Fiedler, E., Sandalova, T., **König, S.** & Schneider, G. Snapshot of a key intermediate in enzymatic thiamin catalysis. *Hasylab Annual Report 2001*, S. 223-224.
- Fiedler, E., **König, S.**, Thorell, S., Sandalova, T. & Schneider, G. Crystal structure of the alpha-carbanion of 2-(1,2-dihydroxyethyl)-thiamine diphosphate in the active site of transketolase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Hasylab Annual Report 2001*, S. 111-112.
- König, S.**, Spinka, M., Fiedler, E., Wille, G., Brauer, J., Koch, M.H.J., Svergun, D.I. Ligand - induced conformational changes in thiamine diphosphate-dependent enzymes. Comparison between crystal and solution structures. *Thiamine: Catalytic Mechanisms and Role in Normal and Disease States* (F. Jordan & M.S. Patel, eds) Marcel Dekker, Inc., New York, S. 93-112.
- Wille, G., Weiss, M.S., **König, S.** & Hübner, G. Binding of FAD in a mutant of pyruvate oxidase from *Lactobacillus plantarum*. *Hasylab Annual Report 2002*, S. 61-62.
- König, S.**, Tasler, R. & Koch, M.H.J. Dependence of the subunit association behaviour of various variants of the enzyme pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis*. *Hasylab Annual Report 2002*, S. 339-340.
- König, S.**, Fiedler, E., Wille, G., Pohl, E., Rypniewski, W. & Weiss, M.S. Data collection of two thiamine dependent enzymes. *Hasylab Annual Report 2002*, S. 507.
- König, S.**, Fiedler, E., Weiss, M.S., Sandalova, T. & Schneider, G. Crystal structure analysis of the transketolase variant E418A in complex with the cofactor derivative N1'-methyl thiamine diphosphate. *Hasylab Annual Report 2002*, S. 73-74.
- Schütz, A., Svergun, D.I., Koch, M.H.J., Hübner, G. & **König, S.** Small-angle scattering studies on indolepyruvate decarboxylase from *Enterobacter cloacae*. *Hasylab Annual Report 2002*, S. 369-370.
- Sandalova, T., Fiedler, E., Thorell, S., Golbik, R., **König, S.** & Schneider, G. (2004) Structure of the  $\alpha$ -Carbanion/Enamine reaction intermediate in the active site of transketolase, determined by kinetic crystallography. *Thiamine. Catalytic Mechanisms and Role in Normal and Disease States* (F. Jordan & M.S. Patel, eds.) Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, S. 159-172.

- König, S.**, Schütz, A. & Koch, M.H.J. SAXS of indolepyruvate decarboxylase in dependence on enzyme concentration. *Hasylab Annual Report 2003*, S. 399-400.
- Wille, G., Werther, T., Weiss, M.S., Rypnewksi, W.R., **König, S.**, Hübner, G. Preliminary analysis of phosphoketolase crystals. *Hasylab Annual Report 2003*, S. 527-528.
- Wille, G., Meyer, D., Kauffmann, B., **König, S.**, Hübner, G. & Tittmann, K. High resolution X-ray structure of the electron transfer deficient variant F479Y of the thiamine diphosphate and FAD dependent pyruvate oxidase at 1.68 Å. *Hasylab Annual Report 2004*, S. 151-152.
- Wille, G., Meyer, D., Kauffmann, B., **König, S.**, Hübner, G. & Tittmann, K. (2004) X-ray structure of the elusive alpha-hydroxyethyl thiamine diphosphate carbanion/enamine trapped in the active site of pyruvate oxidase. *Hasylab Annual Report 2004*, S. 341-342.
- König, S.**, Wille, G., Hübner, G. & Koch, M.H.J. The oligomer structure of phosphoketolase from *Lactobacillus pentosus* is extremely pH dependent. *Hasylab Annual Report 2004*, S. 433-434.
- König, S.**, Lehweß-Litzmann, A., Golbik, R., Hübner, G. & Koch, M.H.J. Transketolase from the heterotrophic archaeon *Thermoplasma acidophilum*. *Hasylab Annual Report 2004*, S. 443-444.
- König, S.**, Spinka, M., Seliger, B., Golbik, R., Hübner, G. & Koch, M.H.J. Conformation changes of pyruvate decarboxylase from *Saccharomyces cerevisiae* after binding an inactive cofactor analogue and substrate. *Hasylab Annual Report 2004*, S. 361-362.
- König, S.**, Weidner, A., Tittmann, K., Hübner, G. & Koch, M.H.J. Effects of ligand binding on the non-activated and chymotrypsin-activated form of pyruvate oxidase from *Escherichia coli*. *Hasylab Annual Report 2004*, S. 365-366.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Habilitationsschrift selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe und dass die vorliegende Habilitationsschrift noch an keiner anderen Universität oder Hochschule zur Begutachtung eingereicht worden ist.

Halle (Saale), 01. 01. 2004