

**Infrarotspektroskopische, strukturelle und
kinetische Untersuchung der Pyruvatoxidase aus
*Lactobacillus plantarum***

Dissertation

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

vorgelegt der
Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg



von **Georg Wille**
geboren am 18. Februar 1973 in Halle

Gutachter:

1. Prof. Dr. rer. nat. habil. Gerhard Hübner, Halle
2. Prof. Dr. rer. nat. habil. Yves Muller, Erlangen

Verteidigung der Arbeit am 22.06.2005

urn:nbn:de:gbv:3-000008680

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000008680>]

One of the symptoms of an approaching nervous breakdown is the belief that one's work is terribly important.

Bertrand Russell

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis	9
Abbildungsverzeichnis	11
Abkürzungen und Symbole	13
1 Einleitung	15
1.1 Das Enzym Pyruvatoxidase	15
1.2 Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD)	17
1.2.1 Konformation des FAD in POX	18
1.2.2 Schwingungsspektroskopie des Flavins	19
1.2.2.1 Prinzip	19
1.2.2.2 Das Problem der Selektivität	19
1.2.2.3 Das Problem der Bandenzuordnung	20
1.2.2.4 Schwingungsspektrum des reduzierten Flavins	22
1.3 ThDP und Reaktionsintermediatanalyse	22
1.4 Der Katalysemechanismus von POX	24
1.5 Bildung von Acetylphosphat	27
1.6 Ziele der Arbeit	28
2 Material und Methoden	31
2.1 Material	31
2.1.1 Geräte	31
2.1.2 Chemikalien	32
2.1.3 Stämme, Plasmide, Oligonukleotide	34
2.2 Generierung von POX-Varianten	35
2.3 Präparation von Pyruvatoxidase	36
2.3.1 Zellanzucht	36
2.3.2 Proteinreinigung	36
2.4 Präparation von Phosphoketolase	37

2.4.1	Zellanzucht	37
2.4.2	Proteinreinigung	38
2.5	Aktivitätstests	39
2.5.1	Pyruvatoxidase	39
2.5.1.1	H ₂ O ₂ -detektierender Test	39
2.5.1.2	DCPIP-Test	40
2.5.2	Phosphoketolase	40
2.6	Bestimmung der Proteinkonzentration	41
2.7	UV-VIS-Spektroskopie	42
2.8	<i>stopped-flow</i> -Spektroskopie	42
2.9	Röntgenkleinwinkelstreuung	43
2.10	Intermediatanalyse mittels ¹ H-NMR-Spektroskopie	43
2.11	Infrarotspektroskopie	44
2.11.1	Probenvorbereitung	45
2.11.2	Aufnahme der Spektren	45
2.12	Berechnung von Schwingungsspektren mittels DFT	47
2.13	Kristallographische Arbeiten	47
2.13.1	Kristallisation und Datensammlung	47
2.13.2	Modellierung und kristallographische Verfeinerung	48
3	Ergebnisse und Diskussion	49
3.1	Das redoxinduzierte FTIR-Differenzspektrum von FAD	49
3.1.1	Theoretische Flavin-Schwingungsspektren	49
3.1.1.1	Methodische Beschränkungen	49
3.1.1.2	Lumiflavin in oxidierter und reduzierter Form	51
3.1.1.3	Lumiflavin-Hydrate	52
3.1.1.4	Deuterierte Spezies	56
3.1.2	Bandenzuordnung der gemessenen Spektren	57
3.1.3	Zusammenfassung	62
3.2	Redoxinduzierte FTIR-Differenzspektren von Flavoproteinen	63
3.2.1	Pyruvatoxidase	63
3.2.1.1	POX-Wildtyp	64
3.2.1.2	Variante POX-V265A	68
3.2.1.3	Variante POX-F121I	68
3.2.2	Glucoseoxidase und D-Aminosäure-Oxidase	69
3.2.2.1	Glucoseoxidase	70

3.2.2.2	D-Aminosäure-Oxidase	71
3.2.3	Zusammenfassung	72
3.3	Die Pyruvatoxidase-Variante V265A	74
3.3.1	Enzymkinetische Eigenschaften	74
3.3.2	FTIR-Differenzspektrum und Redoxpotential	76
3.3.3	Proteinstruktur	78
3.3.3.1	Allgemeines	78
3.3.3.2	Die Umgebung des FAD	81
3.3.3.3	Die Umgebung des ThDP	85
3.3.4	FAD-Bindung	86
3.3.5	Zusammenfassung	90
3.4	Enzymkinetische Untersuchung von Wildtyp-POX und POX-Varianten	92
3.4.1	Reaktionsintermediat-Analyse	92
3.4.2	Die Abspaltung des oxidierten Reaktionsproduktes	99
3.4.2.1	Phosphorolyse vs. Hydrolyse	99
3.4.2.2	Nichtnative Substrate für den Phosphorolyseschritt bei Wildtyp-POX	103
3.4.3	Zusammenfassung	106
4	Zusammenfassung	109
4.1	Ergebnisse	109
4.2	Ausblick	110
	Literaturverzeichnis	113
A	Tabellen mit berechneten Schwingungsmoden	121
A.1	Lumiflavin, nicht deuteriert, nicht hydratisiert	122
A.2	Lumiflavin, nicht deuteriert, hydratisiert	123
A.3	Lumiflavin, deuteriert, nicht hydratisiert	124
A.4	Lumiflavin, deuteriert, hydratisiert	125

Tabellenverzeichnis

1.1	Sequenzhomologien von POX	16
1.2	Funktionen einzelner Aminosäuren in <i>ZmPDC</i>	25
2.1	Verwendete Bakterienstämme	34
2.2	Verwendete Plasmide	34
2.3	Oligonukleotide für Sequenzierungen	34
2.4	Oligonukleotide für ortsgerichtete Mutagenesen	35
2.5	Redoxmediatoren für die IR-Spektroskopie	46
3.1	Normalmoden von LF und LFH ₂ mit hoher Intensität	54
3.2	Zuordnung berechneter und beobachteter Flavin-IR-Peaks	59
3.3	Wellenzahlen der Beiträge zur Amid-I-Bande	63
3.4	Wellenzahlen der $\nu(\text{C}(10\text{a})=\text{N}(1))$ -Bande für verschiedene Flavoenzyme	73
3.5	Statistik für Datensammlung und Modellierung der Struktur von POX-V265A	79
3.6	Undefinierte Aminosäuren in der Struktur von POX-V265A	81
3.7	Molmasse und Gyrationradius von POX-V265A	87
3.8	<i>steady-state</i> -Intermediatverteilung verschiedener POX-Varianten	96
3.9	Verhältnis Acetylphosphat:Acetat für verschiedene POX-Varianten	101
A.1	Berechnete Normalmoden für Lumiflavin	122
A.2	Berechnete Normalmoden für Lumiflavin-Hydrate	123
A.3	Berechnete Normalmoden für deuteriertes Lumiflavin	124
A.4	Berechnete Normalmoden für deuterierte Lumiflavinhydrate	125

Abbildungsverzeichnis

1.1	Die Struktur des POX-Tetramers	16
1.2	Die Struktur von FAD und FMN	17
1.3	Die geknickte Konformation des FAD in POX	18
1.4	Die Struktur von Thiamindiphosphat	23
1.5	Die aktiven Zentren von POX und <i>Zm</i> PDC	24
1.6	Der Katalysemechanismus von POX	26
1.7	Der Katalysemechanismus von PK	27
3.1	FTIR-Differenzspektrum von FAD in H ₂ O	50
3.2	FTIR-Differenzspektrum von FAD in D ₂ O	51
3.3	Energieminimierte Konformation von LF und LFH ₂	52
3.4	Berechnete IR-Spektren von LF und LFH ₂	53
3.5	Oxidiertes und reduziertes Lumiflavinhydrat	53
3.6	Energieminimierte Konformation der Lumiflavinhydrate	55
3.7	Berechnete IR-Spektren der Lumiflavinhydrate	55
3.8	Berechnete IR-Spektren von deuteriertem LF und LFD ₂	57
3.9	Berechnete IR-Spektren der deuterierten Lumiflavinhydrate	58
3.10	Redoxinduziertes FTIR-Differenzspektrum von POX in Phosphatpuffer	65
3.11	Redoxinduziertes VIS-Differenzspektrum und Redoxtitration von POX	66
3.12	Redoxinduziertes FTIR-Differenzspektrum von POX in MES-Puffer	67
3.13	Redoxinduziertes FTIR-Differenzspektrum von POX-F121I	69
3.14	Redoxinduziertes FTIR-Differenzspektrum von GOX	70
3.15	Redoxinduziertes FTIR-Differenzspektrum von DAO	71
3.16	Reaktion von POX-V265A mit Pyruvat	75
3.17	Redoxinduziertes FTIR-Differenzspektrum von POX-V265A	76
3.18	Redoxtitration von POX-V265A	77
3.19	Überlagerung der Tetramerstrukturen von POX-WT und POX-V265A	80
3.20	Kristallkontakte des Tetramers von POX-V265A	80
3.21	Temperaturfaktoren von POX-V265A	80

3.22 Isoalloxazin-Ring in POX-WT und benachbarte Aminosäuren	81
3.23 Vergleich der aktiven Zentren von POX-WT und POX-V265A	82
3.24 Aufweitung von Flavin-C=N-Bindungen durch H-Brücken zum Car- bonylsauerstoff	83
3.25 Struktur des Loops 260–271	84
3.26 Dichte des FAD in POX-V265A und Drehung von His101	84
3.27 Sulfat-Ion im aktiven Zentrum von POX-V265A	85
3.28 VIS-Spektrum des FAD bei POX-V265A	87
3.29 Verdrängung von FAD durch ADP bei POX-V265A	88
3.30 VIS-Spektren von POX-V265A mit ADP und Pyruvat	89
3.31 Aminosäurereste im aktiven Zentrum von Wildtyp-POX	92
3.32 ¹ H-NMR-Spektrum der Reaktionsintermediate von POX-E483Q	94
3.33 Die drei Formen des Acetyl-ThDP	95
3.34 Aktivität verschiedener POX-Varianten in Abhängigkeit von der Phos- phatkonzentration	100
3.35 Hydrolyse von Acetyl-ThDP	101
3.36 Die aktiven Zentren von POX und <i>Ec</i> POX	102
3.37 Reaktion von POX-WT mit Pyruvat in Phosphat- und in MES-Puffer . . .	103
3.38 Reaktion von POX-WT mit verschiedenen Phosphat-Analogen (aerob) .	104
3.39 Reaktion von POX-WT mit verschiedenen Phosphat-Analogen (anaerob)	105

Abkürzungen und Symbole

AcThDP	2-Acetyl-ThDP
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
CD	Circulardichroismus
CoA	Coenzym A
<i>c_p</i>	Proteinkonzentration
Da	Dalton
DAO	D-Aminosäureoxidase aus Schweineleber (<i>Sus scrofa</i>)
DCPIP	2,6-Dichlorphenol-Indophenol
DCPS	2,4-Dichlorphenolsulfonsäure 3,5-Dichlor-2-hydroxybenzonsulfonsäure
DESY	Deutsches Elektronensynchrotron
DFT	Dichtefunktionaltheorie
<i>EcPOX</i>	Pyruvat:Cytochrom b ₁ -Oxidoreduktase („Pyruvatoxidase“) aus <i>Escherichia coli</i>
DHETHDP	2-(1,2-Dihydroxyethyl)-ThDP
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTE	1,4-Dithioerythritol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FADH ₂	1,10-Dihydro-FAD
FMN	Flavinmononukleotid
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
FTIR-	Fourier-Transform-Infrarot-
FWHH	Peakbreite bei halber Höhe (<i>full width at half height</i>)
GOX	Glucoseoxidase aus <i>Aspergillus niger</i>

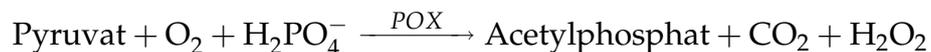
GThDP	2-Glycolyl-ThDP, 2-Hydroxyacetyl-ThDP
HETHDP	2-(1-Hydroxyethyl)-ThDP
HLThDP	2-Hydroxylactyl-ThDP
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
kDa	Kilodalton
LF	Lumiflavin (7,8,10-Trimethylisoalloxazin, 7,8,10-Trimethylbenzo[g]pteridin-2,4(3H,10H)-dion)
LFH ₂	1,10-Dihydrolumiflavin
LThDP	2-Lactyl-ThDP
MALDI	<i>Matrix Assisted Laser Desorption and Ionisation</i>
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
ν	Wellenzahl
NAD	Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NADH	Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid (reduziert)
NMR	Kernresonanz (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDB	Proteinstruktur-Datenbank (<i>protein data bank</i>)
PEG	Polyethylenglycol
POX	Pyruvatoxidase aus <i>Lactobacillus plantarum</i>
RHF	<i>restricted Hartree Fock</i>
RMSD	mittlere quadratische Abweichung <i>residual mean square deviation</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SAXS	Röntgenkleinwinkelstreuung (<i>small angle X-ray scattering</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SHE	Standardwasserstoffelektrode (<i>standard hydrogen electrode</i>)
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
ThDP	Thiamindiphosphat
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UE	Untereinheit
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Masse/Volumen

1 Einleitung

1.1 Das Enzym Pyruvatoxidase

Milchsäurebakterien sind nicht in der Lage, Porphyrine zu bilden. Sie sind darum nicht zur Atmung mit Sauerstoff als terminalem Elektronenakzeptor imstande, da viele Enzyme der Atmungskette Hämgruppen als Kofaktor benötigen. Alle Milchsäurebakterien gewinnen deshalb Stoffwechselenergie durch Gärung; einige, so auch *Lactobacillus plantarum*, können jedoch zusätzlich auch mit Hilfe von Sauerstoff organische Substrate mit Energiegewinn oxidieren. Pyruvatoxidase ist das Enzym, das sie dazu befähigt.

Die Pyruvatoxidase aus *L. plantarum* (POX¹, E.C. 1.2.3.3) wurde 1984 von Sedewitz *et al.* isoliert und beschrieben ([1], [2]). Das Enzym katalysiert die oxidative Decarboxylierung von Pyruvat nach folgender Reaktion:



Durch eine Acetatkinase wird im weiteren Verlauf des Stoffwechsels aus Acetylphosphat und ADP ein Molekül ATP gebildet.

Pyruvatoxidase benötigt zur Katalyse die beiden Kofaktoren Thiamindiphosphat (ThDP) und Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD), des Weiteren — wie alle ThDP-abhängigen Enzyme — ein zweiwertiges Metallion (hier Mg²⁺) für die Bindung dieses Kofaktors. ThDP und FAD werden dabei nichtkovalent, aber sehr fest gebunden ([3], [4], [5], [6], [7]). Die Sequenzhomologie zu anderen ThDP-abhängigen Enzymen ist hoch (Tab. 1.1).

1993 konnten Muller *et al.* die dreidimensionale Struktur der Pyruvatoxidase durch Röntgen-Kristallstrukturanalyse bestimmen ([8], [9]). Das Enzym ist ein Homotetramer mit einer Molekülmasse von 265 kDa, jede Untereinheit besteht aus 603 Aminosäureresten. Jeweils zwei Monomere bilden ein Dimer mit einer zweizähligen Sym-

¹als abkürzende Schreibweise wird im gesamten Text „POX“ anstelle von „LpPOX“ verwendet

Enzym <i>Organismus</i>	% Homologie	% Identität	PDB- Eintrag
Acetolaktatsynthase <i>Klebsiella pneumoniae</i>	44	22	1OZG
Acetohydroxysäuresynthase <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	44	24	1JSC
Carboxyethylargininsynthase <i>Streptomyces clavuligerus</i>	44	25	1UPB
Benzoylformiatdecarboxylase <i>Pseudomonas putida</i>	39	23	1BFD
Pyruvatdecarboxylase <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	40	22	1PVD
Indolpyruvatdecarboxylase <i>Enterobacter cloacae</i>	39	24	1OVM
Pyruvatdecarboxylase <i>Zymomonas mobilis</i>	36	22	1ZPD
Pyruvat:Cytochrom b ₁ -Oxidoreduktase „Pyruvatoxidase“, <i>Escherichia coli</i>	50	30	-/-
Glyoxylat-Carboligase <i>Escherichia coli</i>	45	26	-/-

Tab. 1.1: Signifikante Sequenzhomologien der Pyruvatoxidase aus *Lactobacillus plantarum*. Alle aufgeführten Enzyme enthalten den Kofaktor ThDP

metrieachse, an dessen Kontaktfläche zwei aktive Zentren entstehen. Das ThDP in jedem aktiven Zentrum interagiert mit Aminosäureresten beider Untereinheiten. Zwei dieser Dimere assoziieren zu einem Tetramer mit D_2 -Symmetrie (Abb. 1.1).

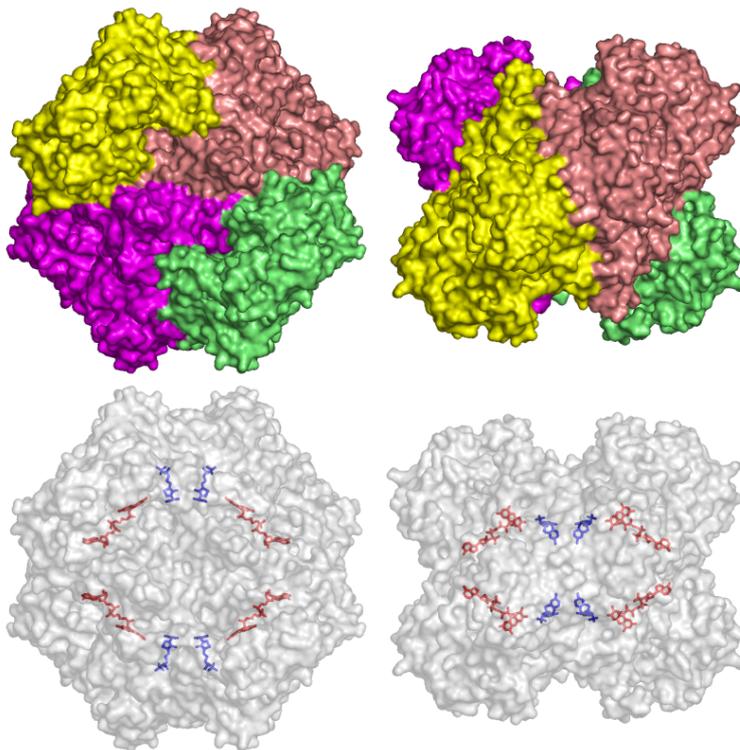


Abb. 1.1: Die Struktur des POX-Tetramers. Links die Frontansicht, rechts 90° um die x-Achse gedreht. ThDP in blauer, FAD in roter Stabdarstellung.

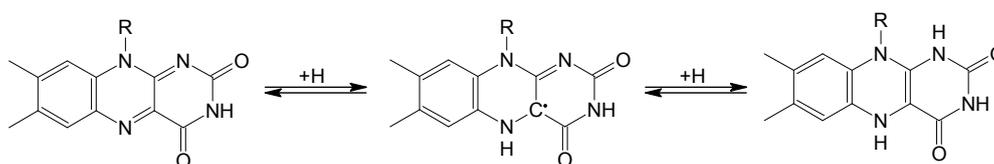
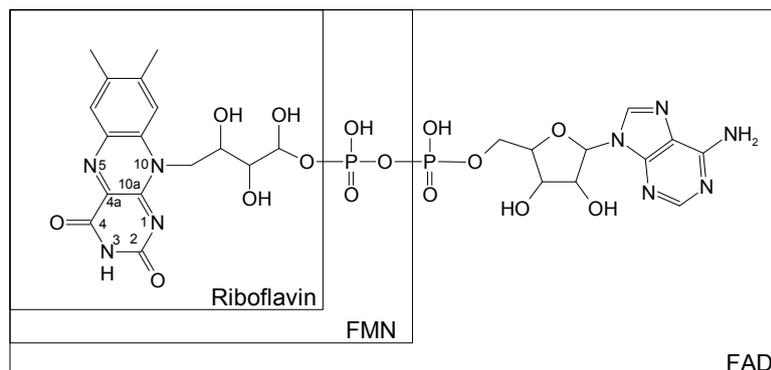


Abb. 1.2: Die Struktur der Flavin-Kofaktoren Flavinmononukleotid (FMN) und Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) sowie ihre Redoxreaktivität. Zur Vereinfachung sind die verschiedenen möglichen Protonierungszustände hier nicht gezeigt: das Semichinon kann bei N(5)–H und das Hydrochinon bei N(1)–H deprotonieren.

1.2 Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD)

Die Flavine FAD und FMN (Abb. 1.2), beide Derivate des Riboflavins (Vitamin B₂), kommen in einer Vielzahl von Redoxenzymen und elektronenübertragenden Proteinen als Kofaktoren vor. Ausschlaggebend für die weite Verbreitung sind zwei Eigenschaften: Flavine können sowohl einzelne Elektronen als auch Elektronenpaare übertragen, und sie sind in der Lage, molekularen Sauerstoff als Elektronenakzeptor zu aktivieren. Die Proteinkomponente bestimmt dabei, welcher Redoxzustand des Flavins kinetisch und thermodynamisch stabilisiert wird und mithin auch, welche Redoxpotentiale mit den einzelnen Elektronenübergängen assoziiert sind. Diese Redoxpotentiale können in einem großen Intervall zwischen –495 mV und +80mV (gegen SHE) variieren [10]. Die Untersuchungen der Flavoenzyme werden wesentlich dadurch erleichtert, dass jeder Redoxzustand der Kofaktoren typische UV-VIS- und fluoreszenzspektroskopische Charakteristika aufweist und damit exzellente Voraussetzungen für die kinetische Analyse bietet. Aufgrund der großen Verbreitung der Flavine in zahlreichen Redoxenzymen und des guten experimentellen Zugangs zu kinetischen Da-

ten existiert eine sehr umfangreiche Literatur. Verwiesen sei hier auf Übersichtsartikel und die darin enthaltenen Referenzen ([10], [11], [12], [13], [14], [15]).

1.2.1 Konformation des FAD in POX

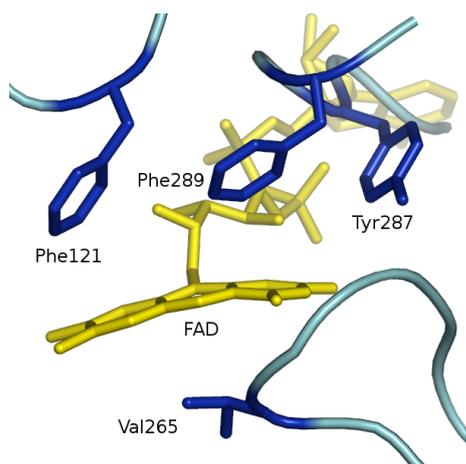


Abb. 1.3: Die geknickte Konformation des Isoalloxazinrings im aktiven Zentrum von POX.

Den Kofaktor FAD betreffend weist die Pyruvatoxidase aus *Lactobacillus plantarum* eine auffällige Besonderheit auf: in der mit 2,1 Å aufgelösten Kristallstruktur ist der redoxaktive Teil des Flavins, der Isoalloxazinring, nicht planar, sondern ca. 13° um die N(5)–N(10)-Achse geknickt². Von der *si*-Seite des Flavins her scheinen drei voluminöse aromatische Reste den Isoalloxazinring gegen das auf der *re*-Seite befindliche Valin-265 zu drücken (Abb. 1.3, [8]). Es ist interessant zu untersuchen, inwiefern diese Konformation des Flavins in POX die Reaktivität des Enzyms beeinflusst, denn es ist bekannt, dass neben Wasserstoffbrücken, elektrostatischen und π -stacking-Wechselwirkungen auch die Konformation die Eigenschaften des Kofaktors modulieren kann [16].

Tatsächlich zeigen quantenchemische Berechnungen, dass die geknickte Konformation für reduziertes FADH₂ energetisch am günstigsten ist ([17], [18]), während oxidiertes planar ist. Wenn also die oxidierte Form durch das Enzym in die geknickte Konformation gezwungen wird, könnte dies das Redoxpotential des Kofaktors erhöhen [8]. Studien an Modellverbindungen belegen diese Möglichkeit [19].

Einen indirekten Hinweis darauf, dass die Konformation des Flavins für die Enzymfunktion eine Rolle spielt, ergibt sich auch aus einer Betrachtung von Flavoproteinstrukturen in der *Protein Data Bank* [20]: alle drei Redoxzustände von Flavodoxin zeigen einen planaren Kofaktor ([21], PDB-Einträge 2FX2, 3FX2, 4FX2, 5FX2)), in Polyamin-Oxidase sind sowohl die oxidierte als auch die reduzierte Form des Flavins stark gebogen ([22], [23], PDB-Einträge 1B37, 1H81), und im *old yellow enzyme* ([24],

²Eine neue Kristallstruktur der Variante POX-F479Y, die sich strukturell nicht vom Wildtyp unterscheidet, zeigt dank der hohen Auflösung von 1,68 Å einen in der Elektronendichte hervorragend definierten Knick des Isoalloxazins mit ca. 25°! (Manuskript in Vorbereitung)

PDB-Einträge 1OYA, 1OYC) und in Thioredoxin-Reduktase ([25], [26], PDB-Einträge 1TDE, 1CL0) ist die oxidierte Form planar und die reduzierte gebogen.

Trotz dieser Vielfalt existiert aber bisher noch keine Studie, in der gezielt versucht wurde, die Konformation von proteingebundenem Flavin zu verändern und die damit verbundenen Effekte zu charakterisieren.

1.2.2 Schwingungsspektroskopie des Flavins

1.2.2.1 Prinzip

Atome sind in Molekülen nicht starr miteinander verbunden, sondern schwingen um eine mittlere Position. Wenn diese Bewegungen mit einer Änderung des Molekül-Dipolmoments verbunden sind, können sie durch Infrarotspektroskopie detektiert werden, und mit der Bewegung verbundene Änderungen der Molekül-Polarisierbarkeit sind Gegenstand der Raman-Spektroskopie [27].

Für ein Molekül mit N Atomen existieren im allgemeinen $3N - 6$ sog. Normalmoden, d.h. Schwingungsbewegungen, die unabhängig voneinander anregbar sind und deren gleichzeitige Überlagerung die Gesamtbewegung des Moleküls ergibt. Prinzipiell hat jedes Atom im Molekül einen Anteil an jeder Normalmode, zum Teil lassen sich aber die Bewegungen in erster Näherung auf einzelne Bindungen lokalisieren, etwa die charakteristische Streckschwingung einer Carbonylgruppe oder die Biegeschwingung eines Wassermoleküls. Sie können allerdings auch in komplexer Weise aus der gekoppelten Bewegung mehrerer Atome bestehen, insbesondere dann, wenn diese Atome gleich schwer und miteinander durch Bindungen von sehr ähnlicher Stärke verknüpft sind.

Dadurch, dass die Schwingungsspektroskopie Signale detektiert, die unmittelbar mit molekularen Eigenschaften wie Bindungsstärke, Bindungslänge oder Dipolmomenten der Bindungen verknüpft sind, stellt sie prinzipiell ein Instrument enormer Aussagekraft zur direkten Beobachtung dieser Moleküleigenschaften dar, z.B. auch zur Untersuchung der Deformation des Isoalloxazinrings in Pyruvatoxidase.

1.2.2.2 Das Problem der Selektivität

Die Tatsache, dass jedes Atom des betrachteten Moleküls im Durchschnitt zu drei Peaks im Schwingungsspektrum beiträgt, schränkt die Nützlichkeit der Methode

stark ein, denn sie hat zur Folge, dass die Signale des viel größeren Proteins und die des Lösungsmittels die Signale des Isoalloxazinrings bei weitem übertreffen.

Das Problem kann auf wenigstens zwei Wegen umgangen werden. Durch Resonanz-Raman-Spektroskopie wird die Tatsache ausgenutzt, dass die Anregung des Raman-Spektrums bei flavinspezifischen UV-VIS-Absorptionsbanden zu einer großen Intensitätssteigerung der Flavin-Peaks im Schwingungsspektrum führt. Tatsächlich beruht die große Mehrzahl der schwingungsspektroskopischen Untersuchungen von Flavoproteinen auf der Resonanz-Raman-Spektroskopie. In letzter Zeit wurden auch durch Differenz-Raman-Spektroskopie, u.a. an Proteinkristallen, Fortschritte erzielt ([28], [29]). So konnten z.B. für p-Hydroxybenzoat-Hydroxylase zwei verschiedene Konformationen des Flavins unterschieden werden [30]. Die Raman-Spektroskopie ist als Methode ungeeignet, wenn das Flavin stark fluoresziert oder wenn die reduzierte Form untersucht werden soll, da letztere nur sehr schwache elektronische Absorptionsbanden zeigt.

Einen zweiten Ansatz, der nicht von der UV-VIS-Absorption der zu untersuchenden Spezies abhängt, bietet die IR-Differenzspektroskopie. Die Spektren einer Proteinprobe vor und nach einem Übergang werden voneinander subtrahiert, sodass nur die Signale übrig bleiben, die mit dem Übergang selbst assoziiert sind. Dieser Übergang kann beispielsweise durch Licht, Temperatur oder eine chemische Reaktion ausgelöst werden. Für ein Redox-Enzym bietet sich hierzu ein Redoxübergang an, der in einer IR-Messzelle, die in geeigneter Weise mit Elektroden ausgestattet ist, mit sehr hoher Basislinienstabilität ausgeführt werden kann. Das Redoxpotential in der Zelle kann elektronisch beliebig geregelt werden und ermöglicht so auch Titrations ([31], [32]). Basierend auf dieser Methode konnte z.B. für verschiedene membrangebundene Hämoproteine der Atmungskette die Kopplung zwischen dem Redoxübergang und Protonierungszustand essentieller Aminosäureseitenketten untersucht werden, die für die Funktion dieser Enzyme entscheidend ist (z.B. [33], [34], [35]). Reine Flavoproteine wurden mit dieser Methode bis jetzt noch nicht detailliert untersucht, in [36] finden sich aber die redoxinduzierten Differenzspektren von freiem FAD und FMN.

1.2.2.3 Das Problem der Bandenzuordnung

Für die Interpretation aller Schwingungsspektren stellt sich das grundlegende Problem der Bandenzuordnung: durch die Bewegung welcher Atome wird eine im Spektrum beobachtete Bande hervorgerufen? Eine *a priori*-Zuordnung ist in der Regel

nur für Moden mit sehr charakteristischer Frequenz möglich, etwa eine $-C\equiv CH$ -Streckschwingung. Verschiedene Verfahren erlauben es dennoch, auch Banden in einem komplexen Spektrum den ihnen zugrunde liegenden Schwingungsmoden zuzuordnen.

Eine experimentelle Methode ist die ortsgerichtete Isotopenmarkierung des Moleküls. Die Verschiebung von IR-Banden aufgrund der veränderten Masse einzelner Atome lässt eine Aussage darüber zu, ob die markierten Atome am Zustandekommen einer Bande beteiligt sind. Bei komplexen Molekülen wie dem FAD ist das mit einem erheblichen chemischen Synthesaufwand verbunden. Eine einfachere Variante besteht in der Aufnahme des Spektrums in D_2O anstelle von Wasser, sodass austauschbare Protonen durch Deuteronen mit doppelter Masse ersetzt werden. Ein Nachteil ist die fehlende Ortsspezifität des Austausches, außerdem sind durch die große relative Massenänderung die Bandenverschiebungen z.T. so groß, dass sich das IR-Spektrum qualitativ komplett verändert, besonders wenn Protonenschwingungen Bestandteil einer komplexen Mode sind und diese Kopplung durch die Deuterierung verloren geht. Da sich in diesem Falle völlig neue Moden ausbilden können, sind keine 1-zu-1-Peakzuordnungen mehr möglich.

Untersuchungen mit Isotopenlabels lassen zwar Schlussfolgerungen über die Beteiligung der markierten Atome zu, gestatten jedoch kaum direkte Aussagen darüber, *wie* diese zur Schwingungsbewegung beitragen bzw. welche der *nicht* markierten Atome außerdem beteiligt sind. Um derartige Informationen zu erhalten, kann eine theoretische Berechnung der Schwingungsspektren durchgeführt werden: die Normalmodenanalyse. Dies wurde für *oxidiertes* Lumiflavin mit molekülmechanischen Methoden bereits durchgeführt ([37], [38]). Dabei wird das Molekül näherungsweise als System aus Massepunkten angesehen, die elastisch miteinander verbunden sind. Die Aussagekraft der Methode ist auf relativ kleine Moleküle beschränkt, da insbesondere Frequenz und Charakter komplexer Moden, an deren Entstehung die Bewegung vieler Atome beteiligt ist, damit nicht zuverlässig vorhergesagt werden können. Der Fortschritt der Computertechnik erlaubte es später, Normalmodenanalysen auf einer weniger empirischen, quantenmechanischen Grundlage durchzuführen [39]. Heute ist die mit Hilfe der Dichtefunktionaltheorie ([40], [41]) erreichte Genauigkeit dabei auch für große Moleküle sehr gut, z.B. für polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe wie Naphthalin oder Coronen, aber auch Heteroatom-Derivate wie 2-Aminoanthracen oder Acridin ([42], [43]). In [44] wird die Aussagekraft der gebräuchlichsten semiempirischen und *ab initio*-Verfahren verglichen.

1.2.2.4 Schwingungsspektrum des reduzierten Flavins

Zum Schwingungsspektrum des *reduzierten* Flavins, und ganz besonders zur protein-gebundenen Form des Kofaktors, gibt es bis jetzt nur sehr wenige Informationen. Das hat vermutlich aus zwei Gründe:

- Reduziertes FAD reagiert sehr leicht mit Sauerstoff und ist daher experimentell schwer zu handhaben. Referenzspektren mit KBr-Presslingen, wie sie für oxidierte Flavine aufgenommen wurden [45], sind bis jetzt noch nicht beschrieben. Lediglich in einer Arbeit wird das IR-Spektrum von elektrochemisch reduziertem FAD diskutiert [46]. Das Spektrum enthält jedoch überlappende Beiträge des Adenin-Teils, und die Bandenzuordnung erfolgte auf rein empirischer Basis.
- Reduziertes Flavin weist nur schwache elektronische Absorptionsbanden auf und ist damit auch der Resonanz-Raman-Spektroskopie unzugänglich. Bisherige Untersuchungen mit dieser Methode beschränken sich daher auf *charge-transfer*-Komplexe von reduzierten Flavoproteinen mit einem organischen Liganden, etwa einem Substratmolekül oder einem Inhibitor ([47],[48],[49]). In den so erhaltenen Spektren konnte jeweils nur ein Peak bei 1605 cm^{-1} der C(4a)=C(10a)-Schwingung des Flavins zugeordnet werden, alle anderen Peaks waren auf den jeweiligen Liganden zurückzuführen.

Die redoxinduzierte IR-Differenzspektroskopie bietet daher einen neuen Zugang zum Vibrationsspektrum des reduzierten Flavins *auch in der Proteinumgebung*, und die Normalmodenanalyse auf der Grundlage der Dichtefunktionaltheorie erlaubt eine erste Interpretation der beobachteten Banden.

1.3 Thiamindiphosphat (ThDP) und die Reaktionsintermediatanalyse

Thiamindiphosphat (Abb. 1.4), die biologisch aktive Form des Thiamins (Vitamin B₁), ist der essentielle Kofaktor von wichtigen Enzymen des Grundstoffwechsels aller Organismen, z.B. der Pyruvatdehydrogenase, der Transketolase und der Pyruvatdecarboxylase. Eine große Zahl von Arbeiten zum Katalysemechanismus ThDP-abhängiger

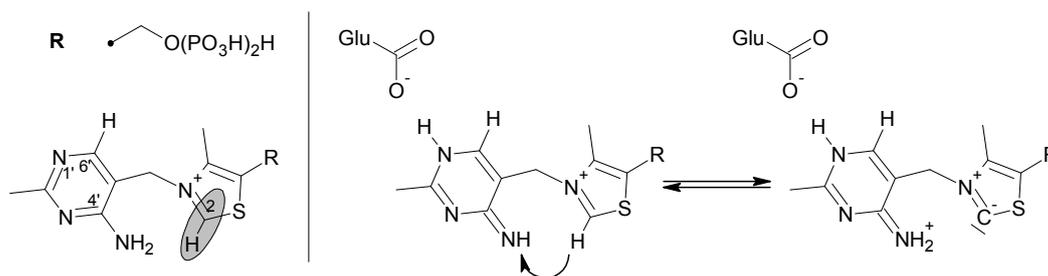


Abb. 1.4: Die Struktur des Kofaktors Thiamindiphosphat (ThDP). Das reaktive C(2)-Kohlenstoffatom, das nach Deprotonierung als Nukleophil an die Carbonylgruppe des Substrates angreift, ist grau unterlegt. Das Proton an C(6)' ändert seine NMR-Resonanzfrequenz in Abhängigkeit vom Substituenten an C(2). **Rechts** Der Mechanismus der Deprotonierung des C(2), an dem ein konservierter Glutamatrest des Proteins und der Aminopyrimidinring des ThDP beteiligt sind.

Enzyme ist erschienen, seit die Struktur des Kofaktors 1937 von Lohmann und Schuster aufgeklärt wurde [50]. Mittlerweile liegen auch viele Übersichtsartikel vor, in denen die bisher erhaltenen Ergebnisse zusammengefasst und unter verschiedenen Gesichtspunkten diskutiert werden. Auf diese Arbeiten sei hier an Stelle einer detaillierten Beschreibung verwiesen ([51], [52], [53], [54], [55], [56] und die jeweils dort enthaltenen Referenzen). Einen bedeutenden strukturellen Beleg für die Funktionsweise des ThDP konnten vor kurzem zwei Arbeitsgruppen nahezu zeitgleich erbringen: Fiedler *et al.* [57] und Chabrière *et al.* [58] beschrieben erstmals die Röntgenkristallstruktur eines enzymgebundenen ThDP-Reaktionsintermediates.

Einen wichtigen Fortschritt für die kinetische Untersuchung ThDP-abhängiger Enzyme stellt die von Tittmann *et al.* beschriebene NMR-basierte Methode dar, die die quantitative Bestimmung *aller* ThDP-Reaktionsintermediate zu einem beliebigen Zeitpunkt während der enzymatischen Reaktion erlaubt, z.B. im *steady state* [59]. Dieses Verfahren beruht auf der Erkenntnis, dass jedes der während des enzymatischen Katalysezyklus auftretende ThDP-Addukt (siehe z.B. für POX Abb. 1.6) eine charakteristische NMR-Frequenz des ThDP-C(6)'-Protons aufweist und damit die Anteile aller Intermediate in einer Mischung mit nur einem NMR-Spektrum bestimmbar sind (vgl. Abb. 3.32). Die enzymatische Reaktion wird durch starkes Ansäuern der Lösung gestoppt, das ausgefallene Protein abgetrennt und die Mischung der ThDP-Addukte mittels ^1H -NMR untersucht.

Insbesondere durch diese Intermediatanalyse und weitere Studien mit Hilfe der ortsgerechten Mutagenese ([60], [61], [62], [63], [64], [65], [66]) war es für Pyruvatdecarboxylase aus *Zymomonas mobilis* (ZmPDC) [59] möglich, einzelnen Aminosäureresten

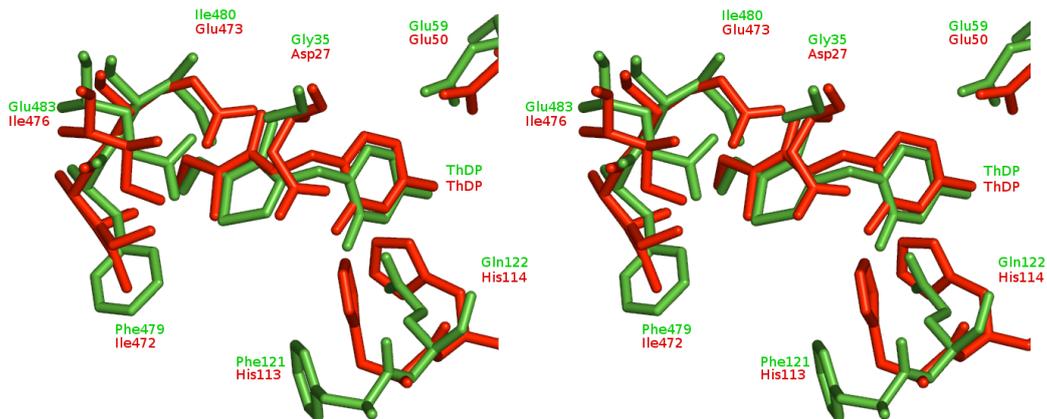
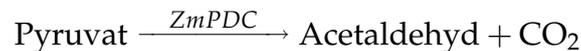


Abb. 1.5: Stereodarstellung der aktiven Zentren von POX (grün) und *ZmPDC* (rot) in der Umgebung des ThDP. Beim Kofaktor ThDP ist zur besseren Übersicht der Pyrophosphatrest weggelassen. Die Abbildung basiert auf den PDB-Einträgen 1POX (POX) und 1ZPD (*ZmPDC*).

im aktiven Zentrum dieses Enzyms spezifische Funktionen im Katalysemechanismus zuzuordnen. Beispielsweise führt der Austausch D27E (siehe Abb. 1.5) zu einer starken Akkumulation von Hydroxyethyl-ThDP, woraus eine Beteiligung dieses Restes an der Produktabspaltung folgt.

Die ersten Teilschritte der von *ZmPDC* katalysierten Reaktion



bis zur Bildung des Hydroxyethyl-ThDP-Carbanion/Enamins sind bei *ZmPDC* und POX identisch (vgl. Abb. 1.6). Dies und die strukturelle Ähnlichkeit der aktiven Zentren beider Enzyme ([67], Abb. 1.5) führen zur Frage nach der Funktion einzelner Aminosäurereste im aktiven Zentrum von POX, insbesondere solcher, die sich von der entsprechenden Position in *ZmPDC* unterscheiden. Die Funktionen homologer Aminosäurereste bei der POX können vermutet werden, sofern sie die ersten Schritte des Katalysezyklus (Pyruvatbindung und -decarboxylierung) betreffen. Zusammengefasst ergeben sich die Zuordnungen in Tab. 1.2.

1.4 Der Katalysemechanismus von POX

Grundlegende Ergebnisse zum Katalysemechanismus und der Geschwindigkeit von einzelnen Reaktionsschritten der Wildtyp-POX aus *L. plantarum* finden sich

Tab. 1.2: Funktionen einzelner Aminosäuren in *ZmPDC* und die Aminosäuren an der entsprechenden Position in POX

AS in <i>ZmPDC</i>	Funktion	homologe Position in POX
E50	H ⁺ -Relais, Deprotonierung ThDP-C(2)	E59
E473	C-C-Bindungsknüpfung, Decarboxylierung	E483
D27, H113	Aldehydabspaltung ¹	G35, F121/Q122

¹dieser Schritt kommt im POX-Reaktionszyklus nicht vor

in [68] und [69]. Das aus diesen Untersuchungen hervorgegangene Reaktionsschema ist in Abb. 1.6 dargestellt. Nach Deprotonierung der C(2)-Position des ThDP-Thiazoliumringes (1) greift das entstandene Carbanion am Carbonylkohlenstoff des Pyruvats an (2). Es entsteht Lactyl-ThDP, welches anschließend zum Hydroxyethyl-ThDP-Carbanion/Enamin decarboxyliert (3). Bis hierher gleichen die Reaktionsschritte denen der Pyruvatdecarboxylase. Während bei dieser im weiteren Verlauf der Hydroxyethylrest als Acetaldehyd abgespalten wird, erfolgt bei der Pyruvatoxidase ein zweifacher Ein-Elektronentransfer vom HETHDP-Carbanion/Enamin zum zweiten Kofaktor FAD (4). Das Flavin wird damit zum Hydrochinon reduziert, und das thiamingebundene Intermediat zum Acetyl-ThDP oxidiert. Durch die Übertragung des Acetylrestes auf ein Phosphat-Ion wird das Thiamindiphosphat regeneriert und Acetylphosphat als Produkt freigesetzt (5). Gleichzeitig und davon unabhängig erfolgt die Reoxidation des Flavins durch molekularen Sauerstoff, wobei als Produkt Wasserstoffperoxid entsteht (6).

Mit den nativen Substraten, d.h. in Gegenwart von Pyruvat, Phosphat und Sauerstoff, erfolgt die Elektronenübertragung zum Flavin so schnell, dass kein Semichinon-Radikal des Flavin detektiert werden kann. Ein kovalentes Addukt von Hydroxyethyl-ThDP-Carbanion und Flavin kann dabei aufgrund des großen Abstandes dieser beiden Kofaktoren ausgeschlossen werden, ebenso ist nach den Ergebnissen der Untersuchungen mit 5-carba-5-deaza-FAD und des Lösungsmittelisotopieeffekts ein Hydridtransfer unwahrscheinlich.

Auch bei der Reoxidation mit molekularem Sauerstoff bildet das Flavin höchstwahrscheinlich keine kovalenten Addukte, da POX zu den Oxidasen gehört und Flavin-Hydroperoxide bisher nur in der Klasse der Oxygenasen gefunden wurden. Somit

beschränkt sich die Rolle des FAD in POX auf den einfachsten Fall eines reinen Elektronenüberträgers vom Hydroxyethyl-ThDP-Carbanion zum Sauerstoff.

Die ebenfalls in [59] vorgestellte Untersuchung der ThDP-Reaktionsintermediatverteilung bei Wildtyp-POX enthält als überraschenden

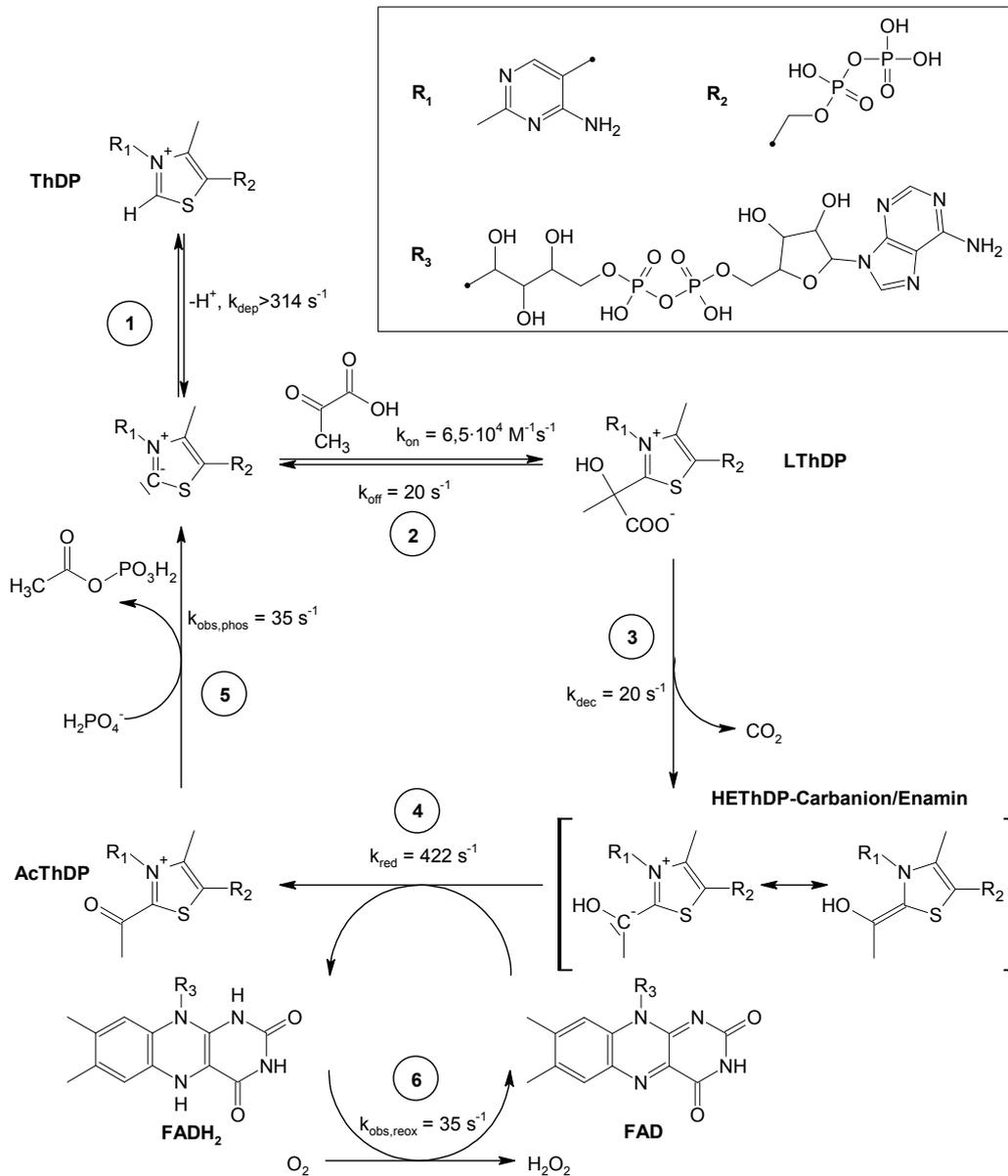


Abb. 1.6: Katalysemechanismus der Pyruvatoxidase aus *Lactobacillus plantarum*, nach [69]. (1) Deprotonierung des C(2) des Thiamindiphosphat (**ThDP**), (2) Addition von Pyruvat und Bildung von Lactyl-ThDP (**LThDP**), (3) Decarboxylierung zu Hydroxyethyl-ThDP-Carbanion/Enamin (**HETHDP**), (4) Oxidation von HETHDP zu Acetyl-ThDP (**AcThDP**), (5) Abspaltung von Acetylphosphat, (6) Reoxidation von FADH₂ zu FAD.

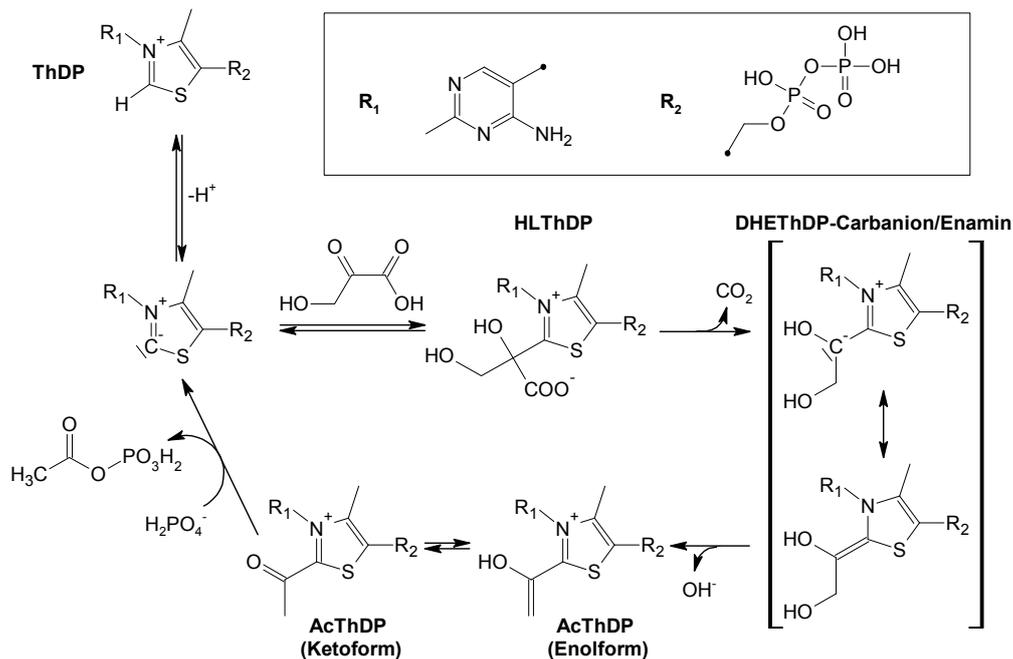


Abb. 1.7: Vorgeschlagener Katalysemechanismus der Phosphoketolase mit Hydroxypyruvat als Substrat. Die Reaktion für das native Substrat Xylulose-5-Phosphat unterscheidet sich nur dadurch, dass anstelle von CO₂ Glycerinaldehyd-3-Phosphat abgespalten wird.

Befund, dass in Gegenwart von Phosphat *kein* Acetyl-ThDP gefunden wird, während es bei Phosphatabwesenheit akkumuliert. Erklärbar ist dies durch die Annahme, dass Phosphat am enzymgebundenen Acetyl-ThDP sehr schnell angreift und ein tetraedrales Addukt bildet, das unter den stark sauren *Quench*-Bedingungen nicht stabil ist und zu ThDP und Acetylphosphat zerfällt.

1.5 Bildung von Acetylphosphat

Ein sehr interessanter und POX-spezifischer Reaktionsschritt ist die Phosphorolyse des Acetyl-ThDP mit der Bildung von Acetylphosphat. Diese Reaktion kommt sonst nur noch bei der Phosphoketolase vor und ist erst wenig untersucht ([70], [71]). Ein hypothetisches Reaktionsschema für Phosphoketolase zeigt Abb. 1.7. Man erkennt, dass hier das Acetyl-ThDP auf anderem Weg als bei POX entsteht, der anschließende Acetyltransfer jedoch prinzipiell gleich ist.

Die Phosphorolyse des Acetyl-ThDP bei POX und Phosphoketolase ist eine der wenigen biologischen Phosphattransfer-Reaktionen, in denen das Phosphat-Ion als Nucleophil reagiert. Der Mechanismus dieser Reaktion ist unklar. Lienhard fand in wäss-

riger Lösung *keine* Übertragung der Acetylgruppe von 2-Acetyl-3,4-Thiazolium auf Phosphat [72]. Auch von Acetyl-ThDP selbst wird in wässriger Lösung kein Acetylrest auf Phosphat übertragen [73]. Dem Enzym kommt bei dieser Reaktion also eine entscheidende Rolle zu, vermutlich durch die Bereitstellung eines wasserfreien Reaktionsmilieus. Eine analoge Situation findet sich in der Literatur: in [74] wird gezeigt, dass in *wasserfreiem* Acetonitril der Acetyltransfer von 2,4-Dinitrophenylacetat auf Phosphat zu 100% verläuft, jedoch schon geringe Mengen Wasser (1%) diese Reaktion zum einen kinetisch inhibieren und zum anderen die Hydrolyse zur dominierenden Konkurrenzreaktion werden lassen.

Die *Hydrolyse* des Acetyl-ThDP ist spezifisch basenkatalysiert ([72], [73], [75], [76]) und verläuft bei physiologischen pH-Werten schnell genug, dass die artifizielle Oxidation von enzymgebundenem Hydroxyethyl-ThDP zu Acetyl-ThDP für Aktivitätstests ausgenutzt werden kann (z.B. für Transketolase, Pyruvatdecarboxylase oder Pyruvatdehydrogenase), wenn dazu chromogene Oxidationsmittel wie Ferricyanid oder Dichlorphenolindophenol verwendet werden. Man beachte, dass im Reaktionszyklus dieser Enzyme die Oxidationsstufe des Acetyl-ThDP normalerweise gar nicht durchlaufen wird und die Hydrolyse des Acetyl-ThDP von diesen Enzymen daher sehr wahrscheinlich auch nicht spezifisch katalysiert wird, also spontan abläuft.

Damit stellt sich die Frage, wie die konkurrierende und thermodynamisch weitaus günstigere Hydrolyse des Acetyl-ThDP bei POX fast völlig unterdrückt wird. Hier wird die Hydrolyse des Acetyl-ThDP erst bei Abwesenheit von Phosphat zur Hauptreaktion ($k_{cat,Phosphat} = 16 \text{ s}^{-1}$, $k_{cat,H_2O} = 0,03 \text{ s}^{-1}$). Überraschenderweise ändert sich mit dem Fehlen von Phosphat auch die Kinetik des Elektronentransfers vom Hydroxyethyl-ThDP zum FAD, also eines der Phosphorolyse eigentlich *vorgelagerten* Schrittes. Dieser Transfer wird zweiphasig: während das erste Elektron weiterhin sehr schnell auf das Flavin übertragen wird, folgt das zweite etwa 100mal langsamer nach. Als Folge dessen treten intermediär radikalische Flavin-Semichinonspezies auf [69].

1.6 Ziele der Arbeit

Aus den oben beschriebenen Sachverhalten ergeben sich die folgenden Fragen für die vorliegende Arbeit.

1. POX eignet sich als Modell, an dem erstmals der Einfluß der FAD-Konformation auf die Eigenschaften des proteingebundenen Kofaktors un-

tersucht werden kann. Als neue Methode soll dazu die redox-induzierte IR-Differenzspektroskopie verwendet werden. Als Referenz dienen freies FAD sowie weitere Flavoproteine. Zur Interpretation der Spektren, insbesondere zur Bandenzuordnung, soll eine quantenchemische Normalmodenanalyse erstmals auch für reduziertes Flavin erfolgen.

2. Es soll versucht werden, die Konformation des POX-gebundenen Flavins durch geeignete Aminosäureaustausche im Protein zu verändern und auch für diese Varianten eine entsprechende Analyse mit Hilfe der IR-Spektroskopie durchzuführen. Der strukturelle Nachweis einer Konformationsänderung des Flavins in den Varianten ist dabei wünschenswert.
3. Durch Aminosäureaustausche im aktiven Zentrum von POX und anschließende Analyse der Reaktionsintermediatverteilung dieser Varianten soll — in Analogie zur oben erwähnten *ZmPDC* — versucht werden, einzelnen Aminosäuren eine Funktion während der Katalyse zuzuordnen.
4. Mit den generierten POX-Varianten und durch kinetische Untersuchungen mit phosphatanalogen Verbindungen soll die Substratspezifität des Phosphorolyse-schrittes und die Kopplung zwischen Phosphorolyse und Elektronentransfer beleuchtet werden.
5. Aufgrund der Ähnlichkeit des Phosphorolyse-schrittes bei POX und Phosphoketolase soll letztere erstmals in ausreichender Menge präpariert und hinsichtlich der Intermediatverteilung bei An- und Abwesenheit von Phosphat untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Thermocycler	T-Gradient	Biometra
DNA-Sequenzierer	ABI Prism 310	Applied Biosystems
Autoklav	3870M	Tuttnauer
Homogenisator („French Press“)	Gaulin	APV Homogeniser GmbH
Zentrifugen	L8-60M	Beckman
	J2-HC	Beckman
	RC 5B	Sorvall
	EBA 12	Hettich
FPLC-System	Pump P-500	Pharmacia LKB
	Programmer GP-250 Plus	Pharmacia LKB
FPLC-Säulen	HiLoad 16/60 mit Superdex 200 <i>prep grade</i>	Pharmacia
	HiLoad 26/10, Q-Sepharose	Pharmacia
	HiLoad 26/10, Source Q	Pharmacia
	XK 26 mit Fractogel EMD TMAE 650 (S)	Pharmacia Merck
UV-VIS-Spektrometer	Uvikon 940	Kontron Instruments
	DU-70	Beckman
<i>Rapid Quenched-Flow</i>	RQF-3	Kintek
<i>Stopped Flow-</i> Spektrometer	SX-18MV	Applied Photophysics
NMR-Spektrometer	Avance ARX 400	Bruker
FTIR-Spektrometer	modifiziertes IFS 25	Bruker

2.1.2 Chemikalien

Acrylamid (30%)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
ADP	AppliChem GmbH, Darmstadt
Agar-Agar	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Agarose	AppliChem GmbH, Darmstadt
4-Aminoantipyrin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Ammoniumcitrat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Ammoniumsulfat	VWR International GmbH, Darmstadt
AMP	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Ampicillin	AppliChem GmbH, Darmstadt
ATP	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Bisacrylamid (2%)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Borsäure	VEB Laborchemie, Apolda
Bromphenolblau	VWR International GmbH, Darmstadt
Rinderserumalbumin, Fraktion V	VWR International GmbH, Darmstadt
Citronensäure, Monohydrat	VWR International GmbH, Darmstadt
CoA, Trilithiumsalz	AppliChem GmbH, Darmstadt
Coomassie-Brillantblau G250	AppliChem GmbH, Darmstadt
DAO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
DCPIP	VWR International GmbH, Darmstadt
DCPS, Natriumsalz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
DTE	AppliChem GmbH, Darmstadt
Deuteriumoxid (99,9%)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Dikaliumhydrogenphosphat	VEB Laborchemie, Apolda
EDTA	VWR International GmbH, Darmstadt
Eisen(III)-chlorid	VWR International GmbH, Darmstadt
Essigsäure	VWR International GmbH, Darmstadt
Ethanol (96%)	VWR International GmbH, Darmstadt
Kaliumhexacyanoferrat(III)	VEB Laborchemie, Apolda
FAD	AppliChem GmbH, Darmstadt
FMN	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Glucose	AppliChem GmbH, Darmstadt
Glycerol (87%)	VWR International GmbH, Darmstadt
Glycin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
GOX	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Hefeextrakt	AppliChem GmbH, Darmstadt

Hydroxybrenztraubensäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Hydroxylamin-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
IPTG	AppliChem GmbH, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	VEB Laborchemie, Apolda
Kaliumhydroxid	VWR International GmbH, Darmstadt
Kanamycin	AppliChem GmbH, Darmstadt
Katalase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Magnesiumsulfat (Heptahydrat)	VWR International GmbH, Darmstadt
Mangansulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Meerrettich-Peroxidase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
MES	AppliChem GmbH, Darmstadt
NADH (97%)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumacetat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumchlorid	VWR International GmbH, Darmstadt
Natriumgluconat	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumhydroxid	VWR International GmbH, Darmstadt
Natriumpyrophosphat	VWR International GmbH, Darmstadt
Natriumpyruvat	VWR International GmbH, Darmstadt
PEG 6000	VWR International GmbH, Darmstadt
Phosphorsäure (85%)	VWR International GmbH, Darmstadt
Protaminsulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Proteasepepton	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Salzsäure (37%)	VWR International GmbH, Darmstadt
Schwefelsäure (97%)	VWR International GmbH, Darmstadt
SDS	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Sorbitol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Streptomycinsulfat	AppliChem GmbH, Darmstadt
TCA	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
TEMED	VWR International GmbH, Darmstadt
ThDP-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Tris	VWR International GmbH, Darmstadt
Trypton	AppliChem GmbH, Darmstadt
Tween	AppliChem GmbH, Darmstadt

Alle verwendeten Feinchemikalien entsprachen dem Reinheitsgrad *pro analysi* und wurden ohne weitere Reinigung verwendet.

2.1.3 Stämme, Plasmide, Oligonukleotide

Tab. 2.1: Verwendete Bakterienstämme

Bezeichnung	Genotyp	Bezugsquelle
<i>Escherichia coli</i> C600	F ⁻ [e14 ⁻ (McrA ⁻) or e14 ⁺ (McrA ⁺)] <i>thr-1 leuB6 thi-1 lacY1</i> <i>supE44 rfbD1 fhuA21</i>	Stratagene, Heidelberg
<i>Escherichia coli</i> XL1 Blue	F'::Tn10 <i>proA⁺B⁺</i> <i>lacI^q Δ(lacZ)M15/recA1</i> <i>endA1 gyrA96 (Nal^r)</i> <i>thi hsdR17 (r_K⁻ m_K⁺)</i> <i>supE44 relA1 lac</i>	Stratagene, Heidelberg
<i>Lactobacillus pentosus</i> DSM Nr. 20314, ATCC 8041	Wildtyp	DSMZ, Braunschweig

Tab. 2.2: Verwendete Plasmide

Bezeichnung	Eigenschaften	Bezugsquelle
pBP200	<i>pox</i> -Gen unter <i>tac</i> - Promotorkontrolle, Ampicillinresistenz	Prof. Dr. R. Rudolph
pFDX500Δdra	Expression von <i>lacI^q</i> , Kanamycinresistenz	Dr. J. Winter

Tab. 2.3: Oligonukleotide für Sequenzierungen

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'
poxseq f 430–450	AAT-AAC-ATG-TGG-CAA-CGT-GGC
poxseq b 773–793	ATT-TGG-GTT-CTG-CTA-ATC-GGG
poxseq f 926–946	GTC-GTT-TAC-CTA-ACT-TAG-CCG
poxseq b 1254–1274	ATT-TGC-TAC-GAT-GGG-AGT-TGG

Tab. 2.4: Oligonukleotide für die ortsgerichtete Mutagenese. Die zur Wildtyp-Sequenz nicht homologen Basen sind **fett** gedruckt. In der Spalte **Enzym** ist ein passendes Restriktionsenzym aufgeführt, für das sich die Schnittstellen von Wildtyp und Mutante unterscheiden und das daher für einen analytischen Restriktionsverdau verwendet werden kann.

Name	Sequenz 5' → 3'	Enzym
E59A-b E59A-f	C-CAT-TAT-ATT-CAA-GTA-CGG-CAT- GCG -GAA-GTT-GGT-GCA-ATG-GCC GGC-CAT-TGC-ACC-AAC-TTC- CGC -ATG-CCG-TAC-TTG-AAT-ATA-ATG-G	SphI
E59D-b E59D-f	CAA-GTA-CGG-CAT- GAT -GAA-GTT-GGT-GCA-ATG CAT-TGC-ACC-AAC-TTC- ATC -ATG-CCG-TAC-TTG	-/-
E59Q-b E59Q-f	C-CAT-TAT-ATT-CAA-GTA-CGG-CAT- CAG -GAA-GTT-GGT-GCA-ATG-GCC GGC-CAT-TGC-ACC-AAC-TTC- CTG -ATG-CCG-TAC-TTG-AAT-ATA-ATG-G	-/-
F121I-b F121I-f	GGG-ATG-AAC-ATG-GAT-ACG- ATC -CAA-GAA-ATG-AAT-GAG CTC-ATT-CAT-TTC-TTG- GAT -CGT-ATC-CAT-GTT-CAT-CCC	DpnI
F121Y-b F121Y-f	GGG-ATG-AAC-ATG-GAT-ACG- TAC - CAG -GAA-ATG-AAT-GAG CTC-ATT-CAT-TTC- CTG - GTA -CGT-ATC-CAT-GTT-CAT-CCC	SnaBI
Q122A-b Q122A-f	G-AAC-ATG-GAT-ACG-TTC- GCG -GAA-ATG-AAT-GAG-AAT-CC GG-ATT-CTC-ATT-CAT-TTC- CGC -GAA-CGT-ATC-CAT-GTT-C	BstUI
Q122E-b Q122E-f	G-AAC-ATG-GAT-ACG-TTC- GAA -GAA-ATG-AAT-GAG-AAT-CC GG-ATT-CTC-ATT-CAT-TTC- TTC -GAA-CGT-ATC-CAT-GTT-C	BstBI
V265A-b V265A-f	G-GGT-TCT-GCT-AAT- CGC - GCG -GCA-CAA-AAA-CCG-GCG CGC-CGG-TTT-TTG-TGC- CGC - GCG -ATT-AGC-AGA-ACC-C	BstUI
E483Q-b E483Q-f	GGA-TTT-ATC-AAA-GAT- CAG -CAG-GAA-GAT-ACT-AAT-C G-ATT-AGT-ATC-TTC-CTG- CTG -ATC-TTT-GAT-AAA-TCC	DpnI

2.2 Generierung von POX-Varianten

Punktmutanten des POX-Gens wurden mit dem QuikChange-Kit der Firma Stratagene, Heidelberg, erzeugt. Das dazu benötigte Wildtyp-Plasmid wurde aus dem entsprechenden *E. coli*-Stamm mit dem Plasmid Mini Kit der Firma Qiagen, Hilden, isoliert. Die Kits wurden nach Anweisung des Herstellers verwendet. Mutagenisierte Plasmide wurden zur Transformation von *E. coli* XL1 Blue-Zellen verwendet. Für jede Mutante wurden in einem ersten Durchgang ca. 6 Klone durch Induktion mit IPTG auf die Expression eines Proteins der korrekten Größe (laut SDS-PAGE) getestet. Aus positiven Kandidaten wurde das Plasmid isoliert und durch analytischen Restriktionsverdau mit einem geeigneten Enzym (siehe Tab. 2.4) der korrekte Einbau der verwendeten Oligonukleotide geprüft. Für positive Kandidaten wurde mit einem der Primer aus Tab. 2.3 das Gen an der fraglichen Stelle sequenziert und mit der Wildtypsequenz auf Abwesenheit ungewollter Basenaustausche an den Übergangsstellen zwischen Mutagenese-Oligonukleotid und Wildtyp-Sequenz geprüft. Abschließend wurde zur Herstellung eines Expressionsstammes das geprüfte Plasmid zur Trans-

formation von *E. coli* C600-Zellen verwendet, die bereits das Plasmid pFDX500 Δ dra trugen. Alle Bakterienstämme wurden als Glycerolkulturen (70% (v/v) LB-Kultur + 30% (v/v) Glycerol) bei -70°C gelagert.

2.3 Präparation von Pyruvatoxidase

2.3.1 Zellanzucht

Pyruvatoxidase aus *Lactobacillus plantarum* wurde rekombinant in *E. coli* exprimiert. Dazu wurde der *E. coli*-Stamm C600 mit dem Plasmid pBP200 transformiert. Dieses Plasmid enthält das *pox*-Gen von *L. plantarum* unter der Kontrolle eines *tac*-Promotors und vermittelt Ampicillinresistenz. Weiterhin wurde der Stamm mit dem Plasmid pFDX500 Δ dra transformiert, welches das *lacI^q*-Gen für den *lac*-Repressor enthält und Kanamycinresistenz vermittelt.

Das Nährmedium für die Zellanzucht enthielt 10 g/l Pepton, 5 g/l Hefeextrakt, 15 g/l Lactose, 100 mg/l Ampicillin, 50 mg/l Kanamycin, 35 mg/l Thiamin, 50 mg/l FMN und 100 mM Kaliumdihydrogenphosphat. Lactose-Stammlösung und das Basismedium mit Pepton, Hefeextrakt und Kaliumdihydrogenphosphat wurden separat autoklaviert und dann gemischt, anschließend wurden sterilfiltrierte Stammlösungen der restlichen Bestandteile bis zur angegebenen Konzentration zugefügt.

6 \times 0,7 l des Mediums wurden mit den Zellen aus 100 ml einer Übernachtskultur angeimpft, die im selben Medium, jedoch ohne Lactose gewachsen war. Dieses Medium wurde 15 h bei 30°C geschüttelt. Die durch Zentrifugation geernteten Zellen (ca. 20 g) wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -30°C eingefroren.

2.3.2 Proteinreinigung

Die folgenden Arbeiten wurden auf Eis bzw. im Kühlraum (6°C) durchgeführt.

Die Zellsuspension wurde nach zwei Einfrier-Auftau-Zyklen mit dem gleichen Volumen Puffer (50 mM Kaliumphosphat pH 6,0, 10% (v/v) Glycerol, je 1 mM ThDP, MgSO_4 und FAD) aufgefüllt und durch Hochdruckdispersion („French Press“) abgeschlossen. Zum Lysat wurde eine konzentrierte wässrige Stammlösung Protaminsulfat tropfenweise bis zu einer Endkonzentration Protaminsulfat von 0,5% (w/v) zugeetzt. Die Suspension wurde für 15 min gerührt und anschließend 30 min mit 50000g zentrifugiert. Das Pellet aus Zellbruchstücken und DNA wurde verworfen.

Der klare Überstand wurde einer fraktionierten Fällung von 23% bis 33% (w/v) Ammoniumsulfat unterworfen. Das resultierende Pellet wurde in 1 ml Glycerol und 3 ml Puffer (20 mM Kaliumphosphat pH 6,0, je 100 μ M ThDP und $MgSO_4$) aufgenommen und der pH-Wert der resultierenden dunkelgelben Lösung mit stark verdünnter KOH-Lösung auf pH 6,0 nachgestellt. Diese Lösung wurde anschließend gegen Puffer (20 mM Kaliumphosphat pH 6,0, je 100 μ M ThDP und $MgSO_4$) dialysiert: 2 h gegen 100 ml, anschließend über Nacht gegen 1 l. Ein eventuell auftretender Niederschlag wurde durch Zentrifugation entfernt.

Das Dialysat wurde auf eine mit Dialysepuffer äquilibrierte Anionenaustauschersäule (20 ml Source 15Q oder 50 ml Q-Sepharose) aufgetragen. Die Elution erfolgte durch linear steigenden Kaliumphosphat-Gradienten (pH 6,0) bis max. 0,5 M Kaliumphosphat. Gelbe Fraktionen wurden gesammelt und mittels SDS-Gelelektrophorese analysiert. Fraktionen ausreichender Reinheit wurden vereinigt und mit 40% (w/v) Ammoniumsulfat ausgefällt. Das nach Zentrifugation erhaltene Pellet wurde in so wenig wie möglich (max. 5 ml) 0,2 M Kaliumphosphatpuffer pH 6,0 aufgelöst, mit je 5 mM ThDP, $MgSO_4$ und FAD rekombiniert und auf eine Gelfiltrationssäule (Superdex 200 prep grade, 2,6 \times 60 cm) aufgetragen. Die Elution erfolgte mit dem gleichen Puffer. Peakfraktionen wurden gesammelt, mittels SDS-Gelelektrophorese analysiert, bei genügender Reinheit vereinigt und mit Macrosep-Zentrifugationsröhrchen konzentriert. Nach Zugabe von 10% (v/v) Glycerol wurde die Proteinlösung aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

Die Präparation von Wildtyp und Varianten erfolgte nach der gleichen Vorschrift. Apoenzym wurde nach der in [77] beschriebenen Methode erhalten (Fällung mit saurer Ammoniumsulfat/KBr-Lösung).

2.4 Präparation von Phosphoketolase

2.4.1 Zellanzucht

Das für die Anzucht des Wildtyp-Stammes von *Lactobacillus pentosus* verwendete M+Gluconat-Medium setzte sich wie folgt zusammen (Angaben für 1 l): 5 g Natriumacetat, 2 g Dikaliumhydrogenphosphat, 2 g Ammoniumcitrat, 50 mg Mangansulfat, 200 mg Magnesiumsulfat, 5 g Hefeextrakt, 1 g Proteasepepton, 1 g Tween, 10 g Natriumgluconat. Der pH-Wert wurde auf pH 6,5 eingestellt und das Medium an-

schließlich autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurden noch 0,2 g Thiamin pro Liter steril zugesetzt.

Zellen aus 200 ml einer über 1,5 Tage bei 37°C ohne Schütteln gewachsenen Vorkultur von *L. pentosus* wurden zum Animpfen von 12 l Medium eingesetzt. Diese Hauptkultur wurde für 2 d ohne Schütteln bei 37°C inkubiert. Die Zellen (≈ 20 g) wurden abzentrifugiert und bis zur Verwendung bei -30°C gelagert.

2.4.2 Proteinreinigung

Die Zellen wurden nach drei Einfrier-Auftau-Zyklen mit dem gleichen Volumen 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6,8, je 1 mM ThDP, MgSO_4 aufgefüllt und durch Hochdruckdispersion (4 Passagen „French Press“) aufgeschlossen. Das Lysat wurde noch einmal mit dem gleichen Volumen Puffer verdünnt und anschließend zur Abtrennung der Zelltrümmer zentrifugiert (30 min, 50000g). Zum Überstand wurde eine konzentrierte wässrige Lösung Protaminsulfat tropfenweise bis zu einer Endkonzentration an Protaminsulfat von 0,3% zugegeben und ausgefallene DNA erneut abzentrifugiert (15 min, 50000g).

Der pH-Wert des so erhaltenen Lysats wurde mit stark verdünnter Phosphorsäure auf pH 5,1 eingestellt und die so ausgefallenen Proteine durch Zentrifugation abgetrennt (30 min, 50000g). Das Pellet wurde verworfen und der Überstand einer fraktionierten Ammoniumsulfatfällung von 23% bis 34% (w/v) Ammoniumsulfat unterzogen. Das im zweiten Fällschritt erhaltene Proteinpellet wurde in 12 ml Puffer (25 mM MES, pH 6,0) aufgelöst und zweimal gegen denselben Puffer dialysiert: 2 h gegen 100 ml, danach über Nacht gegen 1 l. Eine eventuell auftretende Trübung wurde durch Zentrifugation entfernt.

Das Dialysat wurde auf eine mit 25 mM MES, pH 6,0 äquilibrierte Anionenaustauschersäule aufgetragen (50ml Q-Sepharose) und mit einem linear steigenden Ammoniumsulfatgradienten (max. 0,3 M Ammoniumsulfat) eluiert. Peakfraktionen wurden im SDS-Gel analysiert und auf Phosphoketolaseaktivität getestet. Aktive Fraktionen genügender Reinheit wurden vereinigt, mittels Macrosep-Zentrifugenröhrchen konzentriert und mit je 1 mM ThDP und MgSO_4 komplementiert. Die konzentrierte Proteinlösung wurde auf eine mit 25 mM MES, pH 6,0, 0,2 M Ammoniumsulfat äquilibrierte Gelfiltrationssäule aufgetragen und mit dem gleichen Puffer eluiert. Peakfraktionen wurden im SDS-Gel analysiert, bei genügender Reinheit vereinigt, konzentriert, er-

neut mit 1 mM ThDP und MgSO_4 versetzt, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.5 Aktivitätstests

2.5.1 Pyruvatoxidase

2.5.1.1 H_2O_2 -detektierender Test

Beim Wasserstoffperoxid-detektierenden Test („Boehringer-Mannheim-Test“) wird in einer gekoppelten Reaktion das von der POX gebildete H_2O_2 durch Meerrettich-Peroxidase mit 4-Aminoantipyrin und 2,4-Dichlorphenolsulfonsäure zu einem Chinonimin-Farbstoff (4-(p-Benzochinon-monoimino)-phenazon) umgesetzt, dessen Bildung bei 546 nm spektrometrisch verfolgt werden kann.

- BM-Mix: 30 mg 4-Aminoantipyrin ($M=203,2$ g/mol) und 178 mg 2,4-Dichlorphenolsulfonsäure-Natriumsalz ($M=265$ g/mol) mit 10 ml Puffer pH 6 (50 mM Kaliumphosphat oder 100 mM MES) auffüllen und pH-Wert evtl. nachstellen
- 100 μl BM-Mix, 5–75 μl 1 M Na-Pyruvat (in Puffer) in eine Küvette geben, ad 1 ml Puffer pH 6 (50 mM Kaliumphosphat oder 100 mM MES)
- 5 μl Meerrettich-Peroxidase zugeben (10 mg/ml in Puffer pH 6 (50 mM Kaliumphosphat oder 100 mM MES))
- Reaktion starten durch Zugabe von 1–10 μl POX-Lösung

Die spezifische Enzymaktivität ergibt sich dann nach:

$$A_S = \frac{1}{c_P} \cdot A_V = \frac{1}{c_P} \cdot \frac{\Delta E_T \cdot V}{\varepsilon_{546\text{nm}} \cdot d \cdot v}$$

Darin bedeuten: A_V Volumenaktivität (U/ml), A_S spezifische Aktivität (U/mg), ΔE_T Extinktionsänderung pro Zeit (min^{-1}), V Volumen des Messansatzes (μl), v Volumen der POX-Lösung (μl), d Schichtdicke (cm), Proteinkonzentration der POX-Lösung (mg/ml), $\varepsilon_{546\text{ nm}}$ Extinktionskoeffizient des Farbstoffs ($16,5\text{ cm}^2 \cdot \mu\text{mol}^{-1}$)

Dieser Test eignet sich nicht für hohe Konzentrationen an Pyruvat (>100 mM), da dieses zunehmend in einer Konkurrenzreaktion mit Wasserstoffperoxid unter oxidativer Decarboxylierung zu Acetat reagiert.

2.5.1.2 DCPIP-Test

Der Farbstoff 2,6-Dichlorphenol-Indophenol (DCPIP) kann bei der POX-Reaktion die Elektronen vom Hydroxyethyl-ThDP-Carbanions akzeptieren und so die Funktion des Flavins übernehmen. Diese Reduktion des Farbstoffs ist mit einer großen Extinktionsabnahme bei 600 nm verbunden, die spektrometrisch verfolgt werden kann.

- 5–100 μl 1 M Natriumpyruvat in Puffer pH 6 (50 mM Kaliumphosphat oder 100 mM MES) in eine Küvette geben
- ad 1 ml Puffer pH 6 (50 mM Kaliumphosphat oder 100 mM MES)
- 10 μl DCPIP (9,1 mM in Ethanol) zugeben
- Reaktion starten durch Zugabe von 1–10 μl POX-Lösung

Die spezifische Enzymaktivität ergibt sich nach:

$$A_S = -\frac{1}{c_P} \cdot A_V = -\frac{1}{c_P} \cdot \frac{\Delta E_T \cdot V}{\epsilon_{600nm} \cdot d \cdot v}$$

Die Bedeutung der Formelzeichen ist die gleiche wie unter 2.5.1.1, abweichend gilt $\epsilon_{600nm} = 17,7 \text{ cm}^2 \cdot \mu\text{mol}^{-1}$) für den Extinktionskoeffizienten des DCPIP.

2.5.2 Phosphoketolase

Für Phosphoketolase steht nur ein diskontinuierlicher Test zur Verfügung, bei dem das enzymatisch gebildete Acetylphosphat durch nachfolgende Umsetzung mit Hydroxylamin zur Hydroxamsäure als farbiger Eisenkomplex nachgewiesen wird. Dieser Test wurde nur zur Verfolgung der Enzympräparation (Bestimmung der aktiven Fraktionen nach Chromatographie) und nicht für kinetische Untersuchungen verwendet. Das hier verwendete Hydroxypyruvat dient als Ersatz für das kommerziell nicht verfügbare native Substrat Xylulose-5-Phosphat.

- Lösung A: 100 μl Kaliumphosphat (0,2 M, pH 6,8) + 10 μl MgSO_4 (0,1 M) + 20 μl ThDP (50 mM)
- Lösung B: 350 μl $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ (28% (w/v), pH 6.4) + 350 μl Natriumacetat (0,1 M, pH 6,5)
- Lösung C: 150 μl HCl (6 N) + 100 μl TCA (24% (w/v)) + 100 μl FeCl_3 (20% (w/v) in 0,1 N HCl)
- 130 μl Lösung A mischen mit 200 μl Kaliumhydroxypyruvat (20 mM, pH \approx 6,8, frisch bereiten und bei der pH-Einstellung nicht ins Basische übertitrieren) und 10–100 μl Phosphoketolaselösung zugeben, ad 500 μl H_2O , Reaktionsansatz 15 min bei 37°C inkubieren
- 200 μl des Reaktionsansatzes mit 700 μl Lösung B mischen, 10 min bei 50°C inkubieren
- Mischung mit 350 μl Lösung C versetzen, Trübungen abzentrifugieren
- spektrometrische Bestimmung der Extinktion bei 505 nm

Eine Eichung des Tests kann durch Verwendung variierender Mengen von Acetylphosphat anstelle von Hydroxypyruvat geschehen.

2.6 Bestimmung der Proteinkonzentration

Proteinkonzentrationen wurden über die Proteinextinktion (POX) oder durch das Verfahren nach Bradford (POX, Phosphoketolase) [78] bestimmt.

Zur Bestimmung der POX-Konzentration über die Proteinextinktion wurden Spektren in Quarzküvetten aufgenommen. Die verwendeten Extinktionskoeffizienten (laut [5]) betragen für das POX-Holoenzym $\epsilon_{278\text{nm}}=1,65 \text{ cm}^2/\text{mg}$ und $\epsilon_{406\text{nm}}=0,235 \text{ cm}^2/\text{mg}$ und für das POX-Apoenzym $\epsilon_{278\text{nm}}=1,071 \text{ cm}^2/\text{mg}$. Die Messung der POX-Konzentration auf diesem Weg ist nur dann möglich, wenn die Lösung keine überschüssigen Kofaktoren enthält.

Zur Proteinbestimmung nach Bradford wurde eine Eichkurve mit einer POX-Apoenzymlösung erstellt, deren Konzentration spektrometrisch ermittelt wurde.

2.7 UV-VIS-Spektroskopie

Konventionelle UV-VIS-Spektroskopie wurde bei 25°C mit einem Uvikon 941 Spektrometer mit Einweg-Polystyrolküvetten und einfachen oder reduzierten Quarzküvetten verschiedener Schichtdicke (1 oder 10 mm) durchgeführt. Proteinspektren wurden für den Beitrag des Puffers korrigiert. Für Messungen, die die Einstellung eines Gleichgewichts erforderten (etwa nach Verdünnung oder Zusatz eines Liganden), wurden mit der Aufnahme der Spektren solange gewartet, bis diese konstant waren.

2.8 *stopped-flow*-Spektroskopie

Zur Analyse schneller Reaktionen wurde ein SX18 MV *stopped-flow*-Spektrometer verwendet. Eine Spritze des Gerätes wurde mit Pyruvatoxidaselösung (Wildtyp oder Varianten) bekannter Konzentration gefüllt, die andere Spritze mit Substratlösung (jeweils gleicher Puffer). Für aerobe Messungen waren diese Lösungen luftgesättigt ($[O_2]=211 \mu\text{M}$). Für anaerobe Messungen wurden die Lösungen anaerobisiert: zu einem Milliliter Pyruvatoxidase oder Substrat wurden 5 μl 1 M Glucose und 5 μl GOX (100 mg/ml), Katalase (10 mg/ml) gegeben. Als Puffer kamen Kaliumphosphat und MES, pH 6, zum Einsatz. Die Konzentrationen und der Zusatz von Kofaktoren oder anderen Additiven ist bei den entsprechenden Experimenten im Ergebnisteil vermerkt. Spritzen und Messzelle waren durch ein Wasserbad bei 25°C thermostatiert.

Die Reaktion wurde durch schnelle Mischung der Lösungen in den beiden Spritzen im Verhältnis 1:1 gestartet und die Extinktion bei der angegebenen Wellenlänge verfolgt. Bei 457 nm wird die Extinktionsänderung des Flavins detektiert, die hier für den Übergang vom oxidierten zum reduzierten Zustand am größten ist. Bei 600 nm kann die Bildung des neutralen Flavin-Semichinonradikals verfolgt werden. Jede Messung wurde insgesamt dreimal wiederholt und der Mittelwert der drei Messungen für die Auswertung verwendet.

Für die Bestimmung der Enzymaktivität aus den Proteinextinktion-Zeit-Kurven, erhalten bei 457 nm unter aeroben Bedingungen (siehe z.B. Abb. 3.16), wurde die Methode von Gibson *et al.* angewendet [79]. Dabei wird ausgenutzt, dass im *steady state* die Reaktionsgeschwindigkeit proportional zur Flavinextinktion ist (mit der Extinktion des vollständig reduzierten Enzyms als Nullwert). Wird die Messkurve mit einem Faktor derart skaliert, dass die Fläche unter der Kurve und damit das Integral über den Bereich des *steady state* gleich der Anfangskonzentration des Sauerstoffs ist, gibt

der Zahlenwert der so skalierten Kurve in jedem Punkt die momentane Geschwindigkeit des O₂-Verbrauchs und damit die Reaktionsgeschwindigkeit in der Messzelle an. Mit der bekannten Proteinkonzentration ergibt sich daraus die spezifische Aktivität. Eine detaillierte Beschreibung findet sich in [68].

2.9 Röntgenkleinwinkelstreuung

Die Röntgenkleinwinkelstreuung ermöglicht die Bestimmung der molekularen Masse von gelösten Partikeln sowie deren Gyrationradius R_G , d.h. des mittleren Abstands zweier Streuzentren in einem Partikel und damit der Partikelgröße. Für eine ausführliche Behandlung der Theorie wird auf [80] verwiesen.

Für die Experimente wurde ein Messplatzaufbau mit Quadrantendetektor und einer 1,9 m langen Kamera verwendet. Zur Streuachsenkalibrierung diente eine Kollagenprobe. Die Proteinlösungen (BSA als Molekularmassenstandard mit einer Konzentration von 5 mg/ml und POX-V265A mit variablen Proteinkonzentrationen in einem Puffer mit 50 mM Kaliumphosphat pH 6, 5% (v/v) Glycerol, 5 mM DTE) wurden in einer 1 mm-Glimmerküvette bei 12°C thermostatiert. Streukurven wurden mit 15 Frames/Serie mit einem Frame pro Minute aufgenommen, die danach gemittelt wurden. Für jede Proteinprobe wurde im Anschluss eine Referenzmessung mit Puffer durchgeführt, um für den Streubeitrag des Puffers und die im Verlauf einer Füllung des Synchrotron-Speicherrings fallende Strahlintensität korrigieren zu können. Die erhaltenen Rohdaten wurden mit den am Messplatz X33 verfügbaren Programmen ausgewertet.

Die Messungen mittels Röntgenkleinwinkelstreuung am Messplatz X33 der EMBL-Außenstelle und die Auswertung der Daten erfolgten in Zusammenarbeit mit Dr. Stephan König vom Institut für Biochemie am Fachbereich Biochemie/Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg und Dr. Michel H. J. Koch von der EMBL-Außenstelle am Deutschen Elektronensynchrotron in Hamburg.

2.10 Intermediatanalyse mittels ¹H-NMR-Spektroskopie

Für die Intermediatanalyse wurden die Lösungen der Enzyme (POX-Wildtyp oder -Varianten und Phosphoketolase) mit einem Überschuss an Kofaktoren (5 mM ThDP/MgSO₄, 5 mM FAD) rekombiniert. Daran anschließend wurden die Proben mit

Vivaspin-Zentrifugationsröhrchen aufkonzentriert und umgepuffert in 100mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6,0, bis das Spektrum des Eluates höchstens 5 μM an freien Kofaktoren anzeigte. Die Endkonzentration der Proteine wurde durch Bradford-Test bestimmt und lag zwischen 16 und 51 mg/ml.

Für die Intermediatanalyse der POX und der Varianten ist es notwendig, die Zeitpunkte zu ermitteln, zu denen die enzymatische Reaktion den *steady state* erreicht, da hier (anders als bei Phosphoketolase) der verfügbare Sauerstoff mit einer max. Konzentration von 211 μM den Zeitraum des *steady state* stark limitiert. Dazu wurden 1:50-Verdünnungen der Enzymlösungen mit dem gleichen Volumen einer 200 mM Natriumpyruvatlösung in 100 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6,0, im *stopped-flow*-Spektrometer bei 25°C zur Reaktion gebracht und die Reaktion bei 457 nm verfolgt. Aus der Differenz der Flavinoxidation wurde außerdem gleichzeitig die Konzentration der tatsächlich reagierenden aktiven Zentren bestimmt. Zur Umrechnung diente dabei ein zuvor spektrometrisch ermittelter Differenz-Extinktionskoeffizient von $\Delta\epsilon_{457\text{nm},\text{POX}(\text{ox})-\text{POX}(\text{red})} = 0,167 \text{ cm}^2/\text{mg}$.

Zur Herstellung der Proben für die ^1H -NMR-Spektroskopie wurden die unverdünnten Proteinstammlösungen mit Natriumpyruvat in Phosphatpuffer im Verhältnis 1:1 zur Reaktion gebracht, und zwar unter ansonsten gleichen Bedingungen wie bei den vorangegangenen kinetischen Messungen per *stopped flow*. Die Reaktionen erfolgten dabei entweder in einer *chemical-quenched-flow*-Apparatur für Reaktionszeiten kleiner als 2 Sekunden oder manuell für längere Reaktionszeiten. Zum Reaktionsabbruch wurde die Mischung von Enzym und Substrat mit einem gleichen Volumen 12,5% (w/v) Trichloressigsäure in 1 M DCl in D_2O versetzt. Ausgefallenes Protein wurde abzentrifugiert und der Überstand mittels 1D- ^1H -NMR in einem Bruker Avance ARX 400 NMR-Spektrometer vermessen [59].

Die Intermediatanalyse mittels NMR-Spektroskopie ist das Ergebnis einer Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Kai Tittmann vom Institut für Biochemie am Fachbereich Biochemie/Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

2.11 Infrarotspektroskopie

Die IR-spektroskopischen Arbeiten erfolgten in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Michaela Ritter in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Werner Mäntele am Institut für Biophysik der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt/Main.

2.11.1 Probenvorbereitung

FAD-IR-Spektren wurden aufgenommen mit einer Lösung von 10 mM FAD in 100 mM Kaliumphosphat, pH 6, 100 mM Kaliumchlorid.

Proteinlösungen für die FTIR-Spektroskopie wurden mit Microcon- oder Vivaspin-Ultrazentrifugationsröhrchen umgepuffert. Die verwendete Proteinkonzentration betrug dann ca. 1–3 mM aktive Zentren, was für alle drei verwendeten Proteine aufgrund der ähnlichen Molekülgröße etwa 60–180 mg/ml entspricht. Das Eluat aller Proben nach dem letzten Umpufferungsschritt war farblos im Gegensatz zur intensiv gelben Proteinlösung. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass sich in den Proteinlösungen kein freies FAD befand, welches die erhaltenen Spektren verfälscht hätte. Es wurden die folgenden Puffer für die verschiedenen Enzyme verwendet:

- POX: 100 mM Kaliumphosphat, pH 6, 50 mM Kaliumchlorid
- GOX: 100 mM Kaliumphosphat, pH 6,5, 100 mM Kaliumchlorid
- DAO: 100 mM Kaliumpyrophosphat, pH 8,3, 100 mM Kaliumchlorid

Eine detaillierte Beschreibung der verwendeten elektrochemischen Zelle ist [31] zu entnehmen. Das als Arbeitselektrode dienende Goldnetz wurde durch Behandlung mit einer 2 mM Cysteaminlösung hydrophilisiert, um eine Denaturierung des Proteins auf der eigentlich hydrophoben Metalloberfläche zu verhindern. Vor dem Einfüllen in die Zelle wurde die Proteinlösung mit einem Mix von Redoxmediatoren komplettiert (Tab. 2.5, in Anlehnung an [36]). Die Endkonzentration jeder Komponente betrug ca. 40 μ M. Die Mediatoren beschleunigen die Einstellung des Gleichgewichts in der Zelle nach einer Änderung des Elektrodenpotentials. Im Anschluss wurde die IR-Zelle mit 6–10 μ l der Proteinlösung befüllt und die Schichtdicke auf 6–8 μ m eingestellt. Für die Messungen wurde die Zelle auf 15°C thermostatiert.

2.11.2 Aufnahme der Spektren

Zur Verwendung kam ein IFS 25 FTIR-Spektrometer (Bruker), das durch eine Modifikation die simultane Aufnahme von IR-Spektren zwischen 2000 cm^{-1} und 1000 cm^{-1} und von VIS-Spektren zwischen 400 nm und 800 nm in Abhängigkeit vom Redoxpotential in der Messzelle gestattete. Zur Messung der Differenzspektren wurde die

Tab. 2.5: Redoxmediatoren für die IR-Spektroskopie

Mediator	E ⁰ in mV vs. Ag/AgCl/3 M KCl
Ferrocenyltrimethylammoniumiodid	+437
1,1'-Dicarboxylferrocen	+436
Ferricyanid	+216
1,1'-Dimethylferrocen	+133
Tetrachlorobenzochinon	+72
Chinhydron	+70
Tetramethylparaphenylendiamin	+62
2,6-Dichlorphenolindophenol	+9
Ruthenium(III)hexamminchlorid	-8
1,2-Naphthochinon	-63
Trimethylhydrochinon	-108
Menadion	-220
2-Hydroxy-1,4-naphthochinon	-333
Anthrachinon-2-sulfonat	-433
Neutralrot	-515
Benzylviologen	-568
Methylviologen	-654

Probe auf dem Anfangspotential in der Zelle äquilibriert und ein erstes Referenzspektrum aufgenommen. Danach erfolgte der Potentialsprung, an den sich die erneute Gleichgewichtseinstellung der Probe anschloss. Dieser Prozess wurde anhand des Elektrodenstroms und sukzessiver Spektren verfolgt. Wenn der Strom auf Null gesunken war bzw. die Spektren sich nicht mehr änderten, wurde das zweite Spektrum aufgenommen und davon das Referenzspektrum subtrahiert. Für die IR-Spektren wurden jeweils 128 Interferogramme mit einer Auflösung von 4 cm^{-1} addiert und fouriertransformiert. Dabei kam eine Dreiecksapodisation und ein Zerofill-Faktor von 2 zum Einsatz.

Falls notwendig wurden die Spektren basislinienkorrigiert. Dazu wurde der Mittelwert zweier Differenzspektren gebildet, die durch Potentialsprünge in entgegengesetzte Richtungen erhalten wurden. Dieses Mittelwertspektrum wird dann als Basislinie für die beiden Ausgangsspektren verwendet. Es enthält keine redoxinduzierten Beiträge mehr und hat die Form des IR-Spektrums einer wässrigen Proteinlösung. Die Basisliniendrift entsteht durch minimale Veränderungen der Schichtdicke in der

Zelle zwischen den zwei Messungen, ausgelöst beispielsweise durch kleine Temperaturschwankungen.

2.12 Berechnung von Schwingungsspektren mittels Dichtefunktionaltheorie

Für die Zuordnung der beobachteten IR-Banden zu Vibrationsmoden des Flavinkofaktors wurden Frequenzberechnungen auf der Grundlage der Dichtefunktionaltheorie mit dem Hybrid-Dichtefunktional B3-LYP und dem Basissatz 6-31G* durchgeführt.

Zur Berechnung der theoretischen Spektren wurde für das entsprechende Molekül zunächst eine Energieminimierung durchgeführt ($T=298\text{K}$, $p=1\text{ atm}$), um die bevorzugte Konformation zu erhalten, und basierend auf dieser das Schwingungsspektrum berechnet. Korrekte Energieminimierung äußert sich in der Abwesenheit von Moden mit imaginären Frequenzen. Die erhaltenen Frequenzen wurden dann mit einem empirischen Skalierungsfaktor von 0,9614 multipliziert. Diese Korrektur erfolgte in Anlehnung an [44], wo die Autoren anhand eines Satzes von Testmolekülen zeigen, dass diese Skalierung eine Frequenzliste liefert, in der $\approx 86\%$ der Frequenzen weniger als 6% von den gemessenen Werten abweichen. Der RMSD-Wert für berechnete und gemessene Frequenzen wird dort mit 34 cm^{-1} angegeben.

Für das simulierte IR-Spektrum wurden die berechneten Banden zu Gauß-Peaks mit einer Peakbreite von 7 cm^{-1} bei halber Peakhöhe expandiert, was der Peakbreite in den gemessenen Spektren entspricht.

Die Berechnungen wurden in Zusammenarbeit mit PD Dr. R. Friedemann vom Institut für Organische Chemie am Fachbereich Chemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg durchgeführt. Zum Einsatz kamen die Programme GAUSSIAN98 und GAUSSVIEW V.2 [81] auf verschiedenen Rechnern der Firma Silicon Graphics.

2.13 Kristallographische Arbeiten

2.13.1 Kristallisation und Datensammlung

Kristalle der POX-Variante V265A wurden durch Gasphasendiffusion mit der Methode des hängenden Tropfens erhalten. $1\ \mu\text{l}$ der Reservoirolösung (2 M Ammoniumsulfat)

fat) wurde gemischt mit 6 μl der Proteinlösung (Proteinkonzentration 10–15 mg/ml in 50 mM Natriumphosphat, 20 mM Natriumcitrat, pH 5,2, 5% Sorbitol, 10 mM ThDP, 10 mM Magnesiumsulfat, 5 mM FAD). Die Kristalle wuchsen im Verlauf von 2 bis 8 Wochen bei 8°C in der Dunkelheit.

Zur Datensammlung wurde die Methode der Kryokristallographie angewendet, um die Strahlenschäden zu minimieren. Der Kristall wurde für kurze Zeit (30 s bis 2 min) in einer Lösung aus 2 M Ammoniumsulfat und 20% Glycerol inkubiert und dann in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Datensammlung erfolgte an der Beamline X13 an der Außenstelle des European Molecular Biology Laboratory am Deutschen Elektronensynchrotron in Hamburg.

2.13.2 Modellierung und kristallographische Verfeinerung

Für die Integration und Skalierung kamen die Programme DENZO und SCALEPACK aus dem Softwarepaket HKL zum Einsatz [82]. Die Bestimmung eines initialen Phasensatzes erfolgte durch molekularen Ersatz (*molecular replacement*) mit Hilfe der bekannten Struktur des Wildtyp-Proteins (PDB-Code 1POW, [8],[9]) mit dem Program MOLREP [83]. Die Kontrolle der Elektronendichte und die manuelle Modellierung erfolgte mit O [84] und mit PYMOL [85], die automatische Verfeinerung mit REFMAC [86]. MOLREP und REFMAC sind Bestandteil des CCP4-Programmpakets [87]. Die ersten Verfeinerungszyklen wurden ohne Lösungsmittelmoleküle durchgeführt und berücksichtigten die nicht kristallographische Symmetrie der vier Untereinheiten des Tetramers. Nachdem die R-Faktoren R und R_{free} nicht weiter fielen, wurden Wassermoleküle über das in CCP4 enthaltene Modul ARP-WATERS hinzugefügt sowie nicht modellierbare Bereiche des Proteins und der FAD-Moleküle ausgeschlossen. Automatisch eingefügte Wassermoleküle in diesen Bereichen wurden manuell entfernt. Für die letzten Verfeinerungszyklen wurde die nicht kristallographische Symmetrie zwischen den Untereinheiten aufgehoben.

Die Datensammlung und -auswertung geschah in Zusammenarbeit mit Dr. Stephan König vom Institut für Biochemie am Fachbereich Biochemie/Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg und Dr. Manfred S. Weiss von der EMBL-Außenstelle am Deutschen Elektronensynchrotron in Hamburg.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Das redoxinduzierte FTIR-Differenzspektrum von FAD

Das redoxinduzierte FTIR-Differenzspektrum von FAD bildet die Grundlage für die Interpretation der entsprechenden Spektren von Flavoproteinen. Abb. 3.1 zeigt das durch elektrochemische Reduktion bzw. Oxidation erhaltene IR-Differenzspektrum des freien Kofaktors FAD in H₂O. Es spricht dabei für die Reversibilität des Redoxprozesses, dass Potentialsprünge in entgegengesetzte Richtung spiegelsymmetrische Differenzspektren zur Folge haben. Das geringe Rauschniveau der Spektren wird durch die Betrachtung der Region oberhalb von 1730 cm⁻¹ deutlich.

Zum Vergleich zeigt Abb. 3.2 das entsprechende Differenzspektrum von FAD, hier jedoch in D₂O. Während die intensivste Bande bei 1548 cm⁻¹ unverändert erscheint, zeigen sich z.T. deutliche Verschiebungen im Bereich bei 1700 cm⁻¹, jedoch ist eine Zuordnung einander entsprechender Banden in beiden Spektren möglich. Unterhalb von ca. 1450 cm⁻¹ gelingt das nicht mehr, da sich hier nicht nur das Muster vieler kleiner Peaks entlang der Abszisse verschiebt, sondern sich auch qualitativ komplett verändert.

Eine *a priori*-Zuordnung der Peaks in diesen Spektren zu Schwingungsmoden des Moleküls ist aus den in der Einleitung genannten Gründen nicht möglich. Daher wurde eine Normalmodenanalyse auf der Basis quantenchemischer Rechnungen durchgeführt.

3.1.1 Theoretische Flavin-Schwingungsspektren

3.1.1.1 Methodische Beschränkungen

Da das vollständige FAD-Molekül mit 86 Atomen in einer realistischen Protein- oder Solventumgebung auch für eine DFT-Normalmodenanalyse mit vertretbarem Rechenaufwand zu groß ist, wurden folgende vereinfachende Annahmen gemacht:

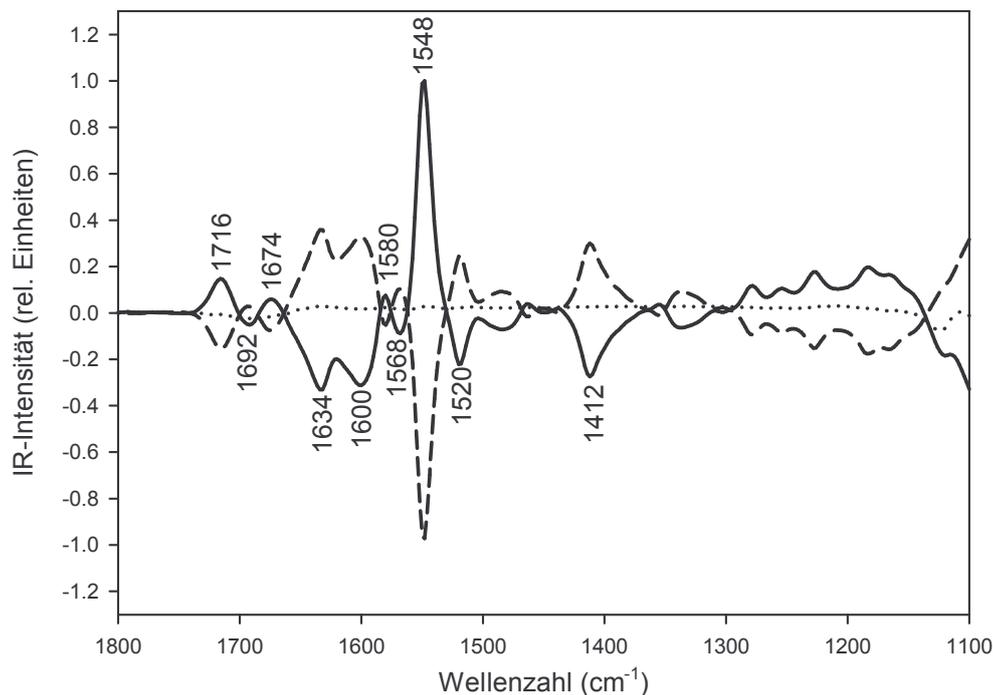


Abb. 3.1: Normalisiertes FTIR-Differenzspektrum von FAD in 100 mM Phosphatpuffer (pH 6,0), 100 mM KCl für einen Potentialsprung von 0,2 auf -0,6 V (durchgezogene Linie) und von -0,6 auf 0,2 V (gestrichelte Linie). Die Summe beider Spektren (gepunktete Linie) ist nahezu identisch mit der x-Achse und belegt damit die Reversibilität des Vorgangs. Die Redoxpotentiale beziehen sich auf eine Ag/AgCl/3 M KCl-Referenzelektrode.

- Als Modellmolekül wurde Lumiflavin (LF) in oxidierter (31 Atome) bzw. vollständig reduzierter Form (LFH₂, 33 Atome) verwendet, d.h. ein Flavin ohne Ribityl-Adenin-Rest, da die Anzahl der Atome quadratisch bis kubisch in die benötigte Rechenzeit eingeht. Diese auf den ersten Blick drastische Vereinfachung ist gut damit zu begründen, dass es sich bei den beobachteten IR-Spektren um *Differenzspektren* handelt, in denen nur die durch den Redoxvorgang hervorgerufenen *Änderungen* im Molekül ein Signal hervorrufen. Dieser Redoxprozess spielt sich ausschließlich im Isoalloxazin-Ring des FAD ab, der im Lumiflavin identisch ist. Experimentell untermauert wird das durch die einander sehr ähnlichen redox-induzierten IR-Differenzspektren von FAD und FMN [36].
- Die Energieminimierung und Normalmodenberechnung wurde für das Molekül *in vacuo* vorgenommen, d.h. die Umgebung des Flavins in Form von Solvent oder bindendem Protein wurde nicht mit einbezogen. Auch dies ist mit der dar-

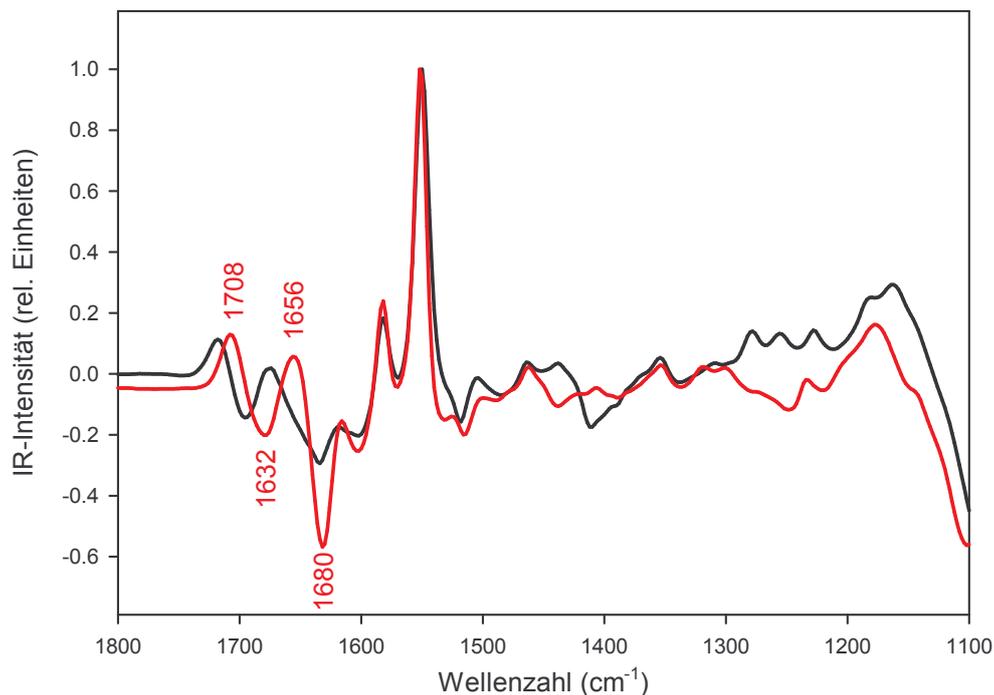


Abb. 3.2: Normalisiertes FTIR-Differenzspektrum von FAD in 100 mM Phosphatpuffer, 100 mM KCl in H₂O (schwarz) und D₂O (rot) bei pH/pD 6.0 für einen Potentialsprung von 0,2 auf -0,6 V (Ag/AgCl/3 M KCl).

aus resultierenden Verkürzung der Rechenzeit begründet. Für eine realistische Einbeziehung der Umgebung wären auch heute noch Großrechner notwendig.

Aufgrund dieser notwendigen Vereinfachungen können die berechneten Frequenzen trotzdem nur als qualitativer Anhaltspunkt dienen und sollten nicht überinterpretiert werden.

3.1.1.2 Lumiflavin in oxidierter und reduzierter Form

Die vor der Berechnung der Vibrationsmoden notwendige Energieminimierung der Moleküle führte zu den in Abb. 3.3 gezeigten Strukturen. Auffallend ist im Gegensatz zur planaren Konformation des oxidierten die entlang der Achse N(5)–N(10) geknickte Konformation des reduzierten Lumiflavins, sodass die beiden Teile des Isoalloxazin-Ringsystems um 27,2° von der Planarität abweichen. Wenn LFH₂ während der Energieminimierung in eine planare Konformation gezwungen wird, ergibt sich eine Destabilisierung verglichen mit der gewinkelten Form von ca. 10 kJ/mol

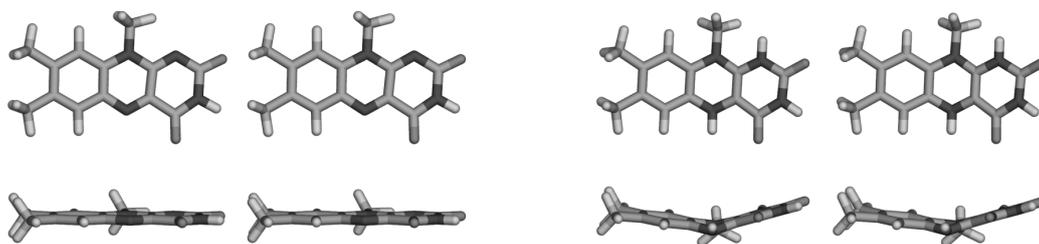


Abb. 3.3: Stereoansichten der energieminierten Konformationen von oxidiertem (**links**) und reduziertem (**rechts**) Lumiflavin, jeweils oben in der Sicht auf die *si*-Seite, unten entlang der N5–N10-Achse

(2,5 kcal/mol). Diese Ergebnisse stimmen sehr gut mit [17] überein, wo auf der Grundlage von *ab initio*-Rechnungen (RHF/6-31G*) nach der Energieminimierung des LFH₂ ein Winkel von 27,3° und eine Stabilisierung gegenüber der planaren Konformation von 26,8 kJ/mol (6,4 kcal/mol) gefunden wurde. Die energetische Stabilisierung der geknickten Konformation des LFH₂ liegt damit in der Größenordnung von Wasserstoffbrückenbindungen.

Ausgehend von den energieminierten Strukturen erfolgte die Berechnung der Normalmoden für das jeweilige System. Abb. 3.4 zeigt die berechneten Spektren für LF und LFH₂, wobei in Anlehnung an die gemessenen Spektren die Peaks der oxidierten Spezies in positive Ordinatenrichtung aufgetragen sind und die der reduzierten in die negative Richtung. Die der Abbildung zugrunde liegenden Moden sind in Tab. A.1 im Anhang aufgeführt.

Das Ergebnis der Berechnungen besteht nicht nur aus einer Liste von Frequenzen und Intensitäten, sondern liefert auch für jede Mode eine Aussage über die Bewegungsvektoren aller Atome. Auf dieser Grundlage ergeben sich für die wichtigsten Peaks der berechneten Spektren die Zuordnungen, die in Tab. 3.1 zusammengefasst sind. Man beachte hier, dass einige Moden in der Frequenz so eng benachbart sind, dass sie im Spektrum als ein Peak auftreten, z.B. die Streckenschwingungen der beiden Carbonylgruppen des oxidierten Lumiflavins bei 1745 cm⁻¹ und 1736 cm⁻¹.

3.1.1.3 Lumiflavin-Hydrate

Um eine Abschätzung für den durch die Vernachlässigung des Solvent hervorgerufenen Fehler zu erhalten, wurde die Normalmodenanalyse auch für jeweils ein Monohydrat der oxidierten und reduzierten Form des Lumiflavins (Abb. 3.5) durchgeführt. Die Schwingungsspektren dieser Hydrate erlauben zumindest qualitative Aus-

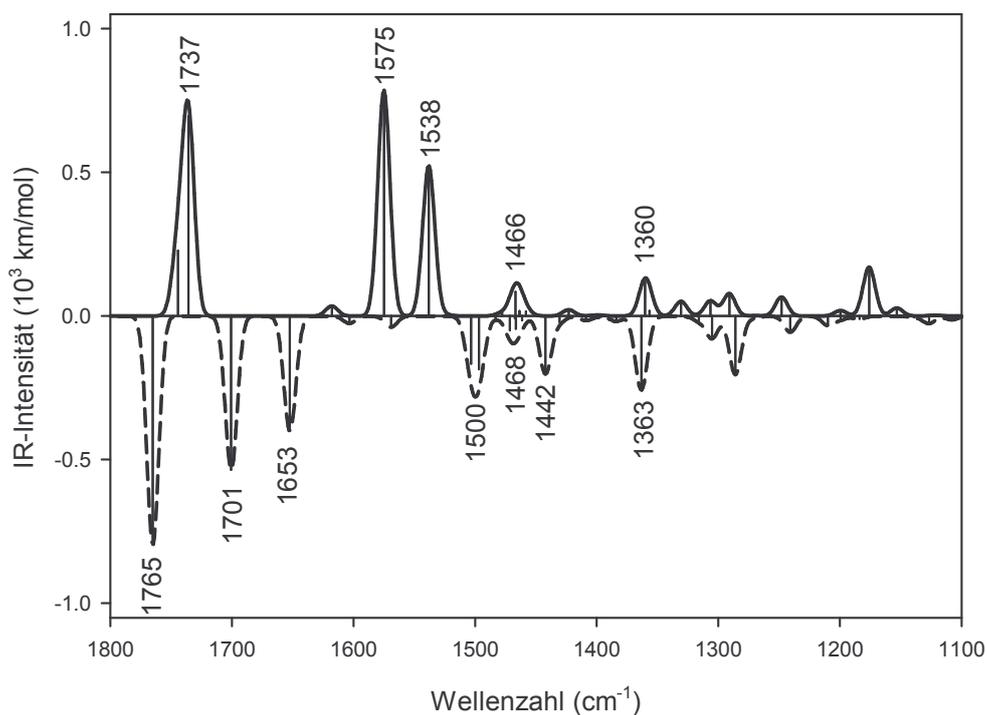


Abb. 3.4: Berechnete IR-Spektren von oxidiertem (durchgezogene Linie) und reduziertem Lumiflavin (gestrichelte Linie). Vertikale Balken zeigen die Frequenz und Intensität aller beitragenden Moden. Die Spektren wurden erzeugt, indem jede Bande zu einem Gauß-Peak mit 7 cm^{-1} FWHH expandiert wurde. Dadurch tragen in einigen Fällen mehrere eng benachbarte Moden zu einem Peak des Spektrums bei.

sagen darüber, in welche Richtung und wie weit sich Banden verschieben können, wenn vom Molekül *in vacuo* zur Lösung übergegangen wird. Insbesondere erlauben sie eine Abschätzung des Effektes von Wasserstoffbrückenbindungen hinsichtlich der Richtung und Größe der Bandenverschiebung.

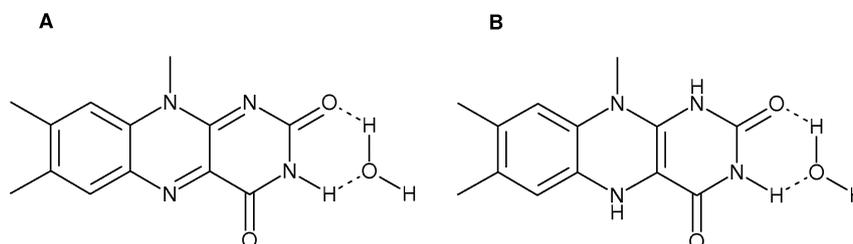


Abb. 3.5: Lumiflavinhydrate, **A** oxidierte Form, **B** reduzierte Form

Für die Ausgangskonfiguration wurde das Wassermolekül derart platziert, dass sich zunächst nur eine Wasserstoffbrücke mit dem Carbonylsauerstoff des C(2)=O als Ak-

Tab. 3.1: Die wichtigsten Beiträge zu den berechneten Normalmoden von LF und LFH₂

Frequenz (cm ⁻¹)	wesentliche Beiträge
oxidiert	
1745	$\nu(\text{C}(4)=\text{O}), \delta(\text{N}(3)-\text{H})$
1736	$\nu(\text{C}(2)=\text{O}), \delta(\text{N}(3)-\text{H})$
1575	$\nu(\text{C}(10\text{a})=\text{N}(1)), \nu(\text{C}(4\text{a})=\text{N}(5))$
1538	$\nu(\text{C}(10\text{a})=\text{N}(1))$
1466	Methylgruppen C(7'), C(8'), C(10')
1360	$\delta(\text{N}(3)-\text{H}), \nu(\text{C}(4\text{a})-\text{C}(10\text{a})), \nu(\text{C}(10')-\text{N}(10))$
reduziert	
1765	$\nu(\text{C}(2)=\text{O}), \delta(\text{N}(3)-\text{H}), \delta(\text{N}(1)-\text{H})$
1701	$\nu(\text{C}(4)=\text{O}), \delta(\text{N}(3)-\text{H}), \delta(\text{N}(5)-\text{H})$
1653	$\nu(\text{C}(4\text{a})=\text{C}(10\text{a})), \delta(\text{N}(1)-\text{H}), \delta(\text{N}(5)-\text{H})$
1504	$\delta(\text{C}(6)-\text{H}), \delta(\text{C}(9)-\text{H}), \nu(\text{C}(9\text{a})-\text{N}(10)), \nu(\text{C}(5\text{a})-\text{N}(5))$
1497	$\delta(\text{N}(1)-\text{H}), \delta(\text{N}(5)-\text{H}), \nu(\text{C}(10\text{a})-\text{N}(1)), \nu(\text{C}(4\text{a})-\text{N}(5))$
1471	$\delta(\text{N}(5)-\text{H}),$ Methylgruppe C(8')
1466	Methylgruppen C(7'), C(10')
1442	$\delta(\text{N}(5)-\text{H}), \delta(\text{N}(1)-\text{H})$
1363	$\delta(\text{N}(5)-\text{H}), \delta(\text{N}(1)-\text{H}), \nu(\text{C}(9)-\text{C}(9\text{a})), \nu(\text{C}(2)-\text{N}(1))$

zeptor bilden konnte. Überraschenderweise ergab sich im Verlauf der anschließenden Energieminimierung eine *zweite* Wasserstoffbrücke mit dem N(3)–H-Proton als Donor. An der generellen Struktur des Isoalloxazin-Rings ändert sich insgesamt sehr wenig. Insbesondere bleibt die oxidierte Form planar, und die reduzierte Form weist eine Abweichung von der Planarität von 27,3° auf. Abb. 3.6 zeigt die Konformationen von LF und LFH₂ und die Ausrichtung des ligandierenden Wassermoleküls.

Welche Auswirkungen hat nun die Hydratisierung auf die theoretischen Spektren? In Abb. 3.7 sind die berechneten Spektren von LF und LFH₂ jeweils frei und hydratisiert vergleichend abgebildet. Auffällig ist die starke Veränderung des Spektrums oberhalb von ca. 1650 cm⁻¹. Eine genauere Betrachtung ergibt, dass erwartungsgemäß die Carbonyl-Streckschwingungen am stärksten beeinflusst werden. Es erfahren jeweils die $\nu(\text{C}(2)=\text{O})$ -Moden sowohl der oxidierten als auch der reduzierten Form des Lumiflavins die größte Verschiebung um ca. 40 cm⁻¹: von 1736 cm⁻¹ auf 1695 cm⁻¹ für LF und von 1765 cm⁻¹ auf 1724 cm⁻¹ für LFH₂. Die $\nu(\text{C}(4)=\text{O})$ -Moden verschieben

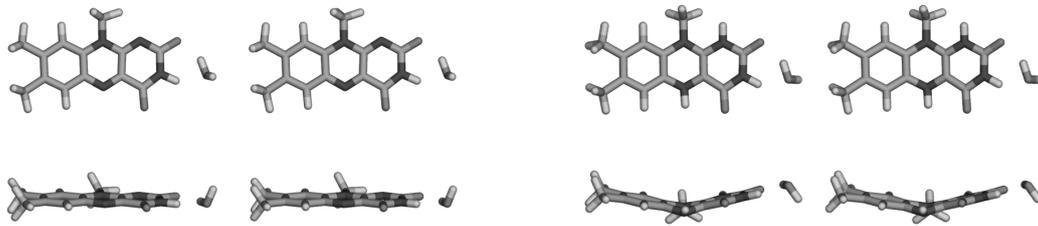


Abb. 3.6: Stereoansicht der energieminierten Lumiflavinhydrate, links die oxidierte und rechts die reduzierte Form

sich durch die Hydratisierung an der O=C(2)–N(3)–H-Gruppe kaum: von 1745 cm^{-1} auf 1744 cm^{-1} für LF und von 1701 cm^{-1} auf 1702 cm^{-1} für LFH₂.

Ein zusätzlicher Peak tritt in beiden Spektren bei 1666 cm^{-1} auf, für LFH₂ überlagert dieser mit der $\nu(\text{C}(4\text{a})=\text{C}(10\text{a}))$ -Bande. Dieser zusätzliche Peak rührt von der Biegeschwingung des gebundenen Wassermoleküls her und gehört daher nicht zum eigentlichen Flavinspektrum.

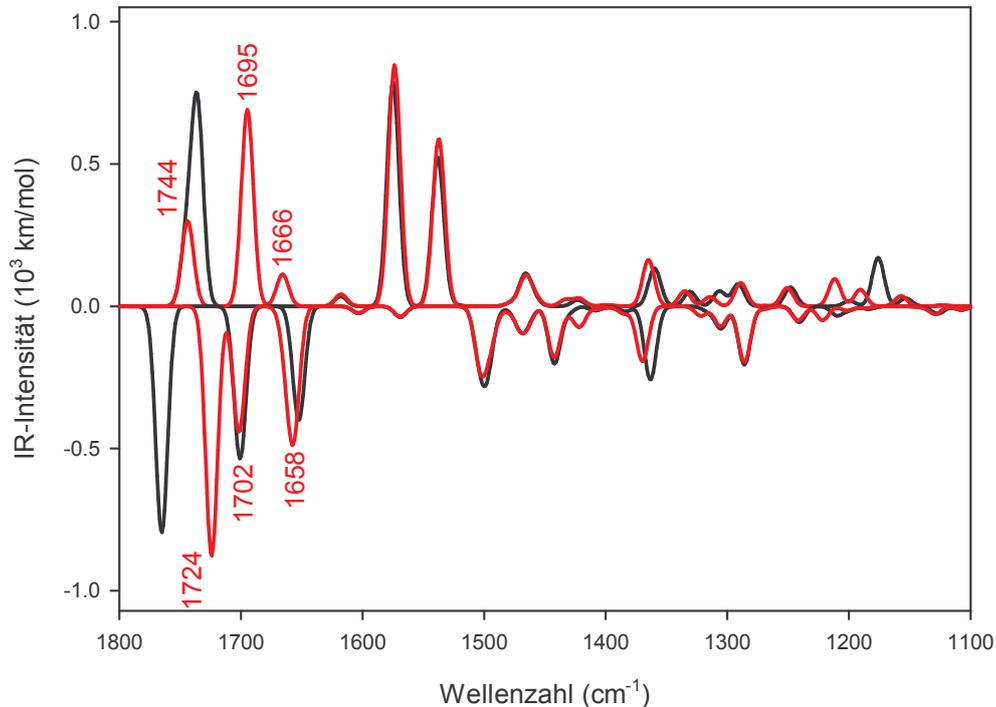


Abb. 3.7: Theoretische Schwingungsspektren von Lumiflavin-Hydrat (rot) im Vergleich mit den theoretischen Schwingungsspektren von Lumiflavin (schwarz). Die Spektren für die oxidierte Form sind in positive Ordinatenrichtung aufgetragen, für die reduzierte in die negative.

Zwar wurde für die Modellrechnung nur die Hydratisierung am C(2)=O simuliert, es ist aber plausibel, dass Wasserstoffbrücken ausgehend vom C(4)=O auf die Frequenz der entsprechenden Streckschwingungen einen ähnlichen Effekt haben, weil in beiden Fällen die Elektronendichte der Bindung verringert und damit die Bindung gelockert wird.

Aus den Ergebnissen der Rechnungen für die Hydrate wird deutlich, dass das Fehlen einer vollständigen Solvent- oder Protein-Umgebung in den Frequenzberechnungen des Flavins in erster Linie einen starken, lokal begrenzten Einfluss auf die Frequenz der $\nu(\text{C}=\text{O})$ -Moden hat. Diese verringern die Frequenz um ca. 40 cm^{-1} , wenn der Carbonylsauerstoff als Wasserstoffbrücken-Akzeptor dient. Das steht im Einklang mit früheren theoretischen Berechnungen [39] und experimentellen Beobachtungen ([88],[45]). Letztere beziehen sich ausschließlich auf das oxidierte Flavin, jedoch ist zu erwarten, dass die generelle Tendenz zur Frequenzverringering durch Wasserstoffbrückenbindung auch für die reduzierte Form gilt.

3.1.1.4 Deuterierte Spezies

Eine weitere Normalmodenanalyse wurde mit oxidierten und reduzierten Lumiflavin-Spezies durchgeführt, in denen alle austauschbaren Wasserstoffatome mit Deuterium substituiert wurden. Das sind N(3)-H für LF und LFH₂, N(1)-H und N(5)-H für LFH₂, sowie die Protonen des Wassermoleküls für die Hydrate. Dies ermöglicht beim Vergleich mit in D₂O gemessenen Flavinspektren eine zusätzliche Güteabschätzung der theoretischen Spektren. Abb. 3.8 zeigt die Spektren von deuteriertem LF und LFH₂, Abb. 3.9 die der entsprechenden deuterierten Hydrate.

Auch hier ist wieder besonders auffällig, dass sich die Deuterierung hauptsächlich in Bandenverschiebungen in der Carbonylregion äußert. Erwartungsgemäß führt die Deuterierung zur Frequenzverringering von Moden, an denen X-H-Bindungen beteiligt sind. Dies ist für die $\nu(\text{C}=\text{O})$ -Streckschwingungen durch die Kopplung mit $\delta(\text{N}-\text{H})$ -Anteilen für N(3), N(1) und N(5) der Fall. Ein zusätzlicher Peak bei 1666 cm^{-1} wie bei den nicht deuterierten Hydraten tritt hier nicht auf, da die zugehörige Biegeschwingung des Wassermoleküls beim Übergang von H₂O zu D₂O eine Verschiebung um ca. 550 cm^{-1} zu niedrigeren Frequenzen erfährt.

Abgesehen vom *spezifischen* Effekt der Deuterierung auf die Carbonylmoden verdeutlichen diese theoretischen Spektren noch eine andere Tatsache von allgemeinerer Bedeutung: es kommt insbesondere für die reduzierte Form, die zwei Deuteriumatome

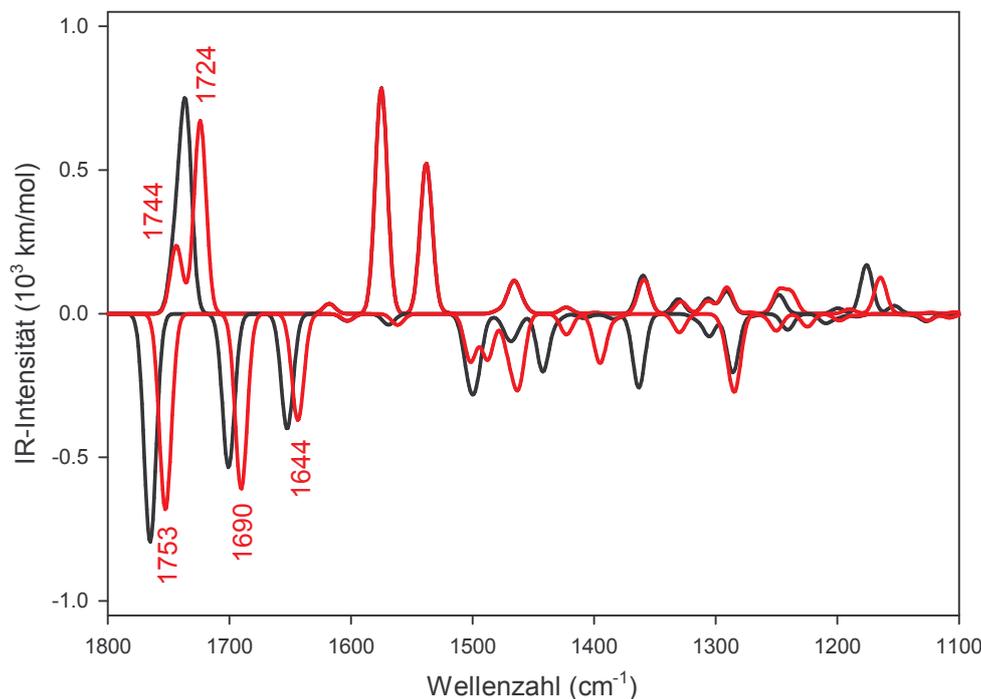


Abb. 3.8: Theoretische Schwingungsspektren von deuteriertem Lumiflavin (rot) im Vergleich mit den theoretischen Schwingungsspektren von nicht isotopenmarkiertem Lumiflavin (schwarz). Die Spektren für die oxidierte Form sind in positive Ordinatenrichtung aufgetragen, für die reduzierte in die negative.

mehr enthält als die oxidierte Spezies, zu zahlreichen Veränderungen des Spektrums unterhalb von 1450 cm^{-1} . Dieser Bereich des Spektrums, die *Fingerprint*-region, geht auf wenig lokalisierte Gerüstschwingungen des Isoalloxazin-Ringsystems zurück, bei denen an jeder Mode zahlreiche Atome und Bindungen, und zwar verteilt über alle drei Ringe, beteiligt sind. Das bedeutet, dass viele dieser Moden auch Beiträge beinhalten, die sich durch Deuterierung (oder andere Effekte wie Hydratisierung oder Bindung an ein Protein) verschieben können. Es ist darum nicht angebracht, theoretisch ermittelte Normalmoden in diesem Bereich des Spektrums Peaks in den gemessenen Spektren zuzuordnen.

3.1.2 Bandenzuordnung der gemessenen Spektren

Im folgenden soll nun auf der Grundlage der theoretischen Spektren der Versuch einer Zuordnung der Peaks in den gemessenen FAD-Spektren unternommen werden. Diese Zuordnungen sind in Tab. 3.2 zusammengefasst.

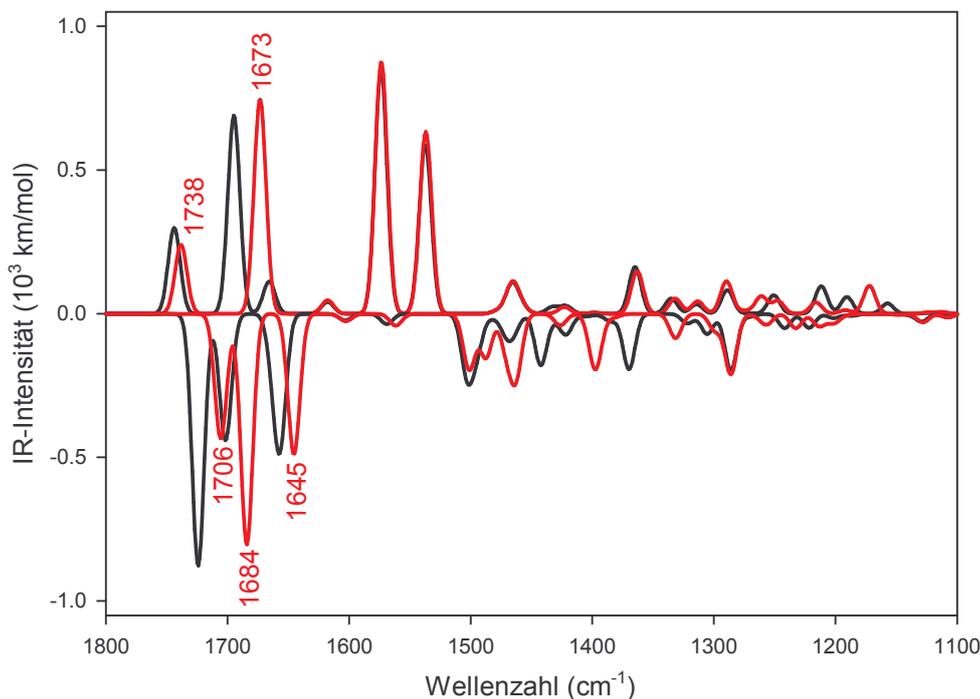


Abb. 3.9: Theoretische Schwingungsspektren von deuteriertem Lumiflavin-Hydrat (rot) im Vergleich mit den theoretischen Schwingungsspektren von nicht isotopenmarkiertem Lumiflavin-Hydrat (schwarz). Die Spektren für die oxidierte Form sind in positive Ordinateurichtung aufgetragen, für die reduzierte in die negative.

Banden bei 1716, 1692, 1674 und 1634 cm^{-1} . Aus dem Vergleich der FAD-Differenzspektren in H_2O und D_2O geht bereits hervor, dass die Banden bei 1716, 1692, 1674 und 1634 cm^{-1} (bzw. 1708, 1680, 1656, 1632 cm^{-1} in D_2O) stark vom Lösungsmittel beeinflusst sind und damit von Molekülteilen ausgehen, die mit dem Lösungsmittel z.B. über Wasserstoffbrückenbindungen wechselwirken. Dies und die charakteristische hohe Frequenz der Banden legen eine Zuordnung zu C=O-Streckschwingungsmoden nahe. Tatsächlich ergab eine Untersuchung mit ^{18}O -markiertem Flavin, dass eine Raman-Bande bei 1711 cm^{-1} des ungelabelten oxidierten FAD der $\nu(\text{C}(4)=\text{O})$ -Streckschwingung entspricht [89].

Auch in den theoretischen Spektren sind die Carbonyl-Streckschwingungen diejenigen mit der höchsten Frequenz, was diese Zuordnung für die gemessenen Spektren bestätigt. Die verhältnismäßig große Diskrepanz der Zahlenwerte zwischen berechneten und gemessenen Frequenzen ist durch das Fehlen des Lösungsmittels im Modell bei der Berechnung begründet. Während die *in vacuo*-Berechnung für Lumiflavin für die $\nu(\text{C}(2)=\text{O})$ -Mode eine Frequenz von 1736 cm^{-1} ergibt, zeigt sich für das Mo-

Tab. 3.2: Zuordnung beobachteter Peaks im redox-getriggerten FTIR-Differenzspektrum von FAD zu entsprechenden Normalmoden und den für Lumiflavin *in vacuo* berechneten Frequenzen

gemessene Frequenz (cm^{-1})	wesentliche Beiträge	berechnete Frequenz (cm^{-1})
oxidiert		
1716	$\nu(\text{C}(4)=\text{O}), \delta(\text{N}(3)-\text{H})$	1745
1674	$\nu(\text{C}(2)=\text{O}), \delta(\text{N}(3)-\text{H})$	1736
1580	$\nu(\text{C}(4a)=\text{N}(5)), \nu(\text{C}(10a)=\text{N}(1))$	1575
1548	$\nu(\text{C}(10a)=\text{N}(1))$	1538
reduziert		
1692	$\nu(\text{C}(2)=\text{O}), \delta(\text{N}(3)-\text{H}), \delta(\text{N}(1)-\text{H})$	1765
1634	$\nu(\text{C}(4)=\text{O}), \delta(\text{N}(3)-\text{H}), \delta(\text{N}(5)-\text{H})$	1701
1600	$\nu(\text{C}(4a)=\text{C}(10a)), \delta(\text{N}(1)-\text{H}), \delta(\text{N}(5)-\text{H})$	1653
1520	$\delta(\text{C}(6)-\text{H}), \delta(\text{C}(9)-\text{H}), \delta(\text{N}(1)-\text{H}), \delta(\text{N}(5)-\text{H})$	1504, 1497
1412	$\delta(\text{N}(5)-\text{H})$ (?)	1442, 1364

nohydrat schon eine Frequenz von 1695 cm^{-1} — eine Verschiebung von 41 cm^{-1} in Richtung der gemessenen Frequenzen. Es ist plausibel, dass Solvatisierung an $\text{C}(4)=\text{O}$ auch hier die entsprechenden berechneten Peaks weiter verschieben würde und diese damit ebenfalls deutlich besser mit den gemessenen Werten übereinstimmen würden.

Bande bei 1600 cm^{-1} . Nishina *et al.* haben mittels Resonanz-Raman-Spektroskopie D-Aminosäure-Oxidase im Komplex mit verschiedenen Substraten untersucht [89]. Das gebundene FAD liegt hier in der reduzierten Form vor. In diesen Studien konnte mit $4,10a\text{-}^{13}\text{C}_2$ -markiertem FAD eine Bande bei 1605 cm^{-1} der $\text{C}(4a)=\text{C}(10a)$ -Streckschwingung zugeordnet werden. Die Berechnungen für die reduzierte Form des Lumiflavins zeigen eine solche Mode bei 1653 cm^{-1} . Diese enthält laut dem aus der Rechnung erhaltenen Bewegungsvektor keine Anteile einer gekoppelten $\text{C}(4)=\text{O}$ -Streckschwingung. Das korrespondiert sowohl mit der Aussage in [89], dass sie sich für 4-Carbonyl- ^{18}O -markiertes FAD nicht verschiebt, als auch mit unserer Beobachtung, dass die Frequenz in D_2O unverändert bleibt.

Banden bei 1580 und 1548 cm^{-1} . Diese auffälligen Banden sind vermutlich der $\text{N}(5)-\text{C}(4a)-\text{C}(10a)-\text{N}(1)$ -Region des Lumiflavins zuzuordnen, wo die Redoxreakti-

on mit der damit verbundenen Umordnung von Einfach- und Doppelbindungen sowie der Protonierung am Stickstoff stattfindet. Die beobachteten Banden bei 1580 und 1548 cm^{-1} korrespondieren sehr gut mit den berechneten Banden bei 1575 und 1538 cm^{-1} , die in dieser Reihenfolge im wesentlichen aus C(4a)=N5- und C(10a)=N(1)-Streckschwingungen hervorgehen. Auch frühere Normalmodenanalysen unterstützen diese Interpretation ([38], [39]). Hier stellt sich die Frage, warum die Intensitäten der berechneten und der gemessenen Banden invertiert sind. Zumindest teilweise ist dies wiederum durch den in der Rechnung fehlenden Solvent begründet. IR-Bandenintensitäten hängen vom Übergangsdipolmoment der Vibrationsbewegung ab. Wenn also Wasser als polarer Solvent nicht völlig isotrop um das gelöste Molekül angeordnet ist (wie es allein schon durch Wasserstoffbrücken ausgelöst wird), so erfährt jede Schwingungsmode ein anderes externes elektrisches Feld und damit einen anderen Effekt des Solvents auf die Peakintensität. Abe *et al.* haben z.B. Lumiflavin-Spektren in KBr-Presslingen aufgenommen und beobachteten dort zwei Peaks gleicher Intensität bei 1583 und 1552 cm^{-1} [45]. Eine weitere intrinsische Ursache für abweichende Peakintensitäten liegt bei Differenzspektren in der Subtraktion der Spektren begründet. Es ist z.B. möglich, dass die Banden des oxidierten Flavins bei 1580 cm^{-1} und des reduzierten bei 1600 cm^{-1} einander teilweise kompensieren und beide in *Einzelspektren*, wie sie mit der hier verwendeten Methode prinzipiell nicht zugänglich sind, eine höhere Intensität zeigen würden.

Bande bei 1520 cm^{-1} . Diese Bande entspricht vermutlich der berechneten bei 1500 cm^{-1} , die sich aus zwei eng benachbarten Peaks bei 1504 und 1497 cm^{-1} zusammensetzt. Beide entstehen durch *in-plane*-Biegeschwingungen von Wasserstoffatomen. C(6)-H und C(9)-H tragen zur ersten bei, N(5)-H und N(1)-H zur letzteren, wodurch diese abhängig von Solvatisierungs- und Deuterierungseffekten werden. Allerdings wird für das in D₂O gemessene Spektrum keine Peakverschiebung beobachtet, die damit zu erwarten gewesen wäre. Aus den Berechnungen für das deuterierte Lumiflavin ergibt sich jedoch, dass die Peakverschiebung zu geringeren Frequenzen beim Übergang von N-H zu N-D so groß ist, dass die resultierende Bande außerhalb des beobachteten Spektralbereiches liegt. Damit blieben für die deuterierte Spezies im Spektrum nur die Anteile von C(6)-H und C(9)-H übrig, da diese Protonen nicht mit dem Lösungsmittel austauschen.

Bande bei 1412 cm⁻¹. Die Zuordnung der Bande bei 1412 cm⁻¹ ist nicht eindeutig, sie könnte mit berechneten Moden bei 1442 oder 1363 cm⁻¹ übereinstimmen. Diesen beiden Moden ist ein *in-plane bending*-Anteil der N(5)–H-Bindung gemeinsam, die damit ebenfalls lösungsmittelabhängig sein sollten. Das in D₂O gemessene Spektrum zeigt einen zu höheren Frequenzen verschobenen Peak (1438 cm⁻¹), und auch die Berechnung liefert zwei Peaks bei höheren Wellenzahlen (1461 und 1396 cm⁻¹). Das ist scheinbar ein Widerspruch, da Deuterium das schwerere Isotop ist. Eine Erklärungsmöglichkeit ergibt sich aus der genaueren Betrachtung der theoretischen Moden. Es zeigt sich, dass diese nach der Deuterierung des Lumiflavins keine Beteiligung von $\delta(\text{N}(5)\text{--H})$ -Schwingungen mehr enthalten und die Frequenzverschiebung mit der Entkopplung dieser Bewegungen verbunden ist. Die Moden sind also vor und nach der Deuterierung nicht miteinander vergleichbar. Die Zuordnung des Peaks bei 1412 cm⁻¹ kann daher nicht mit letzter Sicherheit vorgenommen werden, eine Beteiligung von $\delta(\text{N}(5)\text{--H})$ -Schwingungen ist jedoch wahrscheinlich.

Banden unterhalb von 1412 cm⁻¹. Der Spektralbereich unterhalb von 1412 cm⁻¹ enthält viele Banden geringer Intensität, sowohl in den gemessenen als auch den berechneten Spektren; eine Zuordnung ist jedoch schwierig. Die Normalmodenanalyse zeigt, dass diese Banden von Moden herrühren, die gekoppelte Bewegungen vieler Atome aus allen drei Ringen des Isoalloxazins umfassen. Damit enthalten sie auch Anteile, die sensibel von der Umgebung des Moleküls abhängen. Insbesondere das Fehlen einer realistischen Lösungsmittelstruktur in den Simulationen führt dazu, dass eine Bandenzuordnung zweifelhaft wird. Sehr deutlich wird dieser Effekt beim Vergleich der berechneten Spektren für das Lumiflavin und das Lumiflavin-Monohydrat: ein zusätzliches Wassermolekül allein führt bereits zu zahlreichen Veränderungen von Frequenzen und Bandenintensitäten unterhalb von 1400 cm⁻¹. Eine Bandenzuordnung auf der Basis dieses stark vereinfachten Modells ist daher nicht angeraten. Eine weitere Fehlerquelle ist der spektrale Beitrag des Puffers in dieser Region. Phosphat und Pyrophosphat zeigen pH-abhängige Banden unterhalb von 1200 cm⁻¹. Da die Redoxprozesse des Flavins und auch der für die Messungen verwendeten Redox-Mediatoren mit Protonierung bzw. Deprotonierungen einhergehen, werden demzufolge Pufferpeaks in dieser Region erwartet.

Zheng *et al.* haben in einer aktuellen Arbeit das erste Raman-Spektrum von vollständig reduziertem Flavin vorgestellt und auch eine Bandenzuordnung auf der Basis von Peakverschiebungen in D₂O und theoretischen Berechnungen vorgenommen [90]. Für

die Banden oberhalb von 1450 cm^{-1} decken sich die dort gemachten Beobachtungen mit den oben aufgeführten Ergebnissen. Für den langwelligeren Bereich erscheinen die dort getroffenen Zuordnungen gewagt, da den Berechnungen das Lumiflavinmolekül *in vacuo* zugrunde liegt. Das hat, wie oben diskutiert, einen so großen Einfluss auf Frequenz, Zusammensetzung und Intensität der theoretischen Banden insbesondere in der *Fingerprint*-Region, dass ein Vergleich mit Messungen im wässrigen System zweifelhaft erscheint.

3.1.3 Zusammenfassung der Ergebnisse der FTIR-Untersuchungen von freiem FAD

Das redoxinduzierte FTIR-Differenzspektrum von FAD wurde in H_2O und D_2O aufgenommen. Für eine Peakzuordnung wurde eine Normalmodenanalyse für verschiedene Modellmoleküle durchgeführt: Lumiflavin *in vacuo* und als Monohydrat in oxidierter und reduzierter Form sowie die jeweiligen deuterierten Analoga. Die theoretischen Spektren erlauben die Zuordnung von FAD-Banden am kurzwelligen Ende des Spektrums; darunter sind Carbonylstreckschwingungen, C(10a)=N(1)- und C(4a)=N(5)-Streckschwingungen der oxidierten Form und die C(4a)=C(10a)-Streckschwingungen der reduzierten Form (Tab. 3.2).

Aus dem Vergleich der theoretischen Spektren des reinen Lumiflavins und eines Hydrates geht hervor, dass das praktisch bedingte Fehlen von Solvent- oder Proteinumgebung im Modell sich bei der Berechnung insbesondere auf Moden auswirkt, an denen Gruppen beteiligt sind, die Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden. Dies sind insbesondere die Carbonyl-Streckschwingungen und gekoppelte Schwingungen mit $\delta(\text{N-H})$ -Beteiligung. Da solvatisierbare Gruppen auch zu vielen Moden in der *Fingerprint*-Region des Spektrums unterhalb von 1450 cm^{-1} beitragen, ist die Aussagekraft von Rechnungen für Moleküle *in vacuo* in diesem Bereich begrenzt.

3.2 Redoxinduzierte FTIR-Differenzspektren von Flavoproteinen

Das redoxinduzierte Differenzspektrum des freien Flavin-Kofaktors sollte nun als Basis für die Interpretation entsprechender Spektren von Flavoproteinen dienen. Es sollte dabei der Frage nachgegangen werden, welche Veränderungen das IR-Spektrum des Kofaktors durch die Bindung an das Protein erfährt und ob in den Kristallstrukturen beobachtete Besonderheiten der Flavinbindung in den IR-Spektren einen Niederschlag finden.

Die Amid-I- und die Amid-II-Bande des Proteinrückgrats absorbieren ebenfalls in der hier betrachteten Region des IR-Spektrums. Besonders die Amid-I-Bande bzw. deren Entsprechung in D₂O, die Amid-I'-Bande, werden für die Sekundärstrukturbestimmung von Proteinen angewendet, da die Form dieser Banden von den relativen Anteilen verschiedener Sekundärstrukturelemente wie α -Helices und β -Faltblättern im Protein abhängt. Wie weiter unten

deutlich wird, zeigen auch die redoxinduzierten *Differenzspektren* deutliche Signale in der Amid-I-Region. Eine detaillierte Analyse hinsichtlich sich verändernder Sekundärstrukturgehalte während des Redoxübergangs ist nicht angebracht, da neben dem Kofaktor FAD auch Aminosäureseitenketten des Proteins in schwer vorhersehbarer Weise zu den Differenzspektren beitragen [92]. Tab. 3.3 soll daher nur als Anhaltspunkt für eine Interpretation der Peaks dienen, die offensichtlich nicht vom FAD stammen.

Tab. 3.3: Wellenzahlen der Beiträge zur Amid-I-Bande verschiedener Protein-Sekundärstrukturelemente, nach [91]

Sekundärstruktur	$\nu_{\text{H}_2\text{O}}$ (cm ⁻¹)	
	Mittelwert	Bereich
α -Helix	1654	1648–1657
β -Faltblatt	1633	1623–1641
	1684	1674–1695
<i>Turns</i>	1672	1662–1686
Ungeordnet	1654	1642–1657

3.2.1 Pyruvatoxidase

Für die Kristallstruktur von POX wurde beschrieben, dass der Isoalloxazinring des FAD dort in einer Konformation gebunden ist, die einen Knick von 13° um die N(5)–N(10)-Achse aufweist ([8],[9]). Im folgenden wurde deshalb untersucht, ob die Deformation des Flavins sich im redoxinduzierten FTIR-Spektrum äußert.

Da das reduzierte Flavin von sich aus bereits eine geknickte Konformation aufweist, liegt die Vermutung nahe, dass durch eine erzwungene Deformation des *oxidierten* Flavins das Redoxpotential des Kofaktors im Enzym erhöht wird. Da die verwendete IR-Messtechnik ohnehin für die Bestimmung Redoxpotential-abhängiger Spektren ausgelegt ist, kann auf diesem Wege auch leicht das Mittelpunktpotential redoxaktiver Gruppen durch Titration bestimmt werden, indem der Übergang schrittweise durchgeführt wird. Damit kann erstmals das Redoxpotential des FAD in POX gemessen werden.

In der Einleitung wurde bereits dargelegt, dass die Kinetik des Elektronentransfer-Schrittes im POX-Katalysezyklus von der Gegenwart von Phosphat abhängt. Mit Phosphat werden die Elektronen sehr schnell vom Hydroxyethyl-ThDP-Carbanion/Enamin zum FAD übertragen, ohne dass es zu einer Populierung von radikalischen Flavin-Spezies kommt. Ohne Phosphat ist die Übertragung des zweiten Elektrons verlangsamt, und das neutrale Semichinon-Radikal ist im VIS-Spektrum nachweisbar (vgl. hierzu Abb. 3.37 auf S. 103).

Die IR-Spektroskopie bietet nun einen eleganten Ansatz, um zu untersuchen, ob sich die Eigenschaften des POX-gebundenen FAD in Gegenwart und Abwesenheit von Phosphat unterscheiden. Strukturelle Veränderungen der Bindung machen sich u.U. im IR-Spektrum des Flavins bemerkbar, und die Redox Titration von POX in phosphatfreiem Puffer erlaubt die Bestimmung eines möglicherweise veränderten Mittelpunktpotentials des Kofaktors.

3.2.1.1 POX-Wildtyp

POX-WT in Phosphatpuffer. In Abb. 3.10 ist das redoxinduzierte FTIR-Differenzspektrum von Wildtyp-POX zum Vergleich mit dem von freiem FAD unterlegt. Die Ähnlichkeit der Spektren ist auffallend; Banden, die quasi unverändert auftreten, sind beispielsweise die Carbonylmoden bei 1716 und 1634 cm^{-1} sowie die C(4a)=C(10a)-Mode bei 1600 cm^{-1} .

Das Proteinspektrum zeigt jedoch auch viele zusätzliche Peaks besonders in der Region zwischen 1600 und 1700 cm^{-1} . Hierbei handelt es sich um Beiträge der Proteinumgebung zur Amid-I-Bande (Tab. 3.3), ausgelöst etwa durch eine Veränderung des Netzwerkes aus Wasserstoffbrückenbindungen am FAD im Zuge des Redoxübergangs. Da die Amplituden des Differenzsignals nur ca. 0,1% des gesamten Protein-

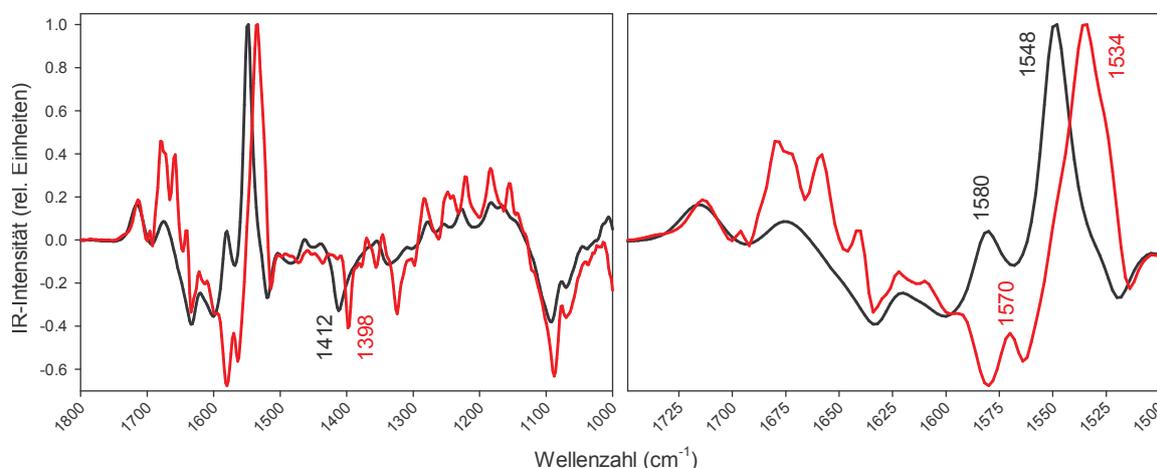


Abb. 3.10: Normalisiertes FTIR-Differenzspektrum von POX-WT in 100 mM Phosphatpuffer (pH 6,0), 50 mM KCl (rot) und FAD in 100 mM Phosphatpuffer (pH 6,0), 100 mM KCl (schwarz) für einen Potentialsprung von 0,2 auf -0,6 V (vs. Ag/AgCl/3 M KCl). Rechts: vergrößerter Ausschnitt.

signals betragen und das Spektrum generell stark vom FAD-Spektrum dominiert ist, sind extensive Veränderungen der Sekundärstruktur unwahrscheinlich.

Besonders interessant sind Banden, die zwar in ähnlicher Form auch im Spektrum des FAD allein auftreten, für POX jedoch signifikante Frequenzverschiebungen erfahren haben. Die prominenteste Vertreterin ist die mit der C(10a)=N(1)-Streckschwingung assoziierte Bande bei 1548 cm^{-1} für FAD, die im POX-Spektrum bei 1534 cm^{-1} auftritt — eine Verschiebung um 14 cm^{-1} . Legt man vereinfachend eine harmonische Schwingung zugrunde, so gilt $f = \sqrt{k/m_r}/(2\pi)$ (mit f : Frequenz, k : Kraftkonstante, m_r : reduzierte Masse). Es entspricht dann eine 0,9% ige Verringerung der Frequenz einer Verringerung der Kraftkonstante um 1,8%, gleichbedeutend mit der Lockerung der Bindung. Ähnliches gilt für die C(4a)=N(5)-Mode, die für FAD bei 1580 cm^{-1} und für POX bei 1570 cm^{-1} auftritt.

Eine andere interessante Bande mit signifikanter Verschiebung ist die bei 1398 cm^{-1} , deren Entsprechung im FAD-Spektrum sich bei 1412 cm^{-1} findet. Die vermutete Beteiligung einer $\delta(\text{N}(5)\text{-H})$ -Schwingung an dieser Bande erklärt die Abhängigkeit der Frequenz von der Umgebung des Kofaktors. Im konkreten Fall sollte hier also die N(5)-H-Bindung für das enzymgebundene Flavin weniger „steif“ sein als in wässriger Lösung, etwa indem das Proton in eine starke Wasserstoffbrückenbindung involviert wird. Es existiert leider noch keine Kristallstruktur der reduzierten POX. In der Struktur des oxidierten Enzyms befindet sich ein Wassermolekül in $3,8\text{ \AA}$ Abstand

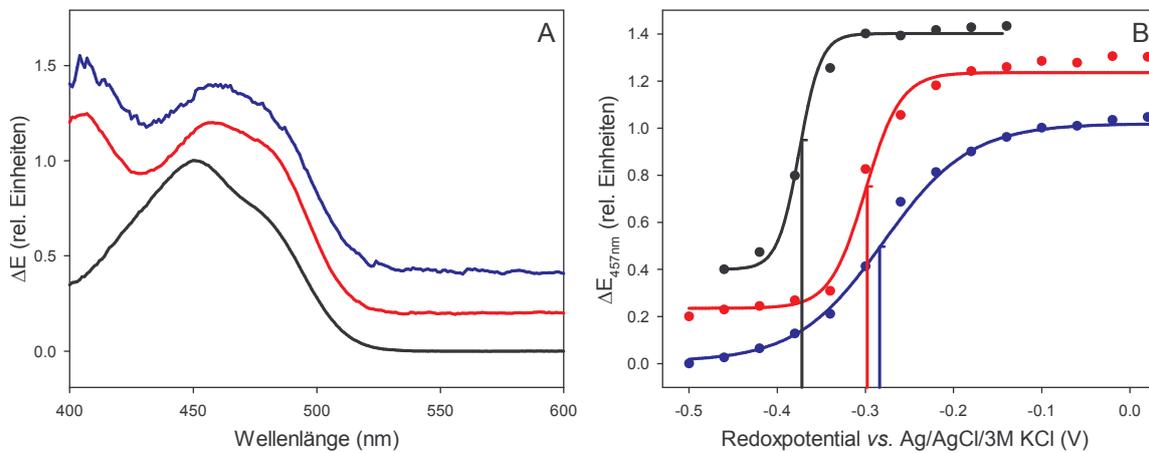


Abb. 3.11: A Normalisierte VIS-Differenzspektrum von FAD in 100 mM Phosphatpuffer (pH 6,0), 100 mM KCl (schwarz), POX-WT in 100 mM Phosphatpuffer (pH 6,0), 50 mM KCl (rot) und POX-WT in 100 mM MES-Puffer (pH 6,0), 50 mM KCl (blau) für einen Potentialsprung von 0,2 auf $-0,6$ V (*vs.* Ag/AgCl/3 M KCl-Referenzelektrode). Zur besseren Übersicht sind die Spektren mit einem *offset* von jeweils 0,2 Extinktionseinheiten versetzt dargestellt. Für alle drei Spektren ist die Extinktionsdifferenz für $\lambda > 550$ nm gleich Null.

B Redox titrationskurven von FAD in 100 mM Phosphatpuffer (pH 6,0), 100 mM KCl (schwarz), POX-WT in 100 mM Phosphatpuffer (pH 6,0), 50 mM KCl (rot) und POX-WT in 100 mM MES-Puffer (pH 6,0), 50 mM KCl (blau) (*vs.* Ag/AgCl/3 M KCl-Referenzelektrode). Fits entsprechend der Nernst-Gleichung (durchgezogene Linien) ergeben Mittelpunktspotentiale von -372 mV für FAD, -298 mV für POX-WT in Phosphatpuffer und -284 mV für POX-WT in MES-Puffer. Zur besseren Übersicht sind die Kurven mit einem *offset* von jeweils 0,2 Extinktionseinheiten versetzt dargestellt.

vom N(5) des Flavins, das eine Wasserstoffbrückenbindung auch im reduzierten Enzym eingehen könnte. Wechselwirkungen von Aminosäureseitenketten mit dem N(5) des Isoalloxazins sind jedoch nicht offensichtlich.

Für die Titration zur Bestimmung des Redoxpotentials vom POX-gebundenen FAD kam ebenfalls die IR-Messzelle zum Einsatz, welche die stufenlose Einstellung des Redoxpotentials erlaubt. Aufgrund des größeren Signals und der stabileren Basislinie erfolgte die Messung jedoch im sichtbaren Bereich des Spektrums bei einer Wellenlänge von 457 nm, die dem Maximum des Peaks im VIS-Differenzspektrum entspricht (Abb. 3.11A). Abb. 3.11B zeigt das Ergebnis dieser Redox titration. Sie liefert für freies FAD ein Mittelpunktspotential von -372 mV gegen die Ag/AgCl-Referenzelektrode, was -164 mV gegen die Standardwasserstoffelektrode entspricht. Das ist für die gegebenen Bedingungen ($\vartheta=15^{\circ}\text{C}$, pH 6) in guter Übereinstimmung mit der Literatur ([93]). Die Titration der Wildtyp-Pyruvatoxidase in Phosphatpuffer zeigt eine deutliche Verschiebung des Redoxpotential zu positiveren Werten, eine Anpassung der

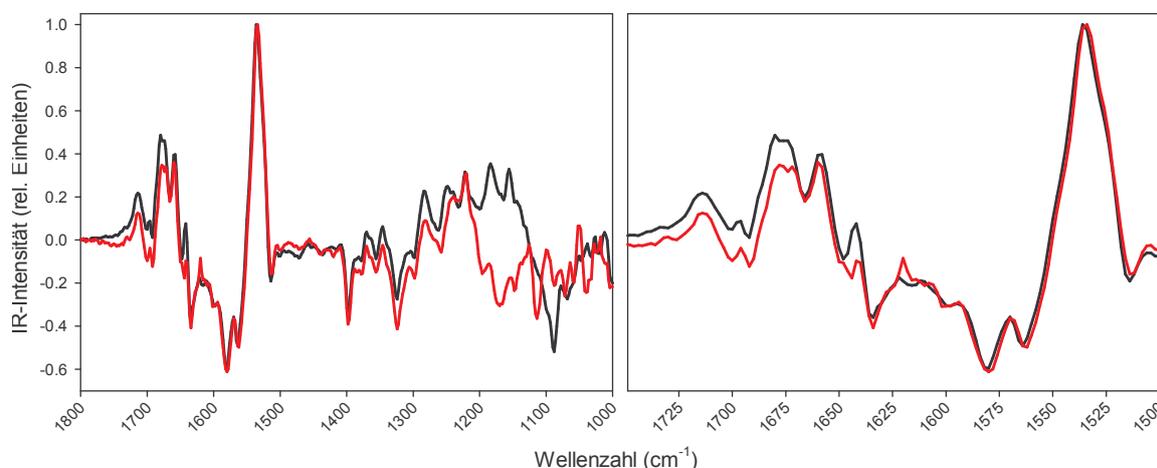


Abb. 3.12: Normalisierte FTIR-Differenzspektren von POX-WT in 100 mM Phosphatpuffer (pH 6,0), 50 mM KCl (schwarz) und in 100 mM MES-Puffer (pH 6,0), 50 mM KCl (rot) für einen Potentialsprung von 0,2 auf -0,6 V (vs. Ag/AgCl/3 M KCl). Rechts: vergrößerter Ausschnitt.

Messwerte mittels der Nernst-Gleichung liefert ein Mittelpunktpotential für die Zwei-Elektronen-Reduktion des FAD von $E_m = -298$ mV (vs. Ag/AgCl, entspricht -90 mV vs. SHE), das damit um 74 mV höher als beim freien Kofaktor liegt. Dieser Wert wurde durch eine unabhängige Bestimmung mittels Farbstofftitration bestätigt (Tittmann, persönliche Mitteilung). In der Tat ist also das Redoxpotential des enzymgebundenen Kofaktors gegenüber der freien Spezies erhöht.

Die Vermutung ist naheliegend, dass die in der Kristallstruktur der POX gefundene geknickte Konformation des FAD die Ursache der beobachteten Peakverschiebungen und des im Vergleich zum freien FAD erhöhten Redoxpotentials ist, da beides auf eine Destabilisierung der oxidierten Form hindeutet. Ein endgültiger Beweis ist das IR-Differenzspektrum allein jedoch noch nicht, da auch andere Wechselwirkungen des Flavins mit dem Protein (Wasserstoffbrücken, elektrostatische und π -stacking-Wechselwirkungen) die Eigenschaften des Kofaktors beeinflussen. Vielmehr ist also ein Vergleich mit dem POX-gebundenen FAD in *planarer* Konformation notwendig, beispielsweise mit Hilfe einer geeigneten Proteinvariante.

POX-WT in MES-Puffer. Abb. 3.12 zeigt die redoxinduzierten IR-Differenzspektren für POX in Phosphat- und in MES-Puffer. Diese sind nahezu deckungsgleich, insbesondere die Flavin-abhängigen Banden. Nur bei Wellenzahlen <1250 cm^{-1} zeigen sich Unterschiede, die auf die unterschiedlichen Puffer (Phosphat und MES) zurückzuführen sind. Die beobachteten Unterschiede der Reaktionskinetik von POX rüh-

ren also höchstwahrscheinlich nicht von einem strukturellen Unterschied der FAD-Bindung her. Weiterhin spricht das Ergebnis der Redox titration dagegen, dass die unterschiedliche Reaktivität von POX in Phosphat- bzw. MES-Puffer auf veränderte Flavin-Redoxpotentiale zurückzuführen ist (Abb. 3.11B). Das Mittelpunktpotential ist mit $E_m = -284$ mV (vs. Ag/AgCl) nur um 14 mV verschoben. Dies allein reicht nicht aus, den Unterschied der Reaktivität zu erklären.

3.2.1.2 Variante POX-V265A

Dem Aminosäurerest V265 kommt eine Schlüsselfunktion für die Erzeugung des Knicks im POX-gebundenen Flavin zu. Die POX-Variante V265A wurde deshalb generiert, um gezielt die Flavinkonformation zu verändern und so deren Einfluß auf die Kofaktoreigenschaften von anderen Wechselwirkungen des Flavins mit dem Protein zu trennen.

Um eine Dopplung im Text zu vermeiden, sei hier auf Abschnitt 3.3.2 (S. 76) verwiesen, wo die redoxinduzierten FTIR-Differenzspektrums dieser Variante detailliert und im Kontext der ebenfalls bestimmten Kristallstruktur diskutiert werden.

3.2.1.3 Variante POX-F121I

Phenylalanin F121 ist einer von drei hydrophoben Resten auf der *si*-Seite des Isoalloxazinrings (Abb. 1.3), also auf der gegenüberliegenden Seite von Valin V265. Wie für die Variante V265A sollte auch dieser Austausch eines aromatischen und starren Phenylalanins gegen ein aliphatisches und flexibleres Isoleucin dazu dienen, den Einfluss von Änderungen der Proteinumgebung auf das redoxinduzierte FTIR-Differenzspektrum abzuschätzen.

Abb. 3.13 zeigt das redoxinduzierte FTIR-Differenzspektrum der POX-Variante F121I. Abgesehen von einer etwas niedrigeren Amplitude oberhalb von 1550 cm^{-1} (hier machen sich kleine Schwankungen der Basislinie aufgrund der starken Wasserabsorption am deutlichsten bemerkbar) sind die Spektren von POX-WT und POX-F121I identisch. Die Peakverschiebungen im Vergleich mit freiem FAD sind für diese Proteinvariante die gleichen. Dies ist insbesondere im Vergleich mit den drastischen Veränderungen von IR-Spektrum und Struktur bei der Variante V265A bemerkenswert und unterstreicht die besondere Rolle von Valin V265. Gemeinsam ist beiden POX-Varianten aber, dass sie in ihrer enzymatischen Aktivität nicht wesentlich beeinträch-

tigt sind (V265A noch weniger als F121I) und auch hinsichtlich der Verteilung der Reaktionsintermediate im *steady state* dem Wildtyp ähneln (siehe Abschnitt 3.4.1 auf S. 92).

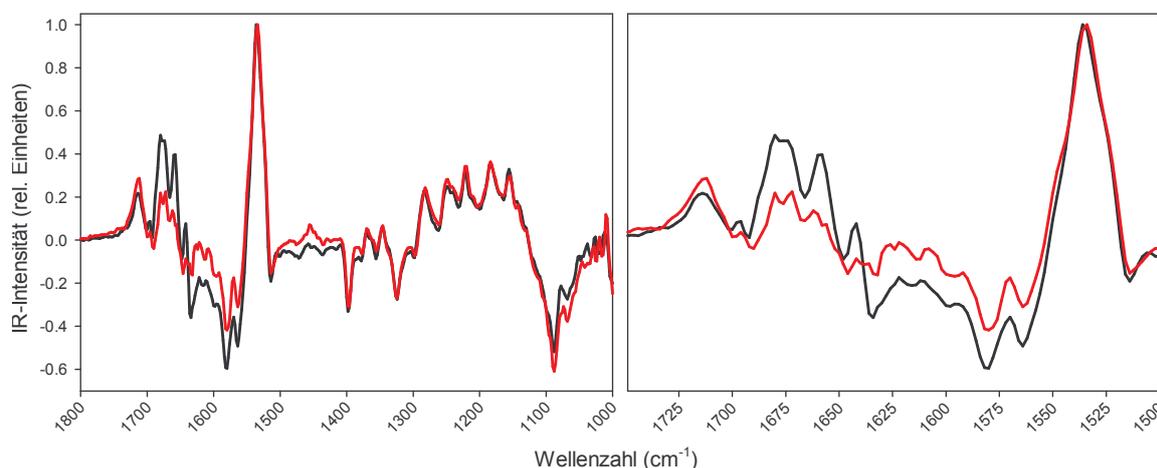


Abb. 3.13: Normalisierte FTIR-Differenzspektren von POX-WT (schwarz) und POX-F121I (rot) in 100 mM Phosphatpuffer (pH 6,0), 50 mM KCl für einen Potentialsprung von 0,2 auf -0,6 V (vs. Ag/AgCl/3 M KCl). Rechts: vergrößerter Ausschnitt.

3.2.2 Glucoseoxidase (GOX) und D-Aminosäure-Oxidase (DAO)

Zusätzlich wurden mit GOX und DAO zwei weitere Flavoenzyme mit bekannter Struktur untersucht. Bei beiden handelt es sich — wie auch bei POX — um Oxidasen, d.h. sie oxidieren ihr jeweiliges Substrat mit Sauerstoff als Elektronenakzeptor, der dabei zu Wasserstoffperoxid reduziert wird. Beide Enzyme enthalten außer FAD keinen weiteren Kofaktor. Für die Redoxpotentiale (gegen SHE) des Übergangs FAD/FADH₂ finden sich in der Literatur die folgenden Werte: GOX -64 mV (pH 5,3) und -220 mV (pH 9,3) [94], DAO -4 mV (pH 7,0) und -75 mV (pH 8,3) [95].

In Glucoseoxidase aus *Aspergillus niger* weist das Flavin eine planare Konformation auf ([96], PDB-Eintrag 1CF3, 1,8 Å Auflösung), und in D-Aminosäureoxidase aus der Schweineleber (*Sus scrofa*) ist der Kofaktor um $\approx 6^\circ$ um die N(5)–N(10)-Achse abgewinkelt ([97], [98], PDB-Einträge 1AN9, 1AA8, 2,5 Å Auflösung), wobei dieser Wert aufgrund der schlechteren Auflösung mit einer gewissen Unsicherheit verbunden ist.

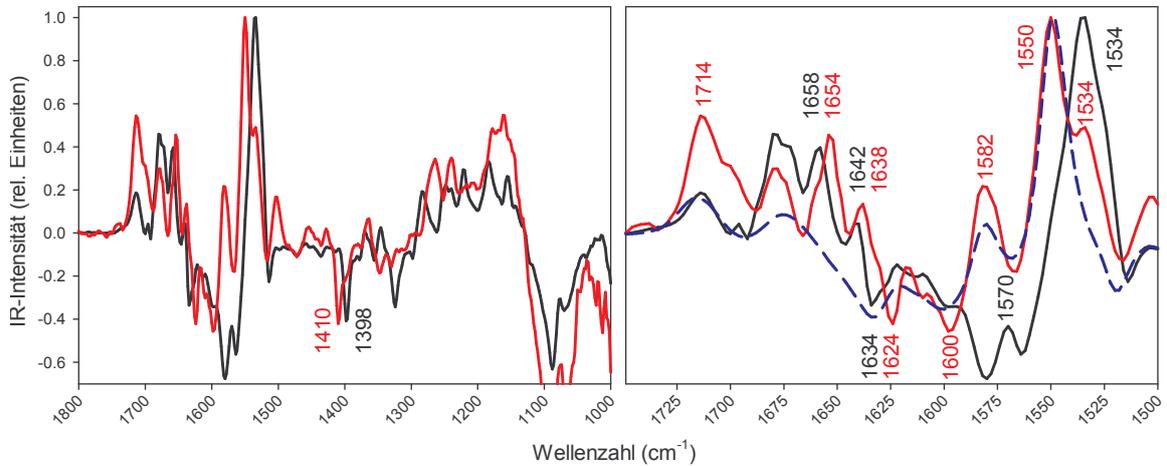


Abb. 3.14: Normalisierte FTIR-Differenzspektren von GOX in 100 mM Phosphatpuffer (pH 6,5), 100 mM KCl (rot), POX-WT in 100 mM Phosphatpuffer (pH 6,0), 50 mM KCl (schwarz) und FAD in 100 mM Phosphatpuffer (pH 6,0), 50 mM KCl (blau) für einen Potentialsprung von 0,2 auf -0,6 V (vs. Ag/AgCl/3 M KCl). Rechts: vergrößerter Ausschnitt.

3.2.2.1 Glucoseoxidase

Abb. 3.14 zeigt das redoxinduzierte FTIR-Differenzspektrum von Glucoseoxidase im Vergleich mit den Spektren von POX-WT und FAD. Es sind deutliche Unterschiede zwischen GOX und POX zu erkennen. Die den $\nu(\text{C}=\text{N})$ -Moden zugeordneten Banden finden sich für GOX bei nahezu den gleichen Frequenzen wie beim freien FAD: 1550 cm^{-1} für $\nu(\text{C}(10\text{a})=\text{N}(1))$ (FAD: 1548 cm^{-1} , POX: 1534 cm^{-1}) und 1582 cm^{-1} für $\nu(\text{C}(4\text{a})=\text{N}(5))$ (FAD: 1580 cm^{-1} , POX: 1570 cm^{-1}). Auch die einer $\delta(\text{N}(5)\text{-H})$ -Mode zugeordnete Bande bei 1410 cm^{-1} ist der des FAD (1412 cm^{-1}) deutlich ähnlicher als der von POX (1398 cm^{-1}). Diese weitgehende Ähnlichkeit der Banden des GOX-gebundenen planaren FAD mit denen des freien Kofaktors unterstützt die These, dass die signifikante Verschiebung entsprechender Peaks bei POX mit der in POX gefundenen geknickten Konformation des FAD zusammenhängt.

Auffällig ist der Nebenpeak der $\nu(\text{C}(10\text{a})=\text{N}(1))$ -Bande bei 1534 cm^{-1} . Es ist zu vermuten, dass dieser der Schulter an der entsprechenden POX-Bande äquivalent ist, jedoch ist die Zuordnung zu einer konkreten Vibrationsmode unklar. Da für freies FAD eine solche Schulter nicht zu finden ist und in dieser Region des Spektrums die Amid-II-Bande des Proteinrückgrats liegt (hauptsächlich $\delta(\text{N-H})$ - und $\nu(\text{C-N})$ -Schwingungen), ist anzunehmen, dass die besagte Schulter von der Proteinkomponente herrührt.

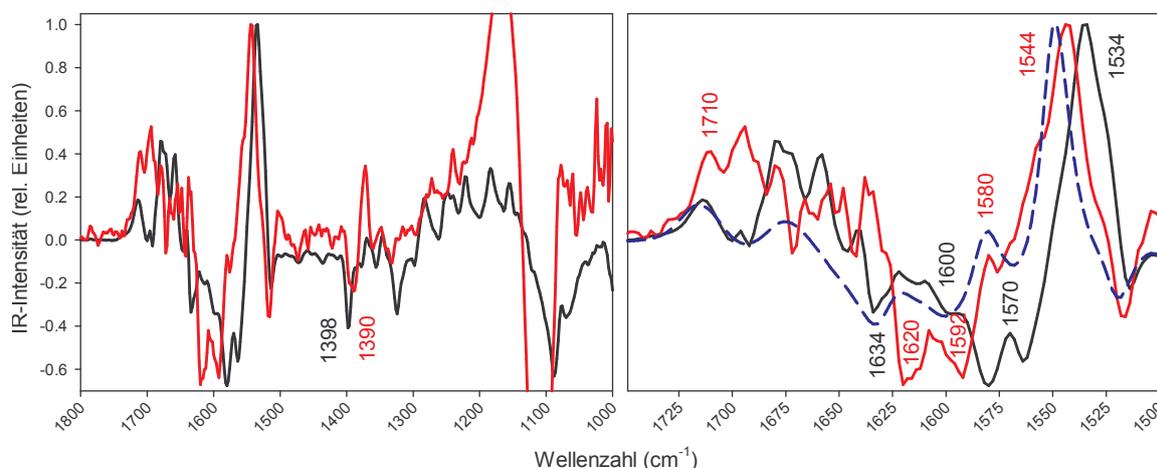


Abb. 3.15: Normalisierte FTIR-Differenzspektren von DAO in 100 mM Pyrophosphatpuffer (pH 8,3), 100 mM KCl (rot), POX-WT in 100 mM Phosphatpuffer (pH 6,0), 50 mM KCl (schwarz) und FAD in 100 mM Phosphatpuffer (pH 6,0), 50 mM KCl (blau) für einen Potentialsprung von 0,2 auf -0,6 V (vs. Ag/AgCl/3 M KCl). Rechts: vergrößerter Ausschnitt.

Ebenso sind die Veränderung zwischen 1600 cm^{-1} und 1660 cm^{-1} , die eine deutliche Ähnlichkeit zur POX zeigen (jedoch mit systematisch niedrigerer Wellenzahl der Peaks), auf die Proteinkomponente zurückzuführen: in dieser Region liegt die dominante Amid-I-Bande des Proteinrückgrats. (siehe Tab. 3.3) In [99] diskutieren Haouz *et al.* die durch den Redoxübergang induzierte Änderung der Amid-I'-Bande von Glucoseoxidase ausgehend von der Dekonvolution dieser Bande in einzelne, spezifischen Sekundärstrukturelementen zugeordnete Komponenten. Da jedoch wie in Abb. 3.14 ersichtlich das FAD in diesem Spektralbereich einen wesentlichen Anteil beiträgt, erscheint die Interpretation der Differenzen ausschließlich als Veränderung des Sekundärstrukturgehalts zumindest unvollständig.

3.2.2.2 D-Aminosäure-Oxidase

Für das Spektrum der D-Aminosäure-Oxidase ist das Signal-Rausch-Verhältnis niedriger als für die oben gezeigten Spektren, wie man an der Basislinie oberhalb von 1720 cm^{-1} ablesen kann (Abb. 3.15). Daher ist eine ausführliche Diskussion der Feinstruktur des Spektrums nicht angebracht. Trotzdem sind einige prominente Banden auch hier wiederzufinden. So erscheint die mit der $\nu(\text{C}(10\text{a})=\text{N}(1))$ -Mode assoziierte Bande für DAO bei 1544 cm^{-1} , was einer Verschiebung von 4 cm^{-1} gegenüber freiem FAD entspricht, und zwar in die gleiche Richtung wie für POX.

3.2.3 Zusammenfassung der Ergebnisse für die FTIR-Untersuchungen an Flavoproteinen

Für alle untersuchten Proteine ist das redoxinduzierte FTIR-Differenzspektrum deutlich vom Spektrum des FAD dominiert. Pyruvatoxidase zeigt hierbei eine auffallend große Verschiebung der $\nu(\text{C}(10\text{a})=\text{N}(1))$ -Bande um 14 cm^{-1} zu niedrigeren Wellenzahlen, als deren Ursache die stark gebogene Konformation des Flavins in diesem Enzym vermutet wird.

Im Bereich der Amid-I-Bande um 1650 cm^{-1} sowie der Amid-II-Bande um 1550 cm^{-1} treten in allen Proteinspektren zusätzliche Banden auf, die nicht eindeutig spezifischen Moden zugeordnet werden können. Veränderungen im Bereich des Proteinerückgrats sind eine mögliche Ursache, jedoch absorbieren hier auch Aminosäureseitenketten. Im Bereich um 1645 cm^{-1} tritt in wässriger Lösung auch die sehr intensive Bande auf, die mit der Biegeschwingung des H_2O -Moleküls assoziiert ist, sodass bedingt durch die Sensitivität der Methode die Möglichkeit besteht, dass hier die Umordnung von in der Proteinstruktur fixiertem Wasser im Zuge des Redoxvorganges detektiert wird. Derartige Umordnungen wurden zum Beispiel für die hochaufgelösten Kristallstrukturen der oxidierten und reduzierten Form der (S)-Mandelatdehydrogenase beschrieben [100].

Die Kristallstrukturen von POX-WT, GOX und DAO sowie die Redoxtitration von POX bzw. die Literaturwerte des Redoxpotentials für Glucoseoxidase und D-Aminosäure-Oxidase zeigen, dass eine Deformation des Flavins und die möglicherweise damit verbundene Peakverschiebung der Flavin- $\nu(\text{C}(10\text{a})=\text{N}(1))$ -Bande nicht direkt mit dem Redoxpotential des enzymgebundenen Kofaktors korrelieren. Das Redoxpotential der POX-Variante V265A unterscheidet sich nicht vom Wildtyp, obwohl das IR-Spektrum der Variante weniger starke Peakverschiebungen (relativ zu freiem FAD) aufweist als das des Wildtyps und auch die Kristallstruktur für ein sterisch entspanntes Flavin spricht (Abschnitt 3.3). Für das Redoxpotential sind andere Einflüsse also stärker ausschlaggebend, etwa die Nähe von Ladungen und Dipolen sowie die Stärke und Art der vom Flavin ausgehenden Wasserstoffbrückenbindungen (im oxidierten und reduzierten Zustand).

Tab. 3.4 fasst die gemessenen Wellenzahlen des $\nu(\text{C}(10\text{a})=\text{N}(1))$ -Peaks der verschiedenen Proteine noch einmal zusammen. Angegeben sind auch die aus den Kristallstrukturen bestimmten Abweichung des Isoalloxazinrings von der Planarität.

Auch wenn sich ein Trend für stärkere Peakverschiebung bei stärkerer FAD-Deformation abzeichnet, ist es derzeit noch nicht angebracht, eine direkte Korrelation zu postulieren. Dazu ist die Zahl der IR-spektroskopisch vermessenen Proteine mit bekannter und vor allem hochaufgelöster Kristallstruktur noch zu gering.

Tab. 3.4: Wellenzahlen der $\nu(\text{C}(10\text{a})=\text{N}(1))$ -Bande für verschiedene Flavoenzyme im Vergleich mit der Abweichung des Kofaktors von der Planarität. Die Redoxpotentiale gelten für die Messbedingungen der IR-Spektren (GOX und DAO Näherungswerte aus Literaturdaten).

Enzym	$\nu(\text{C}(10\text{a})=\text{N}(1))$ (cm^{-1})	E_m vs. SHE (mV)	Deformation des Flavins ($^\circ$)	PDB- Eintrag	Auflösung (\AA)
FAD	1548	-164	0	-/-	-/-
POX-WT	1534	-90	13 (25 ¹)	1POX	2,1
POX-F121I	1534	?	?	-/-	-/-
POX-V265A ²	1538	-92	<13	1Y9D	2,2
GOX	1550	\approx -80	1	1CF3	1,8
DAO	1544	-75	6	1AN9	2,5

¹siehe Fußnote S. 18

²siehe Abschnitt 3.3.2, S. 76

3.3 Die Pyruvatoxidase-Variante V265A

Wie unter 1.2.1 auf Seite 18 erläutert, weist der Isoalloxazinring in der Kristallstruktur der POX eine deutlich geknickte Konformation auf. Dies wurde als Ursache für ein gegenüber freiem FAD erhöhtes Redoxpotential angeführt, da die reduzierte Form bereits von sich aus eine geknickte Konformation zeigt, und zwar sowohl die neutrale Form (FADH₂) als auch neueren Berechnungen zufolge das N(1)-deprotonierte Anion (FADH⁻) [18]. Tatsächlich liegt das Redoxpotential für POX-gebundenes FAD um 74 mV höher als für freies, jedoch beweist das noch keinen ursächlichen Zusammenhang. Zu diesem Zweck wurde die Enzymvariante POX-V265A generiert. Hier ist der Valin-Rest, der als *backstop* für die Verformung des Isoalloxazins diskutiert wird, gegen einen weniger voluminösen Alaninrest ausgetauscht. Es sollte nun untersucht werden, zu welcher Veränderung des Enzyms dies führt. Die betrachteten Schwerpunkte sind dabei:

- die enzymkinetischen Eigenschaften
- das redoxinduzierte FTIR-Differenzspektrum und das Redoxpotential
- die FAD-Bindung
- die Proteinstruktur

3.3.1 Enzymkinetische Eigenschaften

Wenn POX-V265A unter aeroben bzw. anaeroben Bedingungen mit unterschiedlichen Konzentrationen von Pyruvat umgesetzt wird, erhält man die in Abb. 3.16 dargestellten Zeitverläufe der Extinktion des proteingebundenen FAD. Die Auswertung der Kurven aus aeroben Messungen ergibt einen k_{cat} -Wert von $15,5 \pm 1,3 \text{ s}^{-1}$, was dem Wert des Wildtyps gleicht ($16 \pm 2 \text{ s}^{-1}$, [69]). Aus den anaeroben Messungen und damit für die reduktive Halbreaktion allein ergibt sich mittels einer globalen Anpassung über alle Pyruvatkonzentrationen durch das Programm DYNAFIT [101] eine Geschwindigkeitskonstante für den Elektronentransfer von $130 \pm 10 \text{ s}^{-1}$ (Wildtyp: $422 \pm 14 \text{ s}^{-1}$). Der Reduktionsschritt ist damit um den Faktor drei verlangsamt.

Für die vorgelagerte Decarboxylierung liefert diese Anpassung einen Wert von $263 \pm 45 \text{ s}^{-1}$, was etwa um den Faktor zwei schneller ist als beim Wildtyp ($112 \pm 20 \text{ s}^{-1}$). Dabei ist zu berücksichtigen, dass dieser Wert fast ausschließlich von der *lag*-Phase

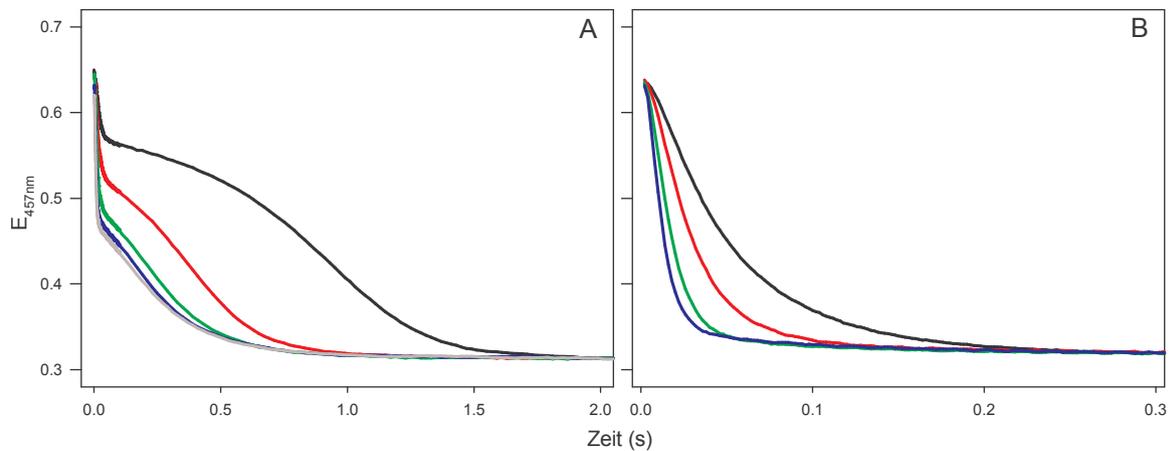


Abb. 3.16: Extinktionsänderung bei 457 nm einer Lösung von POX-V265A (4,3 mg/ml nach Mischung) nach 1:1-Mischung mit Pyruvatlösungen verschiedener Konzentrationen (nach Mischung): schwarz 0,5 mM, rot 1 mM, grün 2,5 mM, blau 10 mM, grau 25 mM.

A: aerobe Bedingungen. Lösungen in luftgesättigtem Kaliumphosphatpuffer 200 mM, pH 6,0, 5 mM ThDP/MgCl₂. Die Extinktionsabnahme repräsentiert das abnehmende Verhältnis FAD/FADH₂ im *steady state* durch den reaktionsbedingten O₂-Verbrauch in der Küvette.

B: anaerobe Bedingungen. Lösungen in Kaliumphosphatpuffer 200 mM, pH 6,0, 5 mM ThDP/MgCl₂ und anaerobisiert durch Glucose/Glucoseoxidase/Katalase. Die Extinktionsabnahme repräsentiert die Reduktion des FAD zu FADH₂ durch *single turnover* mit Pyruvat.

der Extinktionsabnahme abhängt, die innerhalb der ersten 5–10 ms abgeschlossen ist. Dies liegt an der unteren Grenze der messtechnischen Möglichkeiten und macht den Wert anfällig für systematische Fehler und insbesondere initiale Mischartefakte in der Messzelle des *stopped flow*-Spektrometers.

Weder bei den aeroben noch den anaeroben Bedingungen war eine Veränderung der Extinktion bei 600 nm zu beobachten. Damit scheidet unter diesen Bedingungen wie schon für den Wildtyp eine kinetisch relevante Populierung des neutralen Flavin-Semichinons aus.

Insgesamt ist also festzustellen, dass sich die enzymatische Katalyse der Variante POX-V265A nicht bedeutend vom Wildtyp unterscheidet. Die verringerte Geschwindigkeit des Elektronentransfers hat keinen Einfluss auf k_{cat} , da sie weder für Wildtyp noch für die Variante geschwindigkeitsbestimmend ist. Im Vorgriff auf die Reaktionsintermediatanalyse (Abschnitt 3.4.1) ist weiterhin festzustellen, dass sich auch die *steady state*-Verteilung der einzelnen Reaktionsintermediate im Rahmen der Messgenauigkeit der Methode nicht von der des Wildtyps unterscheidet.

3.3.2 Redoxinduziertes FTIR-Differenzspektrum und Redoxpotential

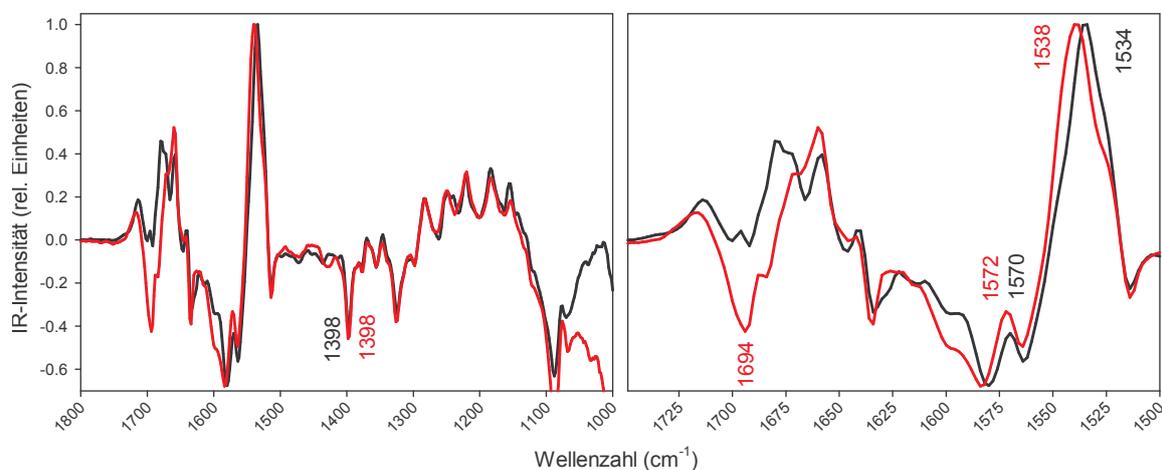


Abb. 3.17: Normalisierte FTIR-Differenzspektren von POX-V265A (rot) und POX-WT (schwarz) in 100 mM Phosphatpuffer (pH 6,0), 50 mM KCl für einen Potentialsprung von 0,2 auf -0,6 V (vs. Ag/AgCl/3 M KCl). Rechts: vergrößerter Ausschnitt.

Abb. 3.17 zeigt das redoxinduzierte FTIR-Differenzspektrum der POX-Variante V265A im Vergleich mit dem des Wildtyps. Die Spektren unterscheiden sich deutlich. Auch für die Variante sind die $\nu(\text{C}=\text{N})$ -Peaks POX-typisch verschoben, jedoch nicht so stark wie für den Wildtyp. Die $\nu(\text{C}(10\text{a})=\text{N}(1))$ -Schwingung findet sich bei 1538 cm^{-1} (WT: 1534 cm^{-1}) und die $\nu(\text{C}(4\text{a})=\text{N}(5))$ -Schwingung bei 1572 cm^{-1} (WT: 1570 cm^{-1}). Dies spricht für die Theorie, dass die Peakverschiebung von der Deformation des Isoalloxazinringes verursacht wird, und dass diese in der Variante aufgrund des Valin→Alanin-Austausches und der damit verbundenen geringeren sterischen Beanspruchung kleiner ausfällt. Die Peaks liegen daher in der Variante V265A näher bei denen des freien Kofaktors.

Sehr auffällig ist auch eine neue Bande bei 1694 cm^{-1} , die in dieser Form weder beim freien FAD noch für den POX-Wildtyp beobachtet wird. Diese und eine schwächer ausgeprägte Differenzbande bei 1670 cm^{-1} sind konsistent mit der IR-Absorption einer Glutamin-Seitenkette [92]. Ein Kandidat hierfür ist der Aminosäurerest Q122 in der Nähe des Isoalloxazinrings (vgl. Abb. 3.22). Die IR-Spektren sprechen dafür, dass sich die Umgebung dieses Glutamins während des Redoxübergangs in der Variante stärker verändert als im Wildtyp. Weiterhin folgt aus der guten Überlagerung der Banden der reduzierten Proteine (1398 cm^{-1} $\delta(\text{N}(5)\text{-H})$ und 1600 cm^{-1} $\nu(\text{C}(4\text{a})=\text{C}(10\text{a}))$) und den im Vergleich dazu größeren Unterschieden auf der „oxidierten“ Seite des Spektrums um 1538 cm^{-1} , dass die *reduzierten* Formen von Wildtyp und Variante

einander ähnlicher sind als die oxidierten Formen und dass der auffällige Peak bei 1694 cm^{-1} im IR-Spektrum von POX-V265A womöglich dadurch zustande kommt, dass ein ihn kompensierender Peak der *oxidierten* Form fehlt. Diese Interpretation wird durch die Strukturbestimmung von POX-V265A unterstützt (siehe 3.3.3.2).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Verschiebungen der $\nu(\text{C}=\text{N})$ -Peaks und die zusätzliche Bande bei 1694 cm^{-1} deutliche Anzeichen für eine veränderte Bindung des Kofaktors in der POX-Variante V265A sind, und zwar insbesondere des oxidierten Zustandes.

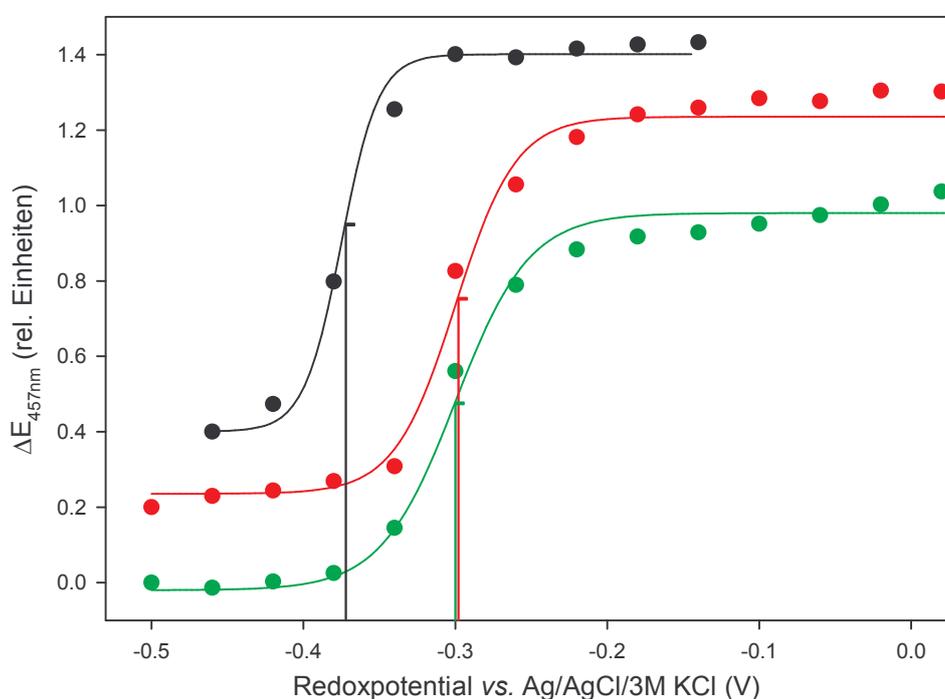


Abb. 3.18: Redox-titrationskurven von FAD in 100 mM Phosphatpuffer (pH 6,0), 100 mM KCl (schwarz), POX-WT (rot) und POX-V265A (grün) in 100 mM Phosphatpuffer (pH 6,0), 50 mM KCl (*vs.* Ag/AgCl/3 M KCl-Referenzelektrode). Fits entsprechend der Nernst-Gleichung (durchgezogene Linien) ergeben Mittelpunktspotentiale von -372 mV für FAD, -298 mV für POX-WT und -300 mV für POX-V265A. Zur besseren Übersicht sind die Kurven entlang der Ordinate versetzt dargestellt.

Das Ergebnis der Redox-titration für POX-V265A ist in Abb. 3.18 dargestellt. Die Titrationskurven sind nahezu deckungsgleich, und die Anpassung an die Nernst-Gleichung liefert ein Mittelpunktspotential von -300 mV (*vs.* Ag/AgCl), das damit im Rahmen der Messgenauigkeit gleich dem des Wildtyps ist (-298 mV). Dies ist im Zusammenhang mit dem deutlich veränderten IR-Spektrum der Variante überraschend,

passt jedoch zu den kinetischen Messungen, die nur geringfügige Unterschiede zwischen Wildtyp und Variante gezeigt haben.

Daraus folgt auch, dass der verlangsamte Elektronentransfer zwischen HETHDP-Carbanion/Enamin und FAD in der Variante auf einer höheren *kinetischen* Barriere beruht, da das Redoxpotential als thermodynamischer Parameter unverändert ist. Die einfachste Erklärung dafür wäre ein größerer mittlerer Abstand der beiden Redoxpartner, oder eine (u.U. nur geringfügige) Verschiebung von Aminosäureseitenketten im aktiven Zentrum, die am Elektronentransfer beteiligt sind.

3.3.3 Proteinstruktur

3.3.3.1 Allgemeines

Die Indizien, insbesondere die um drei Größenordnungen schwächere Bindung des FAD an die Variante (siehe 3.3.4, S. 86) und das veränderte FTIR-Differenzspektrum, sprechen für eine weniger stark geknickte Konformation des FAD in POX-V265A. Um diesen strukturellen Hintergrund der beobachteten Unterschiede zu untersuchen, wurde die Variante POX-V265A kristallisiert und die Struktur mit einer Auflösung von 2,2 Å bestimmt. Tab. 3.5 zeigt die Statistik der Datensammlung und des Strukturmodells. Die Kristallform der Variante gehört zur Raumgruppe $P2_1$, die bisher für POX noch nicht beschrieben wurde und damit die vierte beobachtete Form ist [9]. Die asymmetrische Einheit enthält ein komplettes Tetramer.

Abb. 3.19 zeigt eine Überlagerung der Strukturen von Tetramer und Monomer des Wildtyps und der Variante V265A. Es ist zu erkennen, dass sich diese nicht gravierend unterscheiden. Der RMSD-Wert für die beste Überlagerung des Proteinrückgrates beider Tetramere (2242 C_α -Atome) beträgt 0,73 Å, für die Überlagerung der Monomere A (558 C_α -Atome) 0,57 Å.

Auffallend sind die gegenüber dem Wildtyp generell erhöhten Temperaturfaktoren der Variante. Der mittlere Temperaturfaktor beträgt für die Variante ca. 45 Å², für den Wildtyp jedoch nur 15 Å². Zwei Ursachen können dafür verantwortlich sein: zum einen die weiter unten diskutierte flexiblere Bindung des FAD, die zu einer sehr starken lokalen Erhöhung der Temperaturfaktoren in der Isoalloxazin-Bindungstasche führt, und zum anderen der Unterschied zwischen den Kristallformen für Wildtyp und Variante, da sich durch eine unterschiedliche Einbettung der Moleküle ins Kristallgitter andere Beweglichkeiten für das gesamte Tetramer ergeben. Tatsächlich wird aus

Tab. 3.5: Statistische Parameter für Datensammlung und Modellierung der Kristallstruktur von POX-V265A, Werte in Klammern beziehen sich auf den Bereich der höchsten Auflösung (2,26–2,20 Å).

Datensammlung	
Raumgruppe	P2 ₁
Einheitszellparameter	
a, b, c [Å]	94,66×155,78×100,75
β [°]	92,92
Auflösung [Å]	2,2
Mosaizität [°]	0,475
# Reflexe insgesamt	581204
# Reflexe einzigartig	147399
Redundanz	3,94
I/σ _I	20,6 (2,3)
Completeness [%]	99,9 (100)
R _{merge} [%]	6,2 (64,5)
R _{r.i.m.} [%]	7,2 (75,0)
R _{p.i.m.} [%]	3,6 (37,7)
Verfeinerung	
Auflösung [Å]	27,3–2,2 (2,26–2,2)
# Reflexe insgesamt	147016 (10828)
# Reflexe im <i>working set</i>	139647 (10271)
# Reflexe im <i>test set</i>	7369 (557)
R [%]	17,8 (23,4)
R _{free} [%]	23,8 (30,8)
mittlerer Temperaturfaktor [Å ²]	45
geschätzter Koordinatenfehler [Å]	
basierend auf R	0,222
basierend auf R _{free}	0,199
# Atome im Modell	19404
# Aminosäurereste	2246
# Atome im Protein	17321
# Ionen	4×Mg ²⁺ , 2×Na ⁺
# Liganden	4×(ThDP, FAD, SO ₄ ²⁻)
# Solventatome	1848
RMSD Bindungslängen [Å]	0,018
RMSD Bindungswinkel [°]	1,677
Ramachandran-Plot	
besonders bevorzugt [%]	90,4
zusätzlich erlaubt [%]	9,3
nicht erlaubt [%]	0,3

Abb. 3.21 ersichtlich, dass die Mobilität in den einzelnen Untereinheiten verschieden ist. Ein Vergleich mit Abb. 3.20 verdeutlicht, dass die Untereinheiten mit vergleichsweise niedrigen Temperaturfaktoren (B und D) auch diejenigen sind, die die meisten Kristallkontakte aufweisen.

In der Struktur der Variante fehlt für eine Reihe von Aminosäuren eine klar definierte Elektronendichte, so dass diese Reste nicht modelliert werden konnten. Diese Lücken sind für alle vier Untereinheiten in Tab. 3.6 zusammengefasst, sie unterscheiden sich geringfügig in den einzelnen Untereinheiten. Schlecht definierte Termini der Polypeptidketten werden bei der Bestimmung von Kristallstrukturen häufig gefunden, und

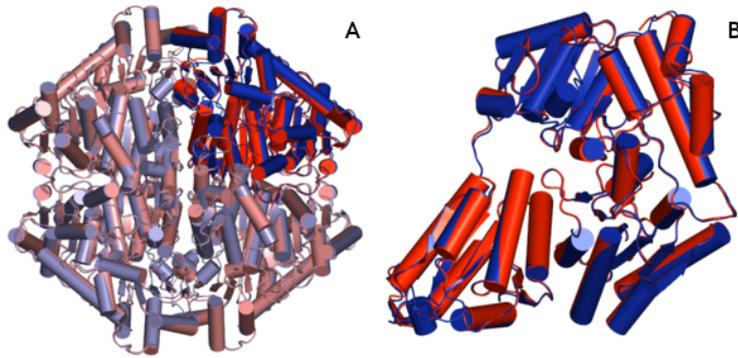


Abb. 3.19: Überlagerungen der Strukturen des Tetramers (A) und des Monomers (B) für WT-Pyruvatoxidase (blau) und die Variante V265A (rot). Ein Monomer (Untereinheit A) ist im linken Bild durch kräftigere Farben hervorgehoben. Die Koordinaten für den Wildtyp entstammen dem PDB-Eintrag 1POX [8].

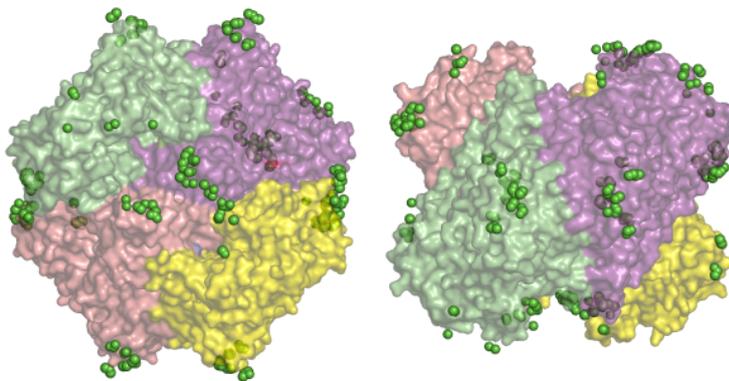


Abb. 3.20: Kristallkontakte des Tetramers, links die Frontansicht und rechts die Draufsicht nach Drehung um 90° um die waagerechte Achse, Untereinheiten verschiedenfarbig. Als grüne Kugeln sind alle Atome von benachbarten Tetramere dargestellt, die weniger als 3 Å entfernt sind.

auch in der Struktur des Wildtyps fehlt die Dichte für die Reste 1–8 und 594–603 in allen vier Untereinheiten. Die Aminosäuren 181–194 gehören zu einem langgestreckten Abschnitt ohne Sekundärstruktur, der die N-terminale *Core*-Domäne mit der zentralen FAD-Domäne verbindet. In der Wildtyp-Struktur ist dieser Bereich gut definiert. Dort ist zumindest in zwei Untereinheiten pro Tetramer die Region 187–190 in strukturstabilisierende Kristallkontakte involviert, während das bei der Variante für keine

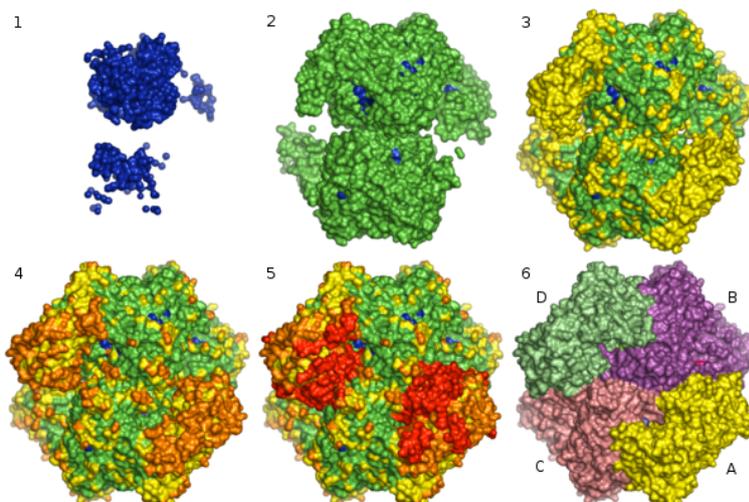


Abb. 3.21: Verteilung der Temperaturfaktoren im Tetramer von POX-V265A (ohne Wassermoleküle). Von Bild 1 bis Bild 5 wird jeweils eine Lage von Atomen hinzugefügt, die Farbskala für B ist dabei: blau $<30 \text{ \AA}^2$, grün 30...45 \AA^2 , gelb 45...60 \AA^2 , orange 60...75 \AA^2 , rot $>75 \text{ \AA}^2$. Bild 6 zeigt die vier Untereinheiten in vier verschiedenen Farben.

Tab. 3.6: Aminosäuren in der Struktur der Variante, für die gut interpretierbare Elektronendichte fehlt.

Bereich	Untereinheit			
	A	B	C	D
N-Terminus	1–8	1–8	1–8	1–8
FAD1	116–122	117–121	116–122	116–122
Domänenlinker	183–191	184–189	181–193	187–194
FAD2	287–297	289–294	288–296	288–297
C-Terminus	594–603	598–603	594–603	594–603

der vier Untereinheiten der Fall ist. Eine ähnliche Situation wie für POX-V265A findet sich in der strukturell sehr ähnlichen Indolpyruvatdecarboxylase aus *Enterobacter cloacae*. Dort fehlt die Elektronendichte für einen langgestreckten Abschnitt aus 14 Aminosäuren, der die mittlere mit der C-terminalen Domäne verbindet [102].

3.3.3.2 Die Umgebung des FAD

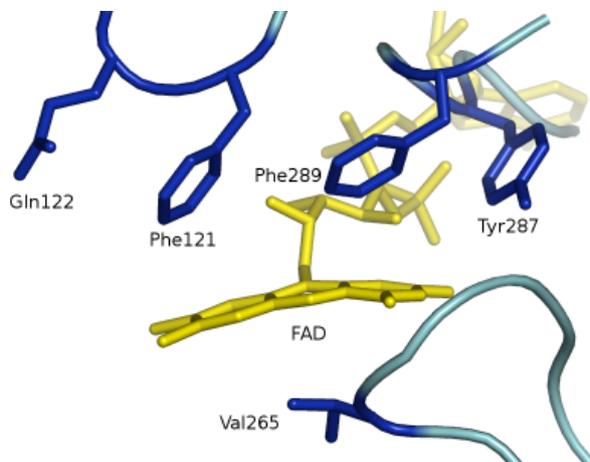


Abb. 3.22: Unmittelbare Umgebung des FAD-Isoalloxazinrings in Wildtyp-POX.

Besonders interessant ist das Fehlen der Dichte für die in der Tabelle 3.6 mit FAD1 und FAD2 bezeichneten Bereiche, denn sie sind beim Wildtyp an der Bindung des FAD-Isoalloxazinrings beteiligt. Diese Loops enthalten die Aminosäuren F121, Y287 und F289. Diese drei voluminösen aromatischen Reste befinden sich nebeneinander auf der *si*-Seite des Isoalloxazins. Valin 265, dem die *Backstop*-Funktion zugesprochen wird und das in der Variante gegen Alanin ausgetauscht ist, befindet sich auf der *re*-Seite (siehe Abb. 3.22). Die mit FAD1 bezeichnete Region enthält auch den Glutamin-

rest Q122 und liefert somit einen strukturellen Anhaltspunkt für die oben vorgestellte Interpretation des Peaks bei 1694 cm^{-1} im IR-Differenzspektrum der Variante.

In der Variante fehlt jedoch nicht nur die Dichte für die Protein-Loops, sondern auch für den gesamten Riboflavinteil des FAD, also den Isoalloxazinring und den Ribitylrest. Zusammen mit den nicht definierten Protein-Loops belegt das die hohe Strukturflexibilität in dieser Region. Die Elektronendichte für den ADP-Teil ist dagegen klar definiert. Die Situation ist in allen vier kristallographisch unabhängigen Unter-einheiten gleich, das spricht gegen die Möglichkeit eines Kristallisationsartefaktes. In Abb. 3.23 sind die Regionen mit fehlender Dichte dargestellt.

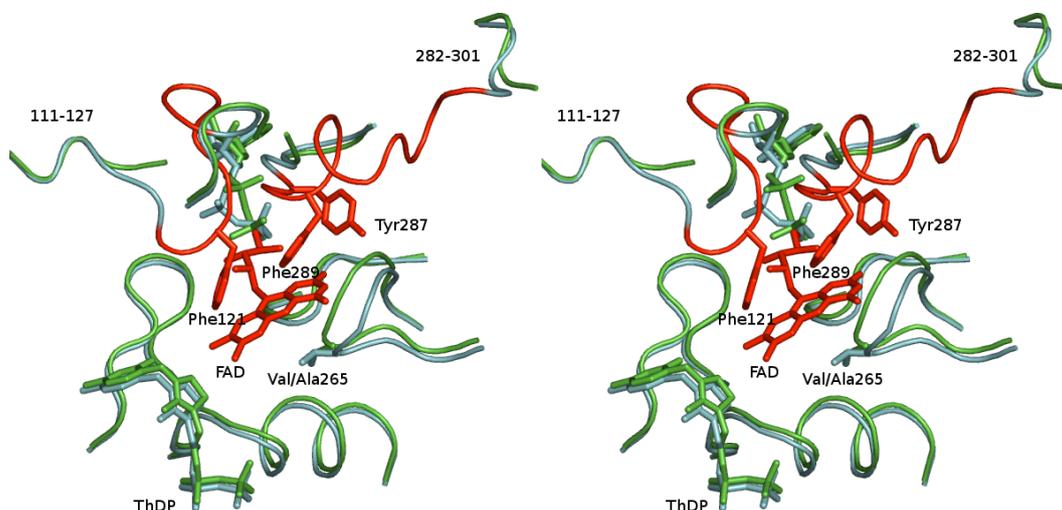


Abb. 3.23: Stereoansicht des aktiven Zentrums von Wildtyp-POX und POX-V265A. Dargestellt ist nur das Proteinrückgrat. Die Kofaktoren FAD und ThDP und die Aminosäureseitenketten V/A265, F121, Y287 und F289 sind als Stabmodell abgebildet. Die Struktur der Variante ist grün; die Struktur des Wildtyps ist cyan bis auf die Bereiche, für die Elektronendichte an den entsprechenden Stellen der Variante V265A fehlt — diese sind in rot wiedergegeben.

Gegen die Möglichkeit, dass die Elektronendichte des Isoalloxazinrings fehlt, weil dieser abgespalten ist, sprechen drei Argumente:

- Die Kristalle zeigen die typische, intensiv gelbe Farbe des Flavins.
- Enzymlösungen sind mindestens so lange stabil und aktiv, wie das Kristallwachstum dauert.
- Eine Hydrolyse des FAD wäre nicht für die Esterbindung zwischen Ribitylrest und Phosphat (wie die Struktur suggeriert), sondern eher für die Säureanhydridbindung zwischen den beiden Phosphatgruppen zu erwarten.

Damit ergibt sich nun eine strukturelle Erklärung für die Unterschiede der IR-Spektren von Wildtyp und Variante und auch für die schwächere FAD-Bindung in der Variante. Zwar kann eine Aussage über die Deformation des Kofaktors in der Variante nicht mit letzter Sicherheit gemacht werden, die hier beobachtete Flexibilität spricht aber deutlich für ein sterisch relaxiertes Isoalloxazin. Es ist überraschend, dass bei dieser großen Beweglichkeit des Kofaktors die $\nu(\text{C}(10\text{a})=\text{N}(1))$ -Bande im IR-Spektrum von POX-V265A nicht *noch* weiter in Richtung des freien Flavins verschoben ist.

Einen Erklärungsansatz hierfür liefert die Betrachtung der Elektronendichte in der Isoalloxazin-Bindungstasche: dort befindet sich positive Elektronendichte etwa dort, wo im Wildtyp die beiden Carbonylgruppen des Isoalloxazins liegen (siehe Abb. 3.26), wo dieses also durch Wasserstoffbrücken fixiert ist. Diese Dichte kann zwar nicht strukturell interpretiert werden, sie ist jedoch nach Form und Intensität auch nicht durch Wassermoleküle zu erklären. Möglicherweise „klappt“ der Isoalloxazinring um diesen Fixpunkt.

In diesem Zusammenhang ist interessant, dass die Elektronendichte für die Aminosäurereste, die im Wildtyp die Wasserstoffbrückenbindungen zum FAD ausbilden, in der Elektronendichte der Variante ebenfalls gut definiert sind (Y218, S243, A262, R264). Diese Wasserstoffbrückenbindungen zu den Carbonylgruppen des Flavins könnten — ebenso wie der Knick entlang der N(5)–N(10)-Achse — zu einer Aufweitung der C(10a)=N(1)-Bindung beitragen, indem sie dort die Elektronendichte verringern (Abb. 3.24).

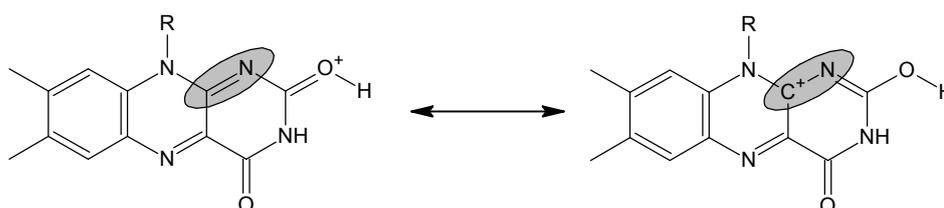


Abb. 3.24: Verringerung der Elektronendichte der C(10a)=N(1)-Bindung durch eine Wasserstoffbrücke bzw. Protonierung am O(2) des Flavins, analoges gilt für C(4a)=N(5) und O(4).

Der Protein-Loop 260–271, der die ausgetauschte Aminosäure 265 enthält, weist zwar ebenfalls überdurchschnittliche Temperaturfaktoren auf, ist aber trotzdem in der Elektronendichte gut zu erkennen. Seine Position unterscheidet sich deutlich von der Wildtypstruktur. Er ist weiter in die Flavin-Bindungstasche hineingeklappt (Abb. 3.25, 3.23).

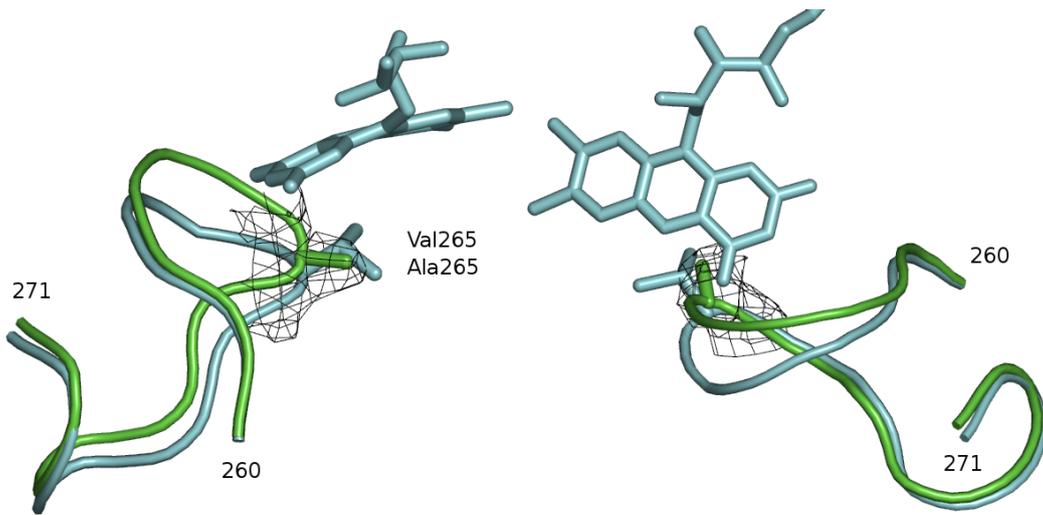


Abb. 3.25: Zwei verschiedene Ansichten des Loops 260–271, in dem der Austausch des Aminosäurerests 265 stattfand (cyan: Wildtyp, grün: V265A, Elektronendichte bei 1σ). Während sich Enden in POX-WT und POX-V265A überlagern, ist der mittlere Teil bei der Variante weiter in die Bindungstasche des Isoalloxazinrings hineingeklappt.

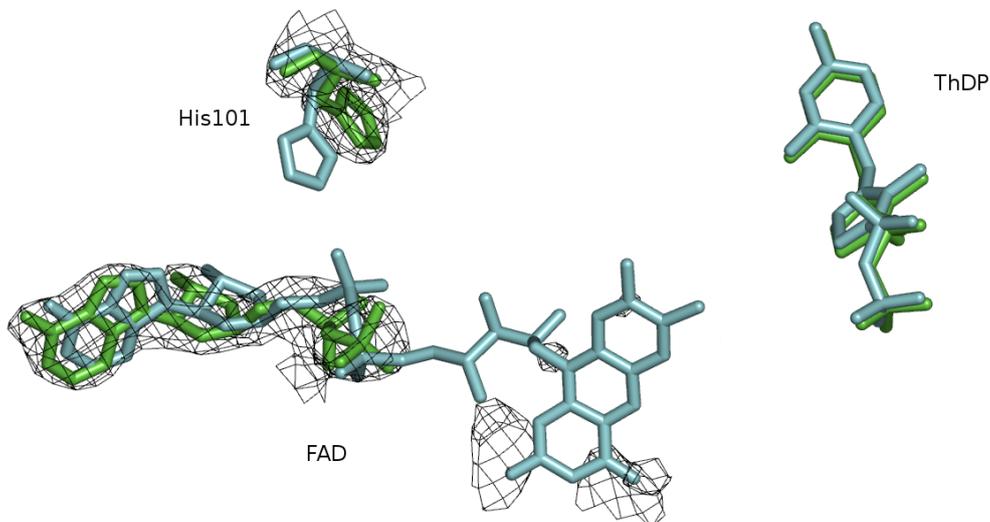


Abb. 3.26: Position von ThDP, H101 und des FAD in POX-WT (cyan) bzw. des ADP-Restes in POX-V265A (grün). Die Positionen des ThDP stimmen sehr gut überein, aber der ADP-Rest des FAD in V265A ist davon ca. 1 Å weiter entfernt als im Wildtyp. Die Seitenkette von H101 in der Variante ist gegenüber dem WT ca. 90° um die C_α - C_β -Achse verdreht und hat den Kontakt zum Pyrophosphat des FAD verloren. Die Elektronendichte (außer für ThDP) ist bei $1,5\sigma$ konturiert.

Auch die Position des ADP-Teils des FAD in der Variante unterscheidet sich vom Wildtyp. Dieser Teil des Molekül, insbesondere der Adenosinrest, ist in POX-V265A ca. 1 Å weiter entfernt vom ThDP (Abb. 3.26). Die Position der terminalen Phosphat-

gruppe, an der der Ribitylrest ansetzt, stimmt jedoch in beiden Strukturen überein. Ein weiterer Unterschied ist Histidin 101, das im Wildtyp eine Wasserstoffbrücke mit dem Pyrophosphat des FAD ausbildet. Dieser Kontakt fehlt in der Variante, da die Seitenkette des Histidin ca. 90° um die C_α - C_β -Achse verdreht ist.

3.3.3.3 Die Umgebung des ThDP

Im Gegensatz zum Flavin ist der zweite Kofaktor ThDP in der Elektronendichte sehr gut definiert. Zusätzlich ist in der Struktur der Variante zwischen den beiden Ringen des ThDP ein klar erkennbarer Peak in der Elektronendichte zu finden, der durch Wasser nicht zu erklären ist, der jedoch sehr gut durch ein tetrahedrales Oxoanion ausgefüllt wird (Abb. 3.27).

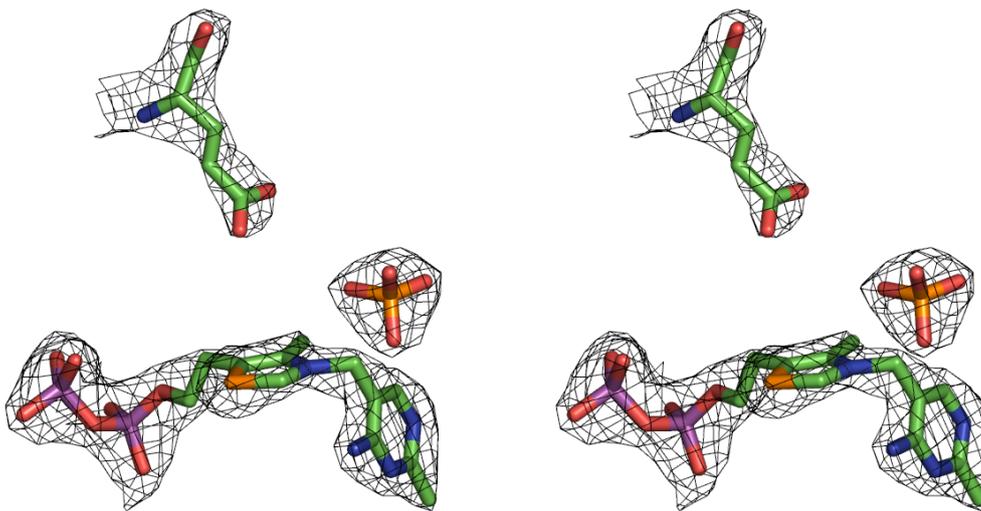


Abb. 3.27: Stereobild eines Sulfat-Ions im aktiven Zentrum von POX-V265A. Unten der Kofaktor ThDP, links oben der Aminosäurerest E483, dem eine Rolle bei der phosphorolytischen Spaltung des Acetyl-ThDP zugesprochen wird. Die Elektronendichte ist bei 2σ konturiert.

Zwischen Phosphat und Sulfat kann bei einer Auflösung von $2,2 \text{ \AA}$ nicht differenziert werden, da beide Ionen im Kristallisationsansatz enthalten sind und sich hinsichtlich der P/S-O-Abstände nur um ca. $0,1 \text{ \AA}$ unterscheiden. Wegen der höheren Konzentration an Sulfat im Kristallisationsansatz wurde für das Strukturmodell das Sulfat-Ion verwendet. Da Sulfat aber weder Substrat noch kompetitiver Inhibitor für POX ist, könnte das in der Elektronendichte gefundene Ion trotzdem die Phosphatbindungsstelle markieren. Dazu passt auch, dass sich das Ion am positiven Ende zweier α -Helix-Dipole befindet.

Der Wildtyp zeigt an dieser Stelle ebenfalls zusätzliche Dichte, die als Glycerolmolekül modelliert wurde. Diese Möglichkeit kann für die POX-V265A mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

3.3.4 FAD-Bindung

Bei Pyruvatoxidase ändert sich das VIS-Spektrum von FAD stark, wenn der Kofaktor an das Apoenzym bindet [3]. Die kürzerwellige Absorptionsbande des Flavins, die für freies FAD in wässriger Lösung bei 375 nm liegt, verschiebt sich trotz der Unterschiede in der Kofaktorbindung für die Variante wie auch für den Wildtyp zu 406 nm und zeigt eine höhere Intensität. Letzterer Effekt ist beim Wildtyp noch ausgeprägter als bei der Variante V265A (Abb. 3.28): das Extinktionsverhältnis E_{406nm}/E_{457nm} beträgt für den Wildtyp 1,26 und für die Variante 1,04. Flavin-VIS-Spektren, die in ähnlicher Weise stark vom Spektrum des freien Kofaktors abweichen, wurden bisher nur für einige Elektronentransfer-Flavoproteine (ETF) beschrieben [103]. Bemerkenswert ist dabei, dass POX und ETF hinsichtlich der Struktur der FAD-Bindungsregion eine eigene Proteinfamilie konstituieren, die sonst keine weiteren Mitglieder enthält und nicht mit den drei großen FAD-Proteinfamilien (Glutathionreduktase-, Ferredoxinreduktase- und p-Kresol-Methylhydroxylase-Familie [104]) verwandt ist. Die genaue molekulare Ursache für die spektrale Abweichung ist aber nach wie vor unklar.

Die Änderung des VIS-Spektrums bei der Bindung des FAD an das Apoprotein kann vorteilhaft für die Bestimmung der Dissoziationskonstanten ausgenutzt werden: in Übereinstimmung mit der in der Struktur gefundenen Mobilität des redoxaktiven Isoalloxazinrings wird im Verdünnungsexperiment für die Variante V265A ein deutlich verringerte Affinität zum FAD gefunden (Abb. 3.28).

Aus der Analyse der Kurven ergibt sich für das FAD ein $K_D=13 \mu\text{M}$. Für den POX-Wildtyp ist der K_D -Wert nur schwer zu bestimmen, er ist aber kleiner als 10 nM [3]. Damit ergibt sich für die Variante eine Verringerung der Affinität um mindestens drei Größenordnungen. Durch die Messung der Molekülmasse und des Gyrationradius mittels Röntgenkleinwinkelstreuung kann ausgeschlossen werden, dass die Verdünnungseffekte auf einen Zerfall der tetrameren Quartärstruktur bei niedriger Proteinkonzentration zurückzuführen sind (Tab. 3.7).

Verdrängung des FAD durch Adenin-Nukleotide. Die Struktur der POX-Variante V265A legt die Vermutung nahe, dass dem ADP-Rest des FAD eine Ankerfunktion für

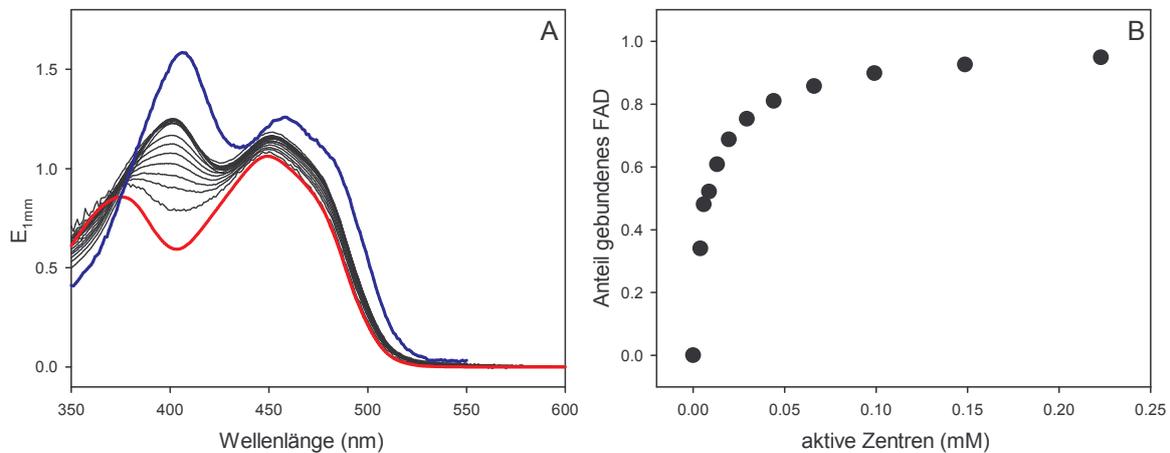


Abb. 3.28: A VIS-Spektren von POX-V265A (schwarz) bei verschiedenen Konzentrationen (von oben nach unten Proteinkonzentration von 1,7 mM bis 3,8 μ M aktive Zentren, entsprechend 113 mg/ml bis 0,25 mg/ml Protein, Puffer 200 mM Kaliumphosphat pH 6,0, 5 mM ThDP/MgCl₂), korrigiert um den Verdünnungsfaktor. Das rote Spektrum entspricht unendlicher Verdünnung und ist identisch mit dem FAD-Spektrum. Das blaue Spektrum ist das von POX-WT.

B Anteil an gebundenem FAD bei zunehmender Enzymkonzentration. Daten berechnet aus der Linearzerlegung der Spektren in A in einen freien und einen vollständig gebundenen Teil.

Tab. 3.7: Molmasse und Gyrationradius von POX-V265A bei verschiedenen Proteinkonzentrationen. Die absoluten Werte der Molmasse sind durch systematische Fehler bei der Konzentrationsbestimmung zu klein, liegen aber im erwarteten Bereich für das Tetramer. Wesentliches Ergebnis ist, dass die Molmassen bei variabler Proteinkonzentrationen ebenso wie die Gyrationradien *keinen* Trend aufweisen.

c_p mg/ml	mol. Masse kDa	R_G nm
1,2	170	4,15 \pm 0,034
2,7	163	3,94 \pm 0,014
5,4	169	4,00 \pm 0,010
7,6	164	4,20 \pm 0,111
10,5	170	4,14 \pm 0,009
19,2	177	4,13 \pm 0,007

die Kofaktorbindung zukommt. Deshalb wurde in Konkurrenzexperimenten versucht, durch Zugabe von Adenin-Nukleotiden (AMP, ADP und ATP) das FAD vom Protein zu verdrängen. Dazu wurde zu einer POX-V265A-Lösung schrittweise eines der genannten Nukleotide zugegeben und die Freisetzung des FAD anhand der spektralen Veränderung verfolgt. In der Tat sind alle drei Nukleotide in der Lage, das FAD vom Protein zu verdrängen. Unter den gewählten Bedingungen ergeben sich ungefähre K_i -Werte für AMP, ADP und ATP von \approx 3 mM, 1,5 mM und 1,5 mM in dieser Reihenfolge (Abb. 3.29). Es ist sogar möglich, das enzymgebundene FAD durch NAD

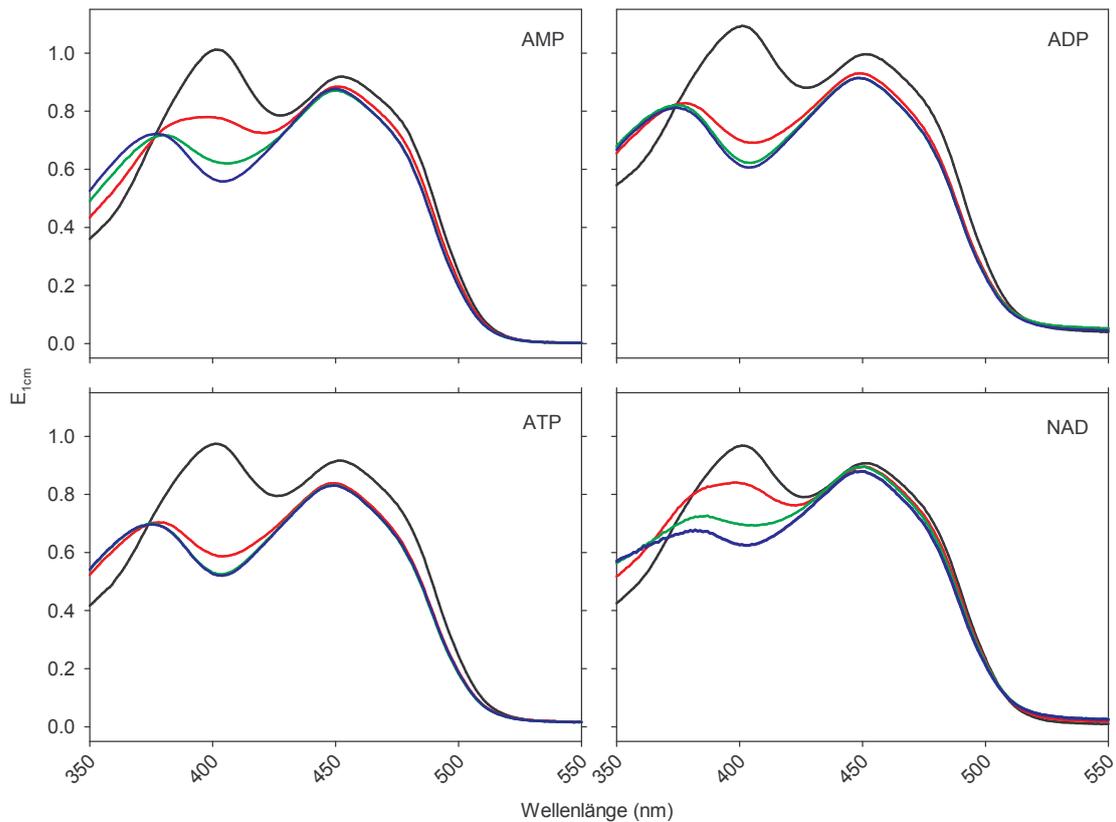


Abb. 3.29: Verdrängung von POX-V265A-gebundenem FAD durch steigende Konzentrationen an Adenin-Nukleotiden (Proteinkonzentration 15 mg/ml in 200 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,0). Konzentration der kompetierenden Spezies: schwarz 0 mM, rot 2,8 mM, grün 8,2 mM, blau 18 mM. Die Spektren mit NAD mussten um den Beitrag einer stark absorbierenden Verunreinigung ($\lambda_{max}=373$ nm) im NAD korrigiert werden und sind daher mit einem größeren Fehler behaftet.

zu verdrängen ($K_i \approx 6$ mM), obwohl dieser Kofaktor außer dem ADP-Anker völlig anders aufgebaut ist und der an das Nikotinamid gebundene zyklische Ribose-Rest sterisch anspruchsvoller ist als der lineare und damit flexiblere Ribityl-Baustein des FAD. Trotz der Bindung des NAD wurde allerdings nach der Zugabe von Pyruvat *keine* Reduktion zu NADH beobachtet.

Aus thermodynamischer Sicht ist ein gegenüber dem freien Kofaktor erhöhtes Redoxpotential des gebundenen FAD äquivalent zu einer festeren Bindung der reduzierten Form. Für ein um 75 mV erhöhtes Potential folgt aus der Nernst-Gleichung eine um den Faktor 340 kleinere Dissoziationskonstante ($\vartheta=25^\circ\text{C}$) für FADH_2 als für FAD. Abb. 3.30 zeigt das Ergebnis eines Experimentes, das dies qualitativ bestätigt.

Nach der Zugabe von ADP zur POX-V265A-Lösung verschiebt sich das Spektrum hin zu dem des freien Kofaktors (Spektren 1 und 2). Zugewetztes Pyruvat führt nach eini-

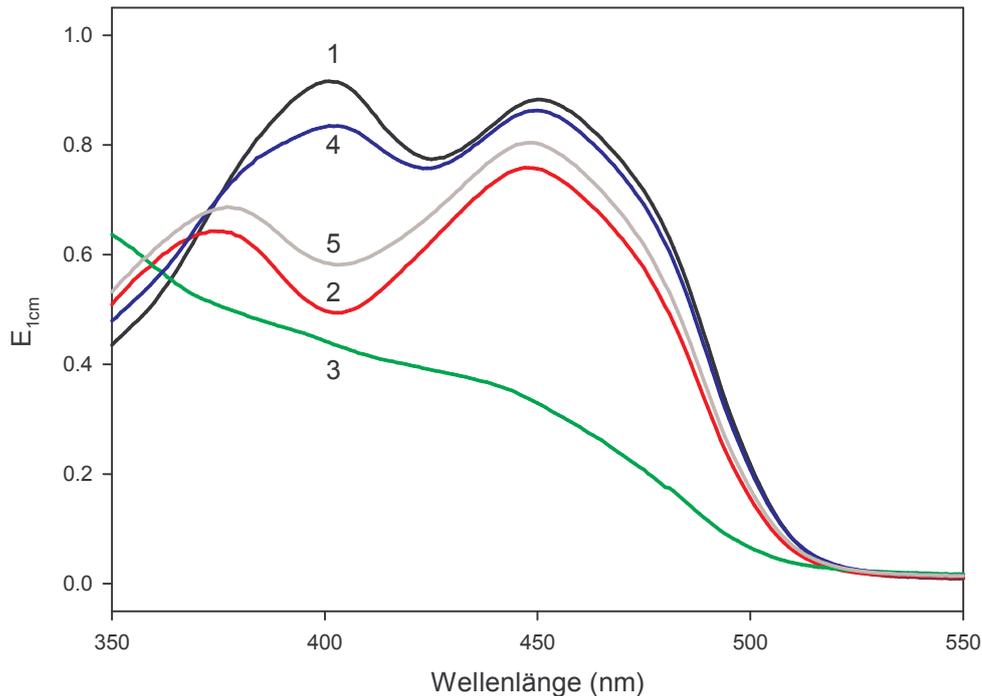


Abb. 3.30: POX-V265A-Spektren in der Gegenwart von ADP während und nach dem Umsatz von Pyruvat. (1 schwarz) Proteinspektrum (12 mg/ml) in 200 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6,0, 5 mM ThDP/MgCl₂), (2 rot) nach der Zugabe von 9 mM ADP, (3 grün) nach weiterer Zugabe von 30 mM Pyruvat und vollständiger Reduktion (30 min), (4 blau) Spektrum unmittelbar nach Pyruvatverbrauch und Enzymreoxidation (Unterschiede zu Spektrum 1 werden verursacht durch die Zeit für das Probenvorbereitung und die Spektrenaufnahme selbst), (5 grau) Spektrum 7 min nach der Reoxidation

ger Zeit zur Reduktion des gesamten FAD in der Küvette (Spektrum 3). Unmittelbar nach dem Verbrauch des Pyruvats und der Reoxidation des FAD zeigt dessen Spektrum trotz Anwesenheit von ADP die charakteristische Form der enzymgebundenen Spezies (Spektrum 4), die sich allerdings innerhalb kurzer Zeit wieder zur freien Form ändert (Spektrum 5). Erklärbar ist das folgendermaßen: ohne Substrat und in Anwesenheit von ADP ist nur ein Bruchteil des FAD an das Enzym gebunden (entsprechend den Dissoziationskonstanten für FAD und ADP). Bei Zugabe von Pyruvat wird das FAD reduziert und bindet dann als FADH₂ so fest, dass es von ADP nicht mehr verdrängt werden kann. Unter den gewählten Versuchsbedingungen (hohe Enzymkonzentration) ist die Diffusion des Sauerstoffs in die Lösung der limitierende Schritt; das Enzym wird darum vollständig reduziert. Unmittelbar nach dem Verbrauch des Pyruvats und der dann möglichen Reoxidation durch Sauerstoff ist das FAD immer noch an das Enzym gebunden und liefert daher ein entsprechendes Spektrum *trotz*

Gegenwart von ADP. Erst nach einigen Minuten ist das Gleichgewichtsverhältnis mit einem Hauptanteil an freiem FAD wieder eingestellt.

3.3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse für die POX-Variante V265A

In der POX-Variante V265A ist die FAD-Bindung beeinträchtigt. Der K_D -Wert liegt mit 13 μM ca. drei Größenordnungen über dem des Wildtyps. FAD wird durch Adennukleotide mit K_i -Werten um 3 mM aus der Proteinbindung verdrängt.

Das redoxinduzierte FTIR-Differenzspektrum für POX-V265A weicht deutlich vom Wildtyp ab, der charakteristische $\nu(\text{C}(10\text{a})=\text{N}(1))$ -Peak liegt um 4 cm^{-1} näher an der Position für den freien Kofaktor. Ein zusätzlicher Peak bei 1694 cm^{-1} kann einem Glutaminrest nahe der Bindungstasche des Isoalloxazinrings zugeordnet werden.

Die Kristallstruktur der Variante zeigt markante Flexibilität des Proteins im Bereich der FAD-Bindungstasche. Interpretierbare Elektronendichte fehlt für den Isoalloxazinring des Kofaktors und zwei Proteinloops, die beim Wildtyp mit diesem in Kontakt stehen. Die gefundene Flexibilität spricht dafür, dass der Kofaktor in der Variante sterisch weniger beansprucht ist, d.h. weniger stark von der planaren Form abweicht. Zumindest ein Teil der für den Wildtyp gefundenen IR-Peakverschiebung der $\nu(\text{C}(10\text{a})=\text{N}(1))$ -Bande ist also tatsächlich auf die geknickte Konformation des Kofaktors zurückzuführen.

Trotz der strukturellen Unterschiede der FAD-Bindung ist das Redoxpotential des Flavins in Variante und Wildtyp gleich. Die enzymatischen Eigenschaften von POX-V265A sind ebenfalls nur wenig beeinflusst. Der k_{cat} -Wert der Gesamtreaktion ist mit $15,5 \pm 1,3\text{ s}^{-1}$ genauso groß wie beim Wildtyp. Der Elektronentransferschritt der reduktiven Halbreaktion ist um den Faktor 3 verlangsamt, jedoch nach wie vor nicht geschwindigkeitsbestimmend. Bei unverändertem Redoxpotential des Flavins ist die Ursache vermutlich kinetischer Natur, etwa durch einen vergrößerten mittleren Abstand von ThDP und FAD oder eine Bewegung von am Elektronentransfer beteiligten Aminosäureseitenketten.

Die Ähnlichkeit der katalytischen Eigenschaften sowie die verbleibende $\nu(\text{C}(10\text{a})=\text{N}(1))$ -Peakverschiebung bei der Variante legen nahe, dass für beides die Deformation des Isoalloxazinringes nicht allein ausschlaggebend ist. Eine Residualelektronendichte in der Isoalloxazin-Bindungstasche der Variante deutet darauf hin, dass trotz seiner Beweglichkeit die vom Isoalloxazinring ausgehenden Wasser-

stoffbrückenbindungen erhalten bleiben und diese das unveränderte Redoxpotential und die verbleibenden IR-Peakverschiebungen erklären.

3.4 Enzymkinetische Untersuchung von Wildtyp-POX und POX-Varianten

3.4.1 Reaktionsintermediat-Analyse

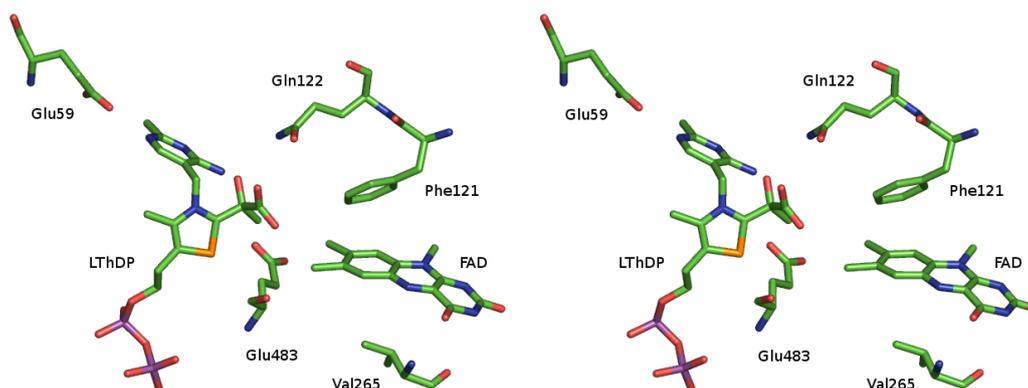


Abb. 3.31: Stereodarstellung des aktiven Zentrums von POX-WT. Die Struktur des Lactyl-Restes am ThDP wurde modelliert, die Atomkoordinaten des ThDP und der Aminosäurereste entsprechen dem PDB-Eintrag 1POX. Zur besseren Übersicht ist vom FAD nur der Isoalloxazinring dargestellt.

Die simultane Bestimmung der *steady-state*-Mengenverhältnisse aller Reaktionsintermediate durch NMR-Spektroskopie ermöglicht es auf sehr elegantem Weg, Aussagen über die Beteiligung einzelner Aminosäurereste an der Katalyse zu treffen. Dazu werden Enzymvarianten für die Analyse eingesetzt, in denen Aminosäurereste im aktiven Zentrum des Proteins ausgetauscht sind. Aus sich in den Proteinvarianten akkumulierenden Reaktionsintermediaten kann dann eine Aussage über die Beteiligung des ausgetauschten Restes für den jeweiligen Reaktionsschritt abgeleitet werden. Im Idealfall ergeben sich aus der quantitativen Verteilung der Intermediate mikroskopische Geschwindigkeitskonstanten für die Einzelschritte der Katalyse. In [59] wird das u.a. am Beispiel der Pyruvatdecarboxylase aus *Zymomonas mobilis* demonstriert (siehe 1.3 auf S. 22).

Für die vorliegende Arbeit sollten nun analoge Untersuchungen bei der Pyruvatoxidase aus *Lactobacillus plantarum* durchgeführt werden. In Abb. 3.31 sind die Reste im aktiven Zentrum von POX dargestellt, die dazu ausgetauscht wurden. Die Abbildung zeigt außerdem ein Modell des Lactyl-ThDP, wie es nach der Bindung von Pyruvat im aktiven Zentrum vorliegen könnte. Für die Modellierung des Lactyl-Restes musste nur ein in der Wildtyp-Struktur gebundenes Glycerol-Molekül entfernt werden,

Kollisionen mit Atomen des Proteins traten nicht auf. Das spricht für die sterische Plausibilität des Modells.

Insgesamt ist die Untersuchung der Reaktionsintermediatverteilung mittels NMR bei Pyruvatoxidase und ihren Varianten mit einem größeren Fehler als bei *ZmPDC* behaftet und erlaubt für dieses Enzym keine zuverlässige Aussage über die absolute Größe von Geschwindigkeitskonstanten der Einzelschritte. Dafür gibt es mehrere Gründe:

- Der NMR-Peak des ThDP-C6'-Protons wird von Signalen des FAD überlagert, sodass das Spektrum für die Peakintegration an dieser Stelle dekonvolviert werden muss. Damit vergrößert sich der Fehler bei der Bestimmung der Menge von ThDP.
- Damit gebundenes ThDP im aktiven Zentrum reaktiv ist, ist auch die gleichzeitige Bindung von FAD erforderlich [77]. Da jedoch überschüssiges FAD die Peakintegration stören würde, muss auf dessen Zugabe zum Reaktionsansatz verzichtet werden. Damit ist potentiell nicht reaktives ThDP in variablen Anteilen im aktiven Zentrum vorhanden, besonders bei Varianten mit verringerter FAD-Affinität (V265A).
- Im Gegensatz zu *ZmPDC* sind nicht alle im Reaktionszyklus von POX auftretenden Intermediate stabil unter den sauren Bedingungen, mit denen die Reaktion abgestoppt wird. Acetyl-ThDP unterliegt einer langsamen Hydrolyse, sodass anhand der bekannten Hydrolysegeschwindigkeit und der Zeit zwischen Reaktion und NMR-Messung die tatsächliche Menge an Acetyl-ThDP im *steady state* zurückextrapoliert werden muss. Das erhöht den Fehler dieser Intermediatkonzentration. Weiterhin wäre ein durch den nukleophilen Angriff von Phosphat auf Acetyl-ThDP gebildetes primäres tetrahedrales Intermediat nicht stabil und würde entweder unter Abspaltung von Phosphat zu Acetyl-ThDP oder unter Abspaltung von ThDP zu Acetyl-Phosphat zerfallen. In beiden Fällen wird die Aussagekraft der Methode über die betreffenden Reaktionsschritte eingeschränkt.
- Die für die Messungen benötigten hohen Enzymkonzentrationen bewegen sich bereits in der Größenordnung der für Sauerstoff maximal erreichbaren Konzentration von $\approx 211 \mu\text{M}$ bei Luftsättigung. Durch diese Sauerstoff-Substratlimitierung wird der *steady state* sehr kurzlebig, und es steigt die Gefahr,

dass sich mehr HEThDP akkumuliert, als für den *steady state* in verdünnten Lösungen der Fall wäre.

Zusammen mit der POX wurde auch die Phosphoketolase der Intermediatanalyse unterzogen. Dieses Enzym katalysiert mit der phosphorolytischen Spaltung des Acetyl-ThDP einen Schritt, der der Pyruvatoxidase analog ist (siehe Abb. 1.7). Da das native Substrat Xylulose-5-Phosphat nicht zur Verfügung stand, wurde diese Untersuchung mit Hydroxypyruvat vorgenommen. Die Aussagen über den Phosphorolyseschritt sollten aber auch für das native Substrat gültig sein, weil für beide Substrate die Reaktion ab der Bildung von Dihydroxyethyl-ThDP gleich verläuft. Zum Vergleich wurde außerdem Pyruvatoxidase mit Hydroxypyruvat an Stelle von Pyruvat umgesetzt und die Intermediatverteilung bestimmt.

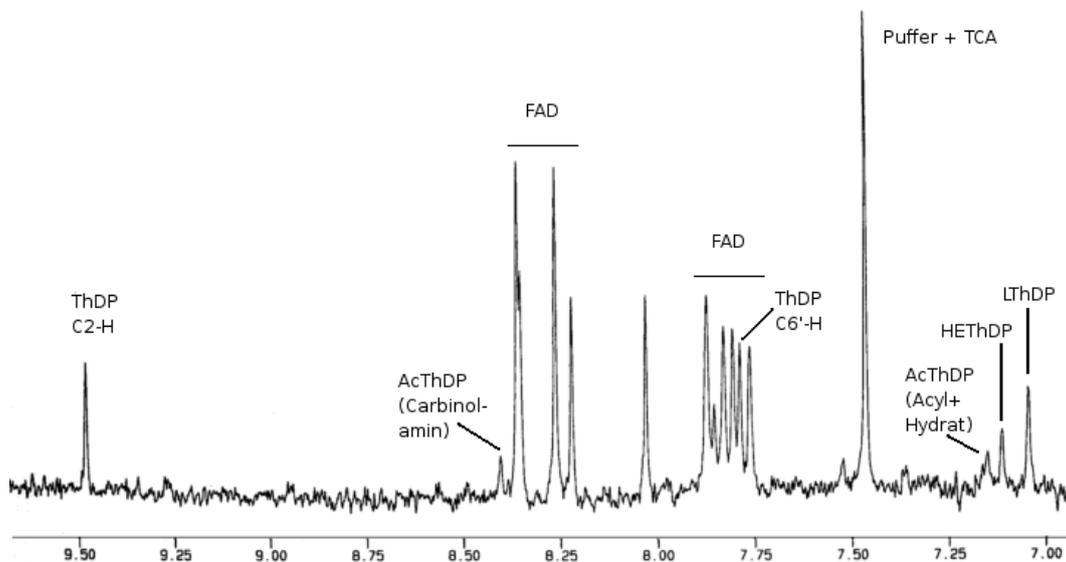


Abb. 3.32: ^1H -NMR-Spektrum der Reaktionsintermediate von POX-E483Q

Abb. 3.32 zeigt beispielhaft des ^1H -NMR-Spektrum der Reaktionsintermediate für die POX-Variante E483Q. Alle erwähnten Intermediate kommen in diesem Spektrum vor: freies ThDP, Lactyl-ThDP, Hydroxyethyl-ThDP und Acetyl-ThDP, wobei letzteres durch die Peaks der drei Spezies Keto-Form, Hydrat-Form und Carbinolamin (Abb. 3.33) repräsentiert wird.

Alle betrachteten POX-Varianten zeigen eine hohe Restaktivität von mindestens 1% des Wildtyps. Das ist ein auffallender Unterschied zur in [59] untersuchten Pyruvatdecarboxylase aus *Zymomonas mobilis*, wo Austausch an homologen Positionen zu Aktivitätsverlusten um mehr als drei Größenordnungen führen (*ZmPDC*(E473,

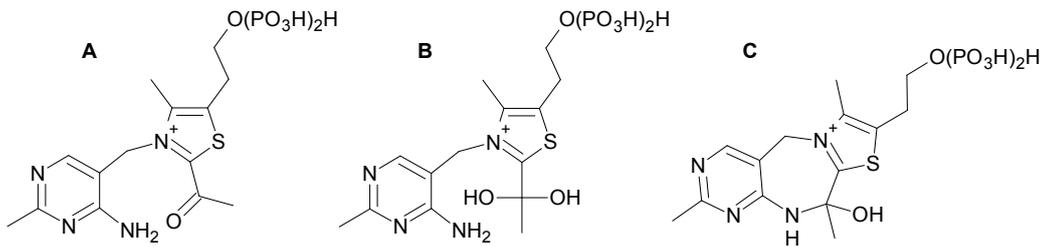


Abb. 3.33: Die drei Formen des Acetyl-ThDP: **A** Keto-Form, **B** Hydrat-Form, **C** Carbinolamin-Form

E50, H113) entsprechen POX(E483, E59, Q122)). Die geschwindigkeitsbestimmenden Schritte bei POX sind jedoch der Acetyltransfer auf das Phosphat-Ion und die Reoxidation des FADH₂; beide Reaktionen kommen bei *Zm*PDC nicht vor.

Tab. 3.8 fasst die erhaltenen Ergebnisse zusammen. Obwohl aus diesen Daten keine zuverlässigen kinetischen Konstanten für die Teilschritte der Katalyse berechnet werden können, lassen sich die folgenden Aussagen treffen:

1. Der Austausch von E59 behindert die initiale C–C-Bindungsknüpfung. Die K_m -Werte für Pyruvat sind bei den E59-Varianten deutlich erhöht (WT 0,5 mM, E59D 15 mM, E59Q 420 mM, E59A 295 mM). Damit sind die Enzyme unter den Reaktionsbedingungen für die ¹H-NMR-Intermediatanalyse (100 mM Pyruvat) zwar nicht vollständig substratgesättigt (E59D 87%, E59Q 20%, E59A 25%), trotzdem ist speziell für E59Q und E59A der Anteil an ThDP-C(2)-Addukten auffallend gering. Das spricht für die Existenz eines *docking site* für Pyruvat, wo dieses in einem vorgelagerten Gleichgewicht bindet, bevor das kovalente ThDP-Addukt entsteht.
2. Die kinetischen Auswirkungen des Austauschs E483Q sind sehr interessant. Der k_{cat} -Wert ist im Vergleich zum Wildtyp nur leicht verringert, die Intermediatverteilung ist jedoch völlig verändert. Zum einen ist wieder der höhere Anteil an freiem ThDP auffällig, obwohl der K_m -Wert für Pyruvat bei der Variante mit 0,5 mM so groß wie beim Wildtyp ist. Besonders aufschlussreich ist aber, dass für die Variante E483Q — anders als für den Wildtyp — in Gegenwart von Phosphat das Intermediat Acetyl-ThDP detektiert werden kann. Diese Variante zeigt folgerichtig auch in der Produktanalyse signifikante Mengen von Acetat neben dem eigentlichen Reaktionsprodukt Acetylphosphat (siehe unten 3.4.2.1

Tab. 3.8: *steady-state*-Intermediatverteilung verschiedener POX-Varianten. Wenn nicht anders angegeben verlief die Reaktion bei 25°C in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,0, 50 mM Natriumpyruvat.

Protein	k_{cat} (s ⁻¹)	detektierte Spezies in % Gesamt-ThDP				
		ThDP	LThDP	HEThDP	AcThDP	andere
POX-WT ¹	16 ²	15	70	15	0	0
POX-WT ¹ –Phosphat	0,03 ²	<5	0	20	>75	0
POX-WT ³ +Hydroxyruvat	15,7	33	0	0	0	HLThDP ⁶ 33 GThDP ⁷ 33
POX-E59A ⁴	0,2	>90	5	5	0	0
POX-E59Q ⁴	0,1	100	0	0	0	0
POX-E59D	2,0	50	25	25	0	0
POX-E483Q	9,0	30	30	10	30	0
POX-Q122E	1,0	70	10	10	10	0
POX-Q122A	2,2	15	75	0	10	0
POX-F121I	5,7	20	80	<5	0	0
POX-F121Y	6,7	50	50	<5	0	0
POX-V265A	15,5 ⁵	80	20	5	0	0
PK +Phosphat ⁵	n.b. ⁸	66	0	0	0	HLThDP ⁶ 33
PK –Phosphat ^{5, 9}	n.b. ⁸	<5	0	0	50	HLThDP ⁶ 50

¹Intermediatanteile geschätzt nach [59], ²nach [69]

³anstelle von Pyruvat 50 mM Hydroxyruvat, ⁴mit 100 mM Pyruvat

⁵separate Messung bei Kofaktorsättigung (siehe 3.3.1, S. 74 und 3.3.4, S. 86)

⁶Hydroxylactyl-ThDP (entspricht LThDP), ⁷Glycolyl-ThDP (entspricht AcThDP)

⁸nicht bestimmt, ⁹anstelle von Phosphatpuffer 50 mM MES-Puffer pH 6,0

auf S. 99). Der Aminosäurerest E483 scheint also für eine effiziente Phosphorolyse essentiell zu sein.

Im Unterschied zu *ZmpDC*, wo der Austausch E473D zu einer starken Akkumulation von Lactyl-ThDP führt, ist dieses Intermediat bei der POX-Variante E483Q nicht signifikant stärker als beim Wildtyp populiert. Die Funktionen dieser beiden Reste, obwohl an ähnlicher Stelle des aktiven Zentrums, sind also nicht identisch.

3. Auch für die Varianten Q122A und Q122E wird Acetyl-ThDP gefunden, d.h. auch der Rest Q122 ist in die Phosphorolyse involviert. Auffallend ist weiter-

hin, dass der Austausch Q122A auch die Decarboxylierung behindert, da für diese Variante kein Hydroxyethyl-ThDP mehr detektiert wird. Evtl. ist Q122 an der korrekten Orientierung des Lactyl-ThDP beteiligt, da CO₂ nur abgespalten werden kann, wenn die Carboxylatgruppe senkrecht zur Thiazolium-Ringebene orientiert ist (vgl. Abb. 3.31). Für den Austausch Q122E scheint wegen des hohen Anteils von freiem ThDP der limitierende Katalyseschritt die Substratbindung zu sein, womöglich aufgrund der elektrostatischen Abstoßung der Carboxylatgruppen von E122 und Pyruvat.

4. Die Varianten F121I und F121Y (K_m für Pyruvat: F121I \approx 1 mM, F121Y 18 mM) zeigen ein etwas größeres Verhältnis von Lactyl-ThDP zu Hydroxyethyl-ThDP als der Wildtyp, scheinen also in der Decarboxylierung behindert zu sein, obwohl der ausgetauschte Aminosäure-Rest für eine direkte Wechselwirkung mit der Carboxylatgruppe zu weit entfernt ist (6.8 Å zum C(2) des ThDP). Die Tatsache, dass sich kein Hydroxyethyl-ThDP akkumuliert, spricht außerdem gegen eine Beteiligung von F121 am Elektronentransfer vom HETHDP- α -Carbanion/Enamin zum Flavin.
5. Die Variante V265A zeigt viel freies ThDP, verursacht durch nicht vollständig mit FAD gesättigtes Enzym. Überschüssiges FAD stört die Messungen und wurde daher beim Umpuffern zur Herstellung der Probe weggelassen. Die schlechtere FAD-Bindung im Vergleich zum Wildtyp führt dann zu aktiven Zentren, in denen FAD fehlt und in denen dadurch auch das gebundene ThDP nicht reaktiv ist [77]. Davon abgesehen ist das Verhältnis von Lactyl-ThDP zu Hydroxyethyl-ThDP mit 4:1 das gleiche wie beim Wildtyp. Dieses Ergebnis unterstreicht die Ähnlichkeit von Wildtyp-POX und Variante V265A, die auch aus den kinetischen Messungen mittels *stopped flow* erhalten wurde (Abschnitt 3.3.1).
6. Der Umsatz von *Hydroxypyruvat* durch Wildtyp-POX zeigt ein überraschendes Resultat: es wird trotz der Gegenwart von Phosphat Glycolyl-ThDP akkumuliert. Für Pyruvat konnte jedoch das der gleichen Oxidationsstufe entsprechende Acetyl-ThDP nicht nachgewiesen werden. Weiterhin wird für die Reaktion mit Hydroxypyruvat kein Dihydroxyethyl-ThDP gefunden, während das analoge Hydroxyethyl-ThDP beim Umsatz mit Pyruvat zu 20% vorliegt. Beides deutet darauf hin, dass der Elektronentransfer vom Dihydroxyethyl-ThDP schneller und evtl. von der Anwesenheit von Phosphat unabhängig verläuft. Zur Klärung dieser Frage sind detaillierte kinetische Untersuchungen nötig. Weiterhin

steht noch eine Antwort auf die Frage aus, ob das POX-Reaktionsprodukt mit Hydroxypyruvat Glycolat (analog zu Acetat) oder Glycolylphosphat (analog zu Acetylphosphat) ist. Das im Vergleich zu Pyruvat unterschiedliche Reaktionsverhalten mit Hydroxypyruvat unterstreicht, dass nicht allein Aminosäurereste des Enzyms die Reaktivität beeinflussen, sondern dass auch auf den ersten Blick für beide Substrate völlig analoge Schritte wie Elektronentransfer und Phosphorolyse subtil von den Eigenschaften des Substrates abhängen. Diese Substrateffekte sind für POX noch weitgehend unerforscht.

7. Das Enzym Phosphoketolase hat mit POX den Acetyltransfer auf Phosphat gemein. Acetyl-ThDP entsteht dabei auf verschiedenen Wegen: bei POX durch Elektronentransfer vom C_α -Carbanion/Enamin des Hydroxyethyl-ThDP auf das FAD, bei PK durch Wasserabspaltung vom C_β des Dihydroxyethyl-ThDP (vgl. Abb. 1.6 und 1.7) Für POX wird in der Intermediatanalyse jedoch kein Acetyl-ThDP in Gegenwart von Phosphat nachgewiesen, woraus folgt, dass der Elektronentransfer vom Hydroxyethyl-ThDP zum FAD mit dem nukleophilen Angriff des Phosphats gekoppelt ist und Acetyl-ThDP als fassbares Intermediat gar nicht durchlaufen wird. Die Reaktion entspräche damit formal der nukleophilen Substitution eines Elektronenpaares mit Phosphat.¹

Eine analoge Situation zeigt sich nun bei der Intermediatanalyse von PK: in Gegenwart von Phosphat wird kein Acetyl-ThDP gefunden. Vielmehr scheint auch hier der Angriff des Phosphats synchron mit der Wasserabspaltung zu verlaufen. Erst wenn das Phosphat im Reaktionsansatz fehlt, ist Acetyl-ThDP detektierbar. Physiologisch ist die Vermeidung des Acetyl-ThDP als Intermediat für beide Enzyme sinnvoll: auf diese Weise wird verhindert, dass Wasser statt Phosphat am Acetyl-ThDP angreifen kann und als Endprodukt energiereiches Acetat anstelle von energiereichem Acetylphosphat entsteht.

¹Es könnte eingewandt werden, dass Acetyl-ThDP zwar entsteht, der Angriff von Phosphat jedoch so schnell erfolgt, dass die *steady-state*-Konzentration zu niedrig für die Detektion ist. Diese Möglichkeit wird durch den Befund aus [69] widerlegt, dass nach Akkumulation von Acetyl-ThDP (durch die Reaktion von POX mit Pyruvat *ohne* Phosphat) bei der anschließenden Zugabe von Phosphat die Übertragung des Acetylrestes *langsamer* verläuft, als wenn das Phosphat schon von Anfang an im Ansatz vorhanden ist. Die einfachste Erklärung dafür ist, dass der Angriff des Phosphates auf zwei verschiedenen Stufen erfolgt, z.B. einmal am C_α -Carbanion/Enamin des Hydroxyethyl-ThDP, zum anderen am Acetylphosphat.

3.4.2 Die Abspaltung des oxidierten Reaktionsproduktes

3.4.2.1 Phosphorolyse vs. Hydrolyse

Die phosphorolytische Bildung von Acetylphosphat ist eine Besonderheit der POX und vom chemischen Standpunkt aus zwei Gründen interessant:

- Nur in wenigen biologischen Phosphoryltransfer-Reaktionen tritt des Phosphat-Ion als Nukleophil auf. Insbesondere konnte Lienhard zeigen, dass das Hydrogenphosphat-Ion HPO_4^{2-} (aber nicht das Dihydrogenphosphat-Ion H_2PO_4^-) in der Lage ist, an den Carbonylkohlenstoff von 2-Acetyl-3,4-Dimethylthiazolium zu addieren [72], jedoch zerfiel das Addukt nicht zu Acetylphosphat, sondern in die Ausgangsverbindungen. Gruys *et al.* kamen bei Untersuchungen mit Acetyl-ThDP zum analogen Ergebnis, dass die Acetylgruppe nicht auf Phosphat übertragen wird [73].
- Vom thermodynamischen Standpunkt aus sollte die Hydrolyse des Acetyl-ThDP aufgrund des energiearmen Reaktionsproduktes Acetat bevorzugt sein, zumal Wasser im Reaktionsmilieu in viel höherer Konzentration vorliegt.

Dem Proteinanteil des Enzyms kommt also eine entscheidende Rolle für die Substratspezifität zu. Es sollten also für verschiedene Enzymvarianten die Produkte der Reaktion in Phosphatpuffer untersucht werden. Schon in [69] wird spekuliert, dass dem Rest E483 eine besondere Bedeutung zukommt. Durch Deprotonierung könnte dieses Glutamat das bei pH 6 dominierende H_2PO_4^- in das bessere Nukleophil HPO_4^{2-} überführen. Abb. 3.27 auf S. 85 verdeutlicht die räumliche Nähe von E483 und der potentiellen Phosphat-Bindungsstelle. Tatsächlich ergibt die Intermediatanalyse für die POX-Variante E483Q, dass im *steady state* Acetyl-ThDP akkumuliert wird.

Auch die Produkte der drei E59-Varianten wurden analysiert, da sie in vorausgegangenen kinetischen Untersuchungen eine überraschende Phosphatabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit zeigten, die in Abb. 3.34 dargestellt ist.

Während also ohne Phosphat der Wildtyp kaum messbare Aktivität zeigt, sind alle vier Varianten in unterschiedlichem Maße aktiv. Auffallend sind dabei die Varianten E59A und E59Q. E59A ist ohne Phosphat am aktivsten, E59Q hat ohne Phosphat 50% der Maximalaktivität und durchläuft bei 8 mM ein ausgeprägtes Maximum. Eine mechanistische Deutung ist schwierig; möglicherweise führt die schlechtere Pyruvatbindung bei diesen Varianten dazu, dass das Anion Phosphat mit Pyruvat kompetieren

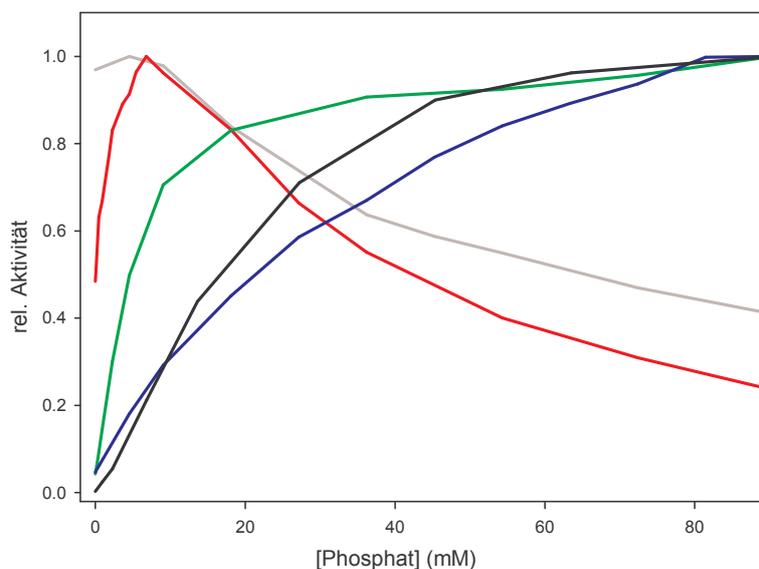


Abb. 3.34: Aktivität verschiedener POX-Varianten in Abhängigkeit von der Phosphatkonzentration (schwarz WT, blau E483Q, grün E59D, rot E59Q, grau E59A) im DCPIP-Test. Messbedingungen: 0–100 mM Kaliumphosphat pH 6 (konstante Ionenstärke eingestellt mit 200 mM MES pH 6), 100 mM Natriumpyruvat, 100 μ M DCPIP. Die Aktivitäten sind für jedes Protein auf das Maximum der Reaktionsgeschwindigkeit normiert.

kann. Das Verhalten der E59-Varianten ist besonders insofern bemerkenswert, als die ausgetauschte Aminosäure E59 *keinen* direkten Kontakt zum Substrat hat. In Analogie zur Protonenrelais-Funktion des ThDP-Pyrimidinrings bei der Aktivierung des Kofaktors (Abb. 1.4) kann man also eine ähnliche mittelbare Funktion von E59 für die Phosphorolyse postulieren. Damit wäre also die Aminogruppe des Pyrimidinrings in die Phosphorolyse involviert.

Tab. 3.9 fasst die Ergebnisse der NMR-Produktanalyse der besprochenen Varianten zusammen. Tatsächlich verursachen alle Austauschungen eine Verringerung der Phosphatspezifität mit einem erhöhten Anteil an Acetat. Für Wildtyp, E59D und besonders E483Q ist die Präferenz für Phosphat allerdings nicht so stark ausgeprägt, wie dies aus der Phosphatabhängigkeit der Kinetik (Abb. 3.34) zu erwarten wäre.

Dieses überraschende Ergebnis deutet darauf hin, dass auch die Hydrolyse erleichtert wird, wenn Phosphat anwesend ist. Der Mechanismus für dieses Verhalten ist aber noch unklar. Die Hydrolyse von Acetyl-ThDP ist spezifisch basenkatalysiert [75]. Möglicherweise kann Phosphat, wenn es bindet wie in Abb. 3.27 dargestellt, als Base das Proton eines Wassermoleküls abstrahieren und so den Angriff eines Hydroxid-Ions erleichtern. Für eine direkte Deprotonierung eines Wassermoleküls durch E483

Tab. 3.9: Das Verhältnis von gebildetem Acetylphosphat zu Acetat für verschiedene POX-Varianten. Messbedingungen: 100 mM MES, 50 mM Kaliumphosphat pH 6, 50 mM $K_3[Fe(CN)_6]$, 10 mM Pyruvat.

Protein	$\frac{[\text{Acetylphosphat}]}{[\text{Acetat}]}$
POX-WT	5,3
POX-E59D	3,3
POX-E59Q	2,4
POX-E59A	1,1
POX-E483Q	1,5

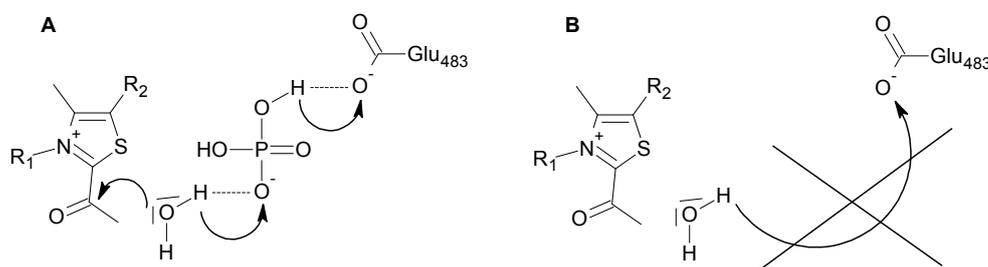


Abb. 3.35: Möglicher Mechanismus für die erleichterte Hydrolyse von Acetyl-ThDP: **A** in Gegenwart von Phosphat wird die Bildung eines Hydroxid-Ions erleichtert, **B** in Abwesenheit von Phosphat ist der Abstand zu E483 zu groß.

ohne Phosphat als Vermittler ist dagegen der Abstand zum C_α -Kohlenstoff des ThDP-Adduktes zu groß. (Abb. 3.35, gezeigt ist der Angriff am Acetyl-ThDP; möglicherweise greift Phosphat aber auch schon vor der Übertragung des zweiten Elektrons an (s. Abschnitt 3.4.2.2), also auf der Stufe des Hydroxyethyl-ThDP-Radikals. Die phosphatvermittelte Hydrolyse könnte sich trotzdem analog zur Abbildung abspielen.)

Die Produktanalyse liefert allerdings noch keine Erklärung für den Befund, dass auch der Aminosäurerest E59 — möglicherweise vermittelt durch die Aminogruppe des ThDP-Pyrimidinrings — in den Produktabspaltungsschritt involviert ist. Leider sind die Konzentrationen der ThDP-Addukte bei der Intermediatanalyse der E59-Varianten insgesamt zu gering um eine Aussage darüber zuzulassen, ob evtl. für diese Varianten Acetyl-ThDP populierte wird.

Die hochaufgelöste Kristallstruktur von POX im Komplex mit Acetyl-ThDP wäre zur Klärung dieser Fragen hilfreich. Dazu könnte beispielsweise ein POX-Kristall in phosphatfreiem Puffer mit Pyruvat und einem artifiziellen Elektronenakzeptor getränkt werden, wobei letzterer die Rolle des anderenfalls limitierenden Sauerstoffs übernimmt.

Mit einer solchen Struktur könnte untersucht werden, ob die Carbinolamin-Form des Acetyl-ThDP — und damit die Pyrimidin-Aminogruppe — am Mechanismus direkt beteiligt ist (Abb. 3.33). Enzymgebundenes ThDP liegt in der V-Konformation vor, die nur eine minimale Bewegung der beiden Ringe gegeneinander erfordern würde, um das tricyclische Carbinolamin zu akkomodieren. In [105] wird in der Kristallstruktur der Acetolactatsynthase aus *Klebsiella pneumoniae* ein tricyclisches ThDP-Intermediat im aktiven Zentrum gefunden. Dort betrifft es zwar einen anderen Reaktionsmechanismus, aber es zeigt zumindest, dass derartige Spezies im aktiven Zentrum sterisch möglich sind.

Sehr aufschlußreich wäre auch die Bestimmung der Kristallstruktur der Pyruvat-oxidase aus *E. coli*, da dieses Enzym ebenfalls Pyruvat oxidativ decarboxyliert, jedoch selbst in Gegenwart von Phosphat nur Acetat bildet [106]. Ein vom SWISS-Modellserver [107] vorhergesagtes Strukturmodell des Enzyms zeigt die große Ähnlichkeit der aktiven Zentren von POX und *Ec*POX. Insbesondere gibt es auch einen zum E483 der POX homologen Glutamatrest (E469), sodass die ausschließliche Hydrolyse bei diesem Enzym besonders überrascht (Abb. 3.36). Einziger Unterschied ist ein Aspartatrest (D27) bei *Ec*POX an der zu G35 der POX homologen Position. Damit ist *Ec*POX an dieser Stelle identisch mit der *Zm*PDC (vgl. Abb. 1.5 auf S. 24).

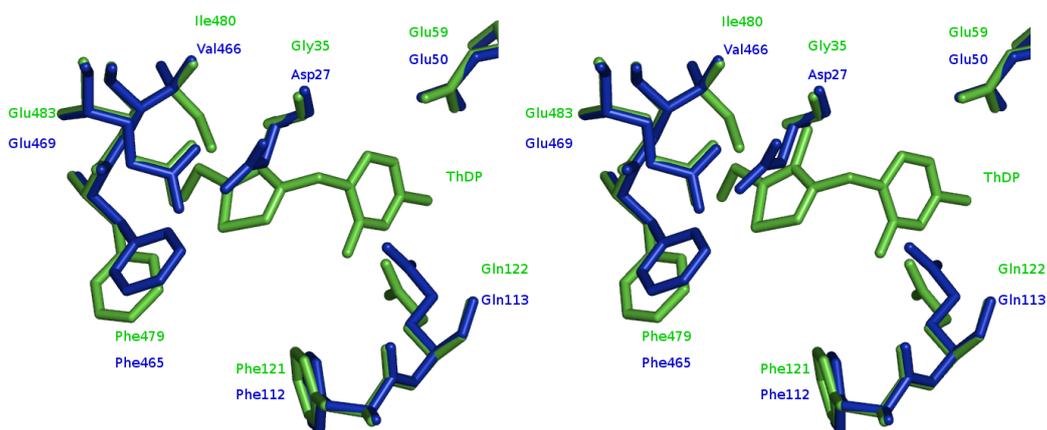


Abb. 3.36: Stereodarstellung der aktiven Zentren von POX (grün) und *Ec*POX (blau) in der Umgebung des ThDP. Beim Kofaktor ThDP ist zur besseren Übersicht der Pyrophosphatrest weggelassen. Die Abbildung basiert auf den PDB-Einträgen 1POX (POX) und einem vom SWISS-Modellserver generierten Homologiemodell der *Ec*POX-Struktur.

3.4.2.2 Nichtnative Substrate für den Phosphorolyseschritt bei Wildtyp-POX

Eine Besonderheit des Reaktionsmechanismus der POX ist, dass in Gegenwart von Phosphat kein intermediäres Flavinradikal, d.h. keine Zweiphasigkeit der Flavinreduktion beobachtet wird, während das ohne Phosphat, etwa in MES-Puffer, der Fall ist. Daraus leitet sich die schon erwähnte Feststellung ab, dass Phosphat auch für den effektiven Elektronentransfer eine Rolle spielt [68]. In Abb. 3.37 ist das gezeigt.

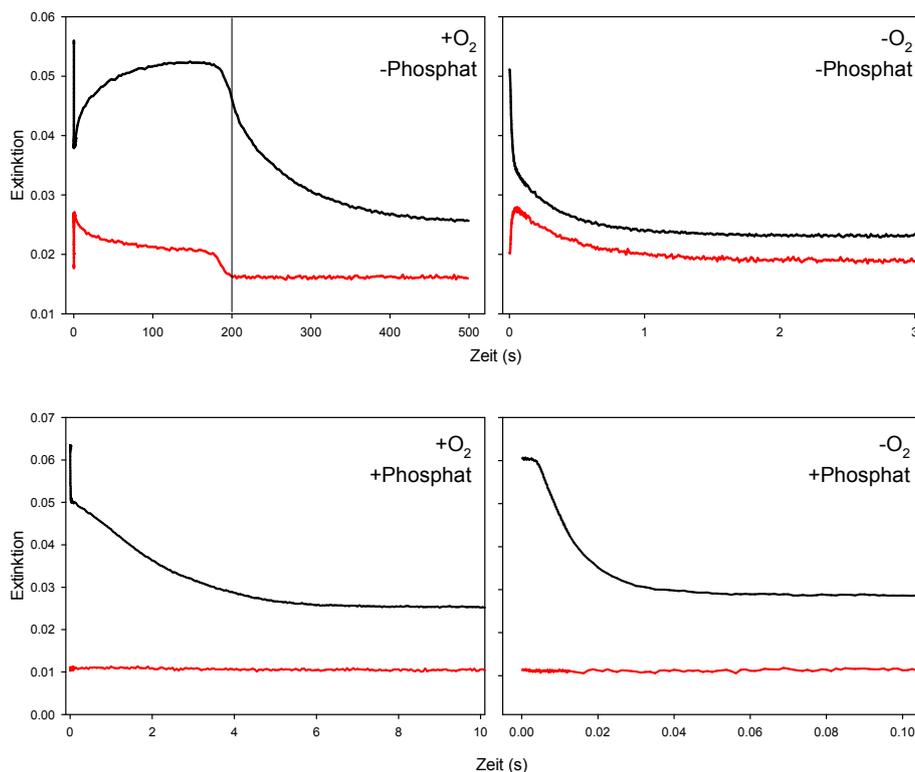


Abb. 3.37: Extinktions-Zeit-Kurven aus *stopped-flow*-Messungen der Reaktion von Wildtyp-POX (0,18 mg/ml) mit 50 mM Pyruvat in 200 mM MES (**oben**) bzw. 100 mM Phosphatpuffer (**unten**), pH 6, 25°C. Beobachtung bei zwei Wellenlängen (schwarz: 457 nm=ox. FAD, rot: 600 nm=FAD-Semichinon-Radikal) bei ansonsten gleichem Setup, jeweils **links** bei luftgesättigten Startbedingungen, **rechts** anaerob. Deutlich erkennbar ist die Zweiphasigkeit des Elektronentransfers im Feld rechts oben. Doppelt-exponentielle Anpassung liefert Geschwindigkeitskonstanten der zwei Phasen von ca. 67 s^{-1} und $2,7\text{ s}^{-1}$. Mit Phosphat (rechts unten) ergibt sich ein einfacher exponentieller Abfall mit einer Geschwindigkeitskonstante von 95 s^{-1} .¹

Die Zweiphasigkeit des Elektronentransfers ist für phosphatfreien Puffer unter anaeroben Bedingungen deutlich zu erkennen, ebenso kann für die Messung ohne Phos-

¹Es sei darauf hingewiesen, dass bei „+O₂-Phosphat“ das Radikal deutlich früher verschwindet, als das FAD vollständig reduziert ist. Evtl. spielt hier das während der Reaktion entstandene H₂O₂ eine Rolle als alternatives Oxidationsmittel.

phat die Populierung einer Flavin-Semichinon-Spezies bei 600 nm nachgewiesen werden.

Bereits in den ersten Untersuchungen zur POX wurde gezeigt, dass das Enzym auch das strukturell und chemisch verwandte Arsenat anstelle von Phosphat akzeptiert [1]. Diese Arsenolyse läuft mit einem Drittel der Geschwindigkeit der Phosphorolyse ab (13 s^{-1} statt 36 s^{-1}), der Mechanismus ist aber der gleiche [68] und weist ebenfalls keine Flavin-Radikale auf.

Für die vorliegende Arbeit wurden diese Untersuchungen ausgedehnt: Gibt es andere Nukleophile, die den Acetylrest vom Enzym übernehmen können? Ist die Fähigkeit, den Elektronentransfer zu beschleunigen, immer an den nukleophilen Charakter geknüpft, oder gibt es Substanzen, die zwar die Zweiphasigkeit des Elektronentransfers (und damit die Bildung des Flavinradikals) verhindern, jedoch nicht acetyliert werden können?

Zu diesem Zweck wurden *stopped-flow*-Messungen der Reaktionskinetik durchgeführt: Pyruvatoxidase wurde mit Pyruvatlösung gemischt und die Flavinextinktion bei 457 nm verfolgt. Anstelle von Phosphat kamen dabei eine Reihe anderer Substanzen als potentielle Acetyl-Akzeptoren zum Einsatz. Bei Luftsättigung, also Sauerstoffgegenwart, kann so die Gesamtreaktionsgeschwindigkeit bestimmt werden, während man unter anaeroben Bedingungen nur die reduktive Halbreaktion beobachtet (vgl. [69]). Die Ergebnisse dieser Messungen sind in den Abb. 3.38 und 3.39 dargestellt.

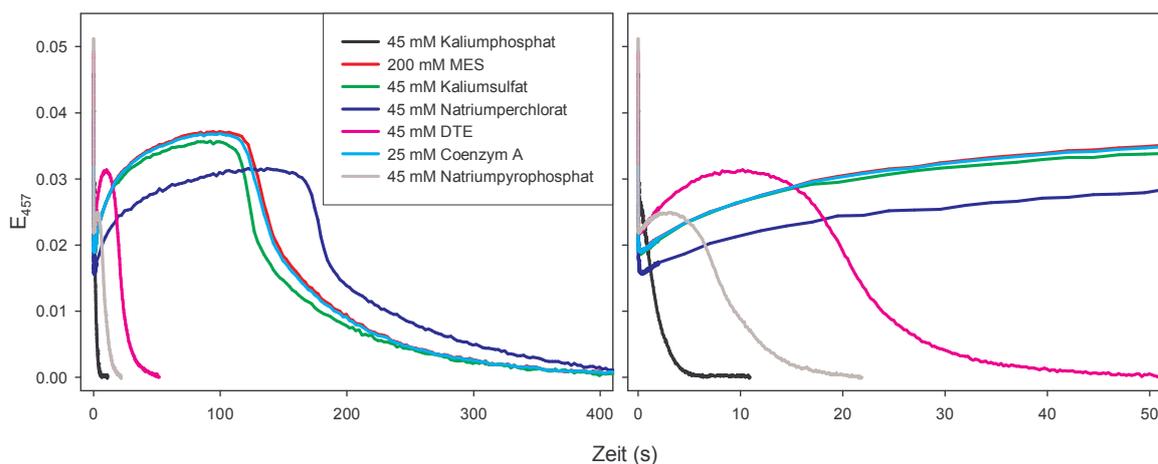


Abb. 3.38: Extinktions-Zeit-Kurven aus *stopped-flow*-Messungen für die Reaktion von Wildtyp-POX (0,3 mg/ml) mit 50 mM Pyruvat unter aeroben Bedingungen. Alle Messungen in 200 mM MES, pH 6, 25°C, unter Zusatz verschiedener Additive. Die Ausgangslösungen sind luftgesättigt ($[\text{O}_2]=211 \mu\text{M}$). **Rechts** ein vergrößerter Ausschnitt.

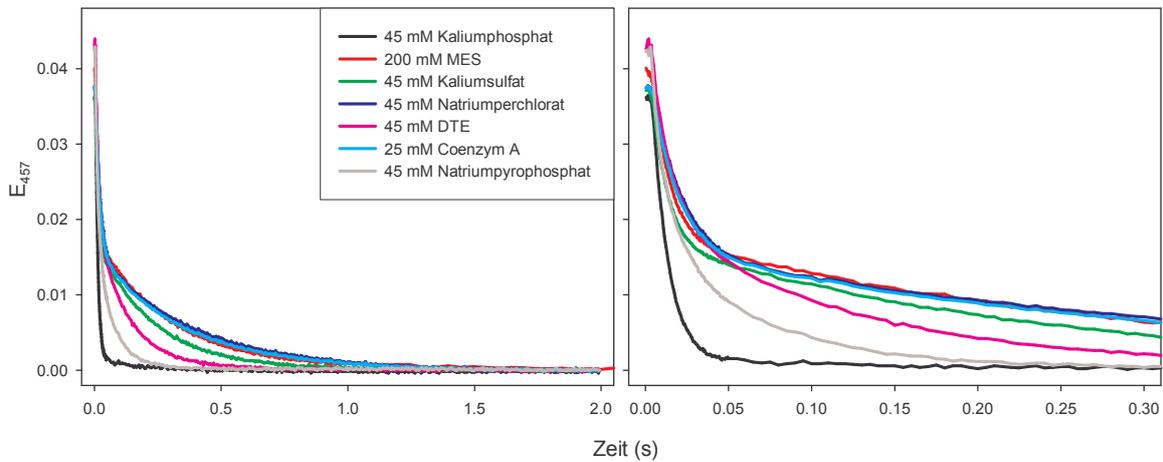


Abb. 3.39: Extinktions-Zeit-Kurven aus *stopped-flow*-Messungen für die Reaktion von Wildtyp-POX (0,3 mg/ml) mit 50 mM Pyruvat unter anaeroben Bedingungen. Alle Messungen in 200 mM MES, pH 6, 25°C unter Zusatz verschiedener Additive. **Rechts** ein vergrößerter Ausschnitt.

Wie sich zeigt, sind außer Phosphat auch Pyrophosphat und Dithioerythritol (DTE) in der Lage, die Reaktion im Vergleich zu MES-Puffer zu beschleunigen (Abb. 3.38). Der Effekt von Pyrophosphat ist dabei wahrscheinlich signifikant und nicht auf eine Verunreinigung mit Phosphat zurückzuführen, da laut verwendetem Reinheitsgrad höchstens 80 μM Phosphat vorliegen, der K_m -Wert bei POX jedoch bei 2 mM liegt. Welches Produkt gebildet wird, wurde nicht untersucht. Denkbar ist neben Acetyl-Pyrophosphat auch Acetylphosphat. Dass auch DTE als Substrat fungiert, ist überraschend, da keine chemische Ähnlichkeit zum Phosphat besteht. Thiole sind aber gute Nukleophile und Thioester als energiereiche Metabolite im Stoffwechsel weit verbreitet. Daher wurde als weiteres potentiell Substrat auch Coenzym A, ein physiologisches Thiol, untersucht. Hier zeigte sich aber kein Unterschied zum MES-Puffer. Vermutlich ist Coenzym A sterisch zu anspruchsvoll für einen Angriff. Als Produkte der Reaktion mit DTE erscheinen Acetyl-DTE oder Diacetyl-DTE plausibel, allerdings lieferte der Versuch der Identifikation mittels MALDI-Massenspektroskopie keine eindeutige Aussage.

Erwartungsgemäß zeigen die aeroben Umsatzkinetiken in Abb. 3.38 auch, dass Sulfat und Perchlorat keine Substrate der POX-Reaktion sind. Während die Kurve für Sulfat mit der für MES-Puffer allein identisch ist, hat Perchlorat einen leicht inhibierenden Einfluss. Dieser ist vermutlich auf den stark chaotropen Charakter dieses Ions zurückzuführen, der das Enzym destabilisiert.

Die anaeroben Kinetiken, also die der reduktiven Halbreaktion allein, sind in Abb. 3.39 dargestellt. Das Hauptergebnis ist hier, dass nur *die* Substrate den Elektronentransfer beschleunigen, die auch als Acetylakzeptor fungieren (Phosphat, Pyrophosphat, DTE). Das ist nicht selbstverständlich. Es wäre z.B. denkbar, dass Sulfat oder Perchlorat als schlechte Nukleophile zwar den Acetylrest nicht übernehmen können, wegen ihrer strukturellen Ähnlichkeit zum Phosphat ($\text{SO}_4^{2-} \approx \text{HPO}_4^{2-}$, $\text{ClO}_4^- \approx \text{H}_2\text{PO}_4^-$) aber die Populierung des Flavinradikals verhindern, indem sie den Transfer des zweiten Elektrons erleichtern. Das ist jedoch nicht der Fall, wie aus der Zweiphasigkeit der Progresskurven abzulesen ist. Die erste Phase ist für alle Phosphat-Analogen ungefähr gleich schnell, während nur Pyrophosphat und (in geringerem Maße) DTE in der Lage sind, den Transfer des zweiten Elektrons zu beschleunigen. Insbesondere die ähnlichen Geschwindigkeiten für die erste Phase führen zur Vermutung, dass im Reaktionszyklus von POX das erste Elektron des Hydroxyethyl-ThDP-Carbanions unabhängig von der Anwesenheit eines Acetylakzeptors übertragen wird und Phosphat oder entsprechende Analoge erst im Anschluss an die entstandene radikalische Zwischenstufe angreifen. Für eine genauere Aussage müssen hier jedoch Konzentrationsabhängigkeiten bis zur Substratsättigung untersucht und die Populierung des Radikals spektroskopisch verfolgt werden.

3.4.3 Zusammenfassung der kinetischen Untersuchungen von POX-Wildtyp und Varianten

Alle untersuchten Variante zeigen signifikante Restaktivitäten (mind. 1% des Wildtyps). Die Intermediatanalyse und die Untersuchung zur Substratspezifität des Phosphorolyseschrittes lassen für einzelne Aminosäurereste im aktiven Zentrum von POX die folgenden Schlüsse zu.

- Glutamat E59 ist in die Pyruvatbindung und überraschenderweise auch in die Phosphorolyse involviert. Die Austausch E59D, E59Q und E59A führen zu einem erhöhten Anteil von Acetat neben Acetylphosphat bei den Reaktionsprodukten. Der Mechanismus, über den E59 in den Phosphorolyseschritt involviert ist, ist noch unklar, eine Funktion des ThDP-Aminopyrimidinrings ist plausibel.
- Glutamat E483 ist ebenfalls notwendig für eine effiziente Phosphorolyse. Der Austausch E483Q erhöht den Anteil von Acetat bei den Reaktionsprodukten (bei nur wenig verringertem k_{cat}) und führt dazu, daß im Gegensatz zum Wildtyp bei den Reaktionsintermediaten das Acetyl-ThDP auftritt.

- Glutamin Q122 trägt zur effizienten Decarboxylierung und auch zur Phosphorolyse bei. Der Austausch Q122A führt zur Akkumulation von Lactyl-ThDP, Q122E von freiem ThDP. Für beide Varianten wird auch Acetyl-ThDP gefunden.
- Die Austausche von Phenylalanin F121 (F121I, F121Y) zeigen als auffälligstes Ergebnis ein größeres Verhältnis von Lactyl-ThDP zu Hydroxyethyl-ThDP als der Wildtyp. Das spricht für eine Behinderung der Decarboxylierung und gegen eine Funktion dieses Restes beim Elektronentransfer zum FAD.

Auch für Spezies mit niedrigem K_m für Pyruvat (Wildtyp, E483Q, F121I) tritt bei den Intermediaten freies ThDP auf. Dies ist wäre dann zu erwarten, wenn Pyruvat in einem vorgelagerten Gleichgewicht am Enzym bindet, bevor es kovalent ans ThDP addiert.

Der Umsatz von POX-Wildtyp mit Hydroxypyruvat deutet darauf hin, dass auch die Struktur des Substrates die Effizienz von Phosphorolyse und Elektronentransfer beeinflusst: es tritt kein Dihydroxyethyl-ThDP auf, dafür wird Glycolyl-ThDP gefunden. Damit wäre der Elektronentransfer gegenüber Pyruvat beschleunigt und evtl. von der Phosphatanwesenheit unabhängig.

Die für POX beobachtete Kopplung zwischen Phosphorolyse des Acetyl-ThDP und dem vorgelagerten Reaktionsschritt (hier Elektronentransfer) wird auch für Phosphoketolase gefunden. Für dieses Enzym ist die Übertragung des Acetylrestes auf Phosphat mit der Abspaltung der C_β -Hydroxylgruppe des Dihydroxyethyl-ThDP verknüpft.

Kinetische Untersuchungen der Wildtyp-POX mit Phosphat-„Analogen“ ergeben, dass eine strukturelle Ähnlichkeit mit Phosphat (SO_4^{2-} und ClO_4^-) nicht ausreicht, um wie dieses den Transfer des zweiten Elektrons vom Hydroxyethyl-ThDP-Carbanion/Enamin zum FAD zu beschleunigen. Stattdessen sind dazu aber andere Nukleophile (DTE) in der Lage, die gleichzeitig als Acetylakzeptor dienen. Dieser Befund belegt die chemische Kopplung von Elektronentransfer und Phosphorolyse und lässt vermuten, dass Phosphat auf der Stufe des Hydroxyethyl-ThDP-Radikals angreift, also nachdem das erste Elektron zum FAD übertragen wurde. Es entsteht damit bei POX eine ähnliche Situation wie bei Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase, wo die Gegenwart des Acetyl-Akzeptors CoA (bei POX Phosphat) den Zerfall des HETHDP-Radikals beschleunigt [108].

Die Frage bleibt bestehen, warum nicht auch Wasser oder Hydroxid-Ionen eine ähnliche gekoppelte Reaktion ausführen können. Immerhin wird freies Acetyl-ThDP von

Wasser effizient hydrolysiert, von Phosphat aber nicht angegriffen. Eine Antwort auf diese Frage hängt entscheidend von der Reaktivität des Hydroxyethyl-ThDP-Radikals gegenüber verschiedenen Nucleophilen ab ($\text{H}_2\text{O}/\text{OH}^-$, Phosphat, Thiole). Aufgrund der Instabilität der beteiligten Spezies existieren dazu aber noch keine systematischen Studien an Modellsystemen.

4 Zusammenfassung

4.1 Ergebnisse

In der vorgelegten Arbeit werden Ergebnisse IR-spektroskopischer, kristallographischer und enzymkinetischer Untersuchungen an Pyruvatoxidase aus *Lactobacillus plantarum* vorgestellt.

Grundvoraussetzung war ein effizientes Protokoll zur Enzympräparation von POX-Wildtyp und -Varianten, das etabliert werden konnte. Auch für die Präparation von Phosphoketolase aus *Lactobacillus pentosus* wurde ein Reinigungsverfahren erstellt, so dass dieses Enzym ebenfalls für kinetische Messungen zur Verfügung stand.

Die vorgelegte Arbeit beschreibt die ersten Untersuchungen von Flavoproteinen mittels redox-induzierter FTIR-Differenzspektroskopie. Das redox-induzierte FTIR-Differenzspektrum von freiem FAD in wässriger Lösung ist dabei der Ausgangspunkt für die Interpretation der Enzymspektren.

Die Zuordnung von Banden des FAD-Spektrums zu Schwingungsmoden erfolgte dabei auf der Grundlage theoretischer IR-Spektren, die mit quantenchemischen Verfahren basierend auf der Dichtefunktionaltheorie berechnet wurden. Berechnete Moden für deuterierte und hydratisierte Spezies erlauben es, die Aussagekraft dieser Spektren kritisch abzuschätzen.

Insgesamt gestatten die Spektrenberechnungen die Zuordnung einiger signifikanter Banden des gemessenen FAD-Spektrums zu Schwingungsmoden des Moleküls, insbesondere der $\nu(\text{C}=\text{O})$ -, $\nu(\text{C}=\text{N})$ - und $\nu(\text{C}(4\text{a})=\text{C}(10\text{a}))$ -Streckschwingungen. Damit ergibt sich auch ein erster Zugang zu einigen IR-Banden des reduzierten Flavins.

Für die redox-induzierten Spektren der untersuchten Flavoproteine zeigt sich, dass diese deutlich vom Spektrum des Flavins dominiert werden. Zusätzliche Banden werden der Proteinumgebung zugeordnet, ohne dass eine Eingrenzung auf spezifische Gruppen möglich ist.

Für POX ergibt sich im Vergleich zu freiem FAD eine auffällige und für kein anderes Protein beobachtete Verschiebung der $\nu(\text{C}(10\text{a})=\text{N}(1))$ -Bande um 14 cm^{-1} zu niedri-

geren Wellenzahlen. Eine Korrelation mit dem Redoxpotential des enzymgebundenen Flavins besteht nicht.

Aus der Untersuchung der Variante POX-V265 geht hervor, dass die Peakverschiebung zumindest teilweise vom Knick des Isoalloxazin-Rings um die N(5)–N(10)-Achse verursacht ist, der in der Kristallstruktur des Wildtyps gefunden wurde. In der Variante V265A ist die Peakverschiebung mit 10 cm^{-1} geringer, und ihre hier ebenfalls beschriebene Kristallstruktur zeigt eine auffällige Flexibilität des Isoalloxazin-Rings und seiner Bindungstasche.

Die POX-Variante V265A zeigt trotz erheblicher struktureller Unterschiede eine dem Wildtyp ähnliche katalytische Reaktivität und auch das gleiche Redoxpotential des Flavin-Kofaktors. Das FAD ist weniger fest als im Wildtyp gebunden und kann durch Adeninnukleotide verdrängt werden.

Die Untersuchung der *steady state*-Intermediatverteilung an Wildtyp-POX und POX-Varianten erlaubt es, katalytische Funktionen einzelner Aminosäurereste im aktiven Zentrum einzugrenzen. Hinsichtlich der Kopplung von Phosphorolyse und Elektronentransfer zum Flavin zeigt sich, dass andere Nukleophile wie DTE das Phosphat ersetzen können und wie dieses auch den Elektronentransfer beschleunigen, jedoch strukturell ähnliche Ionen, die den Acetylrest nicht übernehmen können, dazu nicht in der Lage sind.

Eine ähnliche Kopplung von phosphorolytischer Spaltung und vorgelagertem Reaktionsschritt konnte erstmals auch für Phosphoketolase nachgewiesen werden.

4.2 Ausblick

Die IR-Spektroskopie zeigt für die molekulare Enzymologie ein großes Potential, da zumindest prinzipiell jede Bindung zum Spektrum beiträgt und sich damit einzelne Reaktionsschritte verfolgen lassen. Zwei Engpässe stehen dem entgegen: die Filtrierung der interessierenden Signale aus dem Hintergrund, und die Interpretation der Spektren, d.h. die Zuordnung der Banden zu Schwingungsmoden.

Für das erste Problem bietet die — nicht notwendigerweise *redox*-induzierte — Differenzspektroskopie eine Lösungsmöglichkeit. Bei genügender Basislinienstabilität sollte es z.B. möglich sein, Veränderungen von Schwingungsmoden des ThDP bei der Bindung an ein Apo-Enzym zu detektieren, diese für Wildtyp und Varianten

zu vergleichen und z.B. festzustellen, auf welcher Seite im enzymgebundenen Zustand das Amino-Imino-Tautomerengleichgewicht des ThDP-Pyrimidinrings liegt. Ebenso könnte nach Zusatz von Substrat die Bildung von Reaktionsintermediaten verfolgt werden, und schließlich eröffnet die redox-induzierte Differenzspektroskopie für POX möglicherweise einen Zugang zur Bestimmung des Redoxpotentials des Hydroxyethyl-ThDP-Carbanions im enzymgebundenen Zustand.

Für die notwendige Bandenzuordnung bieten, wie hier gezeigt, quantentheoretische Rechnungen einen ersten Ansatz, auch wenn sie die ortsgerichtete Isotopenmarkierung nicht vollständig ersetzen können. Bei weiter steigender Leistungsfähigkeit der Rechentechnik kann die Aussagekraft der theoretischen Spektren durch die Berücksichtigung möglichst vieler Solvent-Wechselwirkungen noch einmal erheblich verbessert werden.

Hinsichtlich des POX-Reaktionsmechanismus sind weitere kristallographische Untersuchungen wünschenswert. Für dieses Enzym besteht (wie auch schon für Transketolase demonstriert wurde) die Möglichkeit, durch das Weglassen von einem der drei Substrate bestimmte Reaktionsintermediate zu populieren und ihre Struktur zu bestimmen. Wenn dazu Enzymvarianten verwendet werden, ließen sich die Funktionen einzelner Aminosäurereste auch strukturell untermauern.

Die ungewöhnliche phosphorolytische Bildung von Acetylphosphat bei POX und die Kopplung mit dem Elektronentransfer zum FAD sowie die hier gemachte Beobachtung, dass andere Nukleophile die Phosphatfunktion übernehmen können, bieten die Grundlage für weitere kinetische Untersuchungen. Neben der Untersuchung weiterer Substrate sollten insbesondere Konzentrationsabhängigkeiten und die intermediäre Bildung von Flavinradikalen betrachtet werden. Die Beobachtung, dass sich Hydroxypyruvat hinsichtlich der Reaktionsintermediatverteilung deutlich anders als Pyruvat verhält, gibt Anlass zur Untersuchung des Produktspektrums dieser Reaktion sowie zur Untersuchung weiterer Substrate, etwa halogener Pyruvate.

Die Kristallstrukturen von zwei Enzymen würden helfen, die Phosphorolyse bei POX zu verstehen. Zum einen ist *EcPOX* der POX aus *Lactobacillus plantarum* sehr ähnlich, bildet aber nur Acetat und kein Acetylphosphat. Zum anderen hat die Phosphoketolase mit POX die Bildung von Acetylphosphat gemein; und wie oben gezeigt, ist auch für dieses Enzym der Acetyltransfer mit einem anderen Reaktionsschritt gekoppelt, sodass ein gemeinsames Prinzip vermutet werden kann.

Literaturverzeichnis

- [1] **Sedewitz, B., Schleifer, K.-H., Götz, F.** (1984) Purification and biochemical characterization of pyruvate oxidase from *Lactobacillus plantarum*. *J. Bact.* 160, 273–278.
- [2] **Sedewitz, B., Schleifer, K.-H., Götz, F.** (1984) Physiological Role of Pyruvate Oxidase in the Aerobic Metabolism of *Lactobacillus plantarum*. *J. Bact.* 160, 462–465.
- [3] **Risse, B., Stempfer, G., Rudolph, R., Möllering, H., Jaenicke, R.** (1992) Stability and reconstitution of pyruvate oxidase from *Lactobacillus plantarum*: Dissection of the stabilizing effects of coenzyme binding and subunit interaction. *Protein Science* 1, 1699–1709.
- [4] **Risse, B., Stempfer, G., Rudolph, R., Schumacher, G., Jaenicke, R.** (1992) Characterization of the stabilizing effect of point mutations of pyruvate oxidase from *Lactobacillus plantarum*: Protection of the native state by modulating coenzyme binding and subunit interaction. *Protein Science* 1, 1710–1718.
- [5] **Risse, B.** (1992) *Pyruvatoxidase aus Lactobacillus plantarum: Quartärstruktur, Cofaktorbindung und stabilisierende Punktmutationen*. Dissertationsschrift, Universität Regensburg, Regensburg.
- [6] **Stempfer, G.** (1992) *Charakterisierung von Punktmutanten der Pyruvatoxidase aus Lactobacillus plantarum*. Diplomarbeit, Universität Regensburg, Regensburg.
- [7] **Proske, D.** (1995) *Untersuchungen zur Bindung von FAD und TDP an Pyruvatoxidase aus Lactobacillus plantarum*. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle/Saale.
- [8] **Muller, Y., Schulz, G.** (1993) Structure of the thiamine- and flavin-dependent enzyme pyruvate oxidase. *Science* 259, 965–967.
- [9] **Muller, Y. A., Schumacher, G., Rudolph, R., Schulz, G. E.** (1994) The Refined Structures of a Stabilized Mutant and of Wild-type Pyruvate Oxidase from *Lactobacillus plantarum*. *J. Mol. Biol.* 237, 315–335.
- [10] **Ghisla, S., Massey, V.** (1989) Mechanisms of flavoprotein-catalyzed reactions. *Eur. J. Biochem.* 181, 1–17.
- [11] **Palfey, B. A., Ballou, D. P., Massey, V.** (1995) Oxygen Activation by Flavins and Pterins. In J. S. Valentine, C. Foote, J. F. Liebman (Editors), *Active Oxygen in Biochemistry*, 37–83. Kluwer Academic Publishers.
- [12] **Palfey, B. A., Massey, V.** (1997) Flavin-Dependent Enzymes. In M. Sinnott (Editor), *Comprehensive Biological Catalysis, Volume III*, 83–154. Academic Press.
- [13] **Fraaije, M. W., Mattevi, A.** (2000) Flavoenzymes: diverse catalysts with recurrent features. *Trends Biochem. Sci.* 25, 126–132.

- [14] **Miura, R.** (2001) Versatility and specificity in flavoenzymes: control mechanisms of flavin reactivity. *Chem. Rec.* 1, 183–194.
- [15] **Silverman, R. B.** (2002) *The Organic Chemistry of Enzyme-Catalyzed Reactions*. Academic Press.
- [16] **Massey, V., Hemmerich, P.** (1980) Active-site probes of flavoproteins. *Biochem. Soc. Trans.* 8, 246–257.
- [17] **Zheng, Y.-J., Ornstein, R.** (1996) A Theoretical Study of the Structures of Flavin in Different Oxidation and Protonation States. *J. Am. Chem. Soc.* 118, 9402–9408.
- [18] **Rizzo, C. J.** (2001) Further Computational Studies on the Conformation of 1,5-Dihydroxylumiflavin. *Antioxid. Redox Signal.* 3, 737–746.
- [19] **Hasford, J. J., Kemnitzer, W., Rizzo, C.** (1997) Conformational Effects on Flavin Redox Chemistry. *J. Org. Chem.* 62, 5244–5245.
- [20] **Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N., Bourne, P. E.** (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* 28, 235–242.
- [21] **Watt, W., Tulinsky, A., Swenson, R. P., Watenpaugh, K. D.** (1991) Comparison of the Crystal Structures of a Flavodoxin in its Three Oxidation States at Cryogenic Temperatures. *J. Mol. Biol.* 218, 195–208.
- [22] **Binda, C., Coda, A., Angelini, R., Federico, R., Ascenzi, P., Mattevi, A.** (1999) A 30 Å long U-shaped catalytic tunnel in the crystal structure of polyamine oxidase. *Structure* 7, 265–276.
- [23] **Binda, C., Angelini, R., Federico, R., Ascenzi, P., Mattevi, A.** (2001) Structural Bases for Inhibitor Binding and Catalysis in Polyamine Oxidase. *Biochemistry* 40, 2766–2776.
- [24] **Fox, K. M., Karplus, P. A.** (1994) Old yellow enzyme at 2 Å resolution: overall structure, ligand binding, and comparison with related flavoproteins. *Structure* 2, 1089–1105.
- [25] **Waksman, G., Krishna, T. S. R., Williams jr., C. H., Kuriyan, J.** (1994) Crystal structure of *Escherichia coli* thioredoxin reductase refined at 2 Å resolution. Implications for a large conformational change during catalysis. *J. Mol. Biol.* 236, 800–816.
- [26] **Lennon, B. W., Williams jr., C. H., Ludwig, M. L.** (1999) Crystal structure of reduced thioredoxin reductase from *Escherichia coli*: Structural flexibility in the isoalloxazine ring of the flavin adenine dinucleotide cofactor. *Protein Science* 8, 2366–2379.
- [27] **Winter, R., Noll, F.** (1998) *Methoden der Biophysikalischen Chemie*. Teubner.
- [28] **Callender, R. H., Deng, H.** (1994) Nonresonance Raman difference spectroscopy: A general probe of protein structure, ligand binding, enzymatic catalysis, and the structures of other biomacromolecules. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 23, 215–245.
- [29] **Carey, P. R., Dong, J.** (2004) Following Ligand Binding and Ligand Reactions in Proteins via Raman Crystallography. *Biochemistry* 43, 8885–8893.
- [30] **Zheng, Y. G., Dong, J., Palfey, B. A., Carey, P. R.** (1999) Using Raman spectroscopy to monitor the solvent-exposed and „buried“ forms of flavin in p-hydroxybenzoate hydroxylase. *Biochemistry* 38, 16727–16732.

- [31] Moss, D., Nabedryk, E., Breton, J., Mäntele, W. (1990) Redox-linked conformational changes in proteins detected by a combination of infrared spectroscopy and electrochemistry: Evaluation of the technique with cytochrome c. *Eur. J. Biochem.* 187, 565–572.
- [32] Mäntele, W. (1993) Reaction-induced infrared difference spectroscopy for the study of protein function and reaction mechanisms. *Trends Biochem Sci* 18, 197–202.
- [33] Hellwig, P., Behr, J., Ostermeier, C., Richter, O., Pfitzner, U., Odenwald, A., Ludwig, B., Michel, H., Mäntele, W. (1998) Involvement of glutamic acid 278 in the redox reaction of the cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans* investigated by FTIR spectroscopy. *Biochemistry* 37, 7390–7399.
- [34] Lancaster, C., Gorss, R., Haas, A., Ritter, M., Mäntele, W., Simon, J., Kröger, A. (2000) Essential role of Glu-C66 for menaquinol oxidation indicates transmembrane electrochemical potential generation by *Wolinella succinogenes* fumarate reductase. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 13051–13056.
- [35] Ritter, M., Anderka, O., Ludwig, B., Mäntele, W., Hellwig, P. (2003) Electrochemical and FTIR spectroscopic characterization of the cytochrome bc₁ complex from *Paracoccus denitrificans*: evidence for protonation reactions coupled to quinone binding. *Biochemistry* 42, 12391–12399.
- [36] Hellwig, P., Scheide, D., Bungert, S., Mäntele, W., Friedrich, T. (2000) FT-IR Spectroscopic Characterization of NADH:Ubiquinone Oxidoreductase (Complex I) from *Escherichia coli*: Oxidation of FeS Cluster N2 is Coupled with the Protonation of an Aspartate or Glutamate Side Chain. *Biochemistry* 39, 10884–10891.
- [37] Bowman, W. D., Spiro, T. G. (1981) Normal Mode Analysis of Lumiflavin and Interpretation of Resonance Raman Spectra of Flavoproteins. *Biochemistry* 20, 3313–3318.
- [38] Abe, M., Kyogoku, Y. (1987) Vibrational analysis of flavin derivatives: normal coordinate treatments of lumiflavin. *Spectrochim. Acta* 43A, 1027–1037.
- [39] Lively, C., McFarland, J. (1990) Assignment and the Effect of Hydrogen Bonding on the Vibrational Normal Modes of Flavins and Flavoproteins. *J. Phys. Chem.* 94, 3980–3994.
- [40] Hohenberg, P., Kohn, W. (1964) Inhomogeneous Electron Gas. *Phys. Rev. B* 136, 864–871.
- [41] Kohn, W., Sham, L. (1965) Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects. *Phys. Rev. A* 140, 1133–1138.
- [42] Langhoff, S. (1996) Theoretical Infrared Spectra for Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Neutrals, Cations, and Anions. *J. Phys. Chem.* 100, 2819–2841.
- [43] Langhoff, S., Bauschlicher Jr., C., Hudgins, D., Sandford, S., Allamandola, L. (1998) Infrared Spectra of Substituted Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *J. Phys. Chem. A* 102, 1632–1646.
- [44] Scott, A., Radom, L. (1996) Harmonic Vibrational Frequencies: An Evaluation of Hartree-Fock, Møller-Plesset, Quadratic Configuration Interaction, Density Functional Theory, and Semiempirical Scale Factors. *J. Phys. Chem.* 100, 16502–16513.

- [45] Abe, M., Kyogoku, Y., Kitagawa, T., Kawano, K., Ohishi, N., Takai-Suzuki, A., Yagi, K. (1986) Infrared spectra and molecular association of lumiflavin and riboflavin derivatives. *Spectrochimica Acta* 42A, 1059–1068.
- [46] Birss, V., Hinman, A., McGarvey, C., Segal, J. (1994) *In situ* FTIR Thin-Layer Reflectance Spectroscopy of Flavin Adenine Dinucleotide at a Mercury/Gold Electrode. *Electrochim. Acta* 39, 2449–2454.
- [47] Nishina, Y., Shiga, K., Miura, R., Tojo, H., Ohta, M., Miyake, Y., Yamano, T., Watari, H. (1983) On the Structures of Flavoprotein D-Amino Acid Oxidase Purple Intermediates. A Resonance Raman Study. *J. Biochem.* 94, 1979–1990.
- [48] Nishina, Y., Sato, K., Hazekawa, I., Shiga, K. (1995) Structural Modulation of 2-Enoyl-CoA Bound to Reduced Acyl-CoA Dehydrogenases: A Resonance Raman Study of a Catalytic Intermediate. *J. Biochem.* 117, 800–808.
- [49] Suzuki, H., Koyama, H., Nishina, Y., Sato, K., Shiga, K. (1991) A Resonance Raman Study on a Reaction Intermediate of *Pseudomonas* L-Phenylalanine Oxidase (Deaminating and Decarboxylating). *J. Biochem.* 110, 169–172.
- [50] Lohmann, K., Schuster, P. (1937) Untersuchungen über die Cocarboxylase. *Biochem. Z.* 294, 188–193.
- [51] Kluger, R. (1992) Mechanisms of Enzymic Carbon-Carbon Bond Formation and Cleavage. In D. S. Sigman (Editor), *The Enzymes*, Vol. 20, 271–315. Academic Press.
- [52] O'Leary, M. H. (1992) Catalytic Strategies in Enzymic Carboxylations and Decarboxylations. In D. S. Sigman (Editor), *The Enzymes*, Vol. 20, 236–269. Academic Press.
- [53] Schowen, R. L. (1997) Thiamin-Dependent Enzymes. In M. Sinnott (Editor), *Comprehensive Biological Catalysis*, Volume II, 217–266. Academic Press.
- [54] Schellenberger, A. (1998) Sixty years of thiamin diphosphate biochemistry. *Biochim. Biophys. Acta* 1385, 177–186.
- [55] Jordan, F. (2003) Current mechanistic understanding of thiamin diphosphate-dependent enzymatic reactions. *Nat. Prod. Rep.* 20, 184–201.
- [56] Pohl, M., Sprenger, G. A., Müller, M. (2004) A new perspective on thiamine catalysis. *Curr. Opin. Biotechnol.* 15, 335–342.
- [57] 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 α -carbanion of (α , β -dihydroxyethyl)-thiamin diphosphate in the active site of transketolase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 591–595.
- [58] Chabrière, E., Vernède, X., 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.

- [59] **Tittmann, K., Golbik, R., Uhlemann, K., Khailova, L., Schneider, G., Patel, M., Jordan, F., Chipman, D., Duggleby, R., Hübner, G.** (2003) NMR Analysis of Covalent Intermediates in Thiamin Diphosphate Enzymes. *Biochemistry* 42, 7885–7891.
- [60] **Candy, J. M., Koga, J., Nixon, P. F., Duggleby, R. G.** (1996) The role of residues glutamate-50 and phenylalanine-496 in *Zymomonas mobilis* pyruvate decarboxylase. *Biochem. J.* 315, 745–751.
- [61] **Schenk, G., Leeper, F. J., England, R., Nixon, P. F., Duggleby, R. G.** (1997) The role of His113 and His114 in pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis*. *Eur. J. Biochem.* 248, 63–71.
- [62] **Candy, J. M., Duggleby, R. G.** (1998) Structure and properties of pyruvate decarboxylase and site-directed mutagenesis of the *Zymomonas mobilis* enzyme. *Biochim. Biophys. Acta* 1385, 323–338.
- [63] **Chang, A. K., Nixon, P. F., Duggleby, R. G.** (1999) Aspartate-27 and glutamate-473 are involved in catalysis by *Zymomonas mobilis* pyruvate decarboxylase. *Biochem. J.* 339, 255–260.
- [64] **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.
- [65] **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 aceto-lactate. *Eur. J. Biochem.* 267, 6493–6500.
- [66] **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.
- [67] **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.
- [68] **Tittmann, K.** (2000) *Untersuchungen zu Katalysemechanismen von Flavin- und Thiamindiphosphat-abhängigen Enzymen.* Dissertationsschrift, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle/Saale.
- [69] **Tittmann, K., Golbik, R., Ghisla, S., Hübner, G.** (2000) Mechanism of Elementary Catalytic Steps of Pyruvate Oxidase from *Lactobacillus plantarum*. *Biochemistry* 39, 10747–10754.
- [70] **Schröter, W., Holzer, H.** (1962) Zum Wirkungsmechanismus der Phosphoketolase. I. Oxydation verschiedener Substrate mit Ferricyanid zu Glycolsäure. *Biochim. Biophys. Acta* 65, 271–288.
- [71] **Holzer, H., Schröter, W.** (1963) Zum Wirkungsmechanismus der Phosphoketolase. II. Umsatz von „Thiaminpyrophosphat aktiviertem Glycolaldehyd“ *Biochim. Biophys. Acta* 77, 474–481.
- [72] **Lienhard, G. E.** (1966) Kinetics and Mechanism of the Hydrolysis of 2-Acetyl-3,4-dimethylthiazolium Ion. *J. Am. Chem. Soc.* 88, 5642–5649.
- [73] **Gruys, K. J., Halkides, C. J., Frey, P. A.** (1987) Synthesis and Properties of 2-Acetylthiamin Pyrophosphate: An Enzymatic Reaction Intermediate. *Biochemistry* 26, 7575–7585.

- [74] **Machado, V. G., Nome, F.** (1997) Acyl transfer reactions in dipolar aprotic medium: desolvated phosphate ion as acyl acceptor in the formation of energy-rich phosphate compounds. *Chem. Commun.* 1997, 1917–1918.
- [75] **Gruys, K. J., Datta, A., Frey, P. A.** (1989) 2-Acetylthiamin Pyrophosphate (Acetyl-TPP) pH-Rate Profile for Hydrolysis of Acetyl-TPP and Isolation of Acetyl-TPP as a Transient Species in Pyruvate Dehydrogenase Catalyzed Reactions. *Biochemistry* 28, 9071–9080.
- [76] **Frey, P. A.** (1989) 2-Acetylthiamin pyrophosphate: an enzyme-bound intermediate in thiamin pyrophosphate-dependent reactions. *Biofactors* 2, 1–9.
- [77] **Tittmann, K., Proske, D., Spinka, M., Ghisla, S., Rudolph, R., Hübner, G., Kern, D.** (1998) Activation of Thiamin Diphosphate and FAD in the Phosphate-Dependent Pyruvate Oxidase from *Lactobacillus plantarum*. *J. Biol. Chem.* 273, 12929–12934.
- [78] **Bradford, M. M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- [79] **Gibson, Q. H., Swoboda, B. E. P., Massey, V.** (1964) Kinetics and Mechanism of Action of Glucose Oxidase. *J. Biol. Chem.* 239, 3927–3934.
- [80] **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.
- [81] **Frisch, M., Trucks, G., Schlegel, H., Scuseria, G., Robb, M., Cheeseman, J., Zakrzewski, V., Montgomery Jr., J., Stratmann, R., Burant, J., Dapprich, S., Millam, J., Daniels, A., Kudin, K., Strain, M., Farkas, O., Tomasi, J., Barone, V., Cossi, M., Cammi, R., et al.** (1998) *Gaussian 98, Revision A.3.* Gaussian, Pittsburgh, PA.
- [82] **Otwinowski, Z., Minor, W.** (1997) Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol.* 276, 307–326.
- [83] **Vagin, A. A., Teplyakov, A.** (1997) MOLREP: an automated program for molecular replacement. *J. Appl. Crystallogr.* 30, 1022–1025.
- [84] **Jones, T. A., Zou, J. Y., Cowan, S. W., Kjeldgaard, M.** (1991) Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallogr. A* 47, 110–119.
- [85] **DeLano, W.** (2002) *The PyMol Molecular Graphics System.* DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA. <http://www.pymol.org>.
- [86] **Murshudov, G. N., Vagin, A. A., Dodson, E. J.** (1997) Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr. D* 53, 240–255.
- [87] **COLLABORATIVE COMPUTATIONAL PROJECT, NUMBER 4** (1994) The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography. *Acta Cryst. D* 50, 760–763. <http://www.ccp4.ac.uk>.
- [88] **Hazekawa, I., Nishina, Y., Sato, K., Shichiri, M., Miura, R., Shiga, K.** (1997) A Raman Study on the C(4)=O Stretching Mode of Flavins in Flavoenzymes: Hydrogen Bonding at the C(4)=O Moiety. *J. Biochem.* 121, 1147–1154.

- [89] Nishina, Y., Sato, K., Miura, R., Matsui, K., Shiga, K. (1998) Resonance Raman Study on Reduced Flavin in Purple Intermediate of Flavoenzyme: Use of [4-Carbonyl-¹⁸O]-Enriched Flavin. *J. Biochem.* 124, 200–208.
- [90] Zheng, Y., Carey, P. R., Palfey, B. A. (2004) Raman spectrum of fully reduced flavin. *J. Raman Spectrosc.* 35, 521–524.
- [91] Goormaghtigh, E., Cabiaux, V., Ruyschaert, J. M. (1994) Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy. III. Secondary structures. *Subcell. Biochem.* 23, 405–450.
- [92] Barth, A. (2000) The infrared absorption of amino acid side chains. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 74, 141–173.
- [93] Mayhew, S. G. (1999) The effects of pH and semiquinone formation on the oxidation-reduction potentials of flavin mononucleotide. *Eur. J. Biochem.* 265, 698–702.
- [94] Stankovich, M. T., Schopfer, L. M., Massey, V. (1978) Determination of glucose oxidase oxidation-reduction potentials and the oxygen reactivity of fully reduced and semiquinoid forms. *J. Biol. Chem.* 253, 4971–4979.
- [95] Brunori, M., Rotilio, G. C., Antonini, E., Curti, B., Branzoli, U., Massey, V. (1971) Oxidation-reduction potentials of D-amino acid oxidase. *J. Biol. Chem.* 246, 3140–3144.
- [96] Wohlfahrt, G., Witt, S., Hendle, J., Schomburg, D., Kalisz, H. M., Hecht, H.-J. (1999) 1.8 and 1.9 Angstrom Resolution Structures of the *Penicillium amagasakiense* and *Aspergillus niger* Glucose Oxidases as a Basis for Modelling Substrate Complexes. *Acta Crystallogr. D* 55, 969–977.
- [97] Mizutani, H., Miyahara, I., Hirotsu, K., Nishina, Y., Shiga, K., Setoyama, C., Miura, R. (1996) Three-dimensional Structure of Porcine Kidney D-Amino Acid Oxidase at 3.0 Å Resolution. *J. Biochem.* 120, 14–17.
- [98] Miura, R., Setoyama, C., Nishina, Y., Shiga, K., Mizutani, H., Miyahara, I., Hirotsu, K. (1997) Structural and Mechanistic Studies on D-Amino Acid Oxidase*Substrate Complex. Implications of the Crystal Structure of Enzyme*Substrate Analog Complex. *J. Biochem.* 122, 825–833.
- [99] Haouz, A., Twist, C., Zentz, C., Tauc, P., Alpert, B. (1998) Dynamic and structural properties of glucose oxidase enzyme. *Eur. Biophys. J.* 27, 19–25.
- [100] Sukumar, N., Dewanti, A. R., Mitra, B., Mathews, F. S. (2004) High Resolution Structures of an Oxidized and Reduced Flavoprotein. *J. Biol. Chem.* 279, 3749–3757.
- [101] Kuzmic, P. (1996) Program DYNAFIT for the analysis of enzyme kinetic data: application to HIV proteinase. *Anal. Biochem.* 237, 260–273.
- [102] Schütz, A., Sandalova, T., Ricagno, S., Hübner, G., König, S., Schneider, G. (2003) Crystal structure of thiamindiphosphate-dependent indolepyruvate decarboxylase from *Enterobacter cloacae*, an enzyme involved in the biosynthesis of the plant hormone indole-3-acetic acid. *Eur. J. Biochem.* 270, 2312–2321.

- [103] **Sato, K., Nishina, Y., Shiga, K.** (2003) Purification of Electron-Transferring Flavoprotein from *Megasphaera elsdenii* and Binding of Additional FAD with an Unusual Absorption Spectrum. *J. Biochem.* 134, 719–729.
- [104] **Dym, O., Eisenberg, D.** (2001) Sequence-structure analysis of FAD-containing proteins. *Protein Science* 10, 1712–1728.
- [105] **Pang, S. S., Duggleby, R. G., Schowen, R. L., Guddat, L. W.** (2004) The Crystal Structures of *Klebsiella pneumoniae* Acetolactate Synthase with Enzyme-bound Cofactor and with an Unusual Intermediate. *J. Biol. Chem.* 279, 2242–2253.
- [106] **Weidner, A.** (2003) *Mechanistische und strukturelle Charakterisierung der Pyruvatoxidase aus Escherichia coli*. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle/Saale.
- [107] **Schwede, T., Kopp, J., Guex, N., Peitsch, M. C.** (2003) SWISS-MODEL: an automated protein homology-modelling server. *Nucleic Acids Res.* 31, 3381–3385.
- [108] **Ragsdale, S. W.** (2003) Pyruvate ferredoxin oxidoreductase and its radical intermediate. *Chem. Rev.* 103, 2333–2346.

A Tabellen mit berechneten Schwingungsmoden

In den nachfolgenden Tabellen sind die berechneten Frequenzen und IR-Intensitäten der Normalmoden verschiedener Lumiflavin-Systeme zusammengefasst. Wiedergegeben ist dabei nur der Bereich zwischen 1100 cm^{-1} und 1800 cm^{-1} , da auch nur dieser experimentell untersucht wurde. Für jede Spezies sind die zehn intensivsten Moden in diesem Spektralbereich mit einem Stern (*) gekennzeichnet.

A.1 Lumiflavin, nicht deuteriert, nicht hydratisiert

Oxidiertes Lumiflavin		Reduziertes Lumiflavin	
Wellenzahl (cm^{-1})	Intensität KM/mol	Wellenzahl (cm^{-1})	Intensität KM/mol
1116	< 0.001	1108	0.013
1123	0.003	1127	0.026
1153	0.028	1139	0.004
1176*	0.171	1184	0.010
1200	0.019	1199	0.012
1248*	0.066	1210	0.032
1269	0.001	1241*	0.056
1291*	0.078	1270	0.008
1306*	0.053	1286*	0.205
1331	0.051	1305*	0.077
1357	0.018	1316	0.016
1360*	0.119	1350	0.001
1386	< 0.001	1363*	0.258
1398	0.003	1384	0.018
1403	0.001	1396	0.002
1423	0.022	1409	0.015
1447	< 0.001	1431	0.021
1458	0.016	1442*	0.200
1463	0.018	1448	< 0.001
1464	0.013	1461	0.015
1467*	0.084	1466	0.044
1478	0.011	1467	0.008
1485	< 0.001	1471	0.050
1524	0.005	1483	0.007
1538*	0.523	1497*	0.186
1575*	0.786	1504*	0.166
1618	0.035	1569	0.038
1736*	0.695	1603	0.025
1745*	0.227	1653*	0.401
		1701*	0.536
		1765*	0.795

Tab. A.1: Berechnete Normalmoden für oxidiertes und reduziertes Lumiflavin.

A.2 Lumiflavin, nicht deuteriert, hydratisiert

Tab. A.2: Berechnete Normalmoden für oxidiertes und reduziertes Lumiflavin-Monohydrat.

Oxidiertes Lumiflavin		Reduziertes Lumiflavin	
Wellenzahl (cm^{-1})	Intensität KM/mol	Wellenzahl (cm^{-1})	Intensität KM/mol
1116	< 0.001	1108	0.012
1124	0.003	1129	0.027
1157	0.036	1142	0.003
1191	0.059	1187	0.007
1212*	0.096	1201	0.015
1251*	0.065	1222	0.049
1270	0.002	1242	0.050
1289*	0.082	1270	0.009
1314	0.033	1286*	0.196
1335	0.053	1305*	0.071
1365*	0.163	1322	0.033
1385	< 0.001	1370*	0.194
1398	0.003	1385	0.025
1403	0.001	1397	0.003
1422	0.027	1407	0.008
1433	0.023	1421	0.070
1447	< 0.001	1431	0.016
1458	0.021	1442*	0.179
1463	0.018	1448	< 0.001
1464	0.011	1462	0.015
1467*	0.079	1466	0.049
1477	0.011	1467	0.002
1485	< 0.001	1471	0.051
1523	< 0.001	1482	0.012
1537*	0.589	1495*	0.116
1574*	0.848	1503*	0.209
1618	0.042	1569	0.036
1666*	0.112	1603	0.023
1695*	0.691	1657*	0.422
1744*	0.299	1663*	0.127
		1702*	0.442
		1724*	0.878

A.3 Lumiflavin, deuteriert, nicht hydratisiert

Oxidiertes Lumiflavin		Reduziertes Lumiflavin	
Wellenzahl (cm^{-1})	Intensität KM/mol	Wellenzahl (cm^{-1})	Intensität KM/mol
1103	0.006	1108	0.014
1116	< 0.001	1126	0.024
1124	0.004	1145	0.003
1165*	0.126	1183	0.006
1190	0.016	1198	0.024
1238*	0.071	1225	0.045
1248*	0.079	1250	0.059
1272	0.005	1262	0.003
1291*	0.092	1284*	0.246
1306	0.044	1291	0.060
1329	0.043	1330	0.065
1359*	0.119	1382	0.014
1386	< 0.001	1394*	0.125
1398	0.003	1397	0.050
1403	0.001	1405	0.004
1423	0.022	1423*	0.072
1447	< 0.001	1448	< 0.001
1458	0.016	1461	0.047
1463	0.018	1462*	0.180
1464	0.013	1467	0.016
1467*	0.084	1468	0.010
1478	0.011	1471*	0.096
1485	< 0.001	1488*	0.159
1524	0.004	1502*	0.166
1538*	0.524	1562	0.039
1575*	0.785	1603	0.025
1618	0.035	1644*	0.372
1724*	0.673	1690*	0.611
1744*	0.237	1753*	0.682

Tab. A.3: Berechnete Normalmoden für oxidiertes und reduziertes Lumiflavin, deuteriert in allen austauschenden Positionen (N3-H, N1-H, N5-H)

A.4 Lumiflavin, deuteriert, hydratisiert

Tab. A.4: Berechnete Normalmoden für oxidiertes und reduziertes Lumiflavinhydrat, deuteriert in allen austauschenden Positionen (N3-H, N1-H, N5-H, H₂O)

Oxidiertes Lumiflavin		Reduziertes Lumiflavin	
Wellenzahl (cm ⁻¹)	Intensität KM/mol	Wellenzahl (cm ⁻¹)	Intensität KM/mol
1112	0.006	1108	0.012
1116	< 0.001	1128	0.030
1124	0.005	1148	0.004
1172*	0.098	1190	0.003
1192	0.012	1201	0.032
1216	0.039	1213	0.043
1247	0.045	1233	0.050
1261*	0.061	1257	0.037
1274	0.010	1265	0.005
1290*	0.113	1286*	0.210
1313	0.043	1299	0.057
1332*	0.053	1331	0.085
1363*	0.148	1382	0.012
1385	< 0.001	1396*	0.091
1398	0.003	1399*	0.110
1403	0.001	1405	0.003
1423	0.024	1426	0.040
1447	< 0.001	1448	< 0.001
1458	0.022	1462	0.044
1463	0.018	1463*	0.154
1464	0.013	1466	0.019
1466*	0.081	1468	0.005
1477	0.011	1471*	0.103
1485	< 0.001	1487*	0.152
1523	0.001	1501*	0.194
1537*	0.633	1562	0.041
1574*	0.877	1603	0.026
1618	0.047	1645*	0.489
1673*	0.747	1684*	0.804
1738*	0.240	1706*	0.436

Dank

Ich danke herzlich Prof. Dr. Gerhard Hübner für die Möglichkeit, diese Arbeit in der AG Enzymologie anfertigen zu können, für die konstante Unterstützung und die großen Freiheiten, die er mir dabei gewährt hat.

Prof. Dr. Rainer Rudolph hat durch die Überlassung des POX-Plasmids vieles erst möglich gemacht, und Dr. Ulrike Fiedler hat die allerersten Schritte betreut.

Prof. Dr. Werner Mäntele vom Institut für Biophysik der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt/M. hat durch einen Kolloquiumsvortrag die Idee mit der Infrarotspektroskopie gesät. Ich danke ihm dafür, dass er in der Folge die IR-Untersuchungen in seinem Labor ermöglicht hat, und Dr. Michaela Ritter gebührt mein ganz besonderer Dank für die geduldige Betreuung dieser Messungen.

Ich danke ganz herzlich Prof. Dr. Rainer Jaenicke und Agathe Jaenicke für die großzügige Gastfreundschaft während meiner Aufenthalte in Frankfurt.

Herrn PD Dr. Rudolf Friedemann danke ich für die Berechnungen zum theoretischen Teil der Schwingungsspektroskopie und die Geduld mit meinen Sonderwünschen und Sonderwünschen und Sonderwünschen.

Ich danke Dr. Manfred Weiss für die Unterstützung bei meinen ersten Schritten im kristallographischen Irrgarten.

Dr. Stephan König danke ich für die unkomplizierte und offene Zusammenarbeit, für die immer wieder ermöglichte Synchrotron-Messzeit und die SAXS-Messungen.

Für die Unterstützung bei den SAXS-Messungen und aufschlussreiche Gespräche danke ich Dr. Michel Koch.

Dr. Kai Tittmann gilt mein Dank für NMR- und Redoxpotential-Messungen sowie die kompetente Hilfe bei allen anderen die POX betreffenden Problemen, und Herrn „Dr.-in-all-but-name“ Michael Spinka für seine unbestechliche Meinung zu diversen Fragen.

Ich danke allen Mitarbeitern der AG Enzymologie für die angenehme Arbeitsatmosphäre. Dr. Anja Schütz hat vorgeführt, dass 50% gemacht mehr ist als 100% ausgedacht, und Tobias Werther hat — unter anderem — geduldig die Phosphoketolase dressiert.

Jörg Fanghänel danke ich für alle Störungen der Routine, Gespräche über dies und jenes und Biochemie, und für's Anstacheln des Ehrgeizes.

Dr. Christoph Parthier danke ich für die sachliche Hilfe beim Endspurt, und „Mdm Justice“ Bettina Mech für die so ersprießliche Nachbarschaft!

Meinen Eltern danke ich für vieles, und hier ganz besonders für unerschütterliche Unterstützung und die Geduld bis zum Finale.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Die den genutzten Werken inhaltlich oder wörtlich entnommenen Stellen sind als solche gekennzeichnet.

Diese Arbeit wurde von mir weder an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg noch an einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht.

Halle/Saale, den 21.03.2005

Lebenslauf

persönliche Angaben

Name: Wille
Vorname: Georg
geboren: 18. Februar 1973 in Halle/Saale
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch
Adresse: Gottesackerstr. 4, 06108 Halle/Saale
Email: georg@bc.biochemtech.uni-halle.de

Schulbildung

1979–1987 Polytechnische Oberschule Teutschenthal
1987–1991 Erweiterte Spezialoberschule mathematisch-naturwissenschaftlich-technischer Richtung „Georg Thiele“, Kleinmachnow, Schulabschluß Abitur

Grundwehrdienst

01.04.1992–31.03.1993

universitäre Ausbildung

1991–1998 Biochemiestudium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Abschluß Diplom („sehr gut“)
10.1995–09.1996 *Research Assistant* bei Prof. Dr. J. P. Klinman, Dept. of Chemistry, University of California, Berkeley, USA
10.1998–03.2005 wissenschaftlicher Mitarbeiter bei Prof. Dr. G. Hübner, AG Enzymologie, Institut für Biochemie am FB Biochemie/Biotechnologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Arbeiten zur Dissertation „Infrarotspektroskopische, strukturelle und kinetische Untersuchung der Pyruvatoxidase aus *Lactobacillus plantarum*“

Stipendien

1991–1998 Studienstiftung des Deutschen Volkes
01.1999–03.2001 Fonds der Chemischen Industrie

Fähigkeiten

wissenschaftliche: prokaryotische Molekularbiologie (Klonierung, PCR, Mutagenese, Transformation)
Expression und -reinigung rekombinanter Proteine
Enzymkinetik (klassisch, *stopped flow*, *quenched flow*)
UV/Vis und IR-Spektroskopie, NMR (Grundlagen)
Proteinkristallisation und -strukturbestimmung

Lehrerfahrung: Tutorium „Chemie für Biologen“
Betreuung enzymologischer Gruppen- und Einzelpraktika

Sprachen: Englisch (flüssig in Wort und Schrift)
Russisch (Grundlagen)

Computerkenntnisse:

allgemein: MS Office, Corel Draw, Adobe Photoshop,
T_EX/L^AT_EX, GIMP, Linux

wissenschaftlich: MuPAD, DynaFit, SigmaPlot, Hyperchem,
PyMOL, HKL, CCP4

Programmierung: Perl (Grundlagen)

Referenzen

Prof. Dr. G. Hübner, Institut für Biochemie, FB Biochemie/Biotechnologie, Martin-Luther-Universität, Kurt-Mothes-Str. 3, D-06120 Halle, Deutschland

Prof. Dr. W. Mäntele, Institut für Biophysik, FB Physik, J. W. Goethe-Universität, Theodor-Stern-Kai 7, Haus 74, D-60590 Frankfurt/Main, Deutschland

Prof. Dr. J. P. Klinman, Department of Chemistry, 125C Lewis Hall, University of California, Berkeley, CA 94720-1460, USA

Publikationen

G. Wille, M. Ritter, R. Friedemann, W. Mäntele, G. Hübner (2003) Redox-triggered FTIR difference spectra of FAD in aqueous solution and bound to flavoproteins, *Biochemistry* 42, 14814–14821

W. A. Francisco, G. Wille, A. J. Smith, D. J. Merkler, J. P. Klinman (2004) Investigation of the pathway for inter-copper electron transfer in peptidylglycine α -amidating monooxygenase, *J. Am. Chem. Soc.* 126, 13168–13169

G. Wille, M. Ritter, M. S. Weiss, S. König, W. Mäntele, G. Hübner (2005) The role of Val-265 for flavin adenine dinucleotide (FAD) binding in pyruvate oxidase: FTIR, kinetic, and crystallographic studies on the enzyme variant V265A, *Biochemistry*, akzeptiert zur Publikation (Online-Veröffentlichung 10.03.2005, DOI: 10.1021/bi047337o)

Vorträge

„Two methyl groups and the binding of FAD: pyruvate oxidase V265A“, 5. Heart of Europe Biocrystallography Meeting 2002, Goslar, Deutschland

„Crossing mechanisms: towards the structure of phosphoketolase“, 6. Heart of Europe Biocrystallography Meeting 2003, Wittenberg, Deutschland

Poster

G. Wille, K. Tittmann, U. Fiedler, G. Hübner: New insights into the catalytic mechanism and substrate specificity of pyruvate oxidase from *Lactobacillus plantarum*, International Conference on Thiamin, its Biochemistry, and Structural Biology, 2002, Newark, New Jersey, USA