

**Native und rekombinante Pyruvatdecarboxylase aus  
*Pisum sativum* - Gemeinsamkeiten und Unterschiede in  
Struktur und Funktion**

**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 Herrn Arndt Dietrich  
geb. am 18.02.1972 in Reichenbach/ Vogtland

Gutachter: Prof. Dr. G. Hübner  
Prof. Dr. W. Baumeister  
Prof. Dr. H. Bisswanger

Datum der Verteidigung: 31.01.2001, Halle/ Saale

## Abkürzungsverzeichnis

ADH	Alkoholdehydrogenase
ATP	Adenosintriphosphat
BISTRIS	2-[Bis-(2-hydroxyethyl)-imino]-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
CD	Circulardichroismus
CHES	2-(Cyclohexylamino)ethansulfonsäure
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidphosphat
DTE	1,4-Dithioerythritol
kDA	Kilodalton
LDH	Lactatdehydrogenase
MALDI	<i>Matrix assisted laser desorption ionization</i>
MES	Morpholinoethansulfonsäure
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
MPL	Masse pro Länge
NADH	Nicotinsäureamidadenindinukleotid (reduziert)
nPsPDC	native PsPDC
OD	optische Dichte
PDC	Pyruvatdecarboxylase
PDH	Pyruvatdehydrogenase(-komplex)
PEG	Polyethylenglycol
PCR	Polymerasekettenreaktion
PsPDC	Pyruvatdecarboxylase aus <i>Pisum sativum</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
rPsPDC	rekombinante PsPDC
STEM	<i>Scanning transmission electron microscopy</i> (Rastertransmissions-Elektronenmikroskopie)
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
ThDP	Thiamindiphosphat

TRICIN	N-Tris(hydroxymethyl)-methylglycin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	(internationale) Einheit (der Enzymaktivität)
UV	ultraviolett

### **Anmerkungen zur Verwendung von Abkürzungen und Fachbegriffen**

In der Arbeit verwendete Abkürzungen, welche im allgemeinen deutschen Sprachgebrauch üblich sind, sind nicht im Abkürzungsverzeichnis aufgeführt.

Der Begriff "PsPDC" dient als allgemeine Bezeichnung für native PDC aus *Pisum sativum* und das Expressionsprodukt von *PDC1* aus *Pisum sativum* und ist jeweils durch die Begriffe "nativ" und "rekombinant" genauer spezifiziert.

Englische Fachbegriffe werden verwendet, wenn eine entsprechende deutsche Bezeichnung nicht verfügbar oder üblich ist. Diese Wendungen sind kursiv gedruckt (z. B. "*westernblot*"). Kommerziell erhältliche Produkte mit englischen Eigennamen sind nicht besonders gekennzeichnet (z. B. "PCR Purification Kit"). Aus dem Englischen entlehnte oder übernommene Wörter, die im wissenschaftlichen deutschen Sprachgebrauch verwendet werden, sind ebenfalls nicht besonders gekennzeichnet (z. B. "Primer").

Die Bildung der Holoenzyme aus den Apoenzymen nach Zugabe der Cofaktoren ist mit "Rekonstitution" bezeichnet. Der ebenso gebräuchliche Begriff "Rekombination" wurde nicht verwendet, um Wendungen wie "rekombinierte rekombinante PsPDC" zu umgehen.

Die Arbeit wurde nach den Regeln der neuen deutschen Rechtschreibung verfasst.

## Inhaltsverzeichnis

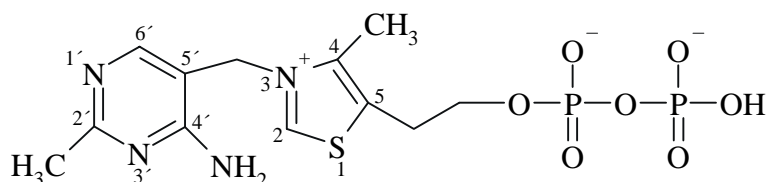
<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	1
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	7
2.1.	Material	7
2.1.1.	Chemikalien	7
2.1.2.	Proteine	8
2.1.3.	Säulenmaterialien	8
2.1.4.	Stämme	8
2.1.5.	Vektoren	8
2.2.	Molekularbiologische Methoden	9
2.2.1.	Konzentrationsbestimmung von DNA	9
2.2.2.	Agarosegele	9
2.2.3.	Verdau mit Nukleasen	9
2.2.4.	Plasmidpräparationen	10
2.2.5.	Polymerasereaktionen	10
2.2.6.	Ligationen	12
2.2.7.	Transformationen in <i>Escherichia coli</i> und <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12
2.2.8.	DNA-Sequenzierung	12
2.2.9.	Zellanzucht	13
2.3.	Proteinchemische Methoden	13
2.3.1.	Präparation des nativen Holoenzym	13
2.3.2.	Präparation des nativen Apoenzym	14
2.3.3.	Präparation rekombinanter PsPDC	14
2.3.4.	Aufkonzentrieren von rekombinanter und nativer PsPDC	15
2.3.5.	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophoresen	16
2.3.6.	<i>Westernblots</i>	16
2.3.7.	Bestimmung der Proteinkonzentration	16
2.3.8.	Bestimmung der Enzymaktivität	17
2.3.9.	Gelfiltration zur Bestimmung der molaren Masse	18
2.4.	Spektroskopische Methoden	18
2.4.1.	<i>Stopped-flow</i> -Messungen zur Substrataktivierung von PsPDC	18
2.4.2.	Bestimmung der intrinsischen Fluoreszenz	18
2.4.3.	Bestimmung des Nah-UV Circular dichroismus	19
2.5.	Elektronenmikroskopie	19

2.5.1. Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) und Bildauswertung	19
2.5.2. <i>Scanning transmission electron microscopy</i> (STEM)	20
<b>3. Ergebnisse und Diskussion</b>	21
3.1. Die Klonierung und Expression von <i>PDC1</i> aus <i>Pisum sativum</i>	21
3.1.1. Die Fusion von <i>PDC1</i>	21
3.1.2. Die Expression von <i>PDC1</i> in <i>Escherichia coli</i>	21
3.1.3. Die Expression von <i>PDC1</i> in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	22
3.2. Die Präparation von nativer und rekombinanter PsPDC	27
3.2.1. Die Präparation von rekombinanter PsPDC	27
3.2.2. Apoenzympräparation und Modifikation der Präparation nativer PsPDC	30
3.3. Strukturelle Eigenschaften nativer und rekombinanter PsPDC	31
3.3.1. Die molare Masse der Untereinheiten rekombinanter PsPDC	31
3.3.2. Die molaren Massen nativer und rekombinanter PsPDC	32
3.3.3. STEM Messungen von nativer und rekombinanter PsPDC	35
3.3.4. Der Aufbau der Filamente	39
3.3.5. Der Einfluss der Cofaktoren ThDP und $Mg^{2+}$ auf die Quartärstruktur	40
3.3.6. Der Einfluss des pH-Wertes auf die Form von PsPDC	43
3.3.7. Beziehungen zwischen Quartärstruktur und Funktion	44
3.3.8. Fluoreszenzeigenschaften der Tryptophanreste in nativer und rekombinanter PsPDC	45
3.3.9. CD-Spektroskopie von nativer und rekombinanter PsPDC	50
3.4. Kinetische Eigenschaften von rekombinanter PsPDC	52
3.4.1. Die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration	52
3.4.2. Die Aktivierung von rekombinanter PsPDC durch Pyruvat	54
3.4.3. Der Einfluss der Temperatur auf die Aktivierung von rekombinanter PsPDC	56
3.4.4. Der Einfluss der Substratkonzentration auf die beobachtete Aktivierungsgeschwindigkeitskonstante	58
3.4.5. Die Abhängigkeit der $v/S$ -Charakteristik vom pH-Wert	61
3.4.6. Der Einfluss verschiedener Salze auf die <i>steady-state</i> -Geschwindigkeit	62
3.4.7. Der Umsatz von substratanalogen Verbindungen	65
<b>4. Zusammenfassung</b>	69
<b>5. Literaturverzeichnis</b>	72

## 1. Einleitung

Im Kohlenhydratstoffwechsel vieler Organismen spielen Enzyme, die als Cofaktor Thiamindiphosphat (Abb.1), ein Derivat des Vitamin B1, enthalten, eine zentrale Rolle. Dazu gehören zum Beispiel Transketolase, ein Enzym des Pentosephosphatstoffwechsels, und Pyruvatdehydrogenase (PDH), welche die oxidative Decarboxylierung von Pyruvat katalysiert. Ein weiteres ThDP-abhängiges Enzym, welches das Endprodukt der Glykolyse umsetzt, ist Pyruvatdecarboxylase (PDC, EC 4.1.1.1.).

Während der enzymatischen Reaktion werden die jeweiligen Substrate kovalent an das C2-Atom des Thiazoliumrings gebunden (Breslow, 1958). Dabei reicht die Dissoziationsgeschwindigkeit des Protons am C2-Atom des freien Cofaktors nicht für die bei der enzymatischen Reaktion gefundenen Substratumsatzgeschwindigkeiten aus (Washabaugh und Jenks, 1988). Im proteingebundenen Zustand wird die Abspaltungsgeschwindigkeit des Protons um mehrere Größenordnungen beschleunigt, was eine Substratbindung ermöglicht (Kern *et al.*, 1997). Nach der Substratanlagerung erfolgt die Abspaltung einer nukleophilen Gruppe und die Anlagerung eines Elektrophils. Holzer und Beaucamp isolierten 1959 das dabei entstehende Zwischenprodukt der PDC-Reaktion Hydroxyethyl-ThDP. Abschließend erfolgt die Abspaltung des Reaktionsproduktes. Die 4'-Aminogruppe und das N1' des Aminopyrimidinrings sind ebenfalls essentiell für die Katalyse der ThDP-Enzyme (Schellenberger, 1967, Golbik *et al.*, 1991). Ursache dafür ist wahrscheinlich die Bildung einer iminotautomeren Form des Aminopyrimidinrings, welche durch die Wechselwirkung des N1' mit einem in allen ThDP-Enzymen konservierten Glutamatrest stabilisiert wird und die Deprotonierung des C<sub>2</sub>-Atoms des Thiazoliumrings erleichtert (Kern *et al.*, 1997).



**Abb. 1:** Thiamindiphosphat.

Für die Bindung von ThDP in den Holoenzymen sind zweiwertige Metallionen, in der Regel  $Mg^{2+}$ , essentiell (Schellenberger *et al.*, 1966, Eppendorfer *et al.*, 1993, Leblova und Valik,

1981). Die Cofaktoren sind in allen bisher untersuchten PDC-Spezies bei pH-Werten unter 6,5 relativ fest gebunden. Sie dissoziieren jedoch zunehmend mit steigendem pH-Wert (Gounaris *et al.*, 1971). Das entstehende Apoenzym, die Proteinkomponente des Enzyms, kann nach Reneutralisierung und Zugabe beider Cofaktoren zum aktiven Holoenzym rekonstituiert werden.

Pyruvatdecarboxylase katalysiert den vorletzten Schritt der alkoholischen Gärung, die nichtoxidative Decarboxylierung von Pyruvat zu Kohlendioxid und Acetaldehyd. Dieser wird anschließend durch Alkoholdehydrogenase (ADH) unter Reoxidation von NADH reduziert. PDC ist damit ein Enzym des anaeroben Kohlenhydratstoffwechsels. Pyruvatdecarboxylase ist jedoch auch in aerob lebenden Organismen bedeutsam. In den obligat aeroben Pflanzen gehört PDC zu den anaeroben Stressproteinen (ANPs) und ermöglicht eine zeitlich oder örtlich begrenzte Toleranz von Sauerstoffmangel. Vor allem während der Samenkeimung, wenn der Embryo von einer für Sauerstoff weitgehend undurchlässigen Testa umgeben ist, ist die Glykolyse der wichtigste Prozess der ATP-Gewinnung und das entstehende Pyruvat wird vor allem zu Ethanol umgesetzt.

Die Proteinsynthese pflanzlicher PDCs wird auf Transkriptionsebene reguliert und durch die Abwesenheit von Sauerstoff induziert (Laszlo und Lawrence, 1983). Nach Zufuhr von Sauerstoff nimmt die Menge der *PDC*-mRNA schnell ab (Umeda und Uchimiya, 1994). In Reis wurden zwei Isoformen beschrieben, wobei die enzymatisch aktivere Form nur unter anaeroben Bedingungen gebildet wird (Rivoal *et al.*, 1997). Auch in Erbsen steigt die Menge der *PDC*-mRNA unter anaeroben Bedingungen an. Bisher wurden 3 PsPDC-Strukturgene beschrieben. Wie im Vergleich der Nukleotid- mit Peptidsequenzen des nativen Proteins deutlich wurde, bilden die Expressionsprodukte von *PDC1* und *PDC2* das Enzym aus Erbsensamen (Mücke, 1997). In nativer PsPDC liegen beide Isoformen etwa im gleichen Verhältnis vor. Bisher wurde nur *PDC1* vollständig sequenziert. Die abgeleiteten Primärstrukturen der Expressionsprodukte aller drei Strukturgene weisen in den bekannten Bereichen eine Identität von ca. 90 % auf (Mücke *et al.*, 1996). Über 75 % Identität in Bezug auf *PDC1* besteht zu den Aminosäuresequenzen von *Nicotiana tabacum PDC2*, *Zea mays PDC1* (Kelley *et al.*, 1991) und *Oryza sativa PDC1* (Hossain *et al.*, 1994). Die Aminosäuresequenzen nichtpflanzlicher PDCs weisen einen geringeren Identitätsgrad zur von *PDC1* aus *Pisum sativum* abgeleiteten Primärstruktur auf - PDC aus *Zymomonas mobilis* und *Neurospora crassa* 42 % (Conway *et al.*, 1987, Alvarez *et al.*, 1993) und PDC aus *Saccharomyces cerevisiae* nur 30 % (Kellermann *et al.*, 1986).

Während die PDC-Spezies aus den Mikroorganismen *Zymomonas mobilis*, *Sarcina ventriculi*, *Aspergillus nidulans* und *Neurospora crassa* homomer sind (Bräu und Sahn, 1986, Lowe und Zeikus, 1992, Lockington *et al.*, 1997, Alvarez *et al.*, 1993), entstehen die PDCs aus pflanzlichen Organismen und *Saccharomyces cerevisiae* durch die Expression mehrerer Strukturgene.

Die auf Proteinebene isolierten Isoformen von PDC aus *Saccharomyces uvarum* waren aktiv (Kuo *et al.*, 1986, Farrenkopf und Jordan, 1992). Ebenso führte die Expression von *PDC1* aus *Saccharomyces cerevisiae* in *Escherichia coli* zu aktiver rekombinanter Hefe-PDC (Barburina *et al.*, 1994). Damit wurde deutlich, dass die enzymatische Aktivität von PDC aus Brau- und Bäckerhefe nicht grundlegend vom Vorhandensein zweier verschiedener Untereinheiten abhängt.

Sowohl rekombinante als auch native Hefe-PDC besitzen bei optimalem pH und 30 °C einen  $k_{\text{cat}}$ -Wert von etwa  $60 \text{ s}^{-1}$  je Untereinheit. Ähnliche Werte wurden auch für die pflanzlichen Enzyme aus Erbsensamen (Mücke *et al.*, 1995), Weizenkeimen (Zehender *et al.*, 1987) und Mais (Lee und Langston-Unkefer, 1985) gefunden. PDC aus *Zymomonas mobilis* ist mit einem mehr als doppelt so hohen  $k_{\text{cat}}$ -Wert und einem  $K_{\text{M}}$ -Wert unter 1 mM die bisher effizienteste aller bisher untersuchten Pyruvatdecarboxylasen (Bringer-Meyer *et al.*, 1986).

Ein physiologisch wichtiger Aspekt pflanzlicher PDCs ist die Abhängigkeit der kinetischen Parameter vom pH-Wert, die eine Regulation der Proteinaktivität in Abhängigkeit des Sauerstoffangebots ermöglicht. Unter aeroben Bedingungen liegt der pH-Wert des Cytosols über dem Neutralwert. PDC, deren pH-Optimum bei etwa 6,0 liegt, ist dann vor allem bei niedrigen Substratkonzentrationen kaum aktiv und das in der Glykolyse gebildete Pyruvat wird hauptsächlich von PDH umgesetzt. Deren  $K_{\text{M}}$ -Wert für Pyruvat ist erheblich geringer ( $57 \mu\text{M}$  für mitochondriale PDH aus Erbsen, Miernyk und Randall, 1987;  $120 \mu\text{M}$  für plastidale PDH aus Erbsen, Camp und Randall, 1985) als der  $S_{0,5}$ -Wert von PDC ( $0,9 \text{ mM}$  bei pH 6,0 für native PsPDC, Mücke *et al.*, 1995). Das entstehende Acetyl-CoA wird anschließend über den Citratzyklus und die Atmungskette oxidiert. Nach Einsetzen einer anaeroben Stresssituation ist dieser Stoffwechselweg blockiert und Pyruvat muss in Gärungsprozessen umgesetzt werden. Dabei fällt der pH-Wert, was entweder durch die einsetzende Lactatbildung (Perata und Alpi, 1993) oder durch die Beeinträchtigung der Funktion der protonenpumpenden  $\text{Mg}^{2+}$ -ATP-abhängigen ATPasen der Tonoplasten- und Plasmamembran (Saint-Ges *et al.*, 1991) verursacht wird. Der Abfall des cytosolischen pH-Wertes führt zur Inaktivierung der Lactatdehydrogenase, die ein pH-Optimum von ca. 8,0 besitzt (Rivoal und Hanson, 1994) und zu einer Erhöhung der PDC-Aktivität.



Dagegen findet in *Saccharomyces cerevisiae* auch in Anwesenheit von Sauerstoff eine alkoholische Gärung statt, wenn auf Grund hoher Glukosekonzentrationen der Pyruvat Spiegel ausreichend hoch ist. Neben der Menge des Expressionsproduktes von *PDC1* (Hohmann und Meacock, 1998) wird die Regulation auf Transkriptionsebene ebenfalls durch das Angebot an Kohlenhydraten, insbesondere Glukose, bestimmt (Hohmann *et al.*, 1996).

Pyruvat ist für viele PDC-Spezies nicht nur Substrat, sondern auch Aktivator, was in sigmoiden v/S-Charakteristiken resultiert. Dieses Verhalten wurde zuerst 1969 von Davies und Corbett für PDC aus Weizenkeimen beschrieben. Wenig später wurde von mehreren Arbeitsgruppen die Substrataktivierung von Hefe-PDC nachgewiesen (Bouitoux und Hess, 1970, Schellenberger und Hübner, 1970, Ullrich und Donner, 1970). Nach der Beschreibung eines kinetischen Modells der Aktivierung (Hübner *et al.*, 1978) wurden zahlreiche Arbeiten zur Aufklärung der strukturellen Ursachen veröffentlicht. Die Untersuchung von p-Chlormercuribenzoat- und Brompyruvamid-modifizierter PDC machten die Beteiligung eines Cysteinrestes wahrscheinlich (Hübner *et al.*, 1988). Auf Grund der kinetischen Parameter eines Fusionsproteins (Zheng *et al.*, 1993) und verschiedener Expressionsprodukte von Punktmutanten des rekombinanten Hefeenzym (Barburina *et al.*, 1994) wurde der Cysteinrest in Position 221 als Bindungsort des regulatorischen Substrates vorgeschlagen und ein Signalübertragungsweg zum mehr als 20 Å entfernten aktiven Zentrum postuliert (zusammengefasst bei Jordan *et al.*, 1998). In Gegenwart des artifiziellen allosterischen Aktivators Pyruvamid kristallisierte Hefe-PDC enthielt allerdings nur in 2 von 4 aktiven Zentren und im Zwischenraum der mittleren und N-terminalen Domäne Aktivatormoleküle, jedoch nicht in der Nähe des Cysteinrestes 221 (Lu *et al.*, 2000).

Auch PDC aus Erbsensamen wird durch Pyruvat aktiviert (Mücke *et al.*, 1995). Allerdings ist dieser Prozess deutlich schneller und die Dissoziationskonstante des Regulatorsubstrates ist kleiner als beim Hefeenzym (Dietrich und König, 1997). Das Enzym aus *Zymomonas mobilis* ist bisher das einzige unter den PDC-Spezies, für das keine Substratregulierung gefunden wurde (Bringer-Meyer *et al.*, 1986).

Neben der Kontrolle der Transkription und der Aktivitätsregulation über den pH-Wert des Cytosols stellt die Kooperativität von Pyruvatdecarboxylasen gegenüber dem Substrat und die damit verbundene Substrataktivierung einen wichtigen Aspekt der Regulation der PDC-Aktivität in pflanzlichen Organismen dar. Diese Eigenschaften resultieren in einer Unterdrückung der PDC-Aktivität unter normoxischen Zuständen. Für die Pflanzen ist dann eine niedrige PDC-Aktivität günstig, da im Gegensatz zu Citratzyklus und

Atmungskettenphosphorylierung, welche sich der PDH-Reaktion anschließen, bei der nichtoxidativen Decarboxylierung und der folgenden Reduktion des Acetaldehyds kein ATP gewonnen wird.

Pyruvatdecarboxylasen sind oligomere Enzyme. Alle Untereinheiten der PDC-Spezies mit bekannter Tertiärstruktur bestehen aus 3 Domänen ( $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  bzw. PYR, R und PP). Die Assoziation zum Dimer erfolgt über größere Bereiche der  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Domänen zweier Untereinheiten. Die ThDP-Bindung wird einerseits über Wasserstoffbrückenbindungen und ionische Wechselwirkungen zwischen der Pyrophosphatgruppe,  $Mg^{2+}$  und Seitenketten der  $\gamma$ -Domäne realisiert. Weiterhin tragen auch Wechselwirkungen zwischen dem Aminopyrimidinring und der  $\gamma$ -Domäne sowie der  $\alpha$ -Domäne der zweiten Untereinheit zur Bindung des ThDP bei. Die Art der Cofaktorbindung macht das Dimer zur kleinstmöglichen funktionellen Einheit (Furey *et al.*, 1998). Diese Strukturprinzipien wurden auch für die verwandten ThDP-Enzyme Benzoylformiatdecarboxylase (Hasson *et al.*, 1998), Transketolase (Lindqvist *et al.*, 1992) und Pyruvatoxidase (Muller und Schulz, 1993) beschrieben. Unterschiede bestehen in der Anordnung der Dimere, welche die tetrameren Pyruvatdecarboxylasen aus *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces uvarum* und *Zymomonas mobilis* bilden (Dobritzsch, 1998).

Bisher konnte noch keine Kristallstruktur einer pflanzlichen Pyruvatdecarboxylase aufgeklärt werden. Auch über die Quartärstrukturen der einzelnen Spezies ist nicht viel bekannt. PDC aus Reis ist wie die bereits beschriebenen Hefe- und *Zymomonas mobilis*-Enzyme tetramer (Rivoal *et al.*, 1990). Andere PDCs aus Pflanzen besitzen eine höhere molare Masse (Zehender *et al.*, 1987, Lee und Langston-Unkefer, 1985, Mücke *et al.*, 1995). Der genaue Oligomerisierungsgrad der PDC-Spezies aus Mais und Erbsen konnte bisher nicht bestimmt werden. Eine ungewöhnliche Quartärstruktur wurde für PDC aus *Neurospora crassa* gefunden. Das Enzym bildet in den Zellen Bündel aus Filamenten mit 8 bis 10 nm Durchmesser (Alvarez *et al.*, 1993). Während der Oligomerisierungsgrad der einzelnen PDC-Spezies stark divergiert, sind die molaren Massen der Untereinheiten sehr ähnlich. Für native PsPDC wurden Massen von 63,4 und 65,0 kDa gefunden (Mücke *et al.*, 1996). Damit sind die Monomere des Enzyms wie die der PDC-Spezies aus Reis (Rivoal *et al.*, 1990) und Weizen (Zehender *et al.*, 1987) relativ groß. Die mit 57 kDa kleinsten Untereinheiten weisen die Pyruvatdecarboxylasen des Prokaryoten *Sarcina ventriculi* (Lowe und Zeikus, 1992) und der Weinhefe *Hanseniasporum uvarum* (Holloway und Subden, 1994) auf.

---

Der Oligomerisierungszustand der PDC-Spezies hängt vom pH-Wert ab. Hefe-PDC dissoziiert bei höheren pH-Werten zunehmend in Dimere (König *et al.*, 1992). Auch die Filamentbündel aus *Neurospora crassa* wurden bei pH 8,0 aufgespalten (Rosa *et al.*, 1990). In Gelfiltrationsexperimenten wurden bei pH 9,5 für PDC aus Erbsensamen kleinere Oligomere gefunden, während die molare Masse des Enzyms bei pH 6,0 größer als 1 MDa ist (Dietrich, 1996). Dagegen ist PDC aus *Zymomonas mobilis* bei pH-Werten von 5,0 bis 9,0 fast ausschließlich tetramer (König *et al.*, 1996).

Zielstellung der vorliegenden Arbeit war es, genauere Aussagen über den Oligomerisierungszustand und die Quartärstruktur nativer PsPDC zu gewinnen. Weiterhin sollte mit der Expression von *PDCI* aus *Pisum sativum* und der Isolation des Expressionsproduktes ein homomeres Protein mit bekannter Aminosäuresequenz gewonnen werden, welches definierte Modifizierungen der Primärstruktur erlaubt. Ein weiteres Ziel war die strukturelle und kinetische Charakterisierung des entsprechenden rekombinanten Proteins, um im Vergleich zum heteromeren nativen Enzym den Einfluss der verschiedenen Untereinheiten auf Aktivität, Regulation und Struktur zu bestimmen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Chemikalien

Aceton	Riedel-de Hen AG, Seelze
Acrylamid (30%ig)	Carl-Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Adeninsulfat	AppliChem GmbH Darmstadt
Agar	Carl-Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Agarose	Carl-Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Ammoniumsulfat	Merck KGaA, Darmstadt
Ammoniumperoxodisulfat	Carl-Roth GmbH & Co, Karlsruhe
ATP	Amersham Pharmacia Biotech
Bisacrylamid (2%ig)	Carl-Roth GmbH & Co, Karlsruhe
BISTRIS	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Bromphenolblau	Merck KGaA, Darmstadt
iso-Butanol	Laborchemie Apolda
<i>casamino acids</i>	DIFCO Laboratories, Detroit
CHES	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Coomassie-Brillantblau	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
dNTPs	Roche Diagnostics GmbH
DTE	Carl-Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Eichproteine fur die Gelfiltration	Roche Diagnostics GmbH
Essigsäure	Riedel-de Hen AG, Seelze
Ethidiumbromid	ICN Pharmaceuticals
Galaktose	AppliChem GmbH Darmstadt
Glukose	AppliChem GmbH Darmstadt
Glycerol	Merck KGaA, Darmstadt
Glycin	Carl-Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Hefeextrakt	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Histidin	AppliChem GmbH Darmstadt
Leucin	AppliChem GmbH Darmstadt
MES	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt
NADH	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Natriumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumpyruvat	Merck KGaA, Darmstadt
PEG 6000	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Pepton	Carl-Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Phosphorsäure (85%)	Laborchemie Apolda
Protaminsulfat (Grade II)	SIGMA Chemical Co., Munchen
Salzsäure (25%, 37%)	Merck KGaA, Darmstadt
SDS	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
ThDP	Merck KGaA, Darmstadt
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
TRICIN	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg

---

TRIS	Merck KGaA, Darmstadt
Trypton	DIFCO Laboratories, Detroit
Tryptophan	AppliChem GmbH Darmstadt
Uracil	AppliChem GmbH Darmstadt
<i>Yeast nitrogen base</i>	DIFCO Laboratories, Detroit

### 2.1.2. Proteine

ADH	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
<i>mung bean nuclease</i>	New England Biolabs
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase	Stratagene
Restriktionsendonukleasen	Amersham Pharmacia Biotech
T4 DNA-Ligase	Amersham Pharmacia Biotech
Rinderserumalbumin	Merck KGaA, Darmstadt
Ziegen-Antikaninchen-Immunglobulin Peroxidasekonjugat	SIGMA Chemical Co., München

### 2.1.3. Säulenmaterialien

Gelmaterial	Säulengröße	Hersteller
Fractogel <sup>®</sup> EMD BioSEC(S)	1,6 x 60 cm	Merck KGaA, Darmstadt
Resource Q	1 und 6 ml	Amersham Pharmacia Biotech
Source Q	2,6 x 2,5 cm	Amersham Pharmacia Biotech
Sephadex G-25 (HiTrap)	5 ml	Amersham Pharmacia Biotech

### 2.1.4. Stämme

<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' <i>proAB lacI<sup>q</sup>ZΔM15 Tn10</i> (Tet <sup>r</sup> )] <sup>c</sup>
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	B F <sup>-</sup> <i>dcm ompT hsdS</i> (r <sub>B</sub> -m <sub>B</sub> -) gal λ(DE3) (Studier <i>et al.</i> , 1990)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> W303 735	MAT/a <i>his3Δ1 leu2 trp1-289 ade2 ura3-52/</i> MAT/α <i>his3Δ1 leu2 trp1-289 ade2 ura3-52</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> INVSc1	MAT/a <i>his3Δ1 leu2 trp1-289 ura3-52/</i> MAT/α <i>his3Δ1 leu2 trp1-289 ura3-52</i>

### 2.1.5. Vektoren

pPCR-Script Amp SK(+)	Stratgene
pUC 18	(Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)
pYES2	Invitrogen

---

## 2.2. Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1. Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von DNA wurde spektroskopisch bei 260 nm bestimmt, wobei ein OD-Wert von 1 einer Konzentration von 50 µg/ml entspricht (Ausubel *et al.*, 1997). Da für die Bestimmung des OD-Wertes ein Spektrum aufgenommen wurde, konnte gleichzeitig die Reinheit der DNA anhand des Verhältnisses der Absorption bei 260 und 280 nm abgeschätzt werden.

### 2.2.2. Agarosegele

Agarosegele wurden nach Standardmethoden angefertigt (Sambrook *et al.*, 1983). Als Puffer wurde 1 x TAE (40 mM TRIS/ Acetat pH 8,5, 2 mM EDTA) verwendet.

Für die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das Gel Extraction Kit (Qiagen) nach den Protokollen des Herstellers verwendet.

### 2.2.3. Verdau mit Nukleasen

Der Verdau von Vektoren und DNA-Fragmenten mit Restriktionsendonukleasen erfolgte nach Standardmethoden (Sambrook *et al.*, 1983). Für alle Reaktionen mit mehreren Enzymen wurde OPA-Puffer (Amersham Pharmacia Biotech) verwendet. Puffer- und Enzymkonzentrationen wurden nach den Angaben des Herstellers gewählt. Die Spaltung der DNA zur Kontrolle des korrekten Aufbaus der Plasmide erfolgte für 2-3 h bei der für die eingesetzten Enzyme optimalen Temperatur. Um einen vollständigen Verdau für anschließende Ligationsexperimente zu gewährleisten, wurden die entsprechenden Ansätze über Nacht inkubiert. Wurden die Fragmente in weiteren Reaktionen eingesetzt, erfolgte, wenn möglich, eine Inaktivierung der Restriktionsendonukleasen durch 20 min Inkubation der Ansätze bei 65 °C. War eine Inaktivierung nicht möglich, wurden die Enzyme mit dem PCR Purification Kit (Qiagen) entfernt.

Um überhängende Enden zu entfernen, wurden die jeweiligen DNA-Fragmente mit *mung bean nuclease* (New England Biolabs) verdaut. Die Reaktionsbedingungen entsprachen den Empfehlungen des Herstellers. Das Enzym wurde im Anschluss an die Reaktion mit Hilfe des PCR Purification Kits (Qiagen) von der DNA getrennt.

#### 2.2.4. Plasmidpräparationen

Für alle Plasmidpräparationen aus *Escherichia coli* wurden 3-6 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin mit einer Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Die Präparation von Plasmiden für Sequenzierungen erfolgte mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers.

Alle anderen Präparationen wurden nach der Methode von Del Sal *et al.* (1988) präpariert.

#### 2.2.5. Polymerasereaktionen

Polymerasereaktionen waren für die Konstruktion von *PDC1* notwendig. Drei in pPCR-Script Amp SK(+) klonierte cDNA-Fragmente aus vorangegangenen Sequenzierungsarbeiten (Mücke *et al.*, 1996) wurden verwendet (Tab. 1).

**Tab. 1:** *PDC1*-Fragmente aus vorhergehenden Sequenzierungsarbeiten (Mücke *et al.*, 1996).

Fragment	Lage in <i>PDC1</i>
5´Fragment	-39 bis 597
Mittelfragment	488 bis 1310
3´Fragment	1197 bis Base 108 im 3´nichttranslatierten Bereich

Für die Rückgewinnung aus pPCR-Script Amp SK(+) wurden PCRs mit folgenden Primern (Gibco) durchgeführt:

---

5'Fragment:                    5' TATCAA**ACTCCATGG**AAACTGAAACTC 3'  
   5' GGAAGATTACAACCTATGC 3'

Mittelfragment:                5' GGCTGTGGTGAATAACTTGG 3'  
   5' TCATAACCGCAATTCTCAGG 3'

3'Fragment:                    5' CTATTCAAGCACATTCAGGC 3'  
   5' GAAT**GGATC**CTCTATTGGGGATTAGGAGGACG 3'

Die neu angefügten Schnittstellen *Nco*I am 5'Fragment und *Bam*HI am 3'Fragment sind hervorgehoben. Für die Isolierung aller Fragmente wurden 20 Zyklen mit 1 min bei 95 °C, 1 min bei 58 °C und 2 min bei 72 °C durchgeführt.

Die Fusion der Fragmente wurde mit einer Polymerasereaktion ohne zusätzliche Primer realisiert. Um die Ausbeute an Fusionsprodukt zu erhöhen, wurden 10 Reaktionszyklen (1 min bei 95 °C, 1 min bei 65 °C und 4 min bei 72 °C) für die Fusion des 5'Fragmentes mit dem Mittelfragment bzw. 6 min bei 72 °C für die Fusion zum Gesamtgen durchgeführt. Die Amplifizierung des gesamten Gens erfolgte mit den Primern 5' TATCAA**ACTCCATGG**AAACTGAAACTC 3' und 5' GAAT**GGATC**CTCTATTGGGGATTAGGAGGACG 3' mit 10 Zyklen (1 min bei 95 °C, 1 min bei 58 °C und 6 min bei 72 °C). Die PCR für das Anfügen einer *Bam*HI-Schnittstelle am 5'Ende und einer *Xba*I-Schnittstelle am 3'Ende wurde mit den Primern 5' ATAT**CGGATC**CAAATGGAAACTGAAACTC 3' und 5' ATATT**CTAGAT**TGATTTCTATTGGGGATTAGGAGG 3' in 20 Zyklen mit 1 min bei 95 °C, 1 min bei 58 °C und 6 min bei 72 °C durchgeführt.

Um die Fehlerrate bei der DNA-Synthese gering zu halten und alle PCR-Produkte direkt klonieren zu können, wurde *Pfu* DNA-Polymerase (Stratagene) eingesetzt. Puffer und Konzentrationen an Nukleotiden, Primern und Plasmiden bzw. DNA-Fragmenten wurden entsprechend den Empfehlungen von Stratagene gewählt. Das Ansatzvolumen betrug jeweils 20 µl. Alle PCRs und Polymerasereaktionen wurden in einem TRIO Thermoblock (Biometra) mit beheizbarem Deckel durchgeführt. Die Reaktionsgemische wurden vor der weiteren Verwendung mit dem PCR Purification Kit (Qiagen) nach den Protokollen des Herstellers gereinigt.



### 2.2.6. Ligationen

Alle Ligationen wurden in 1 x OPA-Puffer (Amersham Pharmacia Biotech) durchgeführt. Die Reaktion erfolgte in einem Volumen von 20 µl mit jeweils 200 fmol Vektor und Fragment, 1 mM ATP und 6 Weiss Einheiten T4-DNA-Ligase. Die Ansätze wurden 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und die Reaktion im Anschluss durch Inkubation für 10 min bei 65 °C gestoppt.

Für die Ligation von PCR-Produkten in pPCR-Script Amp SK(+) wurde das PCR-Script™ Amp Cloning Kit (Stratagene) eingesetzt. Die Reaktionsbedingungen und Konzentrationen entsprachen denen des Herstellers.

### 2.2.7. Transformationen in *Saccharomyces cerevisiae* und *Escherichia coli*

*Saccharomyces cerevisiae*- und *Escherichia coli*-Zellen wurden unter Verwendung von Standardtechniken (Ausubel *et al.*, 1997) für die Elektroporation (Dower *et al.*, 1988) kompetent gemacht. Kompetente *Escherichia coli*-Zellen wurden bei -80 °C bis zu 6 Monaten für die weitere Verwendung aufbewahrt, kompetente Hefezellen wurden nur unmittelbar nach der Präparation verwendet.

Für die Transformation wurden ein GenePulser von Biorad und Elektroporationsküvetten (2 mm) von Eurogentec eingesetzt. Die Transformation von *Escherichia coli*-Zellen erfolgte bei 2,5 kV, 200 Ω und 25 µF, die Einstellungen für Hefezellen betragen 1,5 kV, 200 Ω und 25 µF.

Ligationsansätze wurden vor der Transformation mittels Mikrodialyse entsalzt.

### 2.2.8. DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde nach der Methode von Sanger *et al.* (1977) durchgeführt. Dabei erfolgte die Synthese der DNA-Fragmente mit dem SequiTherm EXCEL™ Long-Read™ DNA Sequencing kit-LC (Biozym) unter Anwendung der Protokolle des Herstellers. Als Sequenzierprimer wurden IRD-41 markierte Standardprimer (M13 universal (-21) und M13 reverse (-29), MWG-Biotech) verwendet. Auftrennung und Detektion wurden an einem DNA sequencer model 4000 (MWG) nach den Protokollen des Herstellers durchgeführt. Die

---

Auswertung der Daten erfolgte mit den Programmen Base Image IR 2.0 (MWG) und Gene Runner (Hastings Software, Inc.).

### **2.2.9. Zellanzucht**

Die Anzucht von Bakterienkulturen erfolgte, wenn nicht anders angegeben, in LB-Medium (Sambrook *et al.*, 1983) bei 37 °C. Wildtyphefestämme wurden in YPD-Medium, transformierte Hefezellen in SD-Medium (Ausubel *et al.*, 1997) bei 30 °C angezogen. Bei der Zellanzucht für die Proteinpräparation wurden neben Adeninsulfat und den essentiellen Aminosäuren Leucin, Histidin und Tryptophan auch nichtessentielle Aminosäuren zugesetzt, um die Ausbeute an Zellen zu erhöhen. Eine 100 ml Vorkultur wurde mit einer Hefekolonie angeimpft und 72 h bei 30 °C geschüttelt. Die 12 x 0,8 l Hauptkulturen wurden mit jeweils 5 ml dieser Vorkultur angeimpft und für 48 h bei 30 °C geschüttelt. Als Kohlenhydratquelle wurde Galaktose (2 % w/v) verwendet, so dass die Proteinexpression während der Anzucht permanent induziert wurde.

## **2.3. Proteinchemische Methoden**

### **2.3.1. Präparation des nativen Holoenzym**

Die Präparation von nativer PsPDC erfolgte nach der Methode von Mücke *et al.* (1995), die wie folgt modifiziert wurde. Die Zeit der Acetonfällung und anschließenden Zentrifugation wurde auf jeweils 15 min reduziert. Ebenso wurden die Schritte der PEG 6000-Fällung auf jeweils 25 min verkürzt. Die Gelfiltration über Sephacryl S400 HR wurde durch eine Ultrazentrifugation ersetzt. Dafür wurde das zweite Ammoniumsulfatpellet in 50 ml 100 mM MES pH 6,2 resuspendiert. Nach 15 min Zentrifugation bei 15000 rpm wurde das Pellet verworfen und dem Überstand jeweils 1 mM Cofaktoren zugesetzt. In der anschließenden Zentrifugation für 2 h bei 35000 rpm wurde das Enzym pelletiert. Nach dem Auflösen des PDC-Pellets in 50 ml 20 mM BISTRIS pH 6,2 wurden unlösliche Bestandteile erneut für 15 min bei 15000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde in der anschließenden Anionenaustauschchromatographie entsprechend Mücke *et al.* (1995) weiterverwendet. Alle

angegebenen Zentrifugationen erfolgten mit einem 45 Ti Rotor in einer L8-60M Zentrifuge (Beckman Instruments). Die Reinheit des Proteins wurde mit SDS-PAGE überprüft. Alle Präparationsschritte erfolgten bei 10 °C, bzw. 4 °C (Zentrifugationen).

### **2.3.2. Präparation des nativen Apoenzyms**

Um das Apoenzym nativer PsPDC zu präparieren, wurde die Anionenaustauschchromatographie als letzter Reinigungsschritt modifiziert. Das Proteinpellet der Ultrazentrifugation wurde in 50 ml 50 mM TRICIN pH 8,6 aufgenommen, 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf eine XK 26/20-Säule mit 12 ml Source Q, die mit 20 mM TRIS-HCl pH 8,2 äquilibriert war, aufgetragen. Die Elution des Proteins erfolgte mit einem linearen Gradienten von 0 bis 30 % 20 mM TRIS-HCl pH 7,8, 1 M Ammoniumsulfat in einem Volumen von 40 ml. Fraktionen, deren Protein nach Rekonstitution mit den Cofaktoren eine spezifische Aktivität von mehr als 45 U/mg aufwies, wurden vereinigt und mit 25 % (w/v) Ammoniumsulfat gefällt. Je nach weiterem Verwendungszweck wurde das Präzipitat in dem entsprechendem Puffer aufgenommen und über HiTrap Sephadex G-25 umgepuffert. Die Reinheit wurde mittels SDS-PAGE geprüft.

Alle Präparationsschritte erfolgten bei 10 °C, bzw. 4 °C (Zentrifugationen).

### **2.3.3. Präparation rekombinanter PsPDC**

Geerntete Hefezellen wurden in 100 ml Aufschlusspuffer (100 mM MES pH 6,2, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 2 % (v/v) Glycerol, 2 mM DTE und 200 µM PMSF) aufgenommen und in einer Kugelmühle (BeadBeater, Biospec Products) aufgeschlossen. Der Durchmesser der verwendeten Glaskugeln betrug 0,25 bis 0,50 mm. Aufgeschlossen wurde in 6 Intervallen für jeweils 30 s. Anschließend wurden die Glaskugeln zweimal mit je 100 ml Aufschlusspuffer gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden vereinigt und 30 min bei 9000 rpm zentrifugiert. Rekombinante PsPDC wurde neben anderen Proteinen mit 8 % (w/v) PEG 6000 aus dem Überstand gefällt. Die Dauer der Fällung und der folgenden Zentrifugation bei 8000 rpm betrug jeweils 20 min. Beide Zentrifugationen erfolgten mit einem JA-10 Rotor in einer J2-HC Zentrifuge (Beckman Instruments). Das Pellet wurde gründlich in 150 ml Aufschlusspuffer resuspendiert. Nichtlösliche Bestandteile wurden für 20 min bei 15000 rpm

abzentrifugiert. Rekombinante PsPDC wurde mit 20 % (w/v) Ammoniumsulfat aus dem Überstand gefällt, 30 min bei 15000 rpm pelletiert und anschließend in 50 ml 30 mM BISTRIS pH 6,2, 1 mM DTE aufgenommen. Die resultierende Proteinlösung wurde nochmals für 20 min bei 15000 rpm zentrifugiert, um unlösliche Bestandteile abzutrennen. Die Zentrifugationen erfolgten mit einem 45 Ti Rotor in einer L8-60M Ultrazentrifuge (Beckman Instruments). Anschließend wurde der Überstand weiter mit 30 mM BISTRIS pH 6,2, 1 mM DTE verdünnt, bis die Leitfähigkeit der Lösung unter 5 mS/cm lag. Diese Proteinlösung wurde auf eine mit 30 mM BISTRIS pH 6,2, 1 mM DTE äquilibrierte XK 26/20-Säule mit 12 ml Source Q aufgetragen und mit einem linearen Gradient von 0 bis 30 % 30 mM BISTRIS pH 6,2, 1 M Ammoniumsulfat, 1 mM DTE in 40 ml eluiert. Nach der Zugabe von 1 mM ThDP wurden die enzymatischen Aktivitäten aller Fraktionen vermessen. Vor der weiteren Verwendung wurden die einzelnen Proteinfractionen über HiTrap Sephadex G-25 Säulen umgepuffert. Die Abtrennung von hefeeigener PDC wurde mit *westernblots* nachgewiesen. Die Reinheit wurde mit SDS-PAGE überprüft. Die Präparation des rekombinanten Apoenzyms erfolgte nach Eppendorfer (1991).  
Alle Präparationsschritte erfolgten bei 10 °C oder 4 °C (Zentrifugationen).

#### **2.3.4. Aufkonzentrieren von rekombinanter und nativer PsPDC**

PsPDC wurde über eine Ultrazentrifugation aufkonzentriert. Die Proben wurden vorher über HiTrap Sephadex G-25 Säulen entsprechend den Anforderungen der folgenden Experimente umgepuffert. Die Zentrifugation erfolgte 90 min bei 50000 rpm mit einem 70 Ti Rotor in einer L8-60M Ultrazentrifuge (Beckman Instruments). Das resultierende Pellet wurde in möglichst wenig Puffer resuspendiert und unlösliche Bestandteile durch eine Zentrifugation in einer Tischzentrifuge (5 min, 22000 g) abgetrennt.

Diese Methode konnte nur für die Konzentrierung der Holoenzyme eingesetzt werden. Um die Holoenzymform des rekombinanten Proteins zu stabilisieren, musste die verwendete Pufferlösung zusätzliche Cofaktoren enthalten (z.B. 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 30 µM ThDP für die Konzentrierung vor der Aufnahme der CD-Spektren).

Zur Aufkonzentrierung der Apoenzyme wurden geeignete Fraktionen mit 30 % (w/v) Ammoniumsulfat gefällt, in möglichst wenig Puffer resuspendiert und die entsprechenden Lösungen über HiTrap Sephadex G-25 Säulen umgepuffert. Die erreichbare Konzentration von maximal 2 mg/ml war für die durchgeführten Experimente ausreichend.

### 2.3.5. SDS-Polyacrylamid Gelelektrophoresen

Gelelektrophoresen wurde für die Beurteilung der Reinheit der Proteinfractionen nach der Präparation angewandt. Sie wurde nach der Methode von Laemmli (1970) durchgeführt.

Das Trenngel hatte eine Acrylamidkonzentration von 10 %, im Sammelgel lag Acrylamid 4 %ig vor. Die Gele hatten eine Schichtdicke von 0,75 mm und die Laufstrecke des als Marker verwendeten Bromphenolblaus lag zwischen 5 und 6 cm. Die Proteine wurden bei 20 mA getrennt, dabei wurden etwa 5 µg Protein pro Bahn aufgetragen.

### 2.3.6. Westernblots

*Westernblots* wurden nach der Methode von Towbin *et al.* (1979) unter Verwendung einer Fastblot-Apparatur (Biometra) durchgeführt. Für den Nachweis von hefeeigener PDC standen polyklonale Antikörper gegen PDC aus haploiden Hefestämmen zur Verfügung (Killenberg-Jabs *et al.*, 1996). Rekombinante und native PsPDC wurden mit polyklonalen Antikörpern gegen native PsPDC (Mücke *et al.*, 1995) nachgewiesen. Die Färbung erfolgte mit FAST DAB Tabletten (Sigma).

### 2.3.7. Bestimmung der Proteinkonzentration

#### *Bestimmung der Konzentration über den Extinktionskoeffizienten*

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde in der Regel ein Spektrum von 240 bis 340 nm aufgenommen und unter Berücksichtigung der Grundabsorption die Extinktion bei 280 nm bestimmt. In gereinigten Enzymfraktionen konnte die PDC-Konzentration über den nach Gill und Hippel (1996) bestimmten Extinktionskoeffizient von  $66000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  bei 280 nm, bezogen auf eine Untereinheit, ermittelt werden.

#### *Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford*

In Proben mit hohem Anteil an Fremdproteinen und lichtstreuenden Teilchen oder bei mit ThDP versetzten Fraktionen wurde die Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford (1976) angewandt. Für die Erstellung der Eichreihe wurden Proben von Rinderserumalbumin

im Bereich von 1 bis 10 mg/ml genutzt, wobei 2 µl Proteinlösung auf 1 ml Bradfordreagenz eingesetzt wurden.

Nach 3 min Inkubation erfolgte die spektrometrische Bestimmung der Extinktion bei 595 nm.

### **2.3.8. Bestimmung der Enzymaktivität**

Die Bestimmung der Enzymaktivität von Proteinfractionen erfolgte mit dem gekoppelten Test nach Holzer *et al.* (1956), bei dem der entstehende Acetaldehyd mit Hilfe von NADH und ADH zu Ethanol umgewandelt und die NADH-Abnahme bei 340 nm bestimmt wird. Im Reaktionsansatz wurden eingesetzt:

- 100 mM MES pH 6,2
- 8,9 U/ml ADH
- 0,19 mM NADH
- 33 mM Pyruvat
- 0,03-0,5 U/ml PDC

Alle Messungen wurden bei 30 °C an den Spektrometern DU 640 oder DU 70 (Beckman Instruments) durchgeführt. Die Aufnahme der verschiedenen v/S-Charakteristiken erfolgte unter Variation der oben angegebenen Bedingungen. Sowohl native als auch rekombinante PsPDC wurden vor den Messungen mit beiden Cofaktoren gesättigt, um die Proteine im Holoenzymzustand zu halten.

### **2.3.9. Gelfiltration zur Bestimmung der molaren Masse**

Alle Versuche wurden mit einer Fractogel<sup>®</sup> EMD BioSEC(S)-Säule (1,6 x 60 cm) (Merck KGaA, Darmstadt) durchgeführt, die für die Trennung von Proteinen mit molaren Massen zwischen 5 und 1000 kDa geeignet ist. Für die Kalibrierung wurden Albumin aus Hühnerei und Rind, Aldolase, Katalase und Ferritin verwendet. Alle Eichproteine und PDC-Proben hatten eine Konzentration von 0,5-1 mg/ml. Jeweils 500 µl wurden auf die Säule aufgetragen. Die Flussrate betrug 1,5 ml/min.

## 2.4. Spektroskopische Methoden

### 2.4.1. *Stopped-flow*-Messungen zur Substrataktivierung von PsPDC

Die Messung der enzymatischen Reaktion im Sekunden-Zeitbereich erfolgte prinzipiell nach der im vorangegangenen Kapitel beschriebenen Methode zur Aktivitätsbestimmung. Dabei wurde ein *stopped-flow*-Spektrometer der Firma Applied Photophysics verwendet. Soweit nicht anders vermerkt, wurden die Experimente bei 20 °C durchgeführt. Alle Proben wurden vor Beginn der Messungen 5 min im Gerät temperiert. Um PsPDC in der Holoenzymform zu stabilisieren, enthielten die Proben außerdem 250  $\mu\text{M}$   $\text{MgSO}_4$  und 100  $\mu\text{M}$  ThDP (Endkonzentrationen in der Küvette). ADH wurde in einem 100-fachen Überschuss, bezogen auf die Aktivität, zu PsPDC eingesetzt. Als Standardpuffer wurde 100 mM MES pH 6,2 verwendet. Bei der Untersuchung der Effekte verschiedener Ionen wurden für jedes Salz einzelne Puffer verwendet, deren Grundlage der oben angeführte MES Puffer war.

### 2.4.2. Bestimmung der intrinsischen Fluoreszenz

Alle Fluoreszenzmessungen wurden an einem FluoroMax-2 (Jobin Yvon, Spex) bei 20 °C aufgenommen. Die Anregungswellenlänge betrug 295 nm. Die Quenchkonstante des ThDP wurde unter Anwendung der Stern-Volmer Gleichung ausgewertet.

### 2.4.3. Bestimmung des Nah-UV Circular dichroismus

Alle CD-Spektren wurden an einem AVIV CD Spektrometer Modell 62A DS bei 20 °C aufgenommen. Die Apoenzymproben wurden in 20 mM MES pH 6,2, 2 mM  $\text{MgSO}_4$  vermessen, der Puffer für die Holoenzyme enthielt zusätzlich 30  $\mu\text{M}$  ThDP.

## 2.5. Elektronenmikroskopie

### 2.5.1. Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) und Bildauswertung

PsPDC Proben mit einer Konzentration von etwa 0,1 mg/ml wurden auf karbonbeschichtete, durch Beglimmung hydrophilisierte *grids* aufgetragen, welche danach mehrfach mit dem jeweiligen Probenpuffer (100 mM MES pH 6,2 für die Apoenzyme; 100 mM MES pH 6,2, 1 mM ThDP, 1 mM MgSO<sub>4</sub> für die Holoenzyme; 100 mM MOPS pH 7,4, 100 mM TRIS-HCl pH 8,2 und 100 mM CHES pH 9,4 für die pH-Wert-Abhängigkeit) gewaschen wurden. Zur Kontrastierung wurde 2 % Uranylacetat verwendet. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden an einem Philips 420 bei einer Spannung von 80 kV und einer 36000fachen Vergrößerung aufgenommen. Die Probenvorbereitung und die Aufnahme der elektronenmikroskopischen Abbildungen wurden freundlicherweise von Frau Ute Santarius durchgeführt.

Für die weitere Auswertung wurden die Aufnahmen geeigneter Filamente unter Verwendung eines Eikonix Densitometers bei einer Schrittlänge von 15 µm, was einer Pixelgröße von 0,42 nm im Objekt entspricht, digitalisiert. Abbildungen längerer und geordneter Filamente wurden ausgewählt und die Stränge mittels geeigneter Interpolationsverfahren gerade gebogen. Die Berechnung der 2D-Modelle erfolgte nach einer eindimensionalen Variante der von Saxton und Baumeister (1982) beschriebenen Korrelationsmittelung. Auf Grund von klar erkennbaren Beugungsreflexen im Powerspektrum wurde von den Filamentbildern die Fouriertransformierte berechnet und so gefiltert, dass nur die Strukturkoeffizienten im Bereich der Reflexe erhalten blieben. Das anschließend rückgerechnete Bild des Strangs wurde als Referenz für die Korrelationsmittelung eingesetzt, d. h. mit dem Bild des Originalfilaments auf periodisch übereinstimmende Bereiche untersucht und die gefundene Periode als Matrix für die Addition der Bildbereiche des Originalstrangs genutzt. Die Bildbearbeitung erfolgte mit den Programmen SEMPER (Saxton, 1996) und EM (Hegerl, 1996).

Die Auswertung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Reiner Hegerl durchgeführt.



### 2.5.2. Scanning transmission electron microscopy (STEM)

Alle PsPDC-Proben wurden auf eine Konzentration von etwa 50 µg/ml mit dem jeweiligen Probenpuffer (20 mM BISTRIS pH 6,2, 1 mM DTE für native PsPDC; 100 mM MES pH 6,2, 5 mM MgSO<sub>4</sub>, 5 mM ThDP für das rekombinante Apoenzym; 100 mM MES pH 6,2 für das rekombinante Apoenzym) verdünnt. 5 µl Aliquote wurden auf karbonbeschichtete, durch Beglimmung hydrophilisierte *grids* aufgetragen, welche anschließend viermal mit Wasser gewaschen wurden, um Puffersalze zu entfernen. Danach wurden die *grids* sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei - 80 °C über Nacht im Mikroskop gefriergetrocknet.

Die Messungen erfolgten an einem Vakuum Generator STEM HB-5 in Verbindung mit einem modularen Computersystem (Tietz Video und Image Processing Systems GmbH, Gauting). Für die Massenbestimmung wurden digitale Dunkelfeldbilder mit einer Größe von 512 x 512 Pixeln von nichtkontrastierten Proben aufgenommen. Die Beschleunigungsspannung betrug 80 kV, die nominale Vergrößerung war 200000fach und die Strahlendosis lag bei 300 Elektronen/nm<sup>2</sup>. Zusätzlich wurden von einigen Bereichen der *grids* wiederholte Aufnahmen bei niedriger Strahlungsintensität gemacht, um den strahlungsinduzierten Massenverlust zu bestimmen.

Die Auswertung der Bilder erfolgte mit dem Programm IMPSYS nach Engel und Reichelt (1988) und Müller *et al.* (1992). Dementsprechend wurden für die Bestimmung der Masse pro Länge (MPL) Bereiche entlang der Achse längerer Filamente gewählt. Außerdem wurden kleinere Oligomere vollständig in Messbereiche eingeschlossen und ihre totale Masse bestimmt. Die resultierenden Werte wurden entsprechend dem strahlungsinduzierten Massenverlust korrigiert und die Massenverteilung mit Gausskurven beschrieben. Weiterhin wurden die Abmessungen einzelner Oligomere und deren Massen bestimmt und gemittelt.

Die Aufnahme und Auswertung der Daten wurde freundlicherweise von Frau Dr. Shirley Müller durchgeführt.

### 3. Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1. Die Klonierung und Expression von *PDC1* aus *Pisum sativum*

##### 3.1.1. Die Fusion von *PDC1*

Aus vorangegangenen Sequenzierungsarbeiten (Mücke *et al.*, 1996) standen drei überlappende cDNA-Fragmente von *PDC1* zur Verfügung. Die in pPCR-Script Amp SK(+) Vektoren vorliegenden Fragmente wurden mittels PCR amplifiziert und dabei am 5'Ende eine *NcoI*-Schnittstelle und am 3'Ende eine *BamHI*-Schnittstelle angefügt.

Die Fusion der Fragmente erfolgte durch eine Polymerasereaktion ohne zusätzliche Primer. Es wurden jedoch mehrere Zyklen durchgeführt, um die Ausbeute an Fusionsprodukten zu erhöhen. Zuerst wurde das 5'Fragment mit dem Mittelfragment fusioniert. Das gesamte Gen entstand anschließend aus der Fusion des resultierenden 1,3 kb-Fragments und des 3'Fragments. Um Nebenprodukte zu entfernen, wurden die Polymerasereaktionsprodukte über ein Agarosegel aufgetrennt und das 1,8 kb-Fragment eluiert. Eine weitere PCR wurde genutzt, um dieses Fragment zu amplifizieren. Das PCR-Produkt wurde erneut in pPCR-Script Amp SK(+) ligiert und der Ligationsansatz in *Escherichia coli* XL1-Blue transformiert. Die Plasmide ampicillinresistenter Klone wurden präpariert. Plasmide, welche das 1,8 kb-Fragment enthielten, wurden sequenziert. Alle Klone enthielten im Gegensatz zur veröffentlichten Sequenz in Position 266 Cytosin statt Guanin. Um auszuschließen, dass eine Punktmutation während der PCR-Reaktionen zur Synthese von *PDC1* entstanden war, wurden einige Originalfragmente nochmals sequenziert und vorliegende Daten erneut ausgewertet. Dabei zeigte sich, dass der Rest in Position 266 tatsächlich ein Cytosin und nicht, wie in der Literatur angegeben, ein Guanin ist. Folglich steht in Position 89 der Peptidkette kein Glycin, sondern Alanin. Ein Vergleich mit den Sequenzen anderer PDC-Spezies (s. Mücke *et al.*, 1996) zeigte, dass dieser Rest offensichtlich konserviert ist.

##### 3.1.2. Die Expression von *PDC1* in *Escherichia coli*

Zu Beginn der Expressionsversuche war unklar, ob das Genprodukt von *PDC1* aus *Pisum sativum* überhaupt enzymatisch aktiv bzw. ausreichend stabil ist. Die Sequenzen einiger im

Vorfeld untersuchter Peptide eines Verdaus nativer PsPDC zeigten im Vergleich mit der Nukleotidsequenz von *PDC1* und *PDC2*, dass native PsPDC aus verschiedenen Isoenzymen zusammengesetzt ist (Mücke *et al.*, 1996). Die Unzugänglichkeit nativer PsPDC gegenüber dem Edmanabbau machte außerdem eine N-terminale Modifizierung des Enzyms sehr wahrscheinlich. Generell können Modifizierungen nicht nur die Stabilität von Proteinen, sondern auch ihre funktionellen Eigenschaften beeinflussen. Eine dem nativen Enzym adäquate Modifizierung konnte jedoch bei der Expression des Gens in einem prokaryotischen System nicht vorausgesetzt werden.

Als Expressionsvektor wurde pET19b (Novagen) gewählt. Das in den Fusionsexperimenten erzeugte PDC-Gen wurde mit *NcoI* und *BamHI* aus pPCR-Script Amp SK(+) geschnitten und in einen entsprechend vorverdauten pET19b-Vektor ligiert. Die Ligationsansätze wurden vorerst in *Escherichia coli* XL1-Blue transformiert. Die Plasmide ampicillinresistenter Klone wurden präpariert und auf den Einbau des richtig ligierten Expressionsvektors untersucht.

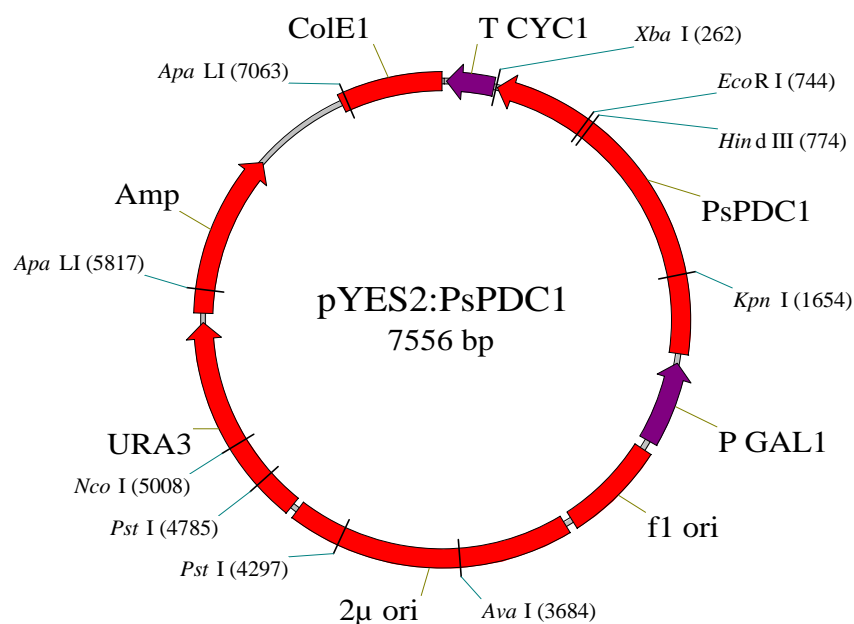
Als Wirtstamm wurde *Escherichia coli* BL21(DE3) verwendet. Einerseits ermöglicht das System eine hohe Ausbeute an Expressionsprodukt, andererseits wurde *PDC1* aus *Saccharomyces cerevisiae* bereits erfolgreich unter Verwendung von pET22b(+) in *Escherichia coli* BL21(DE3) exprimiert (Barburina *et al.*, 1994).

Bei einer Temperatur von 37 °C und Wachstum auf LB-Medium wurde bereits 30 min nach der Induktion mit Isopropylthiogalaktosid verstärkt ein Protein exprimiert, welches im SDS-Gel eine Bande bei etwa 63 kDa zeigte. Diese Größe entspricht der eines Transkriptions-/Translationsproduktes von *PDC1*. Anhand der Bandenform wurde bereits deutlich, dass das exprimierte Protein teilweise unspezifisch proteolytisch abgebaut war. Im *westernblot* zeigte dieses Expressionsprodukt eine deutliche Reaktion mit polyklonalem Antikörper gegen native PDC aus Erbsensamen. Das exprimierte Protein machte einen Anteil bis zu etwa 50 % des Gesamtproteins aus und befand sich größtenteils in der unlöslichen Fraktion des Cytoplasmas. In der löslichen Fraktion war keine PDC-Aktivität nachweisbar. Mit 8 M Harnstofflösung konnte das Expressionsprodukt gelöst werden. Eine Renaturierung zum aktiven Protein war jedoch bisher nicht möglich. Auch eine Expression bei 30 °C oder 25 °C statt bei 37 °C und die Zugabe von Thiamin zum Nährmedium, welche bei der Expression von rekombinanter PDC aus Brauherfe in *Escherichia coli* von Vorteil ist (Killenberg-Jabs *et al.*, 1997), ergab keinen Anteil an PDC-Aktivität im Cytoplasma.

Bei Versuchen einer periplasmatischen Expression mit pelB-Leader am N-Terminus im System pET22b(+)/ *Escherichia coli* BL21(DE3) konnte mittels *western blot* kein Genprodukt von *PDC1* nachgewiesen werden.

### 3.1.3. Die Expression von *PDC1* in *Saccharomyces cerevisiae*

Einige eukaryotische Enzyme werden in prokaryotischen Systemen nicht exprimiert oder bilden nichtaktive, häufig unlösliche Formen. In *Saccharomyces cerevisiae* kann ein Teil dieser Proteine in enzymatisch aktiver Form exprimiert werden. Dementsprechend war die Expression von *PDC1* in Hefe ein weiterer Versuch aktive rekombinante PsPDC zu erhalten. Als Expressionsvektor wurde pYES2 (Invitrogen) gewählt, der die Expression des klonierten Gens unter der Kontrolle des GAL1-Promotors erlaubt. Für einen ersten Test der Eignung des Systems wurden *PDC1* am 5'Ende eine *Bam*HI und am 3'Ende eine *Xba*I-Schnittstelle mittels PCR angefügt, das PCR-Produkt in pPCR-Script Amp SK(+) kloniert, die Plasmide ampicillinresistenter Klone präpariert und die enthaltenen PDC-Gene sequenziert. Fehlerfreie Gene wurden mittels der angefügten Schnittstellen in pYES2 kloniert. Das entstandene Konstrukt pYES2:PsPDC1(a) wurde in *Saccharomyces cerevisiae* W303 735 transformiert.



**Abb. 2:** Restriktionskarte des Expressionsvektors pYES2:PsPDC1.

Bei einer kontinuierlichen Expression mit Galaktose als Kohlenstoffquelle während der Anzucht konnte im *westernblot* rekombinante PsPDC in der löslichen Phase nachgewiesen werden. Die Frage nach der Aktivität des Genproduktes war jedoch ohne eine Reinigung des Proteins nicht möglich, da auch der Gehalt an hefeeigener PDC berücksichtigt werden musste. Im verwendeten Aktivitätstest nach Holzer *et al.* (1956) führt außerdem das Vorkommen von Lactatdehydrogenase (LDH) im Zelllysate zu Wertverfälschungen. Eine Abschätzung dieser LDH-Aktivität war wegen der relativ hohen Konzentration an PDC und hefeeigener ADH im Lysat ebenfalls nicht möglich. In einem Vergleich von Kulturen mit und ohne Expressionsplasmid nach 2 Tagen Zellwachstum bei 24 °C auf Galaktoseminimal-medium hatten Zellen mit pYES2:PsPDC1(a) eine etwa 1,5-fache PDC-Aktivität im Test nach Holzer *et al.* (1956) gegenüber dem Stamm ohne Plasmid. Die Expression von *PDC1* in *Saccharomyces cerevisiae* führte folglich zu einem löslichen und aktiven Enzym. Für eine Reinigung des Proteins waren die Ausbeuten jedoch zu gering.

Gründe für die niedrige Ausbeute an rekombinanter PsPDC bei der Verwendung von pYES2:PsPDC1(a) könnten zum einen im Vorkommen von 4 in Hefe selten verwendeten Arginin-Codons (CGG) und zum anderen am 5' nichttranslatierten Bereich der *PDC1*-mRNA liegen. Um eine bessere Übereinstimmung mit der Konsensussequenz für die Translationsinitiation AA/UAAUG (McCarthy, 1998) zu erreichen, wurde ein *PDC1*-enthaltender pPCR-Script Amp SK(+) Vektor mit *Bam*HI verdaut und die überhängenden Enden mit *mung bean nuclease* entfernt. Das PDC-Gen wurde dann mit *Xba*I aus dem Vektor geschnitten, der Verdau im Agarosegel aufgetrennt und *PDC1* aus dem Gel eluiert. pYES2 wurde mit *Hind*III verdaut, die überhängenden Enden mit *mung bean nuclease* abgebaut und ein weiterer Verdau mit *Xba*I durchgeführt. Anschließend wurde der Vektor im Agarosegel von den Resten der *multicloning site* getrennt, aus dem Gel eluiert und mit dem vorbereiteten PDC-Gen zu pYES2:PsPDC1 (Abb. 2) ligiert. Die Ligationsansätze wurden in *Escherichia coli* XL1 Blue transformiert, die Plasmide ampicillinresistenter Klone präpariert, auf ihre Richtigkeit überprüft und in *Saccharomyces cerevisiae* W303 735 transformiert. Das Konstrukt pYES2:PsPDC1 wurde in allen weiteren Arbeiten für die Expression rekombinanter PsPDC verwendet.

Um einen Vergleich der verschiedenen Konstrukte durchzuführen, wurden Kulturen von W303 735 in jeweils 1,6 l SD Medium bis zum Erreichen der stationären Phase angezogen, die 1) kein Plasmid, 2) pYES2:PsPDC1(a) und 3) pYES2:PsPDC1 enthielten. Die Zellen wurden in einer Kugelmühle aufgeschlossen und die Zelltrümmer abzentrifugiert. Die Gesamtaktivität der Überstände wurde im Test nach Holzer *et al.* (1956) bestimmt. In

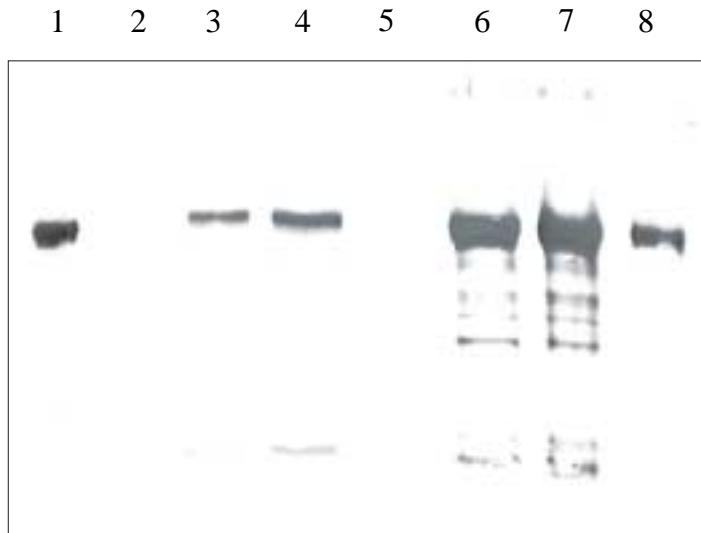
Analogie zum bekannten Verhalten der nativen Enzyme aus Hefe und Erbsensamen (Mücke *et al.*, 1995; Sieber *et al.*, 1983) wurde eine Ammoniumsulfatfällung (20 % w/v) durchgeführt. Bei dieser Salzkonzentration fällt native PDC aus Erbsensamen aus, während Hefe-PDC noch bis 25 % (w/v) in Lösung bleibt. Die Pellets wurden in 100 mM MES pH 6,2 und 1 mM Cofaktoren aufgenommen. Die Ergebnisse sind in Tab. 2 dargestellt. Mit der Ammoniumsulfatfällung wurde auch hefeeigene ADH und LDH abgetrennt, denn ein vergleichender Aktivitätstest ohne ADH im Messansatz führt zu keiner Abnahme der NADH-Konzentration.

**Tab. 2:** Expression des PDC1-Gens in W303 735.

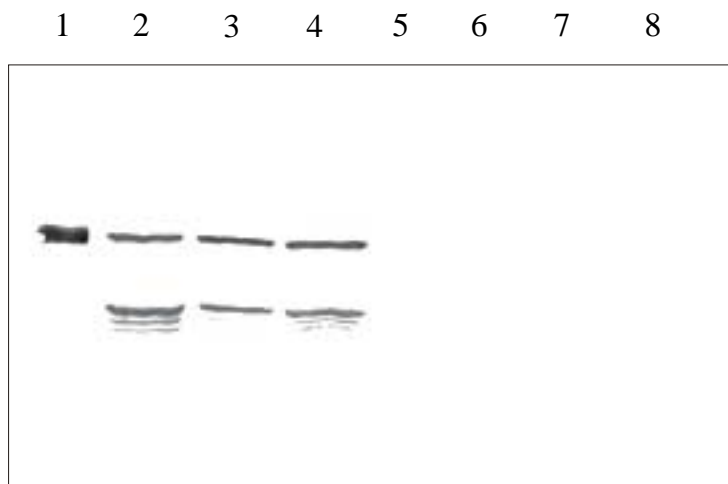
	enthaltene Plasmid	Gesamtaktivität (U)
Rohextrakt	-	266
	pYES2:PsPDC1 (a)	329
	pYES2:PsPDC1	496
Ammoniumsulfatpellet	-	-
	pYES2:PsPDC1 (a)	69
	pYES2:PsPDC1	256

Da die Untereinheiten von PDC aus Hefe und Erbsensamen nahezu identische Größen besitzen, konnte die Abtrennung hefeeigener PDC nur im *westernblot* mit polyklonalen Antikörpern gegen die jeweilige Enzymspezies (Mücke *et al.*, 1995, Killenberg-Jabs *et al.*, 1996) verfolgt werden (Abb. 3, 4). Der Hefe-PDC-Antikörper zeigt eine minimale Reaktion mit den bei 20 % (w/v) ausgefällten Proteinen, geht jedoch auch sehr geringe Kreuzreaktionen mit nativer PsPDC ein, was eine Kreuzreaktion mit rekombinanter PsPDC wahrscheinlich macht.

Damit wird deutlich, dass das homomere Expressionsprodukt von *PDC1* aktiv und das Expressionssystem *pYES2:PsPDC1* in *Saccharomyces cerevisiae* W303 735 geeignet für die Expression des rekombinanten Proteins ist.



**Abb. 3:** Westernblot der Rohextrakte und Ammoniumsulfatpellets von W303 735 mit Erbsen-PDC-Antikörpern. 1) *nPsPDC*, 2) Rohextrakt des Wildtyps, 3) Rohextrakt von W303 735 mit *pYES2:PsPDC1* (a), 4) Rohextrakt von W303 735 mit *pYES2:PsPDC1*, 5-7) Ammoniumsulfatpellets der Extrakte 2) - 4), 8) *nPsPDC*.



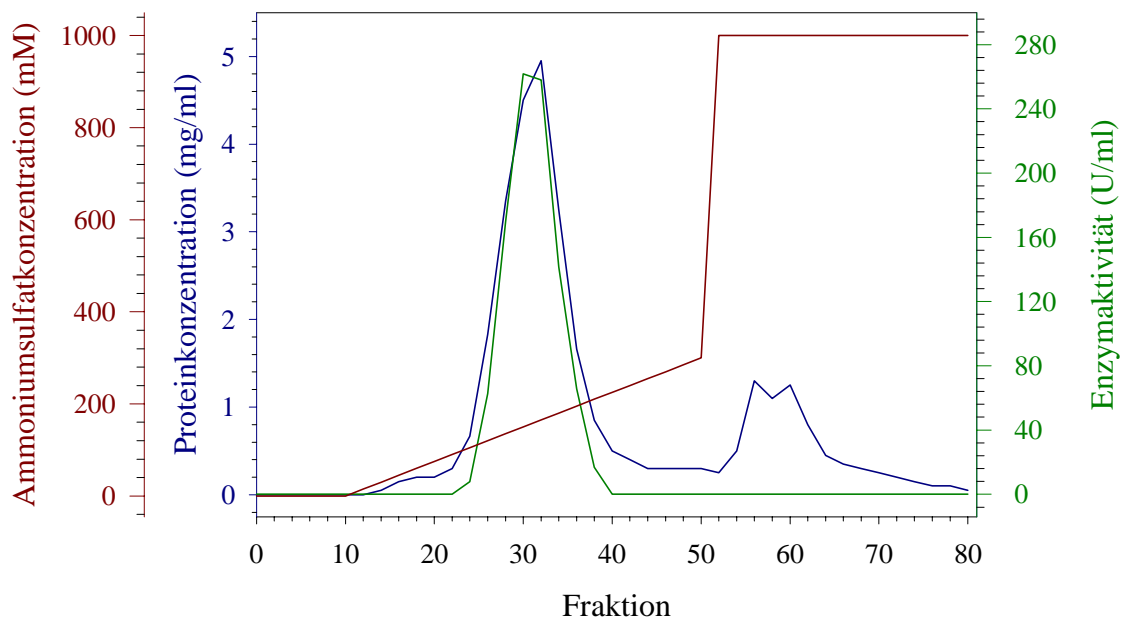
**Abb. 4:** Westernblot der Rohextrakte und Ammoniumsulfatpellets von W303 735 mit Hefe-PDC-Antikörpern. 1) Hefe-PDC, 2) Rohextrakt des Wildtyps, 3) Rohextrakt von W303 735 mit *pYES2:EPDC1* (a), 4) Rohextrakt von W303 735 mit *pYES2:EPDC1*, 5-7) Ammoniumsulfatpellets der Extrakte 2) - 4), 8) *nPsPDC*.

Die Verwendung des vomVertreiber des Plasmids pYES2 empfohlenen Hefestamms INVSc1 führte zu keiner Ausbeutesteigerung an exprimiertem Protein.

## 3.2. Die Präparation nativer und rekombinanter PsPDC

### 3.2.1. Präparation von rekombinanter PsPDC

Nach 48 h Anzucht der Hefezellen in 12 x 0,8 l Medium bei 30 °C wurden 120 g Zellen (feucht) gewonnen. Der Aufschluss erfolgte in einer Kugelmühle. Problematisch war die Abtrennung der entstehenden Zelltrümmer, da rekombinante PsPDC außergewöhnlich große Oligomere bildet (s. Kap. 3.3.2.) und dementsprechend bei hohen Beschleunigungen schnell sedimentiert. In einem ersten Schritt wurden deshalb nur größere Zellbestandteile bei weniger als 15000g Maximalbeschleunigung für 30 Minuten abzentrifugiert. In den folgenden Reinigungsschritten verringerte sich die Menge der kleineren Zelltrümmer, eine endgültige Abtrennung erfolgte jedoch erst mit der abschließenden Anionenaustauschchromatographie.



**Abb. 5:** Elutionsprofil einer Anionenaustauschchromatographie über Source Q (2,6 x 2,5 cm) (Elutionsbedingungen: 30 mM BISTRIS pH 6,2, 1 mM DTE (Startpuffer), 30 mM BISTRIS pH 6,2, 1 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 mM DTE (Elutionspuffer), Fraktionsgröße 1 ml).



Im Gegensatz zu nativer PsPDC (Mücke *et al.*, 1995) war eine Fällung der Nukleinsäuren mit Protaminsulfat nicht möglich. Selbst Konzentrationen von 0,1 % (w/v) führten zur vollständigen Fällung und Inaktivierung des rekombinanten Proteins. Ähnlich dem nativen Protein war dagegen das Verhalten von rekombinanter PsPDC bei der Ammoniumsulfatfällung. Bei einer Konzentration von 20 %  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (w/v) präzipitierte das Protein, während Fremdproteine zum größten Teil gelöst blieben. In diesem Schritt war auch die Abtrennung von hefeeigener PDC möglich, wie in *westernblots* nachgewiesen werden konnte (s. o.). Eine direkte Fällung nach der Gewinnung des Rohextrakts führte jedoch zu einem mehrphasigen Überstand mit Zwischenpellet nach anschließender Zentrifugation, was die weiteren Präparationsschritte erschwerte. Dementsprechend wurde PsPDC neben den meisten anderen Zellproteinen mit 8 % (w/v) PEG 6000 aus dem Rohextrakt gefällt, um eine Änderung des Milieus zu erreichen. Nach dem gründlichen Lösen des PEG-Pellets in Aufschlusspuffer konnten in einer anschließenden Zentrifugation weitere Fremdproteine abgetrennt werden, die sich nach der Fällung nicht mehr lösten. Rekombinante PsPDC wurde dann mit 20 % (w/v) Ammoniumsulfat aus dem resultierenden Überstand gefällt.

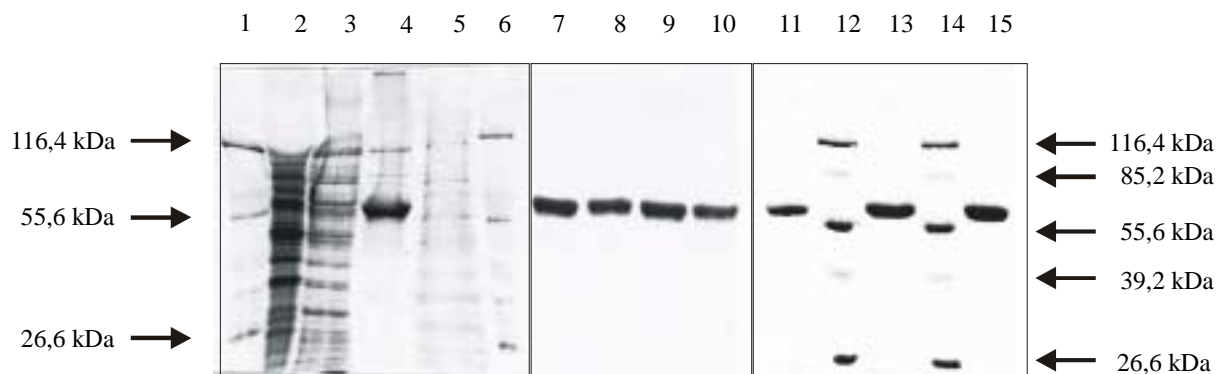
Die Bindung an das Anionenaustauschmaterial Source Q erfolgte auch bis zu einer Leitfähigkeit des Puffers von etwa 7 mS/cm noch vollständig, während native PsPDC vom gleichen Material bereits ab 5 mS/cm eluiert wird (bei gleichen Pufferzusammensetzungen und pH-Wert). Das rekombinante Protein eluierte ab einer Leitfähigkeit von 12 mS/cm, was einem Ammoniumsulfatgehalt von etwa 120 mM im Puffer entsprach (Abb. 5). Die Elution des Proteins erfolgte nicht einheitlich, sondern in bis zu drei benachbarten Peaks, welche nicht vollständig getrennt waren. Während der chromatographischen Reinigung wurde teilweise ThDP vom Protein abgespalten. Folglich war eine Rekonstitution der Proteinfractionen mit den Cofaktoren nach der Anionenaustauschchromatographie notwendig. Die Hauptfraktionen besaßen spezifische Aktivitäten bis zu 60 U/mg und hatten einen Gehalt an Fremdproteinen von höchstens 5 % (Abb. 6, Tab. 3).

Vor der weiteren Verwendung wurden die Proben über HiTrap Sephadex G-25 Säulen umgepuffert. Da niedrigkonzentrierte Proben vorher nochmals mit 25 % (w/v) Ammoniumsulfat gefällt wurden, konnte teilweise eine weitere Abtrennung von Fremdproteinen erreicht werden.

**Tab. 3:** *Reinigung von rekombinanter PsPDC aus W303 735 mit pYES2:PsPDC1. Die Angaben der Ausbeute beziehen sich auf die Gesamtaktivität.*

*\*Die Angaben von Proteinkonzentration und spezifischer Aktivität der Source Q - Fraktionen beziehen sich auf die durchschnittlichen Werte der Fraktionen.*

Reinigungsschritt	V (ml)	Gesamtaktivität [U]	Protein [mg/ml]	spezifische Aktivität [U/mg]	Ausbeute [%]	Anreicherungs-faktor
Aufschluss-suspension	350	8295	n. b.	-	100	-
Rohextrakt	280	6431	20,14	1,14	77,5	1
PEG-Pellet	160	5801	13,85	2,62	69,9	2,3
Zwischen-zentrifugation	135	4412	9,85	3,45	53,1	3,0
Ammoniumsulfat-pellet	6	2425	10,0	40,4	29,2	35,4
Source Q-Fraktionen *	12	2000	3,33	50,0	24,1	43,8



**Abb. 6:** *SDS-PAGE verschiedener Proben der rPsPDC-Präparation. 1, 6, 12, 14) Marker, 2) Rohextrakt, 3) PEG-Pellet, 4) Pellet der Ammoniumsulfatfällung, 5) Überstand der Ammoniumsulfatfällung, 7-10) Fraktionen der Source Q-Säule, 11, 13, 15) rPsPDC-Proben nach einer Ultrazentrifugation als weiteren Reinigungsschritt.*

Zum weiteren Aufkonzentrieren von nativer und rekombinanter PsPDC wurden die Proteine mittels Ultrazentrifugation sedimentiert. Dieser Schritt konnte auch als weiterer Reinigungsschritt von Randfraktionen der Anionenaustauschchromatographie genutzt werden. Um die Proteine in einem möglichst hocholigomeren Zustand zu halten, mussten deren Holoenzymformen dabei jedoch durch den Zusatz von Cofaktoren stabilisiert werden. PsPDC konnte zu mehr als 90 % aus dem Überstand präzipitiert werden. Das resultierende Proteinpellet war wachsartig, klar und schwer löslich. Eine Proteinkonzentration über 12 mg/ml konnte bei der Resuspension in Puffer nicht erreicht werden. Auch nachdem unlösliche Bestandteile, darunter auch nicht gelöste PsPDC, durch eine weitere Zentrifugation pelletiert wurden, waren Proteinlösungen mit mehr als 5 mg/ml PsPDC viskos.

### 3.2.2. Apoenzympräparation und Modifikation der Präparation nativer PsPDC

Die Verkürzung einiger Fällungsschritte der Präparationsmethode nach Mücke *et al.* (1995) verringerte die Präparationszeit geringfügig und resultierte außerdem in einer höheren spezifischen Aktivität der Proteinlösung nach der 2. Ammoniumsulfatfällung (bis zu 30 U/mg im Vergleich zu 3,3 U/mg). Die Gelfiltration über eine S400 HR-Säule konnte somit durch eine Ultrazentrifugation ersetzt werden. Problematisch war dabei das vollständige Lösen des Ammoniumsulfatpellets. Die Präzipitate einer Präparation aus 400 g Erbsen mussten in mindestens 50 ml 100 mM MES pH 6,2 aufgenommen und 1 Stunde oder länger resuspendiert werden. Trotzdem traten in der anschließenden Ultrazentrifugation (26000g bei maximalem Radius für 20 min) die zur Abtrennung von Zelltrümmern durchgeführt wurde, Verluste an Enzymaktivität auf. Vor der folgenden Ultrazentrifugation zur Sedimentierung nativer PsPDC wurden jeweils 1 mM Cofaktoren zugesetzt, um das Enzym in der hocholigomeren Holoenzymform zu stabilisieren. Die Zentrifugation für 2 h bei 35000 U/min in einer Beckman L8-60M Zentrifuge mit 45Ti-Rotor (entspricht 142000g bei maximalem Radius) führte zur nahezu vollständigen Sedimentation des Proteins. Nach der Resuspension des aus der Zentrifugation resultierenden Proteinpellets mussten nichtlösliche Bestandteile erneut mit einer weiteren Zentrifugation abgetrennt werden. Die Ausbeute an nativer PsPDC konnte durch die Substitution des Gelfiltrationsschrittes auf etwa 150 % des von Mücke angegebenen Wertes gesteigert werden (Mücke, 1997).

Das native Apoenzym konnte nicht nach der Vorschrift von Eppendorfer (1991) präpariert werden. Die Dissoziation der Cofaktoren ThDP und  $Mg^{2+}$  vom Protein nimmt ebenfalls mit

steigenden pH-Werten zu. Jedoch scheint deren Bindung fester oder die Dissoziation vom Protein langsamer als beim Hefeenzym oder rPsPDC zu sein. Eine Ablösung von ThDP wurde am besten erreicht, wenn als letzter Schritt der Präparation eine Anionenaustauschchromatographie bei pH 8,2 statt bei pH 6,2 durchgeführt wurde. Das Bindungs- und Elutionsverhalten der nativen PsPDC wurden durch die Variation des pH-Wertes nicht verändert. Während das Protein unter Verwendung von 30 mM TRIS-HCl pH 8,2 am Source Q - Material gebunden wurde, dissoziierte ThDP vom Enzym ab und konnte nicht an das Säulenmaterial binden. Dementsprechend wurde der Cofaktor ständig aus dem Gleichgewicht entfernt und vollständig vom Protein getrennt. Die Elution des ThDPs konnte spektroskopisch über die Absorption bei 280 nm verfolgt werden. Nachdem die Absorption wieder das Niveau der Basislinie erreichte, wurde das native Apoenzym eluiert.

### **3.3. Strukturelle Eigenschaften nativer und rekombinanter PsPDC**

#### **3.3.1. Die molare Masse der Untereinheiten rekombinanter PsPDC**

Die theoretische aus der cDNA-Sequenz abgeleitete molare Masse einer rPsPDC-Untereinheit beträgt 63980 Da. Damit ähnelt sie den molaren Massen von Untereinheiten anderer PDC-Spezies. Massenspektroskopische Untersuchungen an rekombinanter PsPDC ergaben einen Wert von  $64075 \pm 200$  Da. Dieser Wert stimmt gut mit der theoretisch ermittelten Masse der Polypeptidkette überein.

Die N-terminale Sequenzierung scheiterte, ebenso wie beim nativen Enzym (Mücke, 1997), wahrscheinlich an einer Modifizierung der N-terminalen Aminosäure. Dementsprechend konnte auch nicht geklärt werden, ob eine Abspaltung von Aminosäuren am N-Terminus im Rahmen einer kontrollierten posttranslationalen Proteolyse bei der Proteinsynthese stattfand. Möglicherweise ist eine definierte Modifikation essentiell für die Entstehung eines löslichen und aktiven Proteins und macht die Verwendung eines eukaryotischen Expressionssystems notwendig. Ein Indiz dafür ist die Expression von vollständig inaktivem, größtenteils unlöslichem Protein in *Escherichia coli*, während bei der Expression in *Saccharomyces cerevisiae* kein unlösliches Expressionsprodukt mittels *westernblot* nachweisbar war.

SDS-Polyacrylamidgelelektrophoresen rekombinanter PsPDC ergaben eine Bande, die einer Masse von 64,3 kDa entspricht (Abb. 6). Die bei nativer PsPDC beschriebenen Banden

(Mücke *et al.*, 1995) von 42 und 44 kDa sind Abbaubanden, die z. B. während der Probenvorbereitung entstehen können. Wurden die Elektrophoreseproben nicht für 5 min bei 95 °C inkubiert, um eine vollständige Denaturierung zu garantieren, traten diese Banden weder beim nativen noch beim rekombinanten Protein auf. Aufgrund der großen Zahl an Cysteinresten wurden die Proben mit 0,1 M Mercaptoethanol versetzt, da sonst neben den Proteinbanden bei 64 kDa auch höhere Aggregate entstanden, die im Gel Verunreinigungen vortäuschten.

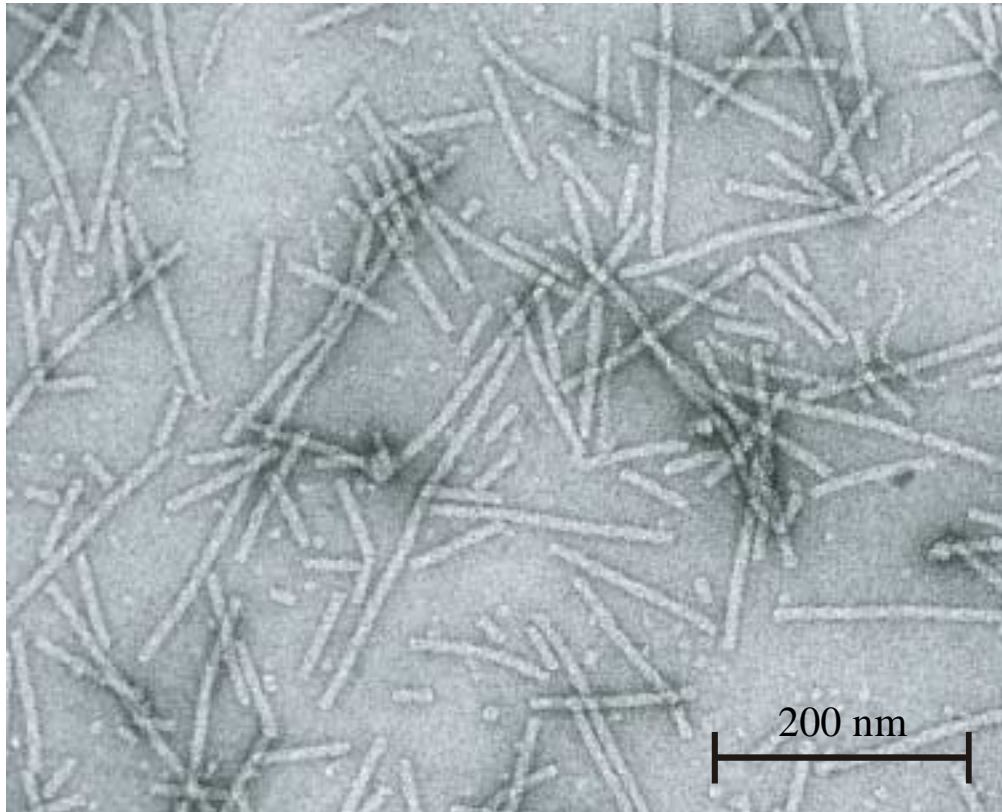
### 3.3.2. Die molaren Massen nativer und rekombinanter PsPDC

Native PsPDC ist ein Heterooligomer. Um die molare Masse des Enzyms bzw. dessen Oligomerisierungsgrad zu bestimmen, führten Mücke *et al.* (1995) native Gelelektrophoresen und Gelfiltrationsexperimente durch. In der Elektrophorese bei pH 8,0 wurden Banden gefunden, deren molare Massen denen von Tetrameren, Oktameren und Hexadekameren entsprachen. Ähnliche Ergebnisse wurden auch mit Gelfiltrationsexperimenten bei pH 9,5 erhalten (Dietrich, 1996). Dagegen eluierte das Protein bei pH 6,1, dem optimalen pH-Wert für Stabilität und Aktivität, immer im Ausschlussvolumen der verwendeten Gelfiltrationssäule MERCK Fractogel<sup>®</sup> EMD BioSEC (S) (1,6 x 60 cm), welche einen linearen Trennbereich bis 1000 kDa für globuläre Proteine aufweist.

Bereits mit den ersten elektronenmikroskopischen Arbeiten von Mücke (1997) wurde deutlich, dass PDC aus Erbsensamen eine außergewöhnliche Größe besitzt. Da die erhaltenen Bilder jedoch zum Teil divergierten, wurde zum damaligen Zeitpunkt native PsPDC als Hexadekamer oder höhere oligomere Form beschrieben.

Neuere, reproduzierbare elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten, dass das native Protein bei pH 6,1, dem Optimum für Stabilität und Aktivität, Filamente unterschiedlicher, bis zu einem Mikrometer Länge und einem Durchmesser von 8-9 nm bildet (Abb. 7). Der Oligomerisierungsgrad des nativen Enzyms ist unter diesen Bedingungen nicht genau definiert. Jedoch lässt sich aus den Abmessungen der Filamente ableiten, dass diese aus bis zu mehreren hundert Untereinheiten aufgebaut sind und die molaren Massen vieler Oligomere im Bereich von etwa  $10^7$  Da liegen. Neben den hocholigomeren Formen enthielten die Fraktionen des nativen Holoenzym auch einen geringen Anteil an kleineren, teilweise globulären Oligomeren, deren Durchmesser dem Durchmesser der Filamente entsprach (Abb. 7).

Rekombinante PsPDC verhält sich prinzipiell ähnlich. In ersten Reinigungsversuchen wurde bereits deutlich, dass auch rPsPDC im Ausschlussvolumen einer Gelfiltrationssäule Sephacryl S400 HR (Amersham Pharmacia Biotech) mit einem Trennbereich von 10 bis 2000 kDa eluiert.

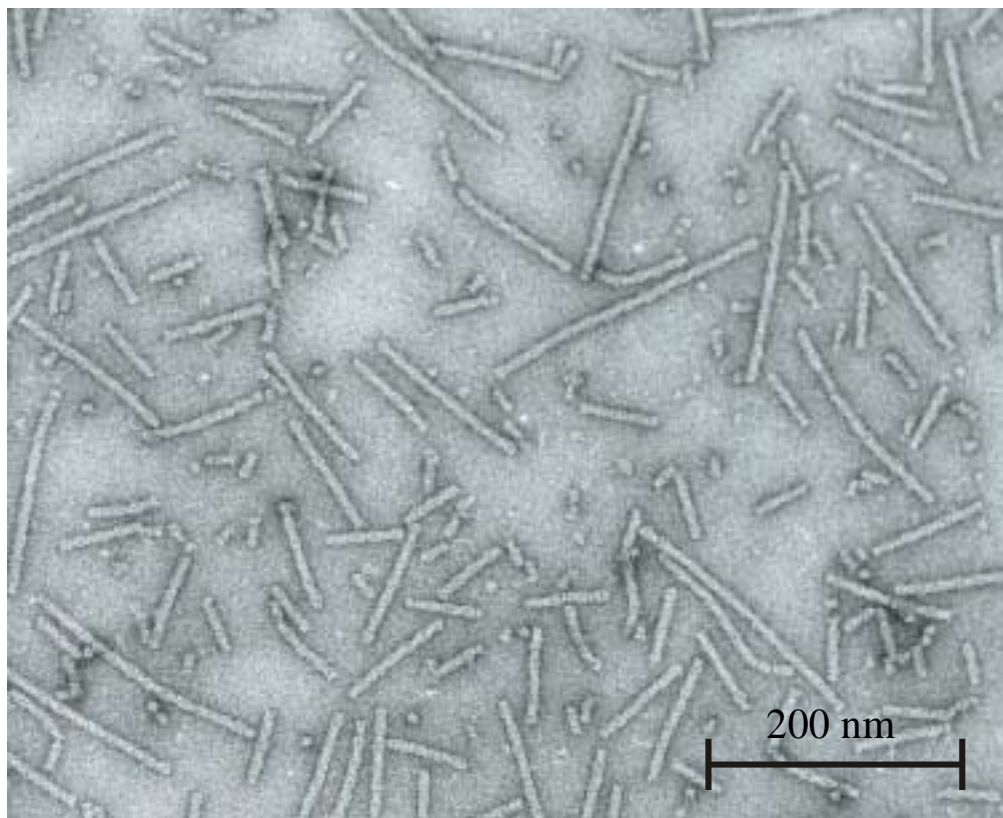


**Abb. 7:** Elektronenmikroskopische Aufnahme nativer PsPDC (Holoenzym in 100 mM MES pH 6,1, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 mM ThDP).

Elektronenmikroskopische Aufnahmen des rekombinanten Holoenzym zeigen neben einem geringen Anteil an kleineren Oligomeren ebenfalls Filamente mit einem Durchmesser von 8-9 nm, die bis zu 500 nm lang waren (Abb. 8). Folglich verhält sich das rekombinante Enzym in Bezug auf Oligomerisierungsgrad und molare Masse ähnlich wie das native Protein. Zur Ausbildung der hocholigomeren Formen sind demzufolge nicht zwingend zwei verschiedene Untereinheiten notwendig.

Die Länge der Filamente ist möglicherweise durch mechanische Beanspruchungen während der Präparation und Probenvorbereitung limitiert und wird durch weitere Parameter wie pH-Wert oder Cofaktorkonzentration beeinflusst (Kap. 3.3.5., 3.3.6.).

Eine ähnliche Form und Größe weisen PDCs aus einigen Ascomyceten auf (Alvarez *et al.*, 1993, Thompson-Coffe *et al.*, 1998). Eine vergleichbare Größe könnte auch PDC aus Mais besitzen. Lee und Langston-Unkefer (1985) beschrieben die Elution dieses Enzyms in der Nähe des Ausschlussvolumens einer Sepharose CL-6B-Säule, welche einen Trennbereich von 10 bis 4000 kDa besitzt. Dagegen wurden für die Enzymspezies aus Reis, *Zymomonas mobilis* und *Saccharomyces cerevisiae* molare Massen gefunden, welche einem Tetramer entsprechen (Rivoal *et al.*, 1990, Neale *et al.*, 1987, Gounaris *et al.*, 1971).



**Abb. 8:** Elektronenmikroskopische Aufnahme rekombinanter PsPDC (Holoenzym in 100 mM MES pH 6,1, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 1mM ThDP).

### 3.3.3. STEM Messungen von nativer und rekombinanter PsPDC

Um weitere Aussagen zur molaren Masse der PsPDC-Spezies zu gewinnen, wurden STEM-Experimente in Zusammenarbeit mit dem Biozentrum Basel durchgeführt.

Für rekombinante PsPDC wurden 2 Proben gemessen, eine Holoenzymprobe, welche jeweils 1 mM Cofaktoren enthielt, und eine Apoenzymprobe. Auch bei der Holoenzymprobe wurden neben längeren Filamenten kleinere Oligomere gefunden, die für eine Massebestimmung geeignet waren (Tab. 4).

**Tab. 4:** Molare Massen verschiedener PsPDC-Oligomere. Die Zahl der in einem Massepeak liegenden Oligomere ist in Klammern angegeben.

wahrscheinlicher Oligomerisierungsgrad	native PsPDC (kDa)	rekombinante PsPDC, Holoenzym (kDa)	rekombinante PsPDC, Apoenzym (kDa)
Dimer	146±44 (n≈170)		
Tetramer	294±51 (n≈305)	266±78 (n≈165)	246±80 (n≈735)
Oktamer	606±71 (n≈270)	542±81 (n≈140)	517±70 (n≈395)
Dodekamer	925±85 (n≈220)	798±71 (n≈70)	753±81 (n≈215)
Hexadekamer	1239±112 (n≈145)	1084±167 (n≈89)	

Die Auswertung von 319 Filamenten ergab eine Masse pro Länge von  $43,3 \pm 2,5$  kDa/nm. Dabei zeigten die Werte für längerer Filamente und kleinere Oligomere keine deutlichen Unterschiede.



Am genauesten definiert waren die Massen der kleinsten Proteinpartikel. Die Massen der verschiedenen Oligomere entsprechen Tetrameren und deren Vielfachen. Außerdem wurde ein geringer, aber messbarer Anteil an Hexameren gefunden. Formen mit weniger als 4 Untereinheiten traten seltener auf.

Weiterhin wurden für einige Oligomere sowohl die Abmessungen als auch die Massen bestimmt. Die längste Abmessung der Tetramere entspricht den kleineren Abmessungen der größeren Oligomere und damit dem Durchmesser der Filamente (Tab. 5).

Nur 7 sehr kurze Filamente konnten für die Bestimmung der MPL des rekombinanten Apoenzym verwendet werden. Der resultierende Wert lag bei  $42,1 \pm 2,4$  kDa/nm. Die Massen einzelner Oligomere waren etwas niedriger als die Massen der verschiedenen Oligomere des Holoenzym. Tetramere und Oktamere dominierten dabei die Zusammensetzung der gemessenen Probe, jedoch wurden auch größere Oligomere gefunden (Tab. 4).

**Tab. 5:** *Abmessungen niedrigoligomerer Formen rekombinanter PsPDC (Holoenzym).*

Oligomerisierungsgrad, entsprechend der Partikelmasse	Zahl der gemessenen Partikel	Breite (nm)	Länge (nm)
Tetramer	20	$7,7 \pm 0,7$	$5,9 \pm 0,6$
Oktamer	9	$8,5 \pm 0,9$	$13,5 \pm 2,2$
Dodekamer	7	$8,8 \pm 0,5$	$19,8 \pm 1,6$
Hexadekamer	4	$7,9 \pm 1,5$	$24,7 \pm 1,2$

Die Unterschiede zwischen Holo- und Apoenzym lassen sich nicht anhand der Massen der Cofaktoren erklären, wenn man davon ausgeht, dass im Holoenzym ein  $Mg^{2+}$  und ein ThDP je Untereinheit gebunden sind. Jedoch liegen alle Werte im Toleranzbereich.

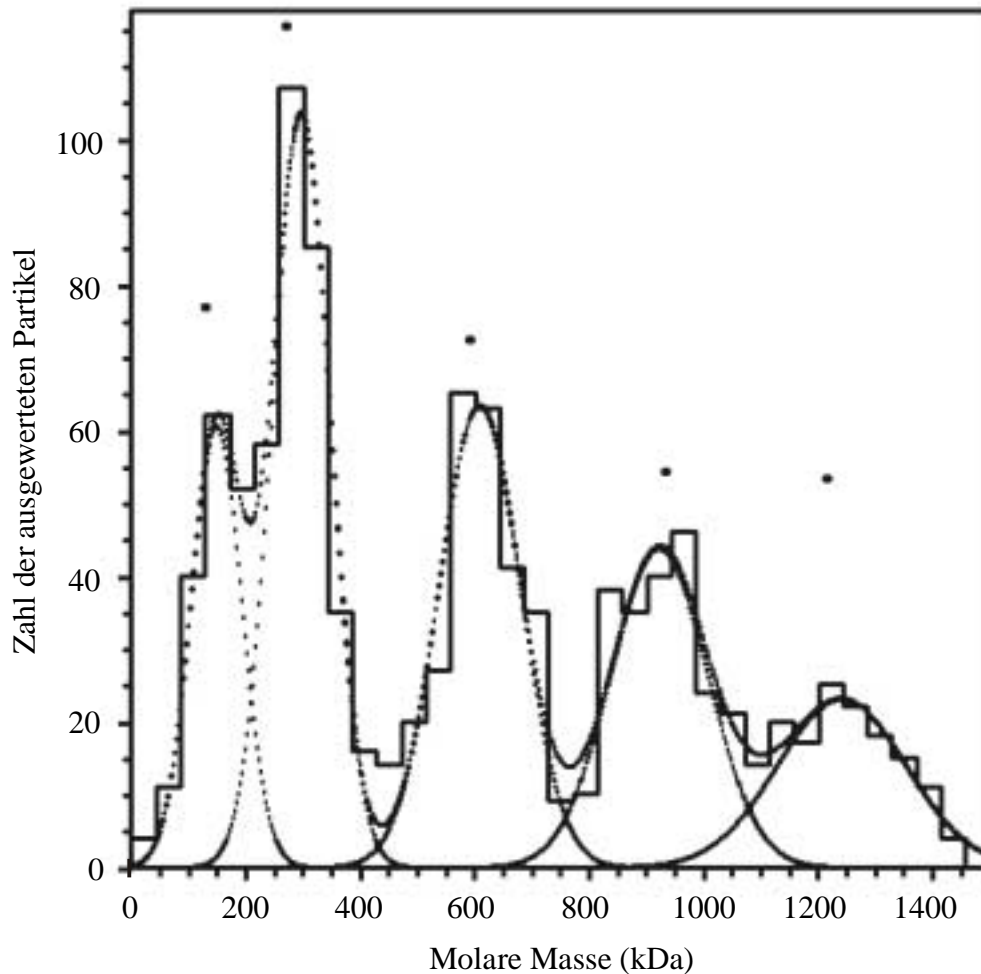
**Tab. 6:** *Abmessungen niedrigoligomerer Formen nativer PsPDC.*

Oligomerisierungsgrad, entsprechend der Partikelmasse	Zahl der gemessenen Partikel	Breite (nm)	Länge (nm)
Tetramer	20	$8,7 \pm 0,9$	$7,1 \pm 0,9$
Oktamer	11	$8,6 \pm 0,6$	$12,5 \pm 1,1$
Dodekamer	7	$9,0 \pm 0,9$	$18,8 \pm 0,8$
Hexadekamer	4	$8,9 \pm 0,9$	$26,6 \pm 1,2$

Während der Durchführung der Arbeiten zur nativen PsPDC waren die Untersuchungen zum Dissoziationsverhalten der Cofaktoren noch nicht abgeschlossen. Die gemessene Probe, welche kein zusätzliches  $\text{MgSO}_4$  und ThDP enthielt, bestand deshalb aus einem Gemisch von Apo- und Holoenzym. Dementsprechend lag auch native PsPDC in Form von verschiedenen kleineren Oligomeren und kürzeren Filamenten vor, was für diese Untersuchungen von Vorteil war. Die Masse pro Länge für filamentöse Formen betrug  $46,9 \pm 2,6$  kDa/nm. Bei den kleineren Oligomeren konnten, wie bei rPsPDC, distinkt große Formen unterschieden werden (Tab. 4, 6). Im Unterschied zu den Formen rekombinanter PsPDC wurde außerdem ein Anteil von Dimeren gefunden (Abb. 9).

Auch für native PsPDC wird deutlich, dass die Massendifferenz zwischen den verschiedenen oligomeren Formen der Masse eines Tetramers entspricht. Allerdings ist die Abweichung vom theoretischen Wert (259 kDa für ein theoretisches Tetramer aus den Massen der Untereinheiten) etwas größer als bei rPsPDC.

Die Untereinheiten aller PDC-Spezies mit bekannter Kristallstruktur bestehen aus drei Domänen ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) (Dyda *et al.*, 1993, Arjunan *et al.*, 1996, Dobritzsch *et al.*, 1998). Ein Dimer wird durch umfangreiche Wechselwirkungen zwischen den  $\alpha$ - und  $\gamma$ - Domänen zweier Monomere gebildet. Dimere sind die kleinsten funktionellen Einheiten, da die Cofaktorbindung im Zwischenraum beider Monomere erfolgt (Furey *et al.*, 1998). Dieses Strukturprinzip wurde auch für die verwandten ThDP-abhängigen Enzyme Transketolase aus



**Abb. 9:** Verteilung der molaren Massen kleinerer Oligomere nativer PsPDC.

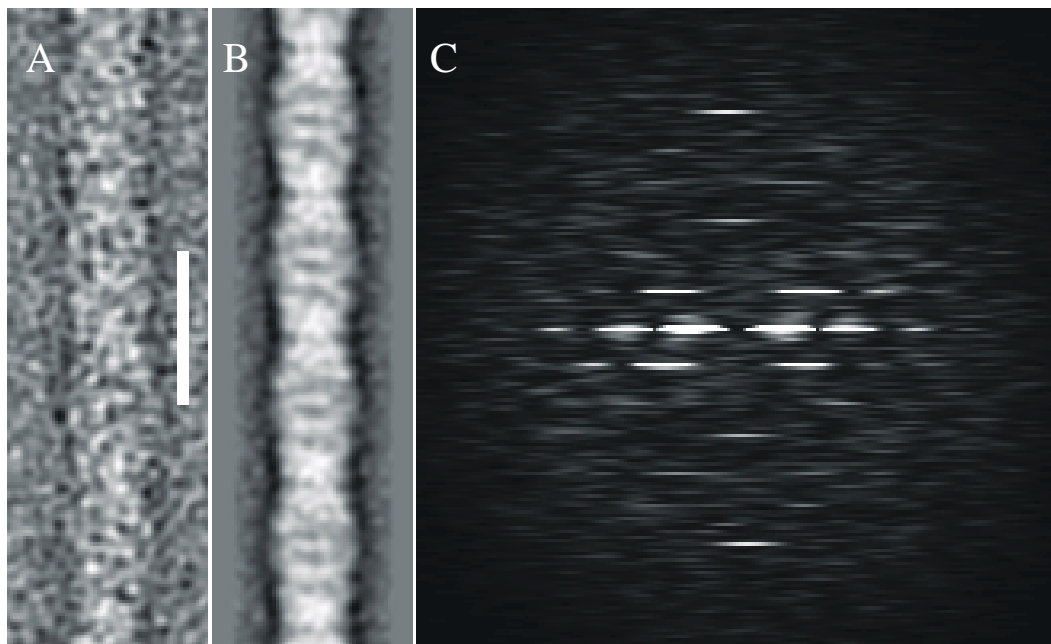
*Saccharomyces cerevisiae* (Lindqvist *et al.*, 1992) und Pyruvatoxidase aus *Lactobacillus plantarum* (Muller und Schulz, 1993) gefunden. Dagegen sind die Wechselwirkungen zwischen den Dimeren im Tetramer relativ schwach. In nichtaktivierter Hefe-PDC werden sie nur durch Bereiche der  $\beta$ -Domänen realisiert (Furey *et al.*, 1996). Das gesamte Tetramer wird deshalb auch als Dimer von Dimeren beschrieben (Furey *et al.*, 1998). Die strukturelle Eigenständigkeit der Dimere äußert sich ebenfalls in einer deutlichen Verschiebung ihrer Lage zueinander, wenn das Enzym in Gegenwart der Aktivatoren Pyruvamid oder Ketomalonat kristallisiert wurde, während sich die Struktur der Dimere selbst nur wenig veränderte (Lu *et al.*, 1997, Furey *et al.*, 1996). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Aufspaltung der Hefe-PDC-Tetramere bei niedrigen Apoenzymkonzentrationen, unter Einfluss von Harnstoff oder bei hohen pH-Werten nicht beliebig, sondern erst in Dimere und später in Monomere erfolgt (König *et al.*, 1993, Killenberg-Jabs, 1997). Ungepaarte Untereinheiten wurden nur in Form von Monomeren gefunden. Das Auftreten von ungepaarten Untereinheiten in PsPDC-

Oligomeren (z. B. in Penta- oder Nonameren) erscheint dementsprechend nicht sehr wahrscheinlich. Tetramere sind offensichtlich stabilere Bausteine der Holoenzymfilamente rekombinanter und nativer PsPDC.

### 3.3.4. Der Aufbau der Filamente

Um die Anordnung der Untereinheiten oder der tetrameren Bausteine in einem PsPDC-Filament zu bestimmen, wurde eine Bildauswertung durchgeführt.

Für die Bewertung des Aufbaus der Filamente wurde jeweils ein Strang des nativen und rekombinanten Holoenzym aus Aufnahmen negativkontrastierter Proben verwendet. Die Powerspektren, die errechneten Beugungsmuster der Stränge, waren nahezu identisch. Die Lage der Beugungsordnungen in den Spektren macht deutlich, dass die PsPDC-Filamente



**Abb. 10:** Bildauswertung eines *rPsPDC*-Filaments (Holoenzym). A) Scan des Originalstrangs, B) Korrelationsmittelung des Filaments, C) Powerspektrum. Der Balken entspricht 20 nm. Die Auswertung eines *nPsPDC*-Filaments führte zu nahezu identischen Ergebnissen.

helikal aufgebaut sind (Abb. 10). Interpretiert man die erste Beugungslinie, welche direkt über dem Mittelpunkt des Powerspektrums liegt als *layerline* 3. Ordnung mit der dazu gehörigen

Bessel-Funktion 0. Ordnung, erhält man als axialen Vorschub zwischen zwei benachbarten Helixbausteinen 6,43 nm für rekombinante und 6,35 nm für native PsPDC. Drei in ihrer Lage zueinander um 120° verdrehte Bausteine bestimmen die Länge einer axialen Periode von 19,29 nm für rPsPDC und 19,05 nm für nPsPDC. Die Helixbausteine entsprechen nach ihren Abmessungen den stabileren tetrameren Bausteinen der Filamente, welche in STEM-Messungen und Gelfiltrationsexperimenten gefunden wurden.

Tetramere von nichtaktivierter Hefe- und *Zymomonas mobilis*-PDC weisen ebenso wie die verwandten ThDP-Enzyme Pyruvatoxidase und Transketolase zumindest annähernd eine 222-Symmetrie auf. Die Verdrehung eines Dimers um 180° um die 2fache Symmetrieachse beschreibt in diesen Proteinen die Lage des 2. Dimers. Trifft dieses Strukturprinzip auch für die tetrameren Bausteine der PsPDC-Filamente zu, könnte die in der Aufsicht der Filamente beobachtete periodische Wiederholung der Struktur auch einer Strukturänderung nach einer halben Periode entsprechen. Eine Verdrehung der Bausteine um 60° würde dann ein identisches Bild im Powerspektrum ergeben.

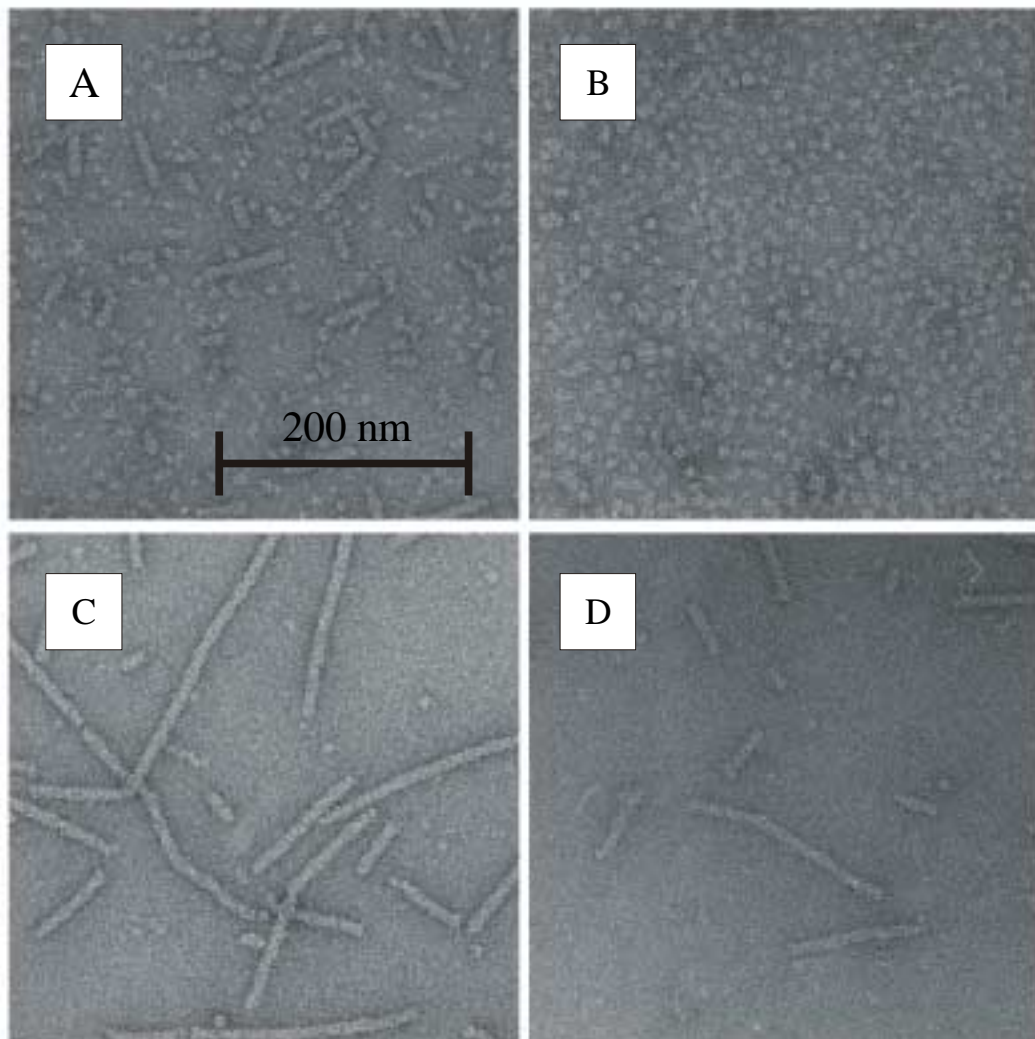
Die Länge der Perioden wurde auch bei der Korrelationsmittelung für beide Filamente bestätigt. Die resultierende Abbildung des rekombinanten PsPDC-Filaments ist in Abb. 10 dargestellt. Der entsprechend ermittelte Aufbau des Filaments nativer PsPDC war nahezu identisch. In Zusammenhang mit den STEM-Ergebnissen wird deutlich, dass in PsPDC im Gegensatz zu niedrigoligomeren PDC-Spezies zusätzliche Wechselwirkungen zwischen tetrameren Bausteinen vorhanden sind, was zur Ausbildung der Filamente führt. Ursache für die Wechselwirkungen zwischen den Tetrameren könnten hydrophobe Bereiche auf der Oberfläche der tetrameren Filamentbausteine sein.

### 3.3.5. Der Einfluss der Cofaktoren ThDP und $Mg^{2+}$ auf die Quartärstruktur

Die Holoenzyme nativer und rekombinanter PsPDC bilden bei pH-Werten um 6,2, dem Optimum der Aktivität, lange Filamente. Die Apoenzymproben enthielten dagegen keine langen Filamente. Bei rekombinanter PsPDC wurden sogar zunehmend globuläre Strukturen gefunden (Abb. 11). Gelfiltrationsexperimente und STEM-Messungen zeigten auch hier, dass die entstehenden Formen molare Massen besitzen, die Tetrameren und deren Vielfachen entsprechen.

Der Zusatz von  $MgSO_4$  verringerte den Oligomerisierungsgrad beider Apoenzymspezies weiter. Dagegen wurde kein Einfluss des Salzes auf den Oligomerisierungszustand des

Holoenzym gefunden. ThDP allein veränderte den Oligomerisierungsgrad der Apoenzymformen nicht. Die Rekonstitution zum Holoenzym nach Zugabe beider Cofaktoren führte zur erneuten Ausbildung längerer Filamente. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der rekonstituierten Enzyme in Abb. 11 entstanden nach Zugabe von Cofaktoren zu den Proben der Apoenzyme, deren Aufnahmen in der gleichen Abbildung dargestellt sind.

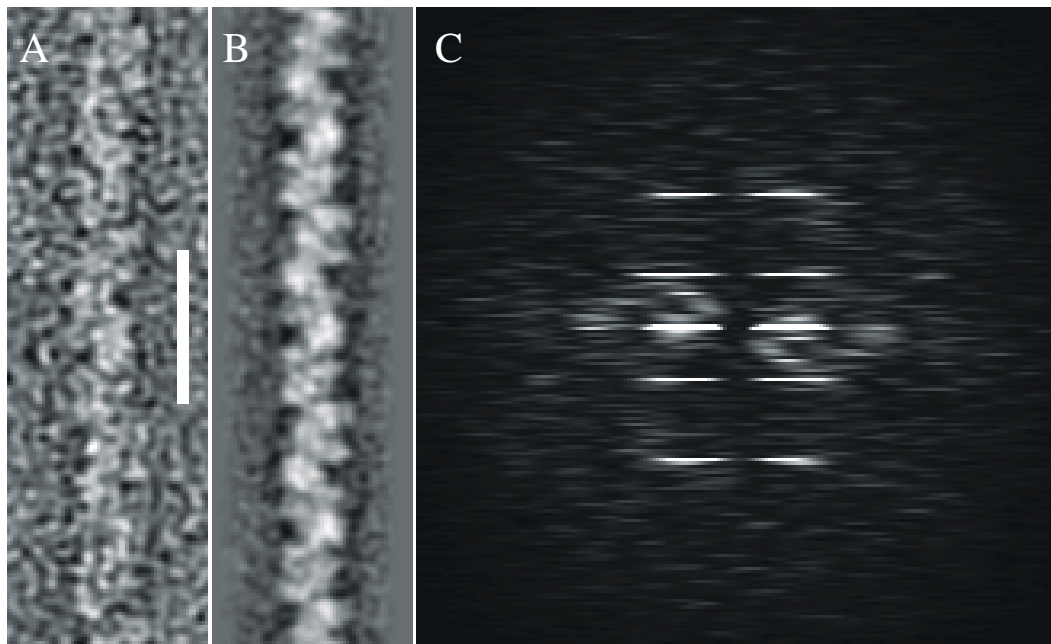


**Abb. 11:** Elektronenmikroskopische Aufnahmen von PspDC. A) natives Apoenzym, B) rekombinantes Apoenzym, C) natives rekonstituiertes Enzym, D) rekombinantes rekonstituiertes Enzym.

Generell muss betont werden, dass die Apoenzymfraktionen keinesfalls homogen waren. Die nahezu vollständig globulär erscheinende Fraktion des rekombinanten Enzyms enthielt verschieden große Formen. Außerdem schwankte der Oligomerisierungsgrad der Apoenzymproben aus unterschiedlichen Präparationen. Auch rekombinante Apo-PspDC

bildete teilweise noch kurze Filamente. Der Oligomerisierungsgrad erhöhte sich jedoch deutlich nach Zugabe beider Cofaktoren. Die Apoenzymproben nativer PsPDC enthielten mehr größere Oligomere als die rekombinanter PsPDC. Ebenso wurden die längsten, etwa 1  $\mu\text{m}$  langen Filamente in Fraktionen des nativen Holoenzym gefunden.

Um die Holoenzymform zu stabilisieren, war es vor allem für das rekombinante Protein notwendig, den Proben ThDP und  $\text{Mg}^{2+}$  zuzusetzen. Bevor das Dissoziationsverhalten der Cofaktoren genauer untersucht wurde, enthielten einige "Holoenzymproben" nativer PsPDC ein Gemisch aus Apo- und Holoenzym. Dabei wurde neben kleineren Oligomeren und den typischen linearen Holoenzymfilamenten auch eine weitere Filamentform gefunden, welche einen Durchmesser von 7-8 nm hatte. Die Bildauswertung eines dieser Stränge ergab, dass alle 25 nm eine periodische Wiederholung der Struktur auftritt (Abb. 12). Entsprechend der



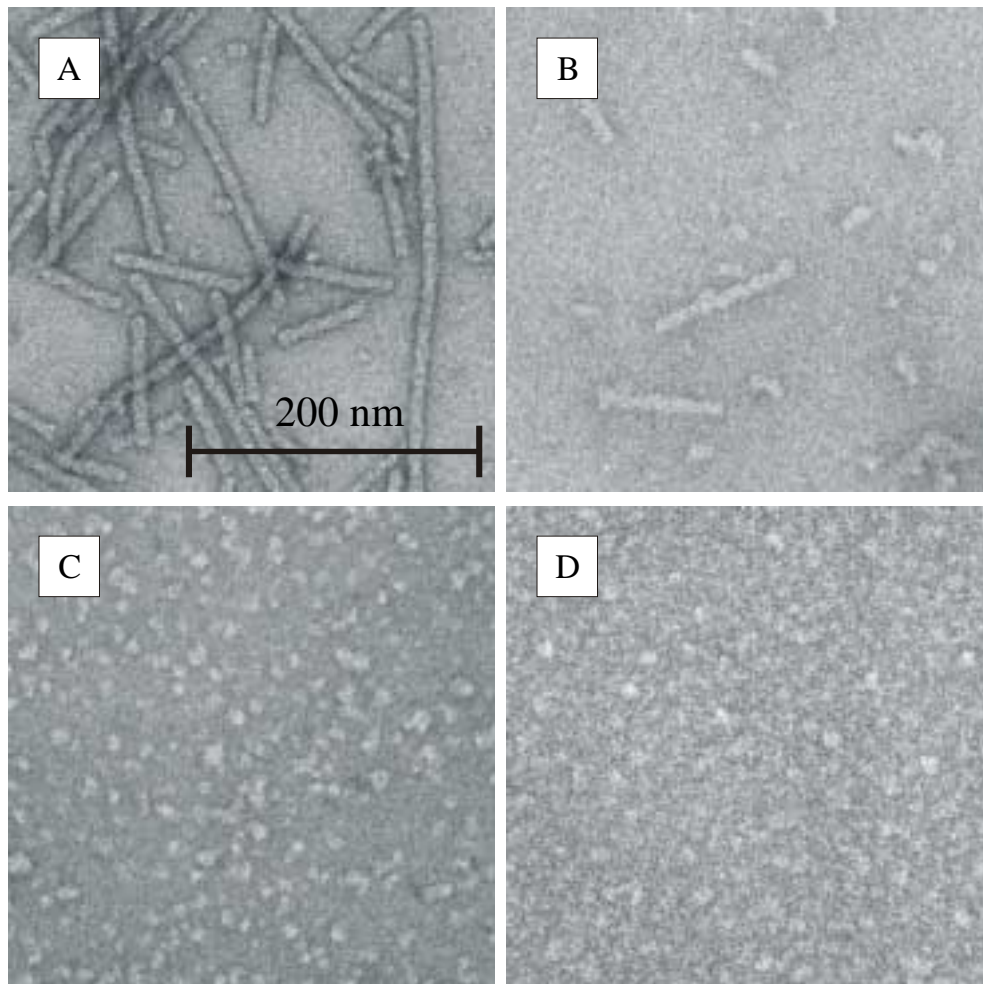
**Abb. 12:** Bildauswertung eines nPsPDC-Filaments (partiell (?) Apoenzym). A) Scan des Originalstrangs, B) Korrelationsmittelung des Filaments, C) Powerspektrum. Der Balken entspricht 20 nm.

spezifischen Aktivität der Enzymproben könnten die Untereinheiten dieser Filamente noch teilweise ThDP gebunden haben und die Filamente folglich Mischformen aus Apo- und Holoenzymformen oder/und eine Übergangsstruktur von linearen Filamenten zu kleineren Oligomeren darstellen. Die Packungsdichte der tetrameren Bausteine ist im Vergleich zur linearen Holoenzymform geringer und die Kontaktregionen sind kleiner. Außerdem entspricht

die Lage der Beugungsreflexe im errechneten Powerspektrum nicht denen von helikalen Strukturen.

### 3.3.6. Der Einfluss des pH-Wertes auf die Form von PsPDC

Bei höheren pH-Werten verringerte sich die Assoziationstendenz der Untereinheiten. Wie bereits mit anderen Methoden gefunden wurde (König *et al.*, 1997) zeigten sich auch in elektronenmikroskopischen Aufnahmen von nativer PsPDC zunehmend kleinere Oligomere



**Abb. 13:** Elektronenmikroskopische Aufnahme von nativer PsPDC bei verschiedenen pH-Werten. A) 100 mM MES pH 6,1, 1mM MgSO<sub>4</sub>, 1 mM ThDP, B) 100 mM MOPS, pH 7,4, C) 100 mM TRIS pH 8,2, D) 100 mM CHES pH 9,2.



bei höheren pH-Werten (Abb. 13). Oberhalb pH 7,0 nehmen jedoch auch die Dissoziationskonstanten und -geschwindigkeiten der Cofaktoren zu. Deshalb enthalten Proben mit einem pH-Wert von 8,0 und höher vor allem Apoenzym, welches selbst auch einen geringeren Oligomerisierungsgrad als das Holoenzym besitzt. Der steigende pH-Wert bewirkt eine zusätzliche Verringerung des Oligomerisierungszustandes. Die Auflösung filamentöser Strukturen bei hohen pH-Werten wurde auch für PDC aus *Neurospora crassa* beschrieben (Rosa *et al.*, 1990).

### 3.3.7. Beziehungen zwischen Quartärstruktur und Funktion

Aus den Kenntnissen über die Quartärstruktur ergibt sich die Frage, ob die *in vitro* beobachteten filamentösen Formen auch in der Zelle existieren und ob der ungewöhnlich hohe Oligomerisierungsgrad notwendig für die Erfüllung der physiologischen Funktion ist.

Bezüglich der Form von PsPDC in der pflanzlichen Zelle wurden noch keine Untersuchungen durchgeführt. Entsprechende Experimente könnten schwierig sein, da das Protein nur 1-2 ‰ des Gesamtproteins in Erbsensamen ausmacht. In den bisherigen Versuchen wurden jedoch unter optimalen Aktivitätsbedingungen (pH 6,2, Cofaktorüberschuss) stets lineare Filamente gefunden. Kleinere Oligomere traten zu größeren Anteilen nur in den Proben mit hohem pH-Wert und den Apoenzymen auf. Unter diesen Bedingungen ist das Enzym jedoch inaktiv. PsPDC spielt nur im anaeroben Kohlenhydratstoffwechsel von Erbsen eine wichtige Rolle. Beim Absinken des pH-Wertes des Cytosols auf Werte unter 7,0, welches z. B. für Maiswurzelspitzen unter anaeroben Bedingungen beobachtet wurde (Saint-Ges *et al.*, 1991), ist anzunehmen, dass PsPDC im Zeitraum der physiologisch größten Aktivität auch im Cytosol Filamente bildet.

Neben der Variation des pH-Wertes wurde auch versucht durch Zusatz von Harnstoff kleinere Formen zu populieren. Allerdings wurden auch in Gegenwart von 1 M Harnstoff in Gelfiltrationsexperimenten keine kleineren Oligomere als Tetramere gefunden. Diese machten zudem weniger als 10 % des eingesetzten Proteins aus. Bei dieser Denaturationskonzentration liegt die Aktivität des Enzyms nur noch bei etwa 75 % im Vergleich zu einer harnstofffreien Probe. Monomere wurden neben kleineren Oligomeren ab etwa 3 M Harnstoff gefunden, einer Konzentration, bei der keine PDC-Aktivität mehr nachweisbar war. Dagegen lassen sich mit 0,5 M Harnstoff aktive Dimere von rekombinanter Hefe-PDC populieren (Killenberg-Jabs, 1997). Die Assoziation der einzelnen Untereinheiten, möglicherweise speziell der

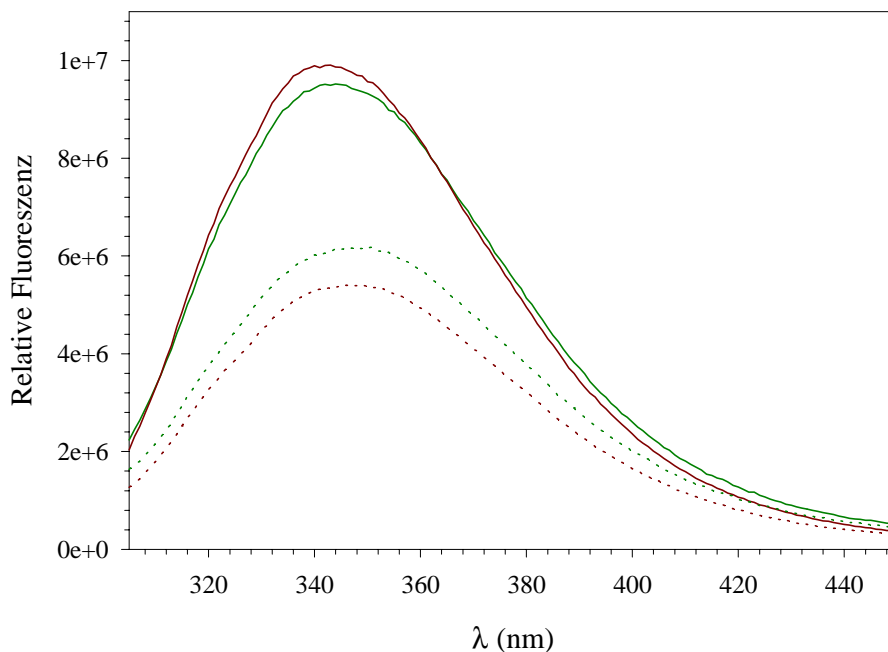
funktionellen Dimere, ist bei PsPDC innerhalb der tetrameren Bausteine offensichtlich erheblich stärker als bei den Tetrameren der Hefe-PDC. Dieses Verhalten wurde auch für PDC aus *Zymomonas mobilis* gefunden (König, 1998, Dobritzsch *et al.*, 1998).

Die Ergebnisse der bisherigen Versuche lassen nicht eindeutig den Schluss zu, dass die Anordnung der Untereinheiten in filamentösen Strukturen Bedingung für die enzymatische Aktivität ist. Es wäre auch möglich, dass für die Aktivität des Enzyms ähnliche Bedingungen wie für die Ausbildung von Filamenten notwendig sind und zumindest die grundlegende enzymatische Funktion nicht von der ungewöhnlichen Quartärstruktur abhängt. Da in allen untersuchten Proben mit vollständiger, teilweiser oder ohne Aktivität immer verschieden große Oligomere gefunden wurden, die offensichtlich im Gleichgewicht zueinander standen, konnte auch die Frage nach dem kleinsten noch aktiven Oligomer nicht beantwortet werden.

### **3.3.8. Fluoreszenzeigenschaften der Tryptophanreste in nativer und rekombinanter PsPDC**

Die intrinsische Fluoreszenz von Proteinen wird bei einer Anregungswellenlänge von 295 nm hauptsächlich von der Anzahl der Tryptophane und ihrer jeweiligen Umgebung im Protein bestimmt. Prinzipiell lassen sich drei Grundtypen unterscheiden. Tryptophanreste mit einem Emissionsmaximum bei 330-332 nm befinden sich in einer unpolaren Umgebung. Oberflächenreste, welche von Wasserdipolen mit einer niedrigen Mobilität umgeben sind, weisen ein Maximum bei 340-342 nm auf. Tryptophanreste mit einer mobilen wässrigen Umgebung, z. B. exponierte Oberflächenreste, besitzen ein Emissionsmaximum bei 350-353 nm (Burstein *et al.*, 1973).

Rekombinante PsPDC enthält 7 Tryptophanreste. Die genaue Anzahl der Tryptophane des nativen Enzyms ist nicht bekannt, jedoch zeigt *PDC2*, das zweite, nicht vollständig sequenzierte Strukturgen von PsPDC, in den bekannten Bereichen eine sehr hohe Sequenzidentität zu *PDC1*. Eine stark abweichende Zahl von Tryptophanresten im nativen Enzym ist dementsprechend unwahrscheinlich. Da die Kristallstruktur von PsPDC nicht bekannt ist, konnten auch keine prinzipiellen Vorhersagen zur Lage der Reste gemacht werden. In Abb. 14 sind die Fluoreszenzspektren der Apo- und Holoenzyme von nativer und rekombinanter PsPDC dargestellt.



**Abb. 14:** Emissionsspektren von PsPDC (Anregungswellenlänge 295 nm, Enzymkonzentration 50  $\mu\text{g/ml}$ ; Temperatur 20  $^{\circ}\text{C}$ ). Natives Holoenzym (—), rekombinantes Holoenzym (korrigiert s. u.) (—), natives Apoenzym (·····), rekombinantes Apoenzym (·····).

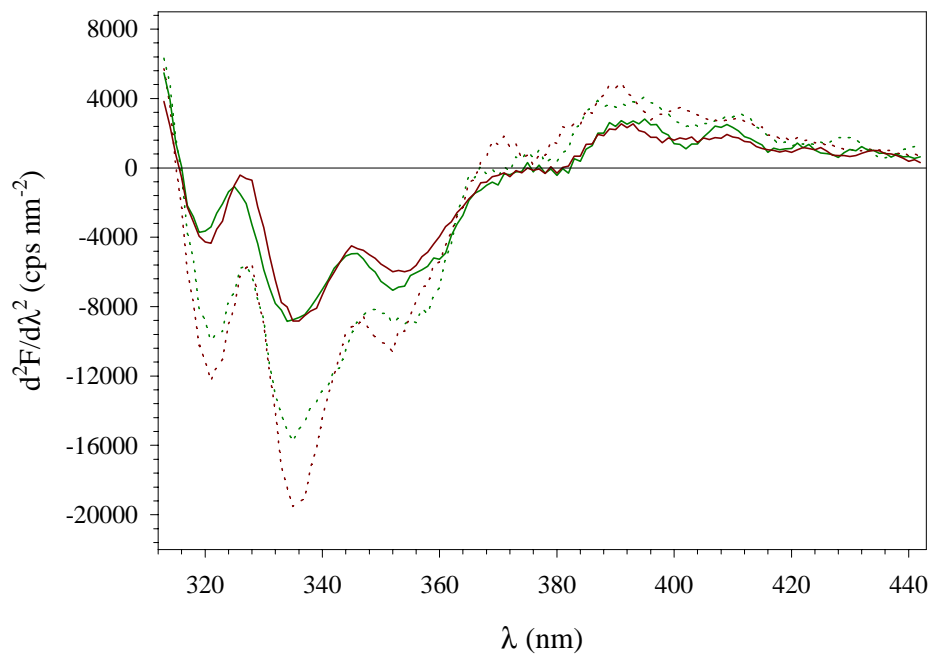
Das Spektrum für das rekombinante Holoenzym musste korrigiert werden, da das Enzym ohne zusätzliche Cofaktoren im Probenpuffer nicht vollständig als Holoenzym vorlag.

Im Vergleich zu PDC aus Brauhefe, deren Emissionsmaximum bei 332 nm liegt (Golbik, 1986), sind in allen PsPDC-Formen vor allem Tryptophanreste in einer stärker polaren Umgebung an der Ausbildung der Emissionsspektren beteiligt. Die Maxima liegen im Bereich um 343 nm und die Bandbreiten variieren von 65 bis 70 nm (Tab. 7).

Die Fluoreszenzspektren der Proteine sind die Summe der Fluoreszenzspektren einzelner Tryptophanfraktionen. Die Bildung der 2. Ableitung der Spektren führt zu einer Erhöhung des Intensitäts-Bandbreitenverhältnisses der Fluoreszenzanteile einzelner Tryptophanfraktionen und lässt damit eine Bandenanalyse zu (Abb. 15).

**Tab. 7:** Emissionsmaxima und Bandbreiten der Apo- und Holoenzymformen von PsPDC, Bedingungen wie in Abb. 14.

Enzymspezies	Fluoreszenzintegral (cps·nm)	Maximum (nm)	Halbwertsbreite (nm)
native PsPDC, Apoenzym	1.798e+9	343	67
rekombinante PsPDC, Apoenzym	1.805e+9	342	65
native PsPDC, Holoenzym	1.307e+9	344	70
rekombinante PsPDC, Holoenzym	9.829e+8	344	69



**Abb. 15:** 2. Ableitung der Emissionspektren von PsPDC (Anregungswellenlänge 295 nm, Enzymkonzentration 50 µg/ml; Temperatur 20 °C). Natives Holoenzym (—), rekombinantes Holoenzym (korrigiert s. u.) (—), natives Apoenzym (·····), rekombinantes Apoenzym (·····).

Drei Hauptfraktionen von Tryptophanresten ließen sich in allen PsPDC-Formen unterscheiden. Das Maximum der ersten Fraktion, welches dem Minimum dieser Fraktion im 2. Derivativspektrum entspricht, lag bei ca. 320 nm. Die Lage des Maximums lässt sich nicht ausschließlich mit der Annahme einer hydrophoben Umgebung der Reste erklären, sondern muss außerdem durch die Ausbildung spezifischer Komplexe im angeregten Zustand begründet sein, welche eine weitere spektrale Verschiebung zu kürzeren Wellenlängen verursachen (Demchenko, 1986). Das zweite Maximum, welches die größte Amplitude in allen Spektren aufweist, lag bei 336 nm. Die Umgebung der entsprechenden Tryptophanreste sollte dementsprechend bereits eher polaren Charakter aufweisen. Daneben existierte, ebenfalls in allen untersuchten PsPDC-Formen, auch eine Fraktion mit einer ungeordneten wässrigen Umgebung, welche das dritte Maximum bei 350 nm ausbildet. Eine genaue Zuordnung der Zahl der einzelnen Reste zu den jeweiligen Fraktionen ist jedoch nicht möglich, da nicht bekannt ist, welche Fluoreszenzintensität die einzelnen Reste aufweisen.

Die Lage der Fluoreszenzspektren wird offensichtlich nicht maßgeblich durch Tryptophanreste in den Kontaktregionen der Filamentbausteine bestimmt, denn erstens waren die Spektren verschiedener Apoenzymfraktionen, deren Oligomerisierungsgrad variierte, identisch und zweitens würde eine Blauverschiebung der Emissionsmaxima der Holoenzyme gegenüber den Apoenzymen erfolgen, wenn lösungsmittelzugängliche Tryptophanreste auf der Oberfläche einzelner Bausteine durch Ausbildung von Kontakten zu weiteren Filamentbausteinen in ein hydrophoberes Milieu gelangen würden.

Die Fluoreszenzintensitäten aller Tryptophanfraktionen der Holoenzyme waren deutlich geringer als die der Apoenzyme. Thiamindiphosphat wirkt entsprechend direkt im Enzym oder indirekt über Konformationsänderungen, welche aus der Bindung des Cofaktors resultieren als Quencher. Der Cofaktor verringert aber nicht spezifisch die Fluoreszenz eines bestimmten Tryptophanrestes.

Der Unterschied der Fluoreszenzintensitäten zwischen Apo- und Holoenzymen lässt sich nutzen, um die ThDP-Bindung an das Apoenzym direkt zu messen. Jedoch musste vor den entsprechenden Versuchen die Wirkung von freiem ThDP als Quencher untersucht werden. Dies war auch erforderlich, um das Spektrum des rekombinanten Holoenzym zu bestimmen, welches ohne zusätzliche Cofaktoren im Puffer teilweise als Apoenzym vorlag.

Im einfachsten Fall ist die Abnahme der Fluoreszenzintensität proportional zur Konzentration des Quenchers und kann mit der Stern-Volmer-Gleichung (Gl. 1) beschrieben werden.

$$\frac{F_A}{F_{0A}} = 1 + k \cdot [Q]$$

Gl. 1

Dabei sind:

$F_A$  Integral über die Fluoreszenz von 302 bis 450 nm bei der jeweiligen Konzentration des Quenchers

$F_{0A}$  Integral über die Fluoreszenz von 302 bis 450 nm ohne Quencher

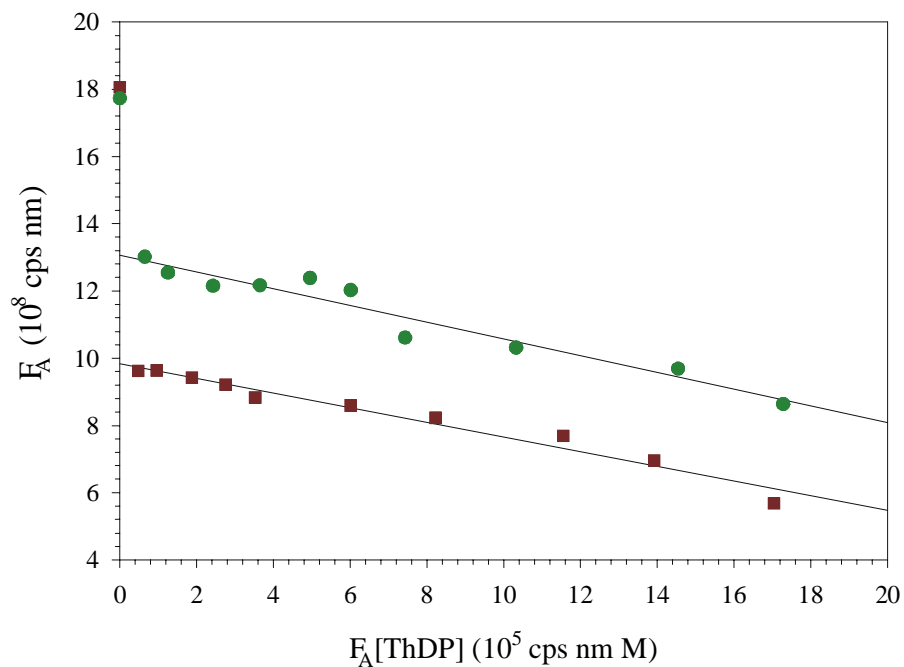
$k$  Quenchkonstante

$[Q]$  Konzentration des Quenchers.

Um die Fluoreszenz des rekombinanten Holoenzym in Abwesenheit von ThDP zu bestimmen, wurde die Gleichung so umgestellt, dass neben der Quenchkonstante auch  $F_{0A}$  aus der Auftragung der Fluoreszenzintegrale gegen  $[Q] \cdot F_A$  (Abb. 16) bestimmt werden konnte (Gl. 2).

$$F_A = F_{0A} - k \cdot [Q] \cdot F_A$$

Gl. 2



**Abb. 16:** Einfluss von ThDP als Fluoreszenzquencher von rekombinanter (■) und nativer (●) PsPDC.

Da die Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  ThDP in Gegenwart von 10 mM  $\text{MgSO}_4$  bereits für eine nahezu vollständige Ausbildung der Holoenzymform ausreichte, wurde das Fluoreszenzspektrum in Gegenwart dieser Cofaktor-Konzentration als Spektrum des rekombinanten Holoenzym verwendet, wobei die Intensität entsprechend dem Quencheinfluss von ThDP korrigiert wurde (s. Abb 14, 16).

Im Konzentrationsbereich bis 200  $\mu\text{M}$  lässt sich das Quenchverhalten von ThDP mit der Stern-Volmer-Gleichung beschreiben. Die ermittelten Quenchkonstanten betragen 2,18  $\text{mM}^{-1}$  für rekombinante PsPDC und 2,50  $\text{mM}^{-1}$  für native PsPDC.

Die Bindung von ThDP wurde in Anwesenheit von 10 mM  $\text{MgSO}_4$  nach 20 Stunden Inkubation der Ansätze bei 15 °C und unterschiedlichen ThDP-Konzentrationen untersucht. Dabei war die Affinität der Enzyme zum Cofaktor so hoch, dass der Einfluss des ThDP als Quencher nicht einbezogen werden musste. Unter der Annahme, dass nur Apo- (als Apo- $\text{Mg}^{2+}$ -Komplex) und Holo-PDC und keine fluorimetrisch zu berücksichtigenden Zwischenformen in den Proben vorkommen, wurden bei einer Enzymkonzentration von 20  $\mu\text{g/ml}$  für native PsPDC 0,18  $\mu\text{M}$  und für rekombinante PsPDC 0,36  $\mu\text{M}$  als Dissoziationskonstanten aus der Abhängigkeit zwischen ThDP-Konzentration und Fluoreszenzintensität ermittelt.

Eine direkte Verfolgung der Kinetik des Rekonstitutionsvorgangs war jedoch auf Grund der hohen Empfindlichkeit des Enzyms gegen *photobleaching* nicht möglich.

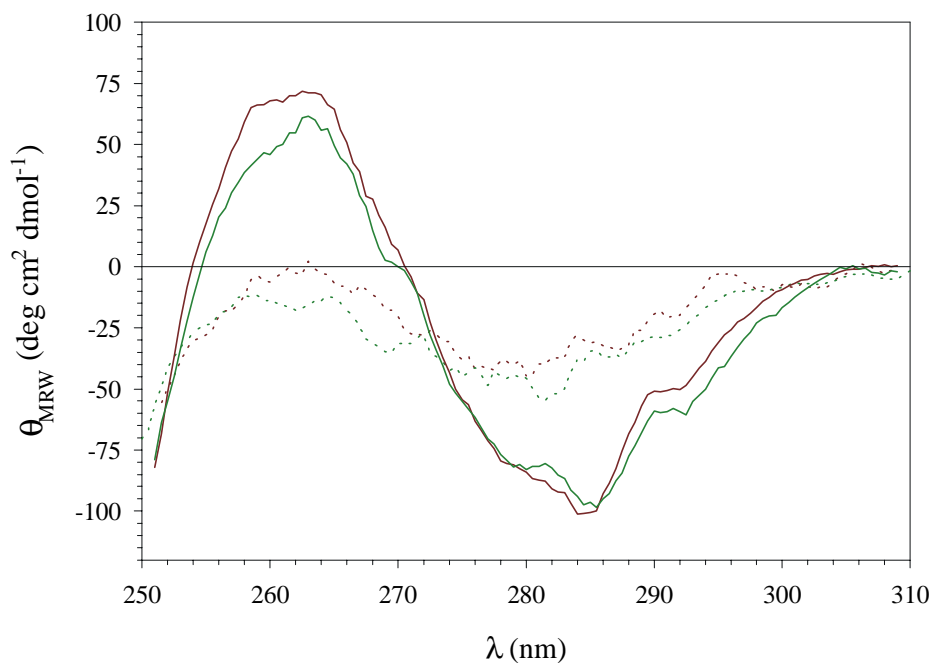
### 3.3.9. CD-Spektroskopie von nativer und rekombinanter PsPDC

Die Umgebung der chromophoren aromatischen Aminosäuren, welche durch die Tertiärstruktur bestimmt wird, wirkt sich auf das Verhalten dieser Reste im Nah-UV CD aus. Demzufolge sind die entsprechend resultierenden Spektren geeignet, um Änderungen der Struktur eines Proteins festzustellen oder Vergleiche mit den Strukturen anderer Proteine durchzuführen.

Die Unterschiede zwischen den jeweiligen Apo- und Holoenzymenspektren von nativer und rekombinanter PsPDC sind sehr ähnlich (Abb. 17). Die Apoenzymproben wurden mit jeweils 2 mM  $\text{Mg}^{2+}$  vorinkubiert, da diese Salzkonzentration auch für die Holoenzyme verwendet wurde. Als Holoenzymproben wurden rekonstituierte Apoenzymproben verwendet, die außerdem 30  $\mu\text{M}$  ThDP enthielten. Der Zusatz beider Cofaktoren war notwendig, um die Holoenzymformen zu stabilisieren.

Die ThDP-Bindung ist mit einer Konformationsänderung der Proteine verbunden, was an der Ausbildung des negativen Extremums bei 262 und des positiven Extremums bei 283 nm erkennbar ist. Die Entstehung dieser Banden wurde bereits für native und rekombinante Hefe-PDC beschrieben (Ullrich und Wollmer, 1971; Killenberg-Jabs *et al.*, 1996). Demnach sind die Strukturelemente, welche die Ursache für die Ausbildung der typischen Extrema sind, in den verschiedenen PDC-Spezies sehr ähnlich.

Die Banden treten nicht in den Holoenzymenspektren der rekombinanten Hefeenzymvarianten E91Q, E91D und E91A sowie W412A auf und kommen nur in verminderter Intensität in der W412F-Variante vor (Li und Jordan, 1999, Li *et al.*, 1999). Der Glutamatrest 91 ist dem



**Abb. 17:** Nah-UV CD-Spektren von PsPDC (Temperatur 20 °C). natives Holoenzym (—), rekombinantes Holoenzym (—), natives Apoenzym (⋯), rekombinantes Apoenzym (⋯).

Tryptophanrest 412 direkt benachbart. Allerdings ist damit nicht geklärt, ob der Tryptophanrest 412 direkt an der Entstehung der Extrema beteiligt ist, denn prinzipiell können auch Strukturveränderungen durch die Mutationen entstehen, welche die Umgebung anderer aromatischer Reste beeinflusst.

ThDP selbst besitzt mit der Methylenbrücke zwischen Thiazolium- und Aminopyrimidinring ebenfalls ein prochirales Zentrum und könnte nach seiner Bindung in der V-Konformation im

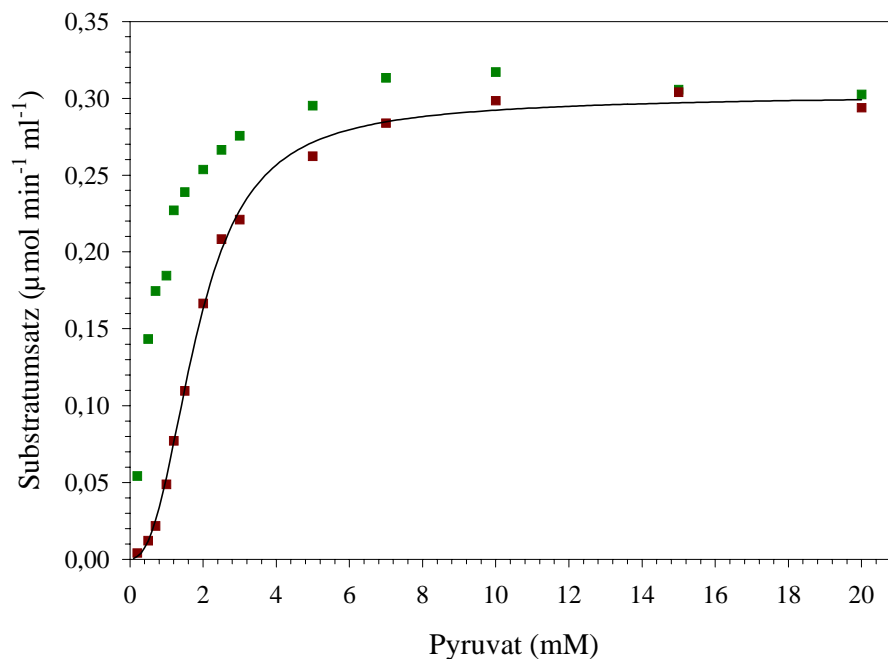


Enzym (Schellenberger, 1967) direkt an der Ausbildung der Banden beteiligt sein (Killenberg-Jabs, 1997).

### 3.4. Kinetische Eigenschaften von rekombinanter PsPDC

#### 3.4.1. Die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration

Wie oben beschrieben, ist die Aktivierbarkeit von PDC durch das eigene Substrat eine Eigenschaft, welche zur Unterdrückung der nichtoxidativen Pyruvatdecarboxylierung unter normoxischen Bedingungen beiträgt. Folgerichtig wurde für alle bisher untersuchten pflanzlichen PDC-Spezies eine Aktivierung durch Pyruvat beschrieben (Davies und Corbett, 1969, Langston-Unkefer und Lee, 1985, Rivoal *et al.*, 1990, Mücke *et al.*, 1995). Eine Folge



**Abb. 18:**  $v/S$ -Charakteristik von nativer (■) und rekombinanter (■) PsPDC und (—) Fit nach Gleichung 4 mit  $V = 0,305 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ml}^{-1}$ ,  $a = 0,000512$ ,  $b = 3,64$  (Enzymkonzentration jeweils  $5 \mu\text{g/ml}$ ,  $100 \text{ mM MES pH } 6,2$ , Temperatur  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ).

der Aktivierung durch das Substrat ist die Abweichung der  $v/S$ -Charakteristik von der hyperbolischen Kurvenform. Auch rekombinante PsPDC zeigt ein sigmoides Verhalten der Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Substratkonzentration, welches deutlich stärker ausgeprägt ist als bei der nativen Form. Bei dieser wird die Sigmoidität erst bei Pyruvatkonzentrationen unter 0,2 mM signifikant (Abb. 18).

In substrataktivierten oligomeren Enzymen kann die Bindung eines Substrates im katalytischen Zentrum einer Untereinheit die Bindung eines weiteren Substrates einer benachbarten Untereinheit erleichtern (positive Kooperativität) oder das regulatorische Substrat bindet an einen anderen Ort des Enzyms und fungiert demnach als allosterischer Aktivator. Dieser Fall wurde auch für die bisher am besten untersuchte PDC-Spezies, das Hefeenzym bzw. dessen rekombinante Variante vorgeschlagen. Auf Grund von Modifizierungsreaktionen mit p-Chlormercuribenzoat in Kombination mit *stopped-flow*-Messungen wurde gefunden, dass als mögliches Bindungszentrum für ein regulatorisches Substratmolekül ein Cysteinrest (Hübner *et al.*, 1988) in Position 221 (Zheng *et al.*, 1992, Barburina *et al.*, 1994) in Frage kommt. Der im folgenden postulierte Signalübertragungsweg (zusammengefasst bei Jordan *et al.*, 1998) ist allerdings umstritten. Ebenso wurde nach Aufklärung der Struktur von in Gegenwart des Aktivators Pyruvamid kristallisierter Hefe-PDC (Lu *et al.*, 2000) die Rolle des Cysteins als Bindungsort für das regulatorische Substrat in Frage gestellt. In PDC aus *Pisum sativum* fungiert wahrscheinlich kein Cysteinrest als Bindungsort des regulatorischen Substrates, da mit Hydroxymercuribenzoat modifizierte native PsPDC noch aktivierbar war (Dietrich und König, 1997). Nach Vergleichen der abgeleiteten Primärstrukturen der *PDCI*-Gene verschiedener Spezies befindet sich außerdem in der dem Hefeenzym entsprechenden Position kein Cystein in PsPDC, sondern wie in PDC aus *Zymomonas mobilis* ein Lysin (Mücke, 1997).

Die Daten der  $v/S$ -Charakteristiken von Hefe-PDC und nativer PsPDC lassen sich an ein Modell anpassen, in dem die Zahl der Substratmoleküle, die gleichzeitig gebunden werden müssen, um die Katalyse eines Moleküls mit voller Katalysegeschwindigkeit zu realisieren, kleiner oder gleich 2 ist (Ermer, 1988; Mücke, 1997). Für rekombinante PsPDC ist das nicht möglich. Alle Anpassungen an die entsprechenden allgemeinen Modelle zeigten systematische Abweichungen. Im Hill-Plot ergab sich ein Koeffizient von 2,5. Der allgemeine Fall einer kooperativen Bindung von 3 Pyruvatmolekülen kann mit Gleichung 3 beschrieben werden, wobei  $V$  die Maximalgeschwindigkeit und die Parameter  $A$ ,  $B$ ,  $C$ ,  $D$ , und  $E$  komplexe Größen sind. Der Fit der  $v/S$ -Charakteristik von rPsPDC lässt eine Reduktion auf die Parameter  $V$ ,  $C$  und  $E$  mit  $V = 0,312 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ml}^{-1}$ ,  $C = 4,497 (\text{mM})^3$  und  $E = 0,0646 \text{ mM}$  zu. Dabei kommt

es nur zu sehr geringen Abweichungen von den Originaldaten bei kleinen Substratkonzentrationen bis 0,5 mM. Vergleichbar gut entspricht ein einfaches sequentielles Modell (Gl. 4) den experimentellen Daten. Der resultierende Fit ist in Abb. 18 dargestellt. Bei einer Temperatur von 20 °C ist die Sigmoidität der v/S-Charakteristik noch stärker ausgeprägt als bei 30 °C. Wie hoch die tatsächliche Kooperativität ist, lässt sich anhand der v/S-Charakteristiken nicht eindeutig klären. Deutlich zu erkennen ist dagegen, dass die Kooperativität größer als zwei ist und damit die Substratbindung an *ein* regulatorisches Zentrum nicht für eine vollständige Aktivierung ausreicht.

$$v = \frac{V \cdot S \cdot (A + B \cdot S + S^2)}{C + D \cdot S + E \cdot S^2 + S^3} \quad \text{Gl. 3}$$

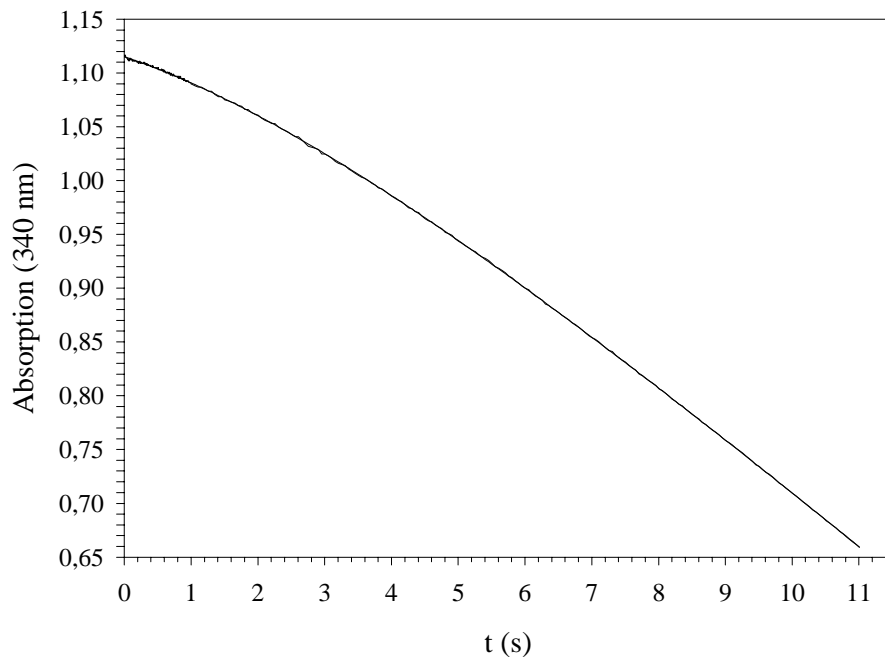
$$v = \frac{V \left( \frac{[S]}{K_s} + \frac{2[S]^2}{aK_s^2} + \frac{[S]^3}{a^2bK_s^3} \right)}{1 + \frac{3[S]}{K_s} + \frac{3[S]^2}{aK_s^2} + \frac{[S]^3}{a^2bK_s^3}} \quad \text{Gl. 4}$$

### 3.4.2. Die Aktivierung von rekombinanter PsPDC durch Pyruvat

Die Ursache der Aktivierung eines substratregulierten Enzyms sind Konformationsänderungen des Proteins, welche durch die Bindung des regulatorischen Substrates induziert werden und die Änderung verschiedener Parameter der enzymatischen Reaktion bewirken. Kinetisch äußert sich dieses Verhalten in der Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit nach Substratzugabe bis zum Erreichen einer konstanten *steady-state*-Geschwindigkeit. Bereits 1978 wurde dieses Verhalten für PDC aus Brauherfe näher untersucht und anhand der Ergebnisse ein Modell entwickelt, welches die Aktivierung des Enzyms unter schneller Bindung eines regulatorischen Substratmoleküls und anschließender langsamer Umwandlung des intermediären Substrat-Protein-Komplexes in seine vollständig aktive Form in vorgelagerten Gleichgewichtsschritten beschreibt (Hübner *et al.*, 1978). Das aktivierte Hefeenzym zeigt eine erheblich höhere Deprotonierungsgeschwindigkeit am C2 des Thiazoliumrings von ThDP gegenüber dem nicht aktivierten Enzym, was die Voraussetzung für eine effizientere Substratbindung ist (Kern *et al.*, 1997). Dieses Modell wird prinzipiell

auch den Daten gerecht, die bei der Untersuchung nativer PsPDC erhalten wurden (Dietrich und König, 1997).

Auch rekombinante PsPDC zeigt eine typische lag-Phase in der Progresskurve nach Zugabe von Pyruvat (Abb. 19).



**Abb. 19:** Progresskurve des Substratumsatzes von rPsPDC und Fit nach Gl. 5 (Enzymkonzentration 40  $\mu\text{g/ml}$ , Pyruvatkonzentration 4 mM, Temperatur 20 °C, 100 mM MES pH 6,2).

Die Progresskurve lässt sich mathematisch nach einer Reaktion 1. und 0. Ordnung auswerten (Gl. 5), was bereits zeigt, dass der geschwindigkeitsbestimmende Schritt die Bildung des vollständig aktivierten Enzyms aus einem intermediären Substrat-Enzymkomplex ist. Die 1. Ableitung von Gl. 5 zum Zeitpunkt  $t = 0$ , welche die Aktivität des Enzyms zu Beginn der Reaktion, also die potentielle Aktivität in Abwesenheit des Substrates beschreiben sollte, ist im Gegensatz zu Brauhefe-PDC (Hübner und Schellenberger, 1986) deutlich von 0 verschieden (ca. 30 % unter den in Abb. 19 eingesetzten Bedingungen). Dieses Verhalten wurde unter anderem auch für PDC aus Weizenkeimen und native PsPDC beschrieben (Kenworthy und Davies, 1976; Dietrich und König, 1997).

$$A(t) = B + C \cdot t + D \cdot e^{-k_{\text{obs}} \cdot t} \quad \text{Gl. 5}$$

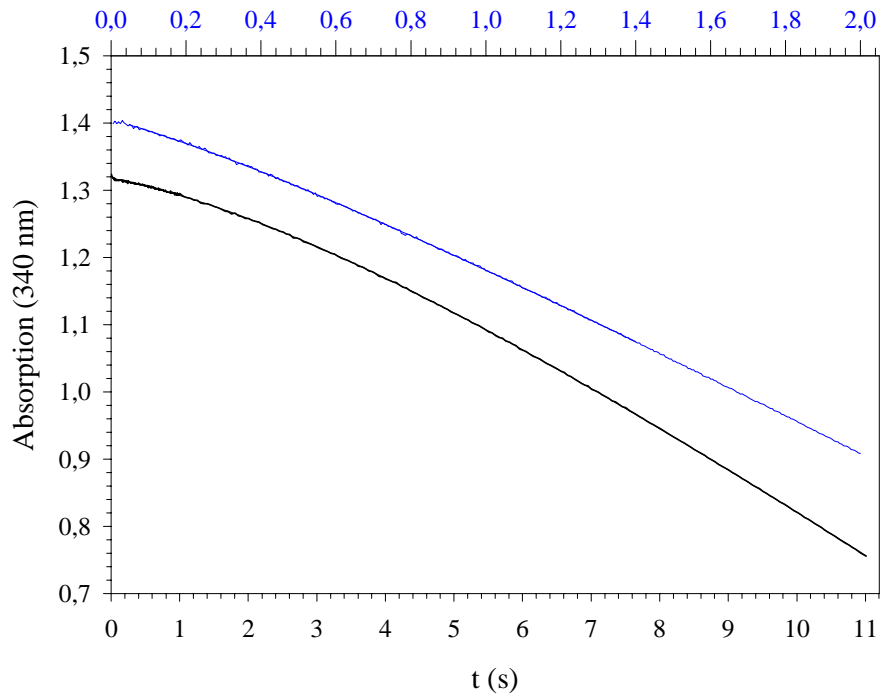
mit	A(t)	Absorption zur Zeit t
	B	Ordinatenschnittpunkt einer Tangente, die nach erfolgter Aktivierung an die Reaktionskurve angelegt wird
	C	negativer Wert der Reaktionsgeschwindigkeit nach Abschluss der Aktivierung
	D	Differenz der Absorption zur Zeit $t = 0$ und B
	$k_{\text{obs}}$	beobachtete Geschwindigkeitskonstante der Gesamtreaktion der Aktivierung der PDC

Um rekombinante PsPDC in der Holoenzymform zu stabilisieren, mussten die eingesetzten PDC-Lösungen  $\text{Mg}^{2+}$  und ThDP enthalten. Um daraus resultierende unerwünschte Effekte auszuschließen, wurde der Einfluss von  $\text{MgSO}_4$  als  $\text{Mg}^{2+}$ -Quelle und ThDP auf die Aktivierung im Rahmen von Kontrollexperimenten untersucht. Als Vergleichsansatz wurde eine Probe mit 100  $\mu\text{M}$  ThDP und 250  $\mu\text{M}$   $\text{MgSO}_4$  verwendet. Gemessen wurde bei 20 °C, die Pyruvatkonzentration betrug 10 mM und die Enzymkonzentration 80  $\mu\text{g/ml}$ . ThDP zeigte bei einer Konzentration von 1 mM keinen Einfluss auf die beobachtete Aktivierungsgeschwindigkeitskonstante, die *steady-state*-Geschwindigkeit und den Anfangsanstieg verglichen mit dem Vergleichsansatz. Dabei war es unerheblich, ob der Cofaktor als Hydrochlorid oder Tetrahydrat vorlag. Dagegen sank  $k_{\text{obs}}$  in Gegenwart von 10 mM  $\text{MgSO}_4$  um ca. 40 %. Die *steady-state*-Geschwindigkeit wurde erreicht. Dieser Einfluss war nicht von der Konzentration des Hilfsenzym ADH abhängig. In weiteren Versuchen zur Substrataktivierung von rPsPDC wurde  $\text{MgSO}_4$  deshalb nicht in Konzentrationen über 250  $\mu\text{M}$  eingesetzt.

### 3.4.3. Der Einfluss der Temperatur auf die Aktivierung von rekombinanter PsPDC

Sowohl die beobachtete Aktivierungsgeschwindigkeitskonstante  $k_{\text{obs}}$ , als auch mit ihr verbundene Größen wie die Aktivität zur Zeit  $t = 0$  sind von verschiedenen Faktoren abhängig. Einen wesentlichen Einfluss auf die Aktivierungsgeschwindigkeit hat die Temperatur (Abb. 20). Bei einer Pyruvatkonzentration von 10 mM stieg die beobachtete Geschwindigkeitskonstante der Aktivierung von 0,24  $\text{s}^{-1}$  bei 15 °C auf 1,84  $\text{s}^{-1}$  bei 30 °C.

Dieses Ergebnis entspricht generell den Erwartungen, da die Geschwindigkeit der Konformationsänderungen von Proteinen temperaturabhängig ist.



**Abb. 20:** Progresskurven der Aktivierung von rPsPDC (Enzymkonzentration 80  $\mu\text{g/ml}$ , 100 mM MES pH 6,2, 10 mM Pyruvat, Temperatur 15 °C (—) bzw. 30 °C (—)). Die obere Zeitskala entspricht der Kurve, die bei 30 °C aufgenommen wurde.

Außerdem erhöhte sich auch der im Fit nach Gl. 5 ermittelte Anfangsanstieg von 30 % bei 15 °C auf mehr als 50 % bei 30 °C. Eine sichere Interpretation dieser Daten ist anhand der bisher durchgeführten Versuche nicht möglich. Unter Berücksichtigung der *steady-state*-Kinetik, nach der mindestens 3 Substrate gebunden werden müssen, um einen Substratumsatz bei voller katalytischer Geschwindigkeit zu ermöglichen, könnte das kinetische Verhalten mit einer vorgelagerten Reaktion des freien Enzyms mit einem ersten regulatorischen Substrat erklärt werden.

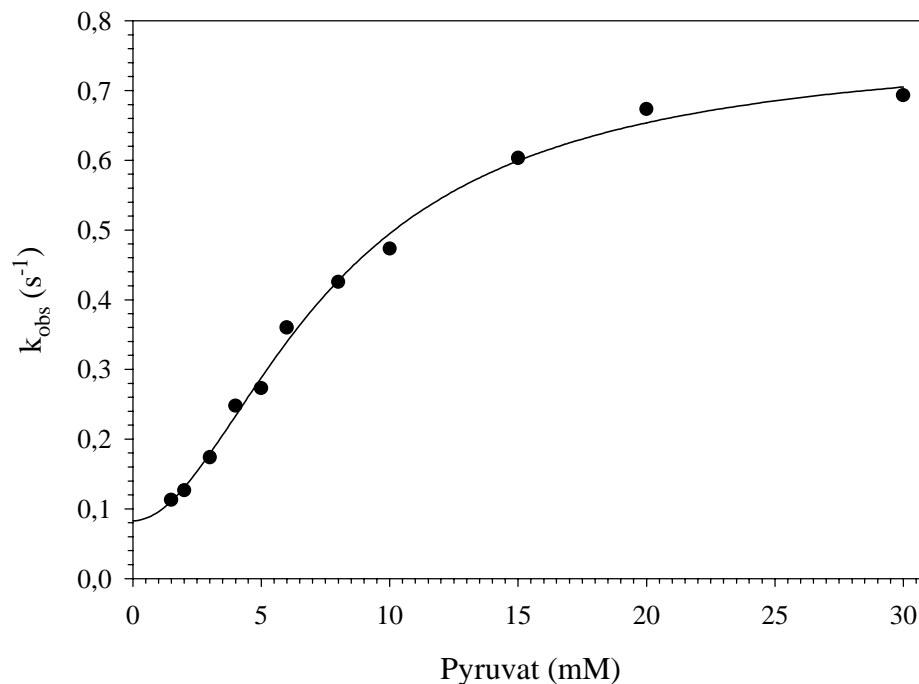


Entsprechend diesem Modell würde nach der Anlagerung eines ersten Substratmoleküls (1) eine zumindest teilweise aktivierte Enzymspezies ( $ES_{\text{akt(p)}}$ ) entstehen (2). Diese Schritte müssten ausreichend schnell, also innerhalb von 100 ms ablaufen. In diesem Zeitraum ist die genaue Detektion des Substratumsatzes mit dem verwendeten Messsystem nicht möglich, da das Signaländerungs/Rausch-Verhältnis zu gering ist. Die erste Aktivierungsphase wäre somit nicht detektierbar. Im Anschluss an die Anlagerung eines zweiten Substrates (3) an das partiell aktivierte Enzym würde die vergleichsweise langsame Umwandlung zum aktivierten Enzym erfolgen (4), welche durch den exponentiellen Anteil der Progresskurven beschrieben wird. Eine Veränderung des Verhältnisses von Anfangs- zu Endanstieg der Progresskurven bei verschiedenen Temperaturen könnte aus einer unterschiedlichen Temperaturabhängigkeit der einzelnen Schritte resultieren.

#### 3.4.4. Der Einfluss der Substratkonzentration auf die beobachtete Aktivierungsgeschwindigkeitskonstante

Reicht die Bindung eines regulatorischen Substrates zur vollständigen Aktivierung des Enzyms aus, lässt sich die Abhängigkeit der beobachteten Aktivierungsgeschwindigkeitskonstante  $k_{\text{obs}}$  von der Substratkonzentration mit einer hyperbolen Funktion mit Anfangsterm beschreiben und die Dissoziationskonstante des Regulatorsubstrates bestimmen (Hübner *et al.*, 1978). Auch für rPsPDC wurde ein steigender  $k_{\text{obs}}$ -Wert mit zunehmender Substratkonzentration gefunden. Im Unterschied zum Hefeenzym ist der Kurvenverlauf jedoch sigmoid (Abb. 21) und lässt sich nach der einfachen Funktion von Gl. 6 beschreiben.

$$k_{\text{obs}} = k_r + \frac{k_h \cdot S^2}{C + D \cdot S + S^2} \qquad \text{Gl. 6}$$

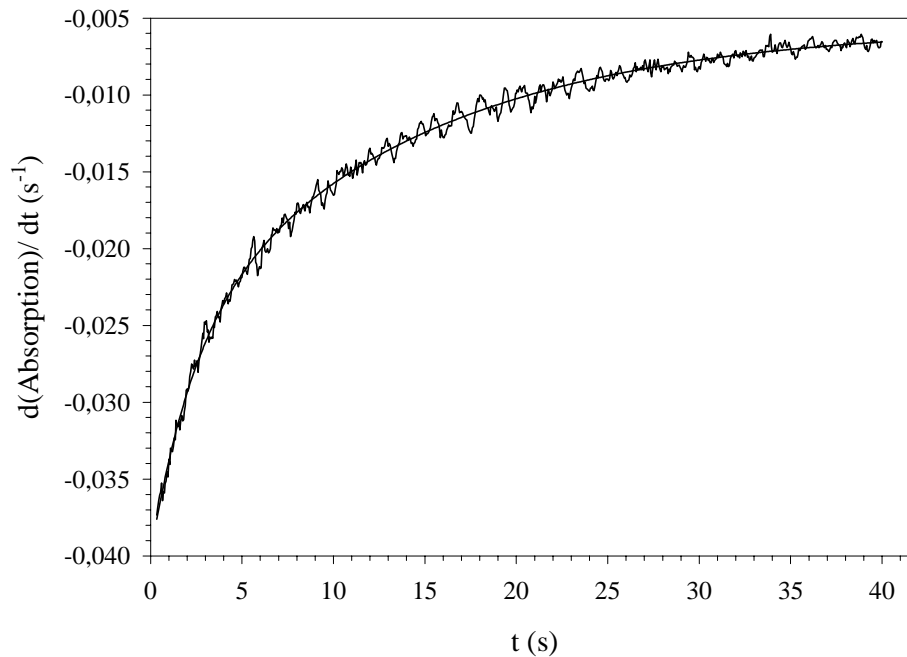


**Abb. 21:** Abhängigkeit von  $k_{obs}$  von der Substratkonzentration (Temperatur 20 °C, 100 mM MES pH 6,2 und Fit nach Gl. 6 mit  $k_r = 0,0829$ ,  $k_h = 0,6949$ ,  $A = 50,569$  (mM)<sup>2</sup> und  $B = 1,8208$  mM).

Die sigmoide Kurvenform ist ein weiteres Indiz für das oben beschriebene Modell der Aktivierung. Anhand dieses Modells beschreibt  $k_{obs}$  die Bindung des 2. Regulatorsubstrates. Wird die Bindung dieses Pyruvates von der Bindung des ersten Substrates positiv beeinflusst, sollte, wie für rPsPDC gefunden, eine sigmoide Abhängigkeit von  $k_{obs}$  gegenüber der Substratkonzentration resultieren.

Prinzipiell lässt sich auch die Rückreaktion der Aktivierung messen. Wird das Enzym mit Pyruvat inkubiert und nach Erreichen der *steady-state*-Geschwindigkeit die Substratkonzentration verringert, sinkt auch die Konzentration an aktivierter PDC. Die resultierende Aktivitätsänderung ist erst nach mehreren Sekunden abgeschlossen. Rekombinante PsPDC zeigte dabei eine Aktivitätsabnahme, die zweiphasig verläuft (Abb. 22), was dem oben beschriebenen Modell entspricht. Die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten waren  $0,44 s^{-1}$  und  $0,076 s^{-1}$ . Die Anpassung an *eine* Reaktion erster Ordnung weicht deutlich von den experimentellen Daten ab.





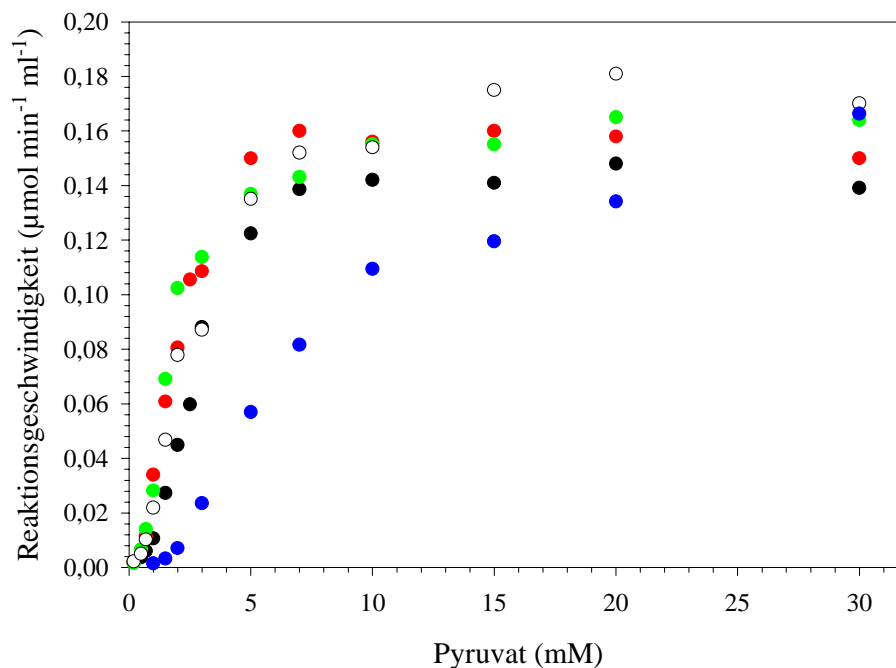
**Abb. 22:** Änderung der Aktivität in Abhängigkeit von der Zeit bei Verdünnung des Enzym/ Substratansatzes und Fit nach einer Summe von zwei Reaktionen erster Ordnung (Enzymkonzentration 40  $\mu\text{g/ml}$ , schnelle Reduktion der Pyruvatkonzentration von 2mM auf 1 mM, Präinkubationszeit 25 s, 100 mM MES pH 6,2, Temperatur 20 °C).

Bisher sind keine genauen Angaben zum Bindungsort der regulatorischen Substrate möglich. Eine kooperative Bindung in den katalytischen Zentren kann nicht ausgeschlossen werden. Für Hefe-PDC wurden die im Rahmen der Aktivierung stattfindenden Tertiärstrukturänderungen näher beschrieben. Die in Gegenwart von Pyruvamid, einem artifiziellen allosterischen Aktivator des Enzyms, kristallisierte PDC enthielt in zwei benachbarten von 4 katalytischen Zentren Pyruvamid. Diese Zentren sind durch zwei *loops* geschlossen, welche von den Aminosäuren 106-113 und 292-301 gebildet werden. Im nativen Zustand sind diese *loop*-Bereiche ungeordnet und die katalytischen Zentren sind lösungsmittelzugänglich. Die nicht durch Pyruvat regulierte PDC aus *Zymomonas mobilis* weist an dieser Stelle (101-112 und 285-302) zwei geordnete *loops* auf (Dobritzsch, 1998). Zwei weitere Pyruvamidmoleküle wurden im Zwischenraum von  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Domänen der Untereinheiten mit definierten *loops* über dem aktiven Zentrum gefunden. Deren Bindung wird durch Wasserstoffbrückenbindungen zur Seitenkette des Tyrosins 157 und zum Hauptkettensauerstoff des Arginin 224 stabilisiert (Lu *et al.*, 2000). In pflanzlichen PDCs und dem Enzym aus *Zymomonas mobilis* ist der Tyrosinrest nicht konserviert. Diese PDC-Spezies besitzen in der entsprechenden Position einen Leucinrest. Ein Vergleich der Primärstrukturen

der *loop*-Bereiche über den aktiven Zentren zeigt, dass rekombinante PsPDC, wie auch alle anderen bisher untersuchten pflanzlichen PDCs, eine von beiden Enzymen mikrobiellen Ursprungs verschiedene Aminosäuresequenz besitzt, so dass weitere Aussagen in Analogie zu bekannten Strukturen nicht möglich sind. Die Ähnlichkeit zu PDC aus *Zymomonas mobilis* ist in diesen Bereichen jedoch größer als die zum Hefeenzym.

### 3.4.5. Die Abhängigkeit der v/S-Charakteristik vom pH-Wert

Die Untersuchungen zum Einfluss des pH-Wertes wurden bei einer Ionenstärke von 0,1 M in MES (pH 5,2-6,7) bzw. MOPS (pH 6,7-7,2) durchgeführt. Bei pH 6,2 und 6,4 ist die Reaktionsgeschwindigkeit bei kleinen Substratkonzentrationen am höchsten, von pH 6,0 bis 7,0 wird die gleiche maximale Geschwindigkeit bei hohen Substratkonzentrationen erreicht (Abb. 23). Wie bei PDC aus Brauhefe (Alvarez *et al.*, 1991) verringert sich die Reaktionsgeschwindigkeit bei Pyruvatkonzentrationen über 30 mM.

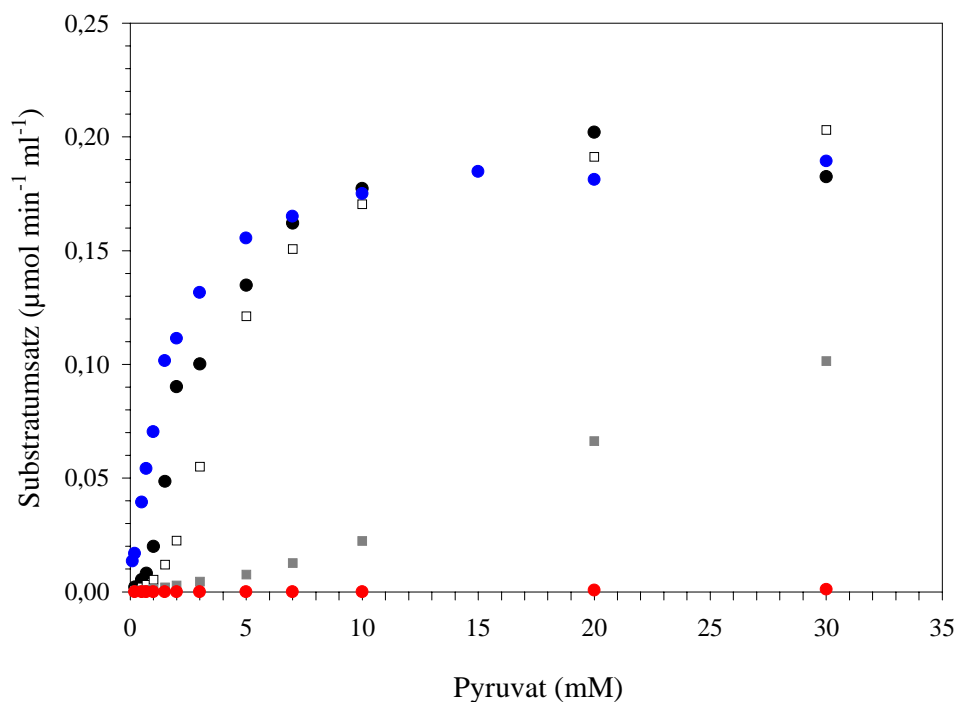


**Abb. 23:** v/S-Charakteristiken in Abhängigkeit vom pH-Wert (Enzymkonzentration jeweils 4 µg/ml, Temperatur 30 °C). pH 6,0 (●); pH 6,2 (●); pH 6,4 (●); pH 6,7 (○); pH 7,0 (●).

Unter pH 6,0 fällt die Maximalgeschwindigkeit sofort drastisch ab. Bei pH 5,6 liegt sie nur noch bei ca. 10 % des Wertes von pH 6,2. Daneben tritt schon bei Pyruvatkonzentrationen ab 10 mM eine drastische Substratüberschusshemmung ein. Dieses Verhalten wurde auch für rekombinante Hefe-PDC beschrieben (Guo *et al.*, 1998). Bei pH 7,0 steigt der  $S_{0,5}$ -Wert an, die Maximalgeschwindigkeit entspricht jedoch der bei pH 6,2 erreichten Substratumsatzgeschwindigkeit. Oberhalb von pH 7,0 verringert sich auch die Maximalgeschwindigkeit, evtl. wegen der zunehmenden Dissoziation der Cofaktoren des Enzyms.

### 3.4.6. Der Einfluss verschiedener Salze auf die Kinetik von rekombinanter PsPDC

Die Untersuchung des Salzeinflusses auf die Reaktionsgeschwindigkeit war notwendig, um mögliche Effektoreigenschaften verschiedener Ionen festzustellen, die in weiteren Experimenten berücksichtigt werden mussten.



**Abb. 24:** Der Einfluss verschiedener Salze auf die  $v/S$ -Charakteristik von  $rPsPDC$  (Enzymkonzentration  $4 \mu\text{g/ml}$ , Temperatur  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Ohne zusätzliches Salz (●), inkl.  $500 \text{ mM}$  Natriumphosphat (●), inkl.  $500 \text{ mM}$   $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (■), inkl.  $250 \text{ mM}$   $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (□) inkl.  $500 \text{ mM}$   $\text{NaCl}$  (●).

In Abb. 24 ist dargestellt, welche Auswirkungen hohe Konzentrationen verschiedener Ionen auf die  $v/S$ -Charakteristik haben.  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  zeigte bei geringen Substratkonzentrationen einen inhibierenden Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit. Der  $S_{0,5}$ -Wert stieg bei einer Konzentration von 250 mM auf 4 mM Pyruvat an, die Maximalgeschwindigkeit blieb gleich.

Ammoniumsulfat erhöhte den  $S_{0,5}$ -Wert, die Reaktionsgeschwindigkeit erreichte auch bei Pyruvatkonzentrationen von 100 mM nicht die Maximalgeschwindigkeit ohne Effektor.

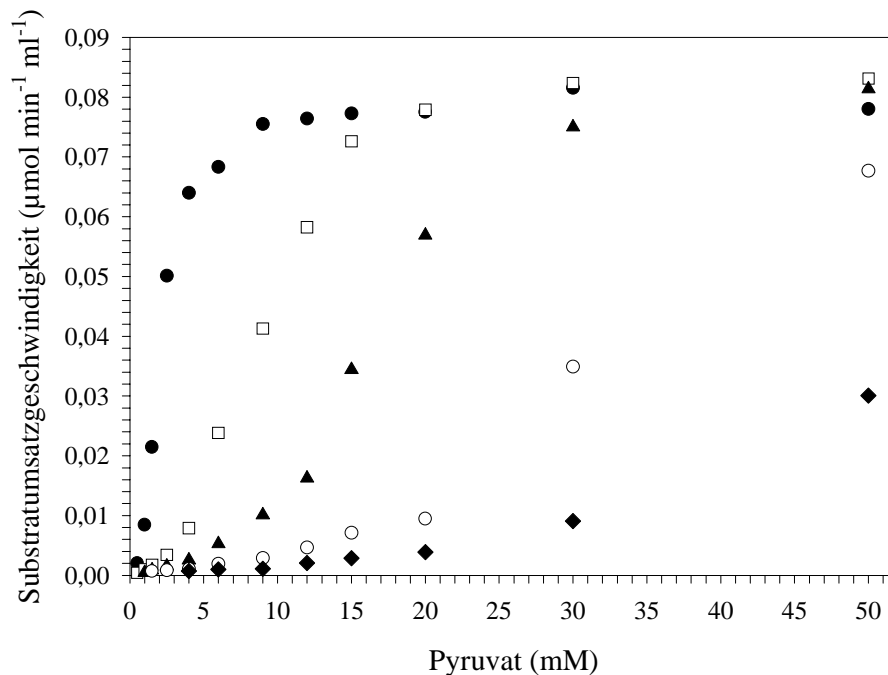
Von den eingesetzten Salzen zeigten NaCl und Natriumphosphat die deutlichsten Effekte. NaCl wirkte in einer Konzentration von 500 mM als Aktivator bei niedrigen Substratkonzentrationen (die Kurve wurde annähernd hyperbol). Die Maximalgeschwindigkeit blieb im Vergleich zur Referenz unverändert und der resultierende  $K_M$ -Wert lag bei 1,2 mM. Der aktivierende Einfluss von NaCl auf die *steady-state*-Geschwindigkeit von nativer PsPDC bei geringen Pyruvatkonzentrationen wurde bereits 1997 von Mücke beschrieben. Im Gegensatz zum rekombinanten Enzym wird hier jedoch die Maximalgeschwindigkeit nicht erreicht. In Gegenwart von 1 M KBr, NaI, Natriumacetat und  $\text{NaClO}_4$  wurden ebenfalls hyperbole Kurven erhalten, jedoch bei gleichzeitiger Verringerung der Maximalgeschwindigkeit und steigendem  $K_M$ -Wert.

Wurde rekombinante PsPDC in Gegenwart verschiedener Konzentrationen an NaCl inkubiert und anschließend Pyruvat zugegeben, vergrößerte sich das Verhältnis der Anfangs- zu den Endanstiegen der Progresskurven des Substratumsatzes mit steigenden NaCl-Konzentrationen. Aktivatorkonzentrationen von mehr als 1 M resultierten in einer größeren Initialgeschwindigkeit (zum Zeitpunkt  $t = 0$ ) im Vergleich zur *steady-state*-Geschwindigkeit. Die Variation der Inkubationszeit mittels *sequential-stopped-flow*-Experimenten zeigte, dass die Aktivierung in Gegenwart von 2 M NaCl nach etwa einer Sekunde abgeschlossen ist. Anders als bei PDC aus Brauhefe ist NaCl kein kompetitiver Inhibitor rekombinanter PsPDC. Das kinetische Verhalten entspricht dem eines allosterischen Aktivators.

Der inhibitorische Einfluss von Phosphat ist, verglichen mit dem anderer Salze, sehr hoch. In Gegenwart von 500 mM Phosphat stieg die Reaktionsgeschwindigkeit bei 100 mM Substrat auf nur ca. 5 % der Maximalgeschwindigkeit ohne Salz. Bereits 10 mM Phosphat führten zu einer drastischen Steigerung des  $S_{0,5}$ -Wertes auf 8 mM (Abb. 25).

Der Effekt von Phosphat lässt sich mit dem eines allosterischen Inhibitors beschreiben, welcher unter anderem die Substratbindung beeinflusst. Bei Phosphatkonzentrationen von mehr als 100 mM ist ein Erreichen der Maximalgeschwindigkeit faktisch nicht mehr möglich, da die notwendigen Substratkonzentrationen zusätzliche Effekte auf die Reaktionsgeschwindigkeit haben. Sowohl für PDC aus Brauhefe als auch für native PsPDC

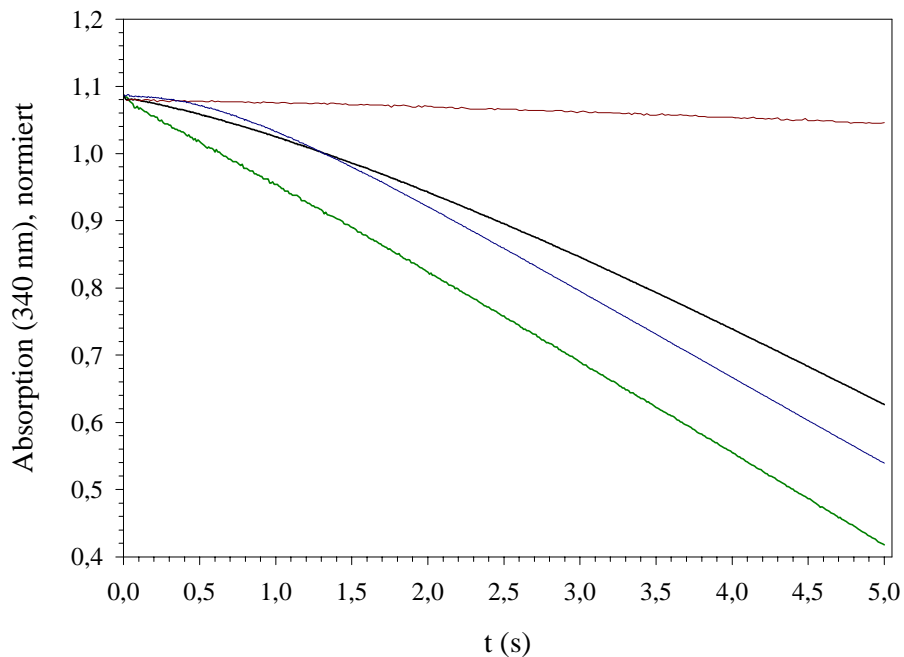
wurde eine Verringerung der Aktivierungsgeschwindigkeit bei steigenden Phosphatkonzentrationen beschrieben (Hübner *et al.*, 1978, Mücke *et al.*, 1995). Für rekombinante PsPDC führten dagegen steigende Inhibitorkonzentrationen in Gegenwart von 10 mM Pyruvat zu größeren beobachteten Geschwindigkeitskonstanten der Substrataktivierung. Die Ursache für das kinetische Verhalten von rekombinanter PsPDC in Gegenwart von Phosphat könnte demnach die Beschleunigung der Rückreaktion der Aktivierung sein. Entsprechende Messungen zeigten, dass die Rückreaktion der Aktivierung in Gegenwart von Phosphat einphasig verläuft. Die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten liegen im Bereich der schnellen Phase der Inaktivierung in Abwesenheit des Inhibitors. Möglicherweise steigt  $k_{\text{obs}}$  der langsamen Phase der Inaktivierung auf Werte von  $k_{\text{obs}}$  der schnellen Phase, so dass eine Unterscheidung beider Phasen nicht mehr möglich ist.



**Abb. 25:**  $v/S$ -Charakteristiken von rPsPDC in Abhängigkeit von der Phosphatkonzentration (Enzymkonzentration  $2\mu\text{g/ml}$ , Temperatur  $30\text{ }^\circ\text{C}$ ). 0 (●), 10 (□), 20 (▲), 50 (○), und 100 (◆) mM Natriumphosphat.

NaCl kann die hemmenden Effekte von Natriumphosphat unterdrücken. Wurde das Enzym mit 50 mM Natriumphosphat inkubiert und anschließend Substrat und NaCl zugegeben, konnte die *steady-state*-Geschwindigkeit des Enzyms ohne Aktivator/Inhibitor erreicht werden (Abb. 26). Die beobachtete Aktivierungsgeschwindigkeitskonstante war mit  $1,1\text{ s}^{-1}$  größer als bei der Referenzmessung ohne Effektor ( $0,45\text{ s}^{-1}$ ). Der Wert für die Messung in

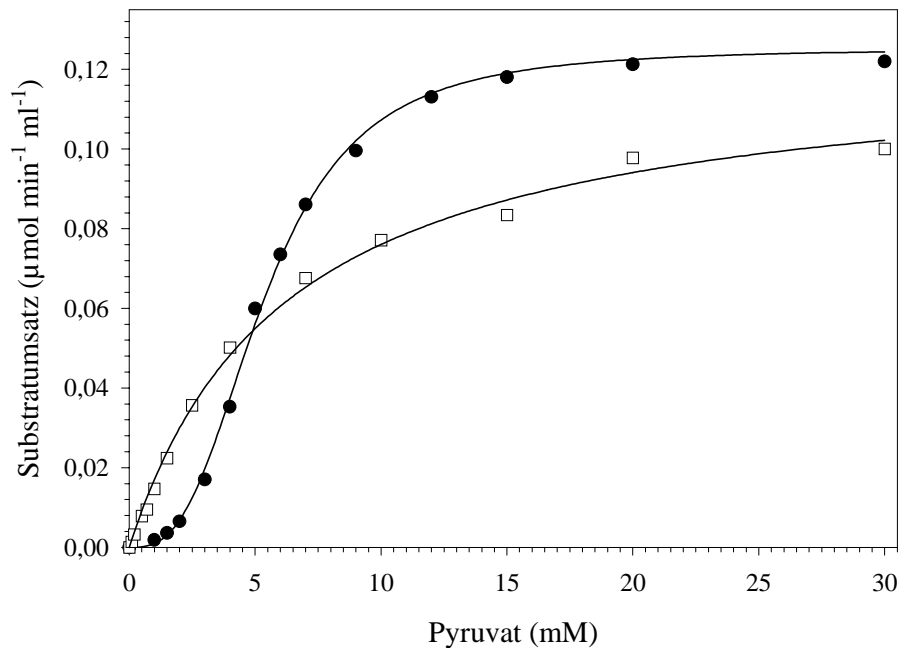
Gegenwart von Phosphat betrug  $0,8 \text{ s}^{-1}$ , allerdings bei einer um etwa 90 % geringeren *steady-state*-Geschwindigkeit. Eine Inkubation mit 200 mM NaCl führte nach anschließender Zugabe von Substrat und Phosphat zu einer linearen Progresskurve bei gleicher *steady-state*-Geschwindigkeit, wie für die Referenzmessung gefunden wurde.



**Abb. 26:** Progresskurven der Substrataktivierung von rPsPDC in Gegenwart von Natriumphosphat und NaCl (Enzymkonzentration  $40 \mu\text{g/ml}$ ,  $100 \text{ mM}$  MES pH 6,2,  $10 \text{ mM}$  Pyruvat, Temperatur  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Referenzmessung ohne Effektor (—), nach Inkubation mit  $50 \text{ mM}$  Natriumphosphat (—), nach Inkubation mit  $50 \text{ mM}$  Natriumphosphat und  $200 \text{ mM}$  NaCl (Endkonzentration) in der Substratlösung (—), nach Inkubation mit  $200 \text{ mM}$  NaCl und  $50 \text{ mM}$  Natriumphosphat (Endkonzentration) in der Substratlösung (—).

### 3.4.7. Der Umsatz von substratanalogen Verbindungen

Generell ist die von PDC katalysierte Hauptreaktion die Decarboxylierung von  $\alpha$ -Oxocarbonsäuren, wobei Pyruvat als Substrat bevorzugt umgesetzt wird. Brauhefe-PDC ist jedoch in der Lage auch länger-kettige und verzweigte  $\alpha$ -Oxocarbonsäuren sowie Phenylglyoxylsäuren zu decarboxylieren. Die Substratbindungsgeschwindigkeit korreliert dabei linear mit den sterischen Substituentenparametern (Lehmann *et al.*, 1972).



**Abb. 27:** *v/S*-Charakteristik der Decarboxylierung von  $\alpha$ -Ketobutyrat in Gegenwart (□) und Abwesenheit (●) von 1 M NaCl mit den Anpassungen nach Michaelis-Menten und Hill (100 mM MES pH 6,2, Enzymkonzentration 5  $\mu$ g/ml, Temperatur 30 °C).

Auch rekombinante PsPDC setzt länger-kettige Substrate um. Die Parameter der Decarboxylierung von  $\alpha$ -Ketobutyrat ähneln denen der Umsetzung von Pyruvat, allerdings stieg der  $S_{0,5}$ -Wert auf 5 mM und die Maximalgeschwindigkeit erreichte nur 50 %. Eine einfache Anpassung nach Hill beschreibt die experimentellen Daten gut, der ermittelte Koeffizient beträgt 2,9. In Gegenwart von 1 M NaCl verläuft die *v/S*-Charakteristik hyperbol (Abb. 27). Im Gegensatz dazu waren die *v/S*-Charakteristiken der Decarboxylierung von  $\alpha$ -Ketovalerat und  $\alpha$ -Ketocapronat hyperbol. Auch die Progresskurven zur Untersuchung der Substrataktivierung waren für  $\alpha$ -Ketovalerat bei 20 °C linear, was ein Indiz für eine Grundaktivität des Enzyms in Abwesenheit des Substrates ist. Der Zusatz von 1 M NaCl zum Reaktionsansatz veränderte die *v/S*-Charakteristiken nicht. Die  $S_{0,5}$ -Werte und die relativen Maximalgeschwindigkeiten sind in Tab. 8 dargestellt. Dimethylpyruvat wird noch umgesetzt, allerdings lagen die Reaktionsgeschwindigkeiten auch bei Substratkonzentrationen über 100 mM unter 1 % der Werte für Pyruvat. Eine quantitative Bestimmung der kinetischen Parameter und der Kurvenform war für dieses Analogon nicht möglich.

**Tab. 8:** Relative Maximalgeschwindigkeiten und  $S_{0,5}$ - bzw.  $K_M$ -Werte der Umsetzung pyruvatanaloger Verbindungen mit rekombinanter PsPDC.

Substrat	$S_{0,5}$ bzw. $K_M$ (mM)	$V_{\max}$ (rel.)
Pyruvat	1,9	100
$\alpha$ -Ketobutyrat	5,5	49
$\alpha$ -Ketobutyrat inkl. 1 M NaCl	6,2	48
$\alpha$ -Ketovalerat	25,8	15
$\alpha$ -Ketocapronat	3,9	2,4

Auch native PsPDC setzt längerkettige Substrate um. Das Enzym ist dabei etwas effektiver als rekombinante PsPDC, was in niedrigeren  $S_{0,5}$ -Werten und höheren Maximalgeschwindigkeiten zum Ausdruck kommt (Tab. 9). Die  $v/S$ -Charakteristiken der Decarboxylierung von  $\alpha$ -Ketovalerat und  $\alpha$ -Ketocapronat sind im Gegensatz zu den Kurven des rekombinanten Enzyms sigmoid. Alle  $v/S$ -Charakteristiken konnten nach einem Modell angepasst werden, bei dem die Bindung von 2 Substraten für die Katalyse eines Substrates bei voller Geschwindigkeit ausreicht. Die  $v/S$ -Charakteristik der Decarboxylierung von  $\alpha$ -Ketobutyrat wurde in Gegenwart von 1 M NaCl hyperbol.

Dimethylpyruvat wurde vom nativen Enzym besser umgesetzt als von rekombinanter PsPDC. Eine quantitative Auswertung war jedoch nicht möglich. Die Maximalgeschwindigkeit der Reaktion, welche erst bei Konzentrationen über 100 mM erreicht wurde, lag bei etwa 2 % im Vergleich zur Decarboxylierungsgeschwindigkeit von Pyruvat.

Die sterischen Substituentenparameter korrelierten für beide Enzyme nicht linear mit der Maximalgeschwindigkeit oder der Substratbindungsgeschwindigkeit. Generell sind beide PsPDC-Formen substratspezifischer als Brauherfe-PDC. Die kinetischen Parameter rekombinanter PsPDC entsprechen eher den für PDC aus *Zymomonas mobilis* gefundenen Daten (Iding *et al.*, 1998). Grund dafür könnte ein weniger lösungsmittel- und



substratzugängliches aktives Zentrum sein, so dass Substrate mit größeren aliphatischen Resten kaum oder gar nicht mehr gebunden werden können. Permanent ausgeprägte *loop*-Regionen, die über dem aktiven Zentrum von PDC aus *Zymomonas mobilis* gefunden wurden (Dobritzsch, 1998), könnten auch bei PsPDC die Ursache für die erhöhte Substratspezifität sein.

**Tab. 9:** *Relative Maximalgeschwindigkeiten und  $S_{0,5}$ - bzw.  $K_M$ -Werte der Umsetzung pyruvat analoger Verbindungen mit nativer PsPDC.*

Substrat	$S_{0,5}$ bzw. $K_M$ (mM)	$V_{\max}$ (rel.)
Pyruvat	0,9	100
$\alpha$ -Ketobutyrat	2,9	65
$\alpha$ -Ketobutyrat inkl. 1 M NaCl	7,9	65
$\alpha$ -Ketovalerat	9,8	21
$\alpha$ -Ketocapronat	5,3	13

## 4. Zusammenfassung

Zahlreiche Strukturgene von Pyruvatdecarboxylasen aus Prokaryoten, Pilzen und Pflanzen wurden in den letzten Jahren sequenziert. Das PDC-Gen aus *Zymomonas mobilis* und *PDC1* aus *Saccharomyces cerevisiae* konnten erfolgreich in *Escherichia coli* exprimiert werden. Ziel der vorliegenden Arbeit war die heterologe Expression eines pflanzlichen PDC-Gens und die strukturelle und kinetische Charakterisierung des Expressionsproduktes im Vergleich zum nativen Protein. Im Zuge dieser Arbeiten sollten auch bisher ungeklärte Aspekte der Struktur und Kinetik des nativen Proteins untersucht werden.

*PDC1*, ein Strukturgen von PDC aus *Pisum sativum*, konnte nach der Fusion bereits verfügbarer cDNA-Fragmente in *Escherichia coli* exprimiert werden. Allerdings war das erhaltene Expressionsprodukt immer inaktiv, größtenteils unlöslich und teilweise unspezifisch proteolytisch abgebaut. Dagegen führte die Expression in *Saccharomyces cerevisiae* zu aktiver homooligomerer rekombinanter PsPDC. Ursache dafür könnten essentielle posttranslationale Modifikationen sein, die nur im eukaryotischen Expressionssystem realisiert werden können. Mit der Etablierung der Expression von *PDC1* in *Saccharomyces cerevisiae* wurde auch die Voraussetzung für die Expression molekularbiologisch modifizierter PsPDC geschaffen.

Die Masse einer Untereinheit von rekombinanter PsPDC beträgt  $64,1 \pm 0,2$  kDa. Wie mit elektronenmikroskopischen Aufnahmen gezeigt werden konnte, liegt das Holoenzym im nativen Zustand bei pH 6,2 als filamentöses Homopolymer mit unterschiedlichem Oligomerisierungsgrad vor. Die Masse pro Länge der Filamente beträgt 43,3 kDa/nm. Ein Überschuss an Cofaktoren führt zur Ausbildung langer, annähernd linearer Enzymfilamente, wahrscheinlich, weil das Protein in seiner Holoenzymform stabilisiert wird. Rekombinante Apo-PsPDC weist einen erheblich geringeren Oligomerisierungsgrad auf. STEM-Messungen und Gelfiltrationsexperimente zeigten, dass Tetramere, Oktamere und Dodekamere die am häufigsten auftretenden Oligomere der Apoenzymfraktionen sind. Die größte Abmessung der Tetramere entspricht der kleinsten Abmessung der größeren Oligomere und dem Durchmesser der Filamente. Der Oligomerisierungsgrad konnte durch die Zugabe von  $MgSO_4$  weiter gesenkt werden. Die Rekonstitution zum Holoenzym mit beiden Cofaktoren führt zur erneuten Ausbildung filamentöser Strukturen.

Die Filamente weisen eine superhelikale Struktur auf. Anhand der Powerspektren wurde eine axiale Periode von 19,29 nm bestimmt, die durch 3 benachbarte Bausteine gekennzeichnet ist. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus den STEM-Messungen konnte somit gezeigt werden, dass eine axiale Periode der Filamente aus 3 tetrameren Bausteinen aufgebaut ist, welche zueinander um 120° verdreht sind. In Analogie zum symmetrischen Aufbau der Tetramere bisher untersuchter PDC-Spezies wäre auch eine Verdrehung um 60° möglich. Damit wird deutlich, dass rekombinante PsPDC im Vergleich zu den PDC-Spezies aus Hefe und *Zymomonas mobilis* auf Grund zusätzlicher Wechselwirkungen zwischen tetrameren Formen Filamente ausbildet. Bisher ist ungeklärt, ob die filamentöse Form des Holoenzym eine Voraussetzung für die enzymatische Aktivität darstellt oder ob die optimalen Bedingungen für die Aktivität des Enzyms und die Ausbildung der Filamente unabhängig voneinander ähnlich sind.

Die Quartärstruktur nativer PsPDC ist der von rekombinanter PsPDC sehr ähnlich. Unterschiede bestehen nur in der Größe einzelner Parameter. Der Abstand zwischen zwei Helixbausteinen der Holoenzymfilamente beträgt 6,35 nm und die Länge der axialen Periode folglich 19,05 nm. Die Masse pro Länge dieser Filamente beträgt  $46,9 \pm 2,6$  kDa/nm. Die Zusammensetzung aus 2 verschiedenen Untereinheiten resultiert offensichtlich in einer geringfügig höheren Packungsdichte der Filamente. Apoenzymfraktionen enthielten neben kleineren Oligomeren auch einige sehr kurze Filamente. Der Oligomerisierungsgrad erhöhte sich jedoch deutlich nach der Rekonstitution mit ThDP und  $Mg^{2+}$  zum Holoenzym.

Die Ähnlichkeit von rekombinanter und nativer PsPDC spiegelt sich auch in ihren spektroskopischen Eigenschaften wider. So weisen die Nah-UV CD-Spektren beider Holoenzyme ein charakteristisches positives Extremum bei 262 nm und ein negatives Extremum bei 283 nm auf. Beide Banden sind in den Apoenzymspektren nicht oder weniger deutlich ausgeprägt. Ebenso weisen die Fluoreszenzspektren der rekombinanten und nativen Enzymspezies nur geringe Unterschiede auf. Die Bindung des ThDP führt zu einer deutlichen Verringerung der Fluoreszenzintensität beider Proteine. Trotz des niedrigeren Oligomerisierungsgrades der Apoenzyme im Vergleich zu den Holoenzymen sind die Apoenzymspektren leicht blauverschoben. Möglicherweise tragen Tryptophanreste im Zwischenraum der tetrameren Bausteine weniger oder nicht zur Ausbildung der Spektren bei.

Rekombinante PsPDC besitzt einen  $k_{cat}$ -Wert von  $57 \text{ s}^{-1}$  bei 30 °C in 100 mM MES pH 6,2 und einen  $S_{0,5}$ -Wert von 2 mM. Der optimale pH-Wert der Decarboxylierung liegt bei 6,2. Die

Kooperativität ist stärker ausgeprägt als bei nativer PsPDC. Für einen Substratumsatz bei voller Katalysegeschwindigkeit ist die Bindung von mehr als zwei Substraten notwendig. Unmittelbar nach Zugabe von Pyruvat ist eine Aktivierungsphase zu beobachten, die bei hohen Substratkonzentrationen und einer Temperatur von 20 °C bereits nach wenigen Sekunden abgeschlossen ist. Die Progresskurven des dabei ablaufenden Substratumsatzes ließen sich mit einer Reaktion erster und nullter Ordnung auswerten. Die Abhängigkeit der beobachteten Aktivierungsgeschwindigkeitskonstanten von der Substratkonzentration war sigmoid, was ein Indiz dafür ist, dass die Bindung des Substrates, welche der beobachteten Aktivitätsänderung vorausgeht, durch die Bindung eines weiteren Regulatorsubstrates beeinflusst wird.

Rekombinante PsPDC wird durch NaCl aktiviert. In Gegenwart einer Salzkonzentration von 1 M wird die Abhängigkeit der Substratumsatzgeschwindigkeit von der Pyruvatkonzentration hyperbol. Dabei wird die Maximalgeschwindigkeit der Reaktion ohne NaCl erreicht. Der  $K_M$ -Wert beträgt 1,2 mM. Auch in Gegenwart von 1M KBr, NaI, Natriumacetat oder NaClO<sub>4</sub> verläuft die  $v/S$ -Charakteristik hyperbol, jedoch bei sinkender Maximalgeschwindigkeit und steigenden  $K_M$ -Werten.

Phosphat inhibiert die enzymatische Reaktion rekombinanter PsPDC. Bei Phosphatkonzentrationen bis 100 mM wird die Maximalgeschwindigkeit in Gegenwart hoher Pyruvatkonzentrationen erreicht. Im Gegensatz zu PDC aus Brauhefe verringert sich die beobachtete Aktivierungsgeschwindigkeitskonstante in Gegenwart des Inhibitors nicht.

Längerkettige Substratanaloga werden ebenfalls von rekombinanter und nativer PsPDC umgesetzt. Allerdings sinkt die Substratumsatzgeschwindigkeit erheblich mit steigender Kettenlänge und die  $S_{0,5}$ -Werte nehmen zu. In Bezug auf die Decarboxylierung substratanaloger Verbindungen entsprechen die maximal erreichbaren relativen Reaktionsgeschwindigkeiten eher denen des Enzyms aus *Zymomonas mobilis* als denen von Brauhefe-PDC.

## 5. Literaturverzeichnis

- Alvarez, F. J., Ermer, J., Hübner, G., Schellenberger, A. und Schowen, R. L.** (1991). Catalytic power of pyruvate decarboxylase. Rate-limiting events and microscopic rate constants from primary carbon and secondary hydrogen isotope effects. *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 8402-8409.
- Alvarez, M. E., Rosa, A. L., Temporini, E. D., Wolstenholm, A., Panzetta, G., Patrito, L. und Maccioni, H. J. F.** (1993). The 59-kDa polypeptide constituent of 8-10 nm cytoplasmatic filaments in *Neurospora crassa* is a pyruvate decarboxylase. *Gene* **130**, 253-258.
- Arjunan, P., Umland, T., Dyda, F., Swaminathan, S., Furey, W., Sax, M., Farrenkopf, B., Gao, Y., Zhang, D. und Jordan, F.** (1996). Crystal structure of the thiamin diphosphate-dependent enzyme pyruvate decarboxylase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* at 2.3 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **256**, 590-600.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., Struhl, K., Albright, L. M., Coen, D. M. und Varki, A.** (1994). *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons, Inc.
- Barburina, I., Gao, Y., Hu, Z. und Jordan, F.** (1994). Substrate activation of brewer's yeast pyruvate decarboxylase is abolished by mutation of cysteine 221 to serine. *Biochemistry* **33**, 5630-5635.
- Boitoux, A. und Hess, B.** (1970). Allosteric properties of yeast pyruvate decarboxylase. *FEBS Letters* **9**, 293-296.
- Bradford, M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Bräu, B. und Sahn, H.** (1986). Cloning and expression of the structural gene for the pyruvate decarboxylase of *Zymomonas mobilis* in *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.* **144**, 296-301.
- Breslow, R.** (1958). On the mechanism of thiamin action. IV. Evidence from studies on model systems. *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 3719-3726.
- Bringer-Meyer, S., Schminz, K. L. und Sahn, H.** (1986). Pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis*. Isolation and partial characterization. *Arch. Microbiol.* **146**, 105-110.
- Burstein, E. A., Vedenkina, N. S. und Ivkova, M. N.** (1973). Fluorescence and the location of tryptophan residues in protein molecules. *Photochem. Photobiol.* **18**, 263-279.
- Camp, P. J. und Randall, D. D.** (1985). Purification and characterization of the pea chloroplast pyruvate dehydrogenase complex. *Plant Physiol.* **77**, 571-577.

- Conway, T., Osman, Y. A., Konnan, J. I., Hoffmann, E. M. und Ingram, L. O.** (1987). Promotor and nucleotide sequence of the *Zymomonas mobilis* pyruvate decarboxylase. *J. Bacteriol.* **169**, 949-954.
- Davies, D. D. und Corbett, R. J.** (1969). Glyoxylate decarboxylase activity in higher plants. *Phytochemistry* **8**, 529-542.
- Del Sal, G., Manfioletti, G. und Schneider, C.** (1988). A one-tube plasmid DNA mini-preparation suitable for sequencing. *Nucl. Acids Res.* **16**, 9878.
- Demchenko, A. P.** (1986). *Ultraviolet spectroscopy of proteins*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Dietrich, A.** (1996). Strukturelle und kinetische Untersuchungen an Pyruvatdecarboxylase aus keimenden Erbsensamen, Diplomarbeit, Halle (Saale).
- Dietrich, A. und König, S.** (1997). Substrate activation behaviour of pyruvate decarboxylase from *Pisum sativum* cv. Miko. *FEBS Letters* **400**, 42-44.
- Dobritzsch, D.** (1998). Untersuchungen zu Struktur und Funktion von Pyruvatdecarboxylasen aus einem Brauereieinzuchtstamm und aus dem Bakterium *Zymomonas mobilis*., Dissertation, Halle (Saale).
- Dobritzsch, D., König, S., Schneider, G. und Lu, G.** (1998). High resolution crystal structure of pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis*. *J. Biol. Chem.* **273**, 20196-20204.
- Dower, W. J., Miller, J. F. und Ragsdale, C. W.** (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* **16**, 6127-6145.
- Dyda, F., Furey, W., Swaminathan, S., B., F. und Jordan, F.** (1993). Catalytic centers in the thiamin diphosphat dependent enzyme pyruvate decarboxylase at 2.4 Å resolution. *Biochemistry* **32**, 6165-6170.
- Engel, A. und Reichel, R.** (1988). Processing of quantitative scanning transmission electron micrographs. *Scanning Microscopy* **2**, 285-293.
- Eppendorfer, S.** (1991). Beiträge zur Affinität definierter Strukturelemente des Thiaminpyrophosphats und der Metallionen zum aktiven Zentrum der Hefe-Pyruvatdecarboxylase, Dissertation, Halle (Saale).
- Eppendorfer, S., König, S., Golbik, R., Neef, H., Lehle, K., Jaenicke, R., Schellenberger, A. und Hübner, G.** (1993). Effects of metal ions, thiamin diphosphate analogues and subunit interactions on the reconstitution behaviour of pyruvate decarboxylase from brewer's yeast. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **374**, 1129-1134.
- Ermer, J.** (1988). Beiträge zur Untersuchung von Transition-State-Strukturen enzymkatalysierter Reaktionen am Beispiel der Pyruvatdecarboxylase. Lösungsmittelisotopieeffekte und pL-Abhängigkeit der kinetischen Parameter der Enzym-Aktivierung und -Katalyse, Dissertation, Halle (Saale).

- Farrenkopf, B. C. und Jordan, F.** (1992). Resolution of brewer's yeast decarboxylase into multiple isoforms with similar subunit structure and activity using high-performance liquid chromatography. *Proteinexpr. Proteinpurif.* **3**, 101-107.
- Furey, W., Arjunan, P., Chen, L., Sax, M., Guo, F. und Jordan, F.** (1998). Structure-function relationships and flexible tetramer assembly in pyruvate decarboxylase revealed by analysis of crystal structures. *Biochim. Biophys. Acta* **1385**, 253-270.
- Furey, W., Arjunan, P., Chen, L., Dyda, F., Umland, T., Swaminathan, S., Sax, S., Jordan, F., Farrenkopf, B., Gao, Y. und Zhang, D.** (1996). Multiple modes of tetramer assembly and insight into allosteric activation revealed by X-ray crystal structures of pyruvate decarboxylase. In *Biochemistry and physiology of thiamin diphosphate enzymes* (ed. H. Bisswanger and A. Schellenberger), S. 103-124, A. u. C. Intemann, Wissenschaftlicher Verlag, Prien, Germany.
- Gill, S. C. und Hippel, P. H.** (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* **182**, 319-326.
- Golbik, R.** (1986). Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen an Hefe-Pyruvatdecarboxylase, Dissertation, Halle (Saale).
- Golbik, R., Neef, H., König, S., Seliger, B., Meshalkina, L., Kochetov, G. A. und Schellenberger, A.** (1991). Function of the aminopyrimidine part in thiamin pyrophosphate enzymes. *Bioorg. Chem.* **19**, 10-17.
- Gounaris, A. D., Turkenkopf, I., Buckwald, S. und Young, A.** (1971). Pyruvate decarboxylase I. Protein dissociation into subunits under conditions in which thiamine pyrophosphate is released. *J. Biol. Chem.* **246**, 1302-1309.
- Gounaris, A. D., Turkenkopf, I., Civerchia, L. L. und Grennlie, J.** (1975). Pyruvate decarboxylase III. Specificity restrictions for thiamine pyrophosphate in the protein association step; subunit structure. *Biochim. Biophys. Acta* **405**, 492-498.
- Guo, F., Zhang, D., Kahyaoglu, A., Farid, R. S. und Jordan, F.** (1998). Is a hydrophobic amino acid required to maintain the reactive V conformation of Thiamin at the center of Thiamin diphosphate-requiring enzymes? Experimental and computational studies of isoleucine 415 of yeast pyruvate decarboxylase. *Biochemistry* **37**, 13379-13391.
- Hasson, M. S., Muscate, A., McLeish, M. J., Polovnikova, L. S., Gerlt, J. A., Kenyon, G. L., Petsko, G. A. und Ringe, D.** (1998). The crystal structure of benzoylformate decarboxylase at 1.6 Å resolution: Diversity of catalytic residues in thiamin diphosphate-dependent enzymes. *Biochemistry* **37**, 9918-9930.
- Hegerl, R.** (1996). The EM program package: a platform for image processing in biological electron microscopy. *J. Struct. Biol.* **116**, 30-34.
- Hohmann, S., Eberhardt, I., Muller, E. und Pretorius, G. J. H.** (1996). Control of the synthesis of pyruvate decarboxylase in yeast. In *Biochemistry and Physiology of Thiamine*

- Diphosphate Enzymes*. (ed. H. Bisswanger and A. Schellenberger), S. 125-133. A. u. C. Intemann, Wissenschaftlicher Verlag, Prien, Germany.
- Hohmann, S. und Meacock, P. A.** (1998). Thiamin metabolism and thiamin-dependent enzymes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: genetic regulation. *Biochim. Biophys. Acta* **1385**, 201-219.
- Holoway, P. und Subden, R. E.** (1994). The nucleotide sequence and initial characterization of pyruvate decarboxylase from the yeast *Hanseniasporum uvarum*. *Yeast* **10**, 1581-1589.
- Holzer, H. und Beaucamp, K.** (1959). Nachweis und Charakterisierung von Zwischenprodukten der Decarboxylierung und Oxidation von Pyruvat: "aktiviertes Pyruvat" und "aktivierter Acetaldehyd". *Angew. Chem.* **24**, 776.
- Holzer, H., Schultz, G., Villar-Palasi, C. und Jüntgen-Sell, J.** (1956). Isolierung der Hefecarboxylase und Untersuchungen über die Aktivität des Enzyms in lebenden Zellen. *Biochem. Z.* **327**, 331-344.
- Hopmann, R. F. W.** (1980). Hydroxyl-ion-induced subunit dissociation of yeast cytoplasmatic pyruvate decarboxylase, a circular dichroism study. *Eur. J. Biochem.* **258**, 311-318.
- Hossain, M. A., Huq, E. und Hodges, T. K.** (1994). Sequence of a cDNA from *Oryza sativa* (L.) encoding the pyruvate decarboxylase 1 gene. *Plant Physiol.* **106**, 799-800.
- Hübner, G., König, S. und Schellenberger, A.** (1988). The functional role of thiol groups of pyruvate decarboxylase from brewer's yeast. *Biomed. Biochim. Acta* **47**, 9-18.
- Hübner, G. und Schellenberger, A.** (1986). Pyruvate decarboxylase - potentially inactive in the absence of the substrate. *Biochem. Int.* **13**, 767-772.
- Hübner, G., Weidhase, R. und Schellenberger, A.** (1978). The mechanism of substrate activation of pyruvate decarboxylase: A first approach. *Eur. J. Biochem.* **92**, 175-181.
- Iding, H., Siegert, P., Mesch, K. und Pohl, M.** (1998). Application of  $\alpha$ -keto acid decarboxylases in biotransformations. *Biochim. Biophys. Acta* **1385**, 307-322.
- Jordan, F., Nemeria, N., Guo, F., Barburina, I., Gao, Y., Kahyaoglu, A., Li, H., Yi, J., Guest, J. R. und Furey, W.** (1998). Regulation of thiamin diphosphate-dependent 2-oxo acid decarboxylases by substrate and thiamin diphosphate. Mg(II) - evidence for tertiary and quaternary interactions. *Biochim. Biomed. Acta* **1385**, 287-306.
- Kellermann, E., Seeboth, P. G. und Hollenberg, C. P.** (1986). Analysis of the primary structure and promotor function of a pyruvate decarboxylase gene (*PDC1*) from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucl. Acids Res.* **14**, 8963-8977.
- Kelley, P. M., Godfrey, K., Lal, S. K. und Alleman, M.** (1991). Characterization of the maize pyruvate decarboxylase gene. *Plant Mol. Biol.* **17**, 1259-1261.



- Kenworthy, P. und Davies, D. D.** (1976). Kinetic aspects of regulation of pyruvic decarboxylase. *Phytochemistry* **15**, 279-282.
- Kern, D., Kern, G., Neef, H., Tittmann, K., Killenberg-Jabs, M., Wikner, C., Schneider, G. und Hübner, G.** (1997). How thiamin diphosphate is activated in enzymes. *Science* **275**, 67-70.
- Killenberg-Jabs, M.** (1997). Untersuchungen zum Katalysemechanismus, zu Stabilität und Faltung rekombinanter Hefe-Pyruvatdecarboxylase, Dissertation, Halle (Saale).
- Killenberg-Jabs, M., König, S., Eberhardt, I., Hohmann, S. und Hübner, G.** (1997). Role of Glu51 for cofactor binding and catalytic activity in pyruvate decarboxylase from yeast studied by site directed mutagenesis. *Biochemistry* **36**, 1900-1905.
- Killenberg-Jabs, M., König, S., Hohmann, S. und Hübner, G.** (1996). Purification and characterization of the pyruvate decarboxylase from a haploid strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **377**, 313-317.
- König, S., Dietrich, A., Svergun, D. und Koch, M. H. J.** (1996). Small-angle X-ray solution scattering studies on the oligomeric structure of the enzyme pyruvate decarboxylase (PDC) from germinating pea seeds. In: *Hasylab Jahresbericht* S. 131-132
- König, S., Svergun, D., Koch, M. H. J., Hübner, G. und Schellenberger, A.** (1992). Synchrotron radiation solution X-ray scattering study of the pH dependence of the quaternary structure of yeast pyruvate decarboxylase. *Biochemistry* **31**, 8726-8731.
- König, S., Svergun, D., Koch, M. H. J., Hübner, G. und Schellenberger, A.** (1993). The influence of the effectors of yeast pyruvate decarboxylase (PDC) on the conformation of the dimers and tetramers and their pH-dependent equilibrium. *Eur. Biophys. J.* **22**, 185-194.
- König, S., Svergun, D. I., Volkov, V. V., Feigin, L. A. und Koch, M. H. J.** (1998). Small-angle X-ray solution-scattering studies on ligand-induced subunit interactions of the thiamine diphosphate dependent enzyme pyruvate decarboxylase from different organisms. *Biochemistry* **37**, 5329-5334.
- Kuo, D., G., D. und Jordan, F.** (1986). Resolution of brewer's yeast pyruvate decarboxylase into two isozymes. *J. Biol. Chem.* **261**, 3316-3319.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Langston-Unkefer, P. J. und Lee, T. C.** (1985). Pyruvate decarboxylase from *Zea mays* L. 2. Examination of hysteretic kinetics. *Plant Physiol.* **79**, 436-440.
- Laszlo, A. und Lawrence, P. S.** (1983). Parallel induction and synthesis of PDC and ADH in anoxic maize roots. *Mol. Gen. Genet.* **192**, 110-117.
- Leblova, S. und Valik, J.** (1981). The effect of metals on isolated pea pyruvate decarboxylase. *Biol. Plant.* **23**, 81-85.

- Lee, T. C. und Langston-Unkefer, P. J.** (1985). Pyruvate decarboxylase from *Zea mays* L. I. Purification and partial characterization from mature kernels and anaerobically treated roots. *Plant Physiol.* **79**, 242-247.
- Lehmann, H., Fischer, G., Hübner, G., Kohnert, K.-D. und Schellenberger, A.** (1973). The influence of steric and electronic parameters on the substrate behaviour of  $\alpha$ -oxo acids to yeast pyruvate decarboxylase. *Eur. J. Biochem.* **32**, 83-87.
- Li, H., Furey, W. und Jordan, F.** (1999). Role of glutamate 91 in information transfer during substrate activation of yeast pyruvate decarboxylase. *Biochemistry* **38**, 9992-10003.
- Li, H. und Jordan, F.** (1999). Effects of substitution of tryptophan 412 in the substrate activation pathway of yeast pyruvate decarboxylase. *Biochemistry* **38**, 10004-10012.
- Lindqvist, Y., Schneider, G., Ermler, U. und Sundström, M.** (1992). Three-dimensional structure of transketolase, a thiamin diphosphat dependent enzyme at 2.5 Å. *EMBO J.* **11**, 2373-2379.
- Lockington, R. A., Borlace, G. N. und Kelly, J. M.** (1997). Pyruvate decarboxylase and anaerobic survival in *Aspergillus nidulans*. *Gene* **191**, 61-67.
- Lowe, S. E. und Zeikus, J.** (1992). Purification and characterization of pyruvate decarboxylase isolated from *Sarcina ventriculi*. *General Microbiol.* **138**, 803-807.
- Lu, G., Dobritzsch, D., Baumann, S., Schneider, G. und König, S.** (2000). The structural basis of substrate activation in yeast pyruvate decarboxylase. A crystallographic and kinetic study. *Eur. J. Biochem.* **267**, 861-868.
- Lu, G., Dobritzsch, D., König, S. und Schneider, G.** (1998). Novel tetramer assembly of pyruvate decarboxylase from brewer's yeast observed in a new crystal form. *FEBS Letters* **403**, 249-253.
- McCarthy, J. E. G.** (1998). Posttranscriptional control of gene expression in yeast. *Microbiol Mol. Biol. Rev.*, 1492-1553.
- Miernyk, J. A. und Randall, D. D.** (1987). Some kinetic properties of the pea mitochondrial pyruvate dehydrogenase complex. *Plant Physiol.* **83**, 306-310.
- Mücke, U.** (1997). Pyruvatdecarboxylase aus Erbsen (*Pisum sativum*) Biochemische und molekularbiologische Untersuchungen, Dissertation, Halle (Saale).
- Mücke, U., König, S. und Hübner, G.** (1995). Purification and characterization of pyruvate decarboxylase from pea seeds (*Pisum sativum* cv. Miko). *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **376**, 111-117.
- Mücke, U., Wohlfarth, T., Fiedler, U., Bäumlein, H., Rücknagel, K. P. und König, S.** (1996). Pyruvate decarboxylase from *Pisum sativum*. Properties, nucleotide and amino acid sequences. *Eur. J. Biochem.* **237**, 373-382.

- Müller, S. A., Goldie, K. N., Bürkie, R., Häring, R. und Engel, A.** (1992). Factors influencing the precision of quantitative scanning transmission electron microscopy. *Ultramicroscopy* **46**, 317-334.
- Muller, Y. A. und Schultz, G. E.** (1993). Structure of the thiamin and flavin-dependent enzyme pyruvate oxidase. *Science* **259**, 965-967.
- Neale, A. D., Scopes, R. K., Wettenhall, R. E. H. und Hoogenrad, N. J.** (1987). Pyruvate decarboxylase of *Zymomonas mobilis*: Isolation, properties and genetic expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **169**, 1024-1028.
- Perata, P. und Alpi, A.** (1993). Plant responses to anaerobiosis. *Plant Science* **93**, 1-17.
- Rivoal, J. und Hanson, A. D.** (1994). Metabolic control of anaerobic glycolysis. Overexpression of lactate dehydrogenase in transgenic tomato roots supports the Davies-Roberts Hypothesis and points to a critical role for lactate secretion. *Plant Physiol.* **106**, 1179-1185.
- Rivoal, J., Ricard, B. und Pradet, A.** (1990). Purification and partial characterization of pyruvate decarboxylase from *Oryza sativa*. *Eur. J. Biochem.* **194**, 791-797.
- Rivoal, J., Sonjeev, T., Pradet, A. und Ricard, B.** (1997). Differential induction of pyruvate decarboxylase subunits and transcripts in anoxic rice seedlings. *Plant Physiol.* **114**, 1021-1029.
- Rosa, A. L., Peralta-Soler, A. und Maccioni, H. J. F.** (1990). Purification of P59Nc and immunocytochemical studies of the 8- to 10 nm cytoplasmic filaments from *Neurospora crassa*. *Exp. Mycol.* **14**, 360-371.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T.** (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- Saxton, W. O.** (1996). Semper: distortion compensation, selective averaging, 3-D reconstruction and transfer function correction in a highly programmable system. *J. Struct. Biol.* **116**, 230-236.
- Saxton, W. O. und Baumeister, W.** (1982). The correlation averaging of a regularly arranged bacterial cell protein. *J. Microsc.* **127**, 127-138.
- Schellenberger, A., Heinroth, I. und Hübner, G.** (1967). Zur Theorie der Thiaminpyrophosphat-Wirkung, VI. Die Bedeutung der Konformationsverhältnisse zwischen Pyrimidin- und Thiazolring für die Coenzymwirkung von Thiaminpyrophosphat in der Hefe-Pyruvatdecarboxylase. *Hoppe-S. Z. Physiol. Chem.* **348**, 506-511.
- Schellenberger, A., Winter, K., Hübner, G., Schwaiberger, R., Helbig, D., Schumacher, S., Thieme, R., Bouillon, R. und Rädler, K. P.** (1966). Zur Theorie der

- Thiaminpyrophosphatwirkung. III. Rekombinations- und Funktionskinetik der Hefe-Pyruvatdecarboxylase. *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **346**, 123-147.
- Sieber, M., König, S., Hübner, G. und Schellenberger, A.** (1983). A rapid procedure for the preparation of highly purified pyruvate decarboxylase from brewer's yeast. *Biomed. Biochim. Acta* **42**, 343-349.
- Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J. und Dubendorff, J. W.** (1990). Use of T7 RNA Polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* **185**, 60-89.
- Thompson-Coffe, C., G., B., Zickler, D. und Rosa, A. L.** (1999). Pyruvate decarboxylase filaments are associated with the cortical cytoskeleton of asci and spores over the sexual cycle of filamentous ascomycetes. *Fungal Genet. Biol.* **26**, 71-80.
- Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J.** (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamid gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4354.
- Ullrich, J. und Donner, I.** (1970). Kinetic evidence for two active sites in cytoplasmatic yeast pyruvate decarboxylase. *Hoppe-S. Z. Physiol. Chem.* **351**, 1026-1029.
- Ullrich, J. und Wollmer, A.** (1971). Yeast pyruvate decarboxylase: spectral studies of the recombination of the apoenzyme with thiamin diphosphat and magnesium. *Hoppe-S. Z. Physiol. Chem.* **352**, 1635-1644.
- Umeda, M. und Uchimiya, H.** (1994). Differential transcript levels on genes associated with glycolysis and alcoholic fermentation in rice plants (*Oryza sativa* L.) under submergence stress. *Plant Physiol.* **106**, 1015-1022.
- Washabaugh, M. W. und Jenks, W. P.** (1988). Thiazolium C(2)-proton exchange: structure-reactivity correlations and the pKa of thiamin C(2)-H revisited. *Biochemistry* **27**, 5044-5053.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. und Messing, J.** (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-119.
- Zehender, H., Trescher, D. und Ullrich, J.** (1987). Improved purification of pyruvate decarboxylase from wheat germ. Its partial characterization and comparison with the yeast enzyme. *Eur. J. Biochem.* **167**, 149-154.
- Zeng, X., Farrenkopf, B., S., H., Dyda, F., Furey, W. und Jordan, F.** (1993). Role of cysteins in the activation and inactivation of brewer's yeast pyruvate decarboxylase investigated with a PDC1-PDC6 fusion protein. *Biochemistry* **32**, 2704-2709.

## **Danksagung**

*An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen meiner Doktorarbeit beigetragen haben.*

*Herrn Prof. Dr. G. Hübner, in dessen Arbeitsgruppe Enzymologie des Fachbereichs Biochemie/Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg ich diese Arbeit anfertigen durfte, danke ich für die Förderung und das stetige Interesse am Fortgang der Arbeit, die fachlichen Diskussionen und vor allem für die wertvollen Hinweise zum kinetischen Teil.*

*Ganz besonders möchte ich mich bei Dr. Ralph Golbik bedanken, der wichtige Kontakte zu anderen Arbeitsgruppen vermittelte und mich während der gesamten Promotionszeit mit vielen Ratschlägen und Diskussionen, insbesondere zum spektroskopischen Teil, unterstützt hat.*

*Herrn Prof. Dr. W. Baumeister danke ich für die Möglichkeit, in Zusammenarbeit mit seiner Arbeitsgruppe Strukturbiologie am MPI in Martinsried, die Quartärstruktur von PsPDC zu untersuchen sowie für die Diskussion der dabei erhaltenen Ergebnisse. Des Weiteren gilt mein Dank Herrn Dr. Reiner Hegerl, der die Bildauswertung durchführte und mir dabei Einblicke in diese Methode vermittelte. Frau Ute Santarius möchte ich herzlich für die Durchführung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen danken.*

*Herrn Prof. Dr. A. Engel danke ich für die Möglichkeit, in Zusammenarbeit mit seiner Arbeitsgruppe am Biozentrum Basel, Aussagen zur Masse und Abmessung einzelner Oligomerspezies zu gewinnen und für die Diskussion der erhaltenen Ergebnisse. In diesem Zusammenhang möchte ich mich besonders bei Dr. Shirley Müller bedanken, die mit der sorgfältigen Auswertung der STEM-Daten und vielen kritischen Diskussionen einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung der Filamentstruktur geleistet hat. Sabine Wirtz danke ich für die Aufnahme der Dunkelfeldbilder.*

*Mein herzlicher Dank gilt allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Enzymologie. Zahlreiche fachliche und nichtfachliche Gespräche und Diskussionen sowie die Unterstützung bei kleinen Problemen im Laboralltag machten die Arbeit während der letzten Jahre angenehm und interessant.*

*Mark Kipping danke ich für die Durchführung der Massenspektroskopie. Weiterhin gilt mein Dank Ines Eberhardt für die Einführung in molekularbiologische Techniken und Tanja Lisse für die Hilfe während meiner ersten Arbeiten mit einem Hefeexpressionssystem.*

*Ganz herzlich danke ich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, meinem Bruder und meiner verstorbenen Oma, die mich während des Studiums und der folgenden Promotionszeit auf vielfältige Weise unterstützten.*

## **Erklärung**

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

Ich versichere, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst und nur die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht.

Halle, den 29. 04. 2000

## **Lebenslauf**

### Angaben zur Person

Name: Arndt Dietrich  
Adresse: Erlicht 51  
08468 Reichenbach

Geburtsdatum: 18.02.1972  
Geburtsort: Reichenbach  
Familienstand: ledig

### Bildungsweg

September 1978 - Juli 1986	Besuch der Polytechnischen Oberschule „Johann-Heinrich-Pestalozzi“ in Reichenbach
September 1986 - Juli 1990	Schüler an der Spezi­alschule mathematisch-naturwissenschaftlich-technischer Richtung „Hans-Beimler“ in Chemnitz
Juli 1990	Abitur
September 1990 - August 1991	Zivildienst als Hilfspfleger im Pflegeheim Reichenbach
Oktober 1991	Beginn eines Biologie-Studiums an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Oktober 1992	Studienfachwechsel, Fortsetzung des Studiums als Biochemie-Studium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Juli 1996	Abschluß des Biochemiestudiums, Gesamtprädikat "sehr gut"
Oktober 1995 - Juli 1996	Anfertigung einer Diplomarbeit mit dem Thema „Strukturelle und kinetische Untersuchungen an Pyruvatdecarboxylase aus keimenden Erbsensamen“
September 1996 - März 2000	Tätigkeit als Doktorand am Fachbereich Biochemie/ Biotechnologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
September 1996 - November 1996	Arbeitsaufenthalt am Instituut vor Plantkunde der Katholieke Universiteit Leuven
seit April 2001	Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter bei der Scil Proteins GmbH