

# Untersuchungen zur Struktur und zum Katalysemechanismus der Indolpyruvatdecarboxylase aus *Enterobacter cloacae*

**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

Frau Anja Schütz

geb. am 11.04.1977 in Wurzen

Gutachter:

1. Prof. G. Hübner
2. Prof. G. Schneider
3. Prof. em. R.L. Schowen

verteidigt in Halle (Saale) am 01.12.2004

**urn:nbn:de:gbv:3-000007613**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000007613>]

# Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abkürzungsverzeichnis

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Materialien und Methoden .....</b>	<b>14</b>
2.1. Materialien .....	14
2.1.1. Chemikalien .....	14
2.1.2. Geräte .....	16
2.2. Herstellung der Aminosäureaustauschmutanten .....	16
2.3. Anzucht der Zellen .....	18
2.4. Enzympräparation .....	19
2.5. Strukturelle Untersuchungen der <i>EcIPDC</i> und Varianten.....	21
2.5.1. Analyse der Primärstruktur der <i>EcIPDC</i> .....	21
2.5.2. Röntgenkristallstrukturanalyse.....	21
2.5.3. Röntgenkleinwinkelstreuung.....	24
2.6. Kinetische Untersuchungen der <i>EcIPDC</i> .....	28
2.6.1. Messmethoden.....	28
2.6.2. <i>steady state</i> Kinetiken .....	29
2.6.3. Substrataktivierung.....	31
2.6.4. <sup>1</sup> H-NMR-Untersuchungen.....	31
<b>3. Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>38</b>
3.1. Herstellung der <i>EcIPDC</i> -Varianten.....	38
3.2. Enzympräparation .....	38
3.3. Strukturelle Untersuchungen der <i>EcIPDC</i> .....	39
3.3.1. Analyse der Primärstruktur der <i>EcIPDC</i> .....	39
3.3.2. Röntgenkristallstrukturanalyse.....	42
3.3.2.1. Kristallisationsbedingungen und Datenaufnahme.....	42
3.3.2.2. Allgemeine Struktur .....	46
3.3.2.3. Monomer .....	48
3.3.2.4. Dimer.....	49
3.3.2.5. Tetramer .....	50

3.3.2.6.	Cofaktorbindung.....	52
3.3.2.7.	Das aktive Zentrum der <i>EcIPDC</i> .....	54
3.3.3.	Röntgenkleinwinkelstreuung.....	58
3.3.3.1.	Untersuchung der pH-abhängigen Oligomerisierung der <i>EcIPDC</i> .....	58
3.3.3.2.	Einfluss der Enzymkonzentration auf die Streuparameter.....	59
3.3.3.3.	Vergleich der Lösungsstruktur mit der Kristallstruktur .....	61
3.4.	Kinetische Untersuchungen.....	63
3.4.1.	Untersuchungen zur Substrataktivierung der <i>EcIPDC</i> .....	64
3.4.2.	Kinetische Konstanten der <i>EcIPDC</i> -Katalyse.....	67
3.4.2.1.	Synthese und Analyse der Standards .....	68
3.4.2.2.	Aktivierung von ThDP in <i>EcIPDC</i> .....	70
3.4.2.3.	Bestimmung kinetischer Konstanten der <i>EcIPDC</i> .....	71
3.4.2.4.	Intermediatverteilung bei der Umsetzung von Pyruvat.....	75
3.4.2.5.	Intermediatverteilung bei der Umsetzung von Benzoylformiat.....	78
3.4.2.6.	Intermediatverteilung bei der Umsetzung von Indolpyruvat .....	81
3.4.2.7.	Umsetzung 4-substituierter Benzoylformiate durch die <i>EcIPDC</i> .....	81
3.4.3.	Vorgeschlagener Katalysemechanismus der <i>EcIPDC</i> .....	86
3.4.4.	Decarboxylierung von Indolpyruvat durch <i>ZmPDC</i> und <i>ScPDC</i> .....	91
3.5.	Weitere Aspekte der <i>EcIPDC</i> -Katalyse .....	93
<b>4.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>99</b>
	Literaturverzeichnis.....	102
	Anhang .....	115

Dankesworte

Erklärung

Lebenslauf

## Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abb. 1:	Strukturformel des Thiamindiphosphates (ThDP). .....	2
Abb. 2:	Vorgeschlagener Katalysemechanismus ThDP-abhängiger Enzyme. ....	8
Abb. 3:	Schema des L-Tryptophan-abhängigen Indolpyruvat-Weges zur Indolessig- säure-Biosynthese in <i>Enterobacter cloacae</i> . .....	11
Abb. 4:	Schema der <i>EcIPDC</i> -Katalyse. ....	34
Abb. 5:	SDS-PAGE zur Beurteilung der Expression der <i>EcIPDC</i> -Varianten. ....	38
Abb. 6:	SDS-PAGE zum Verlauf der Reinigungsprozedur der <i>EcIPDC</i> . ....	39
Abb. 7:	Vergleich der Primärstrukturen verschiedener ThDP-abhängiger Enzyme. ....	41
Abb. 8:	Primäre Kristalle des <i>EcIPDC</i> -Wt. ....	43
Abb. 9:	Kristalle des <i>EcIPDC</i> -Wt nach Anwendung des Verfahrens zur Aussaat von Nukleationskeimen („ <i>seeding</i> “). ....	44
Abb. 10:	Primäre Kristalle verschiedener <i>EcIPDC</i> Varianten. ....	44
Abb. 11:	Kristalle der <i>EcIPDC</i> Varianten nach Anwendung des Verfahrens zur Aussaat von Nukleationskeimen („ <i>seeding</i> “). ....	45
Abb. 12:	Ramachandran-Plot für ein <i>EcIPDC</i> -Tetramer. ....	47
Abb. 13:	Schema eines <i>EcIPDC</i> -Monomers. ....	48
Abb. 14:	Struktur des <i>EcIPDC</i> Tetramers. ....	51
Abb. 15:	Vergleich der Tetramerstrukturen von <i>EcIPDC</i> , <i>ScPDC</i> und <i>ZmPDC</i> . ....	52
Abb. 16:	Stereobild der ThDP-Bindung im aktiven Zentrum der <i>EcIPDC</i> . ....	53
Abb. 17:	Schematische Darstellung des aktiven Zentrums der <i>EcIPDC</i> . ....	54
Abb. 18:	Stereobild ausgewählter Aminosäurereste im aktiven Zentrum der <i>EcIPDC</i> . ....	55
Abb. 19:	Darstellung des Substratkanals der <i>EcIPDC</i> . ....	57
Abb. 20:	pH-Abhängigkeit des Oligomerisierungsgrades der <i>EcIPDC</i> . ....	59
Abb. 21:	Abhängigkeit der Streuparameter von der Konzentration an <i>EcIPDC</i> . ....	60
Abb. 22:	Vergleich der experimentellen und der aus der Kristallstruktur berechneten Streukurve. ....	61
Abb. 23:	Vergleich der tetrameren Struktur der <i>EcIPDC</i> in Lösung und im Kristall. ....	62
Abb. 24:	Progresskurven der Decarboxylierung von Indolpyruvat, Pyruvat und Benzoylformiat durch <i>EcIPDC</i> -Wt. ....	65
Abb. 25:	Bestimmung der C2-H-Deprotonierungsgeschwindigkeitskonstanten. ....	70
Abb. 26:	Stereobild der Superposition der aktiven Zentren von <i>EcIPDC</i> und nativer <i>ScPDC</i> <sup>(A)</sup> . ....	76

Abb. 27:	Stereobild der Superposition der aktiven Zentren von <i>EcIPDC</i> und <i>ZmPDC</i> .....	77
Abb. 28:	Stereobild der Superposition der aktiven Zentren von <i>EcIPDC</i> und <i>BFD</i> .....	79
Abb. 29:	Abhängigkeit von $\log(k_{\text{cat}}/k_{\text{cat}}^0)$ der Decarboxylierung 4-substituierter Benzoylformiate von der Substituentenkonstante $\sigma_p$ .....	83
Abb. 30:	Einfluss elektronenziehender Substituenten auf die Umsetzung 4-substituierter Benzoylformiate. ....	85
Abb. 31:	Möglicher Mechanismus der Substratbindung in <i>EcIPDC</i> . ....	87
Abb. 32:	Stereobild des modellierten IndLThDP im aktiven Zentrum der <i>EcIPDC</i> . ....	88
Abb. 33:	Möglicher Mechanismus der Aldehydabspaltung in <i>EcIPDC</i> . ....	89
Abb. 34:	Stereobild der modellierten $\alpha$ -Carbanion/Enamin-Form des IndHEThDP im aktiven Zentrum der <i>EcIPDC</i> . ....	90
Abb. 35:	Abhängigkeit der katalytischen Aktivität der <i>ScPDC</i> von der Konzentration an Indolpyruvat. ....	91
Abb. 36:	Stereobild der Superposition der aktiven Zentren von <i>EcIPDC</i> und <i>ZmPDC</i> .....	93
Abb. 37:	Stabilität von 2-Mandelyl-ThDP (MThDP). ....	119
Abb. 38:	Stabilität von 2-(2-Indolyl-lactyl)-ThDP (IndLThDP). ....	120
Abb. 39:	$^1\text{H-NMR}$ -chemische Verschiebungen der kovalenten ThDP-Addukte HBzThDP und IndHEThDP. ....	121
Abb. 40:	Abhängigkeit der katalytischen Aktivität der <i>EcIPDC</i> -Varianten von der Substratkonzentration. ....	122
Abb. 41:	Progresskurve der Umsetzung von Indolpyruvat durch die <i>EcIPDC</i> -Variante Asp <sup>29</sup> Glu. ....	124
Abb. 42:	$^1\text{H-NMR}$ Spektren zur Bestimmung der Intermediatverteilung in der Umsetzung von Pyruvat. ....	125
Abb. 43:	$^1\text{H-NMR}$ Spektren zur Bestimmung der Intermediatverteilung in der Umsetzung von Benzoylformiat. ....	126
Abb. 44:	$^1\text{H-NMR}$ Spektren zur Bestimmung der Intermediatverteilung in der Umsetzung von Indolpyruvat. ....	127
Abb. 45:	Untersuchung der Umsetzung 4-substituierter Benzoylformiate. ....	128
Abb. 46:	$^1\text{H-NMR}$ -Spektren zur Bestimmung der Intermediatverteilung in der Umsetzung von 4-substituierten Benzoylformiaten durch die <i>EcIPDC</i> . ....	129

Tab. 1:	<sup>1</sup> H-NMR-chemische Verschiebungen zur Identifizierung der Intermediate.....	32
Tab. 2:	Chemische Struktur verschiedener durch die <sup>1</sup> H-NMR-Spektroskopie detektierbarer ThDP-Intermediate in der <i>EcIPDC</i> -Katalyse.....	35
Tab. 3:	Statistik der Datensammlung und Verfeinerung.....	46
Tab. 4:	Superposition eines <i>EcIPDC</i> Monomers und eines Monomers der BFD, POX und verschiedenen Pyruvatdecarboxylasen.....	49
Tab. 5:	Vergleich der Interaktionen zwischen den Untereinheiten in <i>EcIPDC</i> und verschiedenen Pyruvatdecarboxylasen.....	50
Tab. 6:	Potentielle Wasserstoffbrückenbindungen ausgewählter AS-Reste im aktiven Zentrum der <i>EcIPDC</i> .....	56
Tab. 7:	pH-Abhängigkeit der Streuparameter.....	58
Tab. 8:	Einfluss der Enzymkonzentration auf die Streuparameter.....	60
Tab. 9:	Strukturelle Parameter der Kristall- und Lösungsmodelle verschiedener ThDP-abhängiger Enzyme.....	63
Tab. 10:	Katalytische Konstanten der Decarboxylierung von Indolpyruvat, Benzoylformiat und Pyruvat durch <i>EcIPDC</i> und Varianten.....	74
Tab. 11:	Katalytische Konstanten der Decarboxylierung von 4-substituierten Benzoylformiaten durch die <i>EcIPDC</i> .....	82
Tab. 12:	Mikroskopische Geschwindigkeitskonstanten elementarer Schritte in der Decarboxylierung von 4-substituierten Benzoylformiaten durch <i>EcIPDC</i> -Wt....	84
Tab. 13:	Konstruktion der Primer zur Generierung der <i>EcIPDC</i> -Mutanten.....	115
Tab. 14:	Sekundärstrukturelemente im <i>EcIPDC</i> -Monomer.....	116
Tab. 15:	Potentielle Wasserstoffbrücken- und Salzbrückenbindungen im Monomer- Monomer-Interaktionsbereich der <i>EcIPDC</i> .....	117
Tab. 16:	Potentielle Wasserstoffbrückenbindungen im Dimer-Dimer-Interaktions- bereich der <i>EcIPDC</i> .....	117
Tab. 17:	Unmittelbare und über Wassermoleküle vermittelte Kontakte der Cofaktoren ThDP und Mg <sup>2+</sup> im aktiven Zentrum der <i>EcIPDC</i> .....	118

## Abkürzungsverzeichnis

AS	Aminosäure
Bf	Benzoylformiat
IPyr	Indol-3-pyruvat
PEG	Polyethylenglycol
Pyr	Pyruvat
ThDP	Thiamindiphosphat

FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion

### *Enzyme*

ADH	Alkoholdehydrogenase
AHAS	Acetohydroxysäuresynthase (EC 4.1.3.18; neu EC 2.2.1.6)
ALS	Acetolactatsynthase (EC 2.2.1.6) aus <i>Klebsiella pneumoniae</i>
BFD	Benzoylformiatdecarboxylase (EC 4.1.1.7) aus <i>Pseudomonas putida</i>
IPDC	Indolpyruvatdecarboxylase (EC 4.1.1.74)
<i>EcIPDC</i>	IPDC aus <i>Enterobacter cloacae</i>
KsDH	$\alpha$ -Ketosäuredehydrogenase (EC 1.2.4.x)
PDC	Pyruvatdecarboxylase (EC 4.1.1.1)
<i>ScPDC</i>	PDC aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ( <i>PDC1</i> )
<i>ZmPDC</i>	PDC aus <i>Zymomonas mobilis</i>
PDH	E1-Komponente der Pyruvatdehydrogenase (EC 1.2.4.1)
PFOR	Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase (EC 1.2.7.1)
POX	Pyruvatoxidase (EC 1.2.3.3)
TK	Transketolase (EC 2.2.1.1)

### *Intermediate in der ThDP-Katalyse*

HBzThDP	2-(1-Hydroxybenzyl)-ThDP
HEThDP	2-(1-Hydroxyethyl)-ThDP
IndHEThDP	2-(2-Indolyl-1-hydroxyethyl)-ThDP
IndLThDP	2-(2-Indolyl-lactyl)-ThDP
LThDP	2-Lactyl-ThDP
MThDP	2-Mandelyl-ThDP

### *Allgemeine Parameter und Konstanten*

$\varepsilon$	Extinktionskoeffizient
$k$	Geschwindigkeitskonstante
$K_D$	Dissoziationskonstante
$K_M$	Michaelis-Menten-Konstante
$K_I$	Inhibitorkonstante
$\sigma$	Hammettsche Substituentenkonstante (Hammett, 1937)
r.m.s.	Standardabweichung vom Idealwert ( <i>root mean square</i> )

### *Anmerkungen zur Terminologie*

Die verwendeten Anglizismen und Latinismen sind *kursiv* dargestellt.

### *Anmerkungen des Autors*

Einen umfassenden Überblick der Wirkungsweise des Cofaktors Thiamindiphosphat geben die Arbeiten von KLUGER *et al.* (1987), SCHOWEN (1998), SCHELLENBERGER (1998) und JORDAN (2003). Erkenntnisse über die Indolpyruvatdecarboxylase aus *Enterobacter cloacae* sind in den Arbeiten von KOGA *et al.* (1992, 1995) und SCHÜTZ *et al.* (2003<sub>a,b</sub>) zu finden.



# 1. Einleitung

Enzyme katalysieren eine Vielzahl von Reaktionen. Die funktionellen Gruppen ihrer Aminosäureseitenketten ermöglichen die Teilnahme an Säure-Base-Reaktionen, bilden vorübergehende kovalente Bindungen zu einem Substrat und sind an Ladungs-Ladungs-Interaktionen beteiligt, die den Übergangszustand stabilisieren können. Sie sind allerdings weniger für die Katalyse von Redoxreaktionen und vieler Arten von Gruppentransferreaktionen geeignet. Für derartige Reaktionen benötigen die Enzyme die Cofaktoren als Hilfsmoleküle. Cofaktoren können entweder anorganisch sein, wie z. B. die bei der elektrophilen Katalyse anzutreffenden  $\text{Fe}^{2+}$ -,  $\text{Mn}^{2+}$ -,  $\text{Mg}^{2+}$ - oder  $\text{Zn}^{2+}$ -Ionen, oder sie sind komplexe organische Moleküle, die man als Coenzyme bezeichnet. Bestimmte Bestandteile von Coenzymen können von vielen Organismen nicht synthetisiert werden. Deshalb müssen diese Substanzen, die man als Vitamine bezeichnet, in der Nahrung enthalten sein. Tatsächlich wurden viele Coenzyme als Substanzen entdeckt, deren Gabe bei Ernährungsmangelkrankheiten von Menschen und Tieren heilend wirkte. Im 19. und frühen 20. Jahrhundert war die Nervenkrankheit Beriberi, die durch neurophysiologische Störungen, Paralyse und Gewichtsverlust gekennzeichnet ist, verbreitet. Der holländische Arzt C. EIJKMAN fand 1897 heraus, dass die Ursache für Beriberi auf den Mangel einer „vitalen“ Substanz in der Ernährung zurückzuführen ist - des Thiamins. Diese Entdeckung führte zum Konzept der Vitamine. Für diese bedeutende Erkenntnis wurde EIJKMAN 1929 mit dem Nobelpreis für Physiologie/Medizin geehrt.

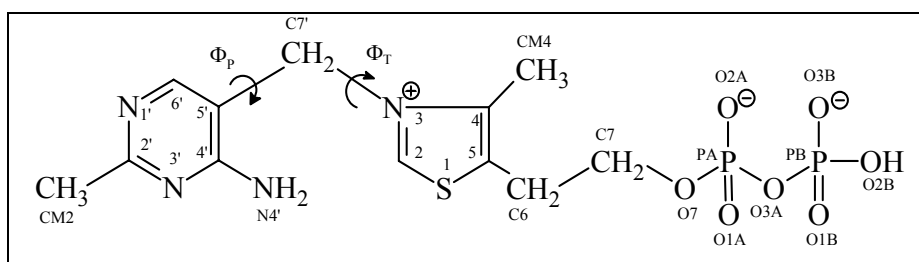
Thiamin, das essentielle wasserlösliche Vitamin  $\text{B}_1$ , wurde erstmals 1911 isoliert (Funk, 1911). Die biologisch aktive Form des Thiamins ist das Coenzym Thiamindiphosphat (ThDP). ThDP ist in einer Vielzahl wichtiger enzymatischer Reaktionen, die in energieproduzierenden Biosynthesewegen katalytisch agieren und bei denen C-C Bindungen von Substraten der allgemeinen Struktur  $\text{R-CO-X}$  gespalten bzw. geknüpft werden, involviert.

Die ThDP-abhängigen Enzyme gehören verschiedenen Enzymklassen an. Zu den Lyasen werden z. B. die Pyruvatdecarboxylase, die eine Schlüsselrolle im Prozess der alkoholischen Gärung spielt, und die Benzoylformiatdecarboxylase, die im Rahmen des „Mandelatweges“ Benzoylformiat decarboxyliert, gezählt. Die Acetohydroxysäuresynthase, die Aminosäurevorstufen bildet, und die Transketolase, die im Rahmen des „Pentosephosphatweges“ bei der Umwandlung von Zuckerphosphaten der Kettenlänge C3 bis C7 beteiligt ist, gehören zur

Klasse der Transferasen. Zu den Oxidoreduktasen zählen z.B. die Pyruvatoxidase und die Pyruvat:Ferredoxinoxidoreduktase, die Elektronentransferreaktionen katalysieren.<sup>1</sup>

Hinsichtlich der bedeutenden Rolle des Cofaktors in zentralen Stoffwechselwegen besteht großes Interesse an der Aufklärung des Katalysemechanismus und an der Analyse von Struktur-Funktionsbeziehungen von ThDP-abhängigen Enzymen. Inzwischen blicken wir auf viele Jahre Forschung auf dem Gebiet der Thiamindiphosphat-Biochemie zurück. Vielfältige Untersuchungsmethoden gaben eine Antwort auf die Frage der Wirkungsweise des Cofaktors und führten zu Erkenntnissen, die ökonomisch genutzt werden können. Die Anwendung einiger ThDP-abhängiger Enzyme als Katalysatoren in chemoenzymatischen Synthesen resultiert beispielsweise in der Produktion von pharmazeutischen Präparaten wie Ephedrin, Glycosidase-Inhibitoren, Geschlechtspheromonen wie  $\alpha$ -Exo-Brevicommin oder von Intermediaten wie 1-Deoxy-xylulose-5-phosphat, einer Vorstufe von Vitaminen und Isoprenoiden (Schörken & Sprenger, 1998; Sprenger & Pohl, 1999; Ward & Baev, 2000; Ohta & Sugai, 2000).

In den 30-er Jahren erfolgte die Isolierung (Auhagen, 1932) und die strukturelle Identifizierung (Lohmann & Schuster, 1937) des ThDP als Cocarboxylase der Pyruvatdecarboxylase. Das ThDP enthält eine Diphosphatgruppe und besteht aus zwei Ringsystemen, einem 2-Methyl-4-aminopyrimidin- und einem 4-Methyl-5-ethyl-thiazoliumring, die über eine Methylenbrücke miteinander verbunden sind (Abb. 1). Die chemische Synthese von ThDP (Cline *et al.*, 1937) und die Bestimmung der Kristallstruktur des isolierten Thiamindiphosphates bestätigten diese Struktur (Pletcher & Sax, 1966, 1972; Karle & Britts, 1966; Carlisle & Cook, 1969).



**Abb. 1:** *Strukturformel des Thiamindiphosphates (ThDP). Die Nomenklatur der Atome entspricht der in der Struktur der EcIPDC (1OVM, Zugangscode in der Proteindatenbank Brookhaven) und wird weiterhin im Text genutzt.*

In weiterführenden Arbeiten wurden verschiedene Konformationen der Thiaminderivate empirisch berechnet (Jordan, 1974, 1976) oder mit Hilfe der Röntgenkristallstrukturanalyse

<sup>1</sup> PDC (Holzer *et al.*, 1956), BFD (Hegeman, 1966), AHAS (Crout, 1990), TK (Schneider & Lindqvist, 1998), POX (Sedewitz *et al.*, 1984), PFOR (Kerscher *et al.*, 1982)

bestimmt (zusammenfassend dargestellt in Shin *et al.*, 1993). So kann freies Thiamin eine F-, S- oder V-Konformation einnehmen. Die Konformationen unterscheiden sich in den beiden Drehwinkeln (Abb. 1), die die relative Lage der beiden Ringe zueinander definieren. Die F-Konformation ( $\Phi_T \approx 0^\circ$ ,  $\Phi_P \approx \pm 90^\circ$ ) ist dabei energetisch begünstigt und wurde in den meisten Kristallstrukturen des freien Thiamins bestimmt. Seltener ist die S-Konformation ( $\Phi_T \approx \pm 100^\circ$ ,  $\Phi_P \approx \pm 150^\circ$ ) zu beobachten, die hauptsächlich bei C2-substituierten Thiaminen gefunden wurde. Obwohl die V-Konformation ( $\Phi_T \approx \pm 90^\circ$ ,  $\Phi_P \approx \pm 90^\circ$ ) von freiem Thiamin und seinen C2-Addukten nie experimentell bestimmt werden konnte, schlug SCHELLENBERGER diese als biologisch aktive Konformation vor (1967).

In den ersten Arbeiten zur Aufklärung des Katalyseprinzips ThDP-abhängiger Enzyme wurde postuliert, dass die 4'-Aminogruppe das Reaktionszentrum des Coenzym darstellt (Langenbeck, 1930, 1932). In späteren Arbeiten schlägt BRESLOW (Breslow, 1957, 1958; Breslow & McNelis, 1959) einen Reaktionsmechanismus vor, der bis heute akzeptiert wird. Darin stellt das C2-Atom des Thiazoliumrings den Reaktionsort in der ThDP-Katalyse dar (Abb. 1). Es wird angenommen, dass während der Katalyse ThDP-abhängiger Enzyme zwei Carbanionen auftreten: das C2-Carbanion (Ylid), welches die konjugierte Base des Thiazoliumrings darstellt und in einer initialen Reaktion gebildet wird, und das C(2R)-Carbanion/Enamin, welches der konjugierten Base des 2-R-(di)hydroxyethyl(oder aryl)thiamindiphosphates entspricht und in der Katalyse nach erfolgter kovalenter Substratbindung auftritt. Die Analysen der thermodynamischen, kinetischen und strukturellen Eigenschaften von Reaktionszwischenstufen in der ThDP-Katalyse waren Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Zunächst studierte man die Eigenschaften isolierter Thiaminverbindungen und seiner Derivate. Man fand heraus, dass das C2-H-Atom von freiem Thiamin und seiner Salze einen  $pK_a$ -Wert von circa 17-20 besitzt (Eigen, 1964, Crosby & Lienhard, 1970) und die Deprotonierung des C2-H-Atoms basenkatalysiert ist (Kemp & O'Brien, 1970). Ausführliche Studien zur initialen C2-H-Protonenabstraktion wurden von WASHABAUGH & JENCKS (1988, 1989<sub>a,b</sub>) durchgeführt. Zudem wurde die Decarboxylierungsreaktion isolierter Thiaminverbindungen untersucht. KLUGER *et al.* (1981<sub>a,b</sub>) beschäftigten sich beispielsweise mit der Reaktion von Thiamin mit Pyruvat und analysierten die Eigenschaften des entstehenden Lactylthiamins. Weitere Untersuchungen von Thiamin-Addukten wurden von KLUGER und seinen Mitarbeitern (Hu & Kluger, 2004) und WASHABAUGH *et al.* (1994) durchgeführt. Der Einfluss von Lösungsmittelfeffekten auf die Reaktivität der Thiaminverbindungen wurde von LIENHARD und Mitarbeitern analysiert (Crosby *et al.*, 1970; Crosby & Lienhard, 1970). Die Studien an den isolierten

Thiaminverbindungen lieferten wichtige Erkenntnisse in Bezug auf mögliche Reaktionsfolgen und das potentielle Verhalten von Thiamin im enzymgebundenen Zustand. Eine zusammenfassende Darstellung dieser Arbeiten geben KLUGER (1987) und SCHOWEN (1998).

Detaillierte Analysen von Struktur-Funktionsbeziehungen von vielen Schlüsselenzymen die ThDP als Coenzym nutzen, wurden durch die Fortschritte bei der Bestimmung der Raumstruktur möglich. Erste Hinweise zur Struktur eines ThDP-abhängigen Enzyms erhielt man durch die elektronenmikroskopische Untersuchung der Pyruvatdecarboxylase aus Hefe (Hübner *et al.*, 1975). Weitere strukturelle Informationen resultierten aus den Experimenten der Röntgenkleinwinkelstreuung. KÖNIG und Mitarbeiter (1992, 1993, 1998, 2004) analysierten die allgemeine Form ThDP-abhängiger Enzyme in Lösung und in Abhängigkeit von verschiedenen Effektoren (pH, Cofaktoren, Aktivatoren). Die detaillierten strukturellen Daten, die durch die Röntgenkristallstrukturanalyse zugänglich wurden, trugen wesentlich zum Verständnis des Mechanismus ThDP-abhängiger Enzyme bei. Die ersten Kristalle wurden von der Pyruvatoxidase aus *E. coli* im Rahmen der Proteinreinigung erhalten (Williams & Hager, 1966). Die erste Struktur eines ThDP-abhängigen Enzyms, der Transketolase aus *Saccharomyces cerevisiae*, wurde von LINDQVIST *et al.* (1992) bestimmt. Es folgten die Raumstrukturen der Pyruvatoxidase aus *Lactobacillus plantarum* und *Aerococcus viridans*, der Pyruvatdecarboxylase aus verschiedenen *Saccharomyces*-Stämmen und *Zymomonas mobilis*, der Transketolase aus *E. coli* und *Zea mays*, der Benzoylformiatdecarboxylase aus *Pseudomonas putida*, der E1-Komponenten der verzweigtkettigen  $\alpha$ -Ketosäuredehydrogenase aus *Pseudomonas putida*, *Homo sapiens* und *Thermus thermophilus*, der Pyruvat:Ferredoxinoxidoreduktase aus *Desulfovibrio africanus*, der katalytischen Untereinheit der Acetohydroxysäuresynthase aus *Saccharomyces cerevisiae* und *Arabidopsis thaliana*, der E1-Komponenten der bakteriellen und humanen Pyruvatdehydrogenase, der Acetolactatsynthase aus *Klebsiella pneumoniae*, sowie der N<sup>2</sup>-(2-carboxyethyl)argininsynthase aus *Streptomyces clavuligerus*.<sup>2</sup>

---

<sup>2</sup> Die Zugangscode in der Proteindatenbank Brookhaven entsprechen 1TRK (TK aus *Saccharomyces cerevisiae*), 1POW (POX *Lactobacillus plantarum*; Muller & Schulz, 1993; Muller *et al.*, 1994), 1VDE/1VDF (POX *Aerococcus viridans*, Hossain *et al.*, unveröffentlicht), 1PVD (*ScPDC*; Arjunan *et al.*, 1996), 1PYD (PDC aus *Saccharomyces uvarum*; Dyda *et al.*, 1990, 1993), 1ZPD (*ZmPDC*; Dobritzsch *et al.*, 1998), 1QGD (TK *E. coli*; Isupov, M.N., Rupprecht, M.P., Wilson, K.S., Dauter, Z. & Littlechild, J.A. Crystal structure of *E. coli* transketolase., unveröffentlicht), 1ITZ (TK aus *Zea mays*; Gerhardt *et al.*, 2003), 1BFD (BFD; Hasson *et al.* 1998), 1QS0 (KsDH aus *Pseudomonas putida*; AEvarsson *et al.*, 1999), 1DTW (humane zelluläre KsDH; Aevvarsson *et al.*, 2000), 1V11, 1V16, 1V1M, 1V1R (humane mitochondriale KsDH, Li *et al.*, unveröffentlicht), 1UMB (KsDH aus *Thermus thermophilus*; Nakai *et al.*, 2004), 1B0P (PFOR; Chabrière *et al.*, 1999), 1JSC (AHAS aus *Saccharomyces cerevisiae*; Pang *et al.*, 2002), AHAS aus *Arabidopsis thaliana*; (Pang *et al.*, 2004<sub>a</sub>; Zugangscode nicht freigegeben), L8A (*E. coli* PDH; Arjunan *et al.*, 2002), 1NI4 (humane PDH; Ciszak *et al.*, 2003), 1OZF (ALS; Pang *et al.*, 2004<sub>b</sub>) und 1UPA, 1UPB, 1UPC (N<sup>2</sup>-(2-carboxyethyl)argininsynthase aus *Streptomyces clavuligerus*, Caines *et al.*, 2004).

In allen Kristallstrukturen ist das ThDP in einer V-Konformation gebunden, die durch eine große hydrophobe Aminosäure-Seitenkette stabilisiert wird. Diese V-Konformation, in der das reaktive C2-Atom des Thiazoliumrings und die 4'-Aminogruppe des Pyrimidinrings in räumliche Nähe gebracht werden, spielt eine bedeutende Rolle im initialen Schritt der Katalyse, der Deprotonierung des C2-H-Atoms. Betrachtet man die ermittelte Geschwindigkeitskonstante der Deprotonierung des freien Cofaktors (Washabaugh & Jencks, 1988) ist diese nicht ausreichend, um die Geschwindigkeit der Enzymreaktion zu erklären. In den ThDP-abhängigen Enzymen begünstigt die V-Konformation des Cofaktors die Deprotonierung des C2-H-Atoms um den Faktor  $10^3$  (Kern *et al.*, 1997; Hübner *et al.*, 1998). Es wird angenommen, dass die 4'-Amino-Gruppe, die während der Katalyse als Protonenrelais agiert, an der Abstraktion des Protons vom C2-Atom beteiligt ist. Dabei kommt es zur Ausbildung eines Iminotautomers, das durch eine Wasserstoffbrücke zwischen der Seitenkette eines hoch konservierten Glutamats und dem N1'-Atom des Pyrimidinrings stabilisiert ist (Schneider & Lindqvist, 1993). Die Beteiligung der 4'-Amino-Gruppe und des N1'-Atoms an der Deprotonierung wurde auch durch empirische Berechnungen (Friedemann & Neef, 1998) und die Analyse von Cofaktorderivaten nachgewiesen. SCHELLENBERGER und Mitarbeiter berichteten bereits 1967 von der gezielten Synthese und Analyse von Cofaktorderivaten, bei denen bestimmte Atome und funktionelle Gruppen modifiziert wurden. Dies führte zur Identifizierung der für die Katalyse und Bindung wichtigen Bestandteile des ThDP. Ein Überblick über diese Arbeiten ist in SCHELLENBERGER *et al.* (1997) zu finden. Die Analyse der Bindungsmodi verschiedener Cofaktorderivate in den Strukturen der Transketolase aus *Saccharomyces cerevisiae* mit gebundenem N1'-Pyridyl-ThDP, N3'-Pyridyl-ThDP und 6'-Methyl-ThDP zeigte in diesem Zusammenhang keine signifikanten, strukturellen Änderungen im Vergleich zur Struktur mit unmodifizierten ThDP.<sup>3</sup>

Die Analyse der Raumstrukturen ThDP-abhängiger Enzyme verdeutlicht, dass bei der ThDP-Bindung hoch konservierte Aminosäurereste beteiligt sind. Ein Aspartat und ein Asparagin repräsentieren den ersten und den letzten Aminosäurerest in der ThDP-Fingerprintssequenz X5-Gly-Asp-Gly-Y25-28-Asn, die an der Bindung des Diphosphatanteils des Cofaktors beteiligt ist (Hawkins *et al.*, 1989). Für die Bindung des ThDP sind neben der Diphosphatgruppierung, die den Hauptanker zum Protein darstellt, der Aminopyrimidinring und der zweite Cofaktor, ein zweiwertiges Metallion, wichtig.

---

<sup>3</sup> Die Zugangscodes in der Proteindatenbank entsprechen 1TKA, 1TKB und 1TKC (König *et al.*, 1994).

Die Bedeutung funktioneller Aminosäureseitenketten im aktiven Zentrum während der Katalyse wurde durch die Bestimmung der Kristallstruktur mit gebundenen Liganden (Substrat, Inhibitor oder Aktivator) aufgeklärt. Bekannt sind die Strukturen von Transketolase aus *Saccharomyces cerevisiae* mit dem gebundenen Akzeptorsubstrat Erythrose-4-phosphat und Inhibitor Thiaminthiazolondiphosphat, von Pyruvat:Ferredoxinoxidoreduktase aus *Desulfovibrio africanus* mit gebundenem Pyruvat, von Pyruvatdecarboxylase aus *Saccharomyces cerevisiae* mit gebundenem Ketomalonat und Aktivator Pyruvamid, von Acetohydroxysäuresynthase aus *Saccharomyces cerevisiae* und *Arabidopsis thaliana* mit dem Inhibitor Chlorimuronethyl, einem Herbizid der Sulfonylharnstoff-Klasse, von der Benzoylformiatdecarboxylase aus *Pseudomonas putida* mit den gebundenen Inhibitoren R-Mandelat und Thiaminthiazolondiphosphat und von Pyruvatdehydrogenase aus *E. coli* mit Thiaminthiazolondiphosphat.<sup>4</sup> Von besonderem Interesse war die Bestimmung von Raumstrukturen, in denen gebildete Reaktionsintermediate identifiziert wurden. Das erste strukturell bestimmte Reaktionsintermediat war die durch die Pyruvat:Ferredoxinoxidoreduktase aus *Desulfovibrio africanus* gebildete Radikalform des Acetyl-ThDP. Es folgten die strukturellen Identifizierungen des  $\alpha$ -Carbanion/Enamins des 2-(1,2-Dihydroxyethyl)-ThDP der Transketolase aus *Saccharomyces cerevisiae*, des 2-(1-Hydroxyethyl)-ThDP-Derivates des trizyklischen ThDP der Acetolactatsynthase aus *Klebsiella pneumoniae*, die Struktur der verzweigt-kettigen  $\alpha$ -Ketosäuredehydrogenase aus *Thermus thermophilus* mit gebundenem 4-Methyl-2-oxopentanoat und die strukturelle Identifizierung eines Intermediates der Umsetzung von Pyruvat durch die Pyruvatoxidase aus *Aerococcus viridans*.<sup>5</sup>

Die chemische Synthese und die Untersuchung der Eigenschaften von Reaktionsintermediaten lieferten weitere Erkenntnisse. Als Beispiele sollen die Synthesen und Analysen des durch die Transketolase gebildeten 2-(1,2-Dihydroxyethyl)-ThDP, des durch die Pyruvatdehydrogenase und Pyruvatoxidase gebildeten 2-Acetyl-ThDP und des durch die Pyruvatdecarboxylase gebildeten 2-(1-Hydroxyethyl)-ThDP aufgeführt werden.<sup>6</sup>

---

<sup>4</sup> Die Zugangscodes entsprechen 1NGS (TK; Nilsson *et al.*, 1993), 2PDA (PFOR; Chabrière *et al.*, 1999), ScPDC mit Ketomalonat (kein pdb-Eintrag; Furey *et al.*, 1996), 1QBP (ScPDC; Lu *et al.*, 1997, 2000), 1N0H (AHAS, *Saccharomyces cerevisiae*; Pang *et al.*, 2003), AHAS (*Arabidopsis thaliana*; Pang *et al.*, 2004<sub>b</sub>; kein pdb-Eintrag), 1MCZ und 1Q6Z (BFD; Polovnikova *et al.*, 2003; Bera & Hasson, unveröffentlicht) und 1RP7 (PDH, *E. coli*; Arjunan *et al.*, 2004).

<sup>5</sup> Die Zugangscodes entsprechen 1KEK (PFOR; Chabrière *et al.*, 2001), 1GPU (TK; Fiedler *et al.*, 2002), 1OZG und 1OZH (ALS; Pang *et al.*, 2004<sub>a</sub>), 1UMD (KsDH, *Thermus thermophilus*; Nakai *et al.*, 2004) und 1V5G (POX, Hossain *et al.*, unveröffentlicht).

<sup>6</sup> DHETHDP (Krampitz & Votaw, 1966; Siderova *et al.*, 1995; Usmanov *et al.*, 1996), 2-Acetylthiamindiphosphats (Gruys *et al.*, 1987; Frey, P.A., 1989), HETHDP (Krampitz *et al.*, 1958; Holzer & Beaucamp, 1959).

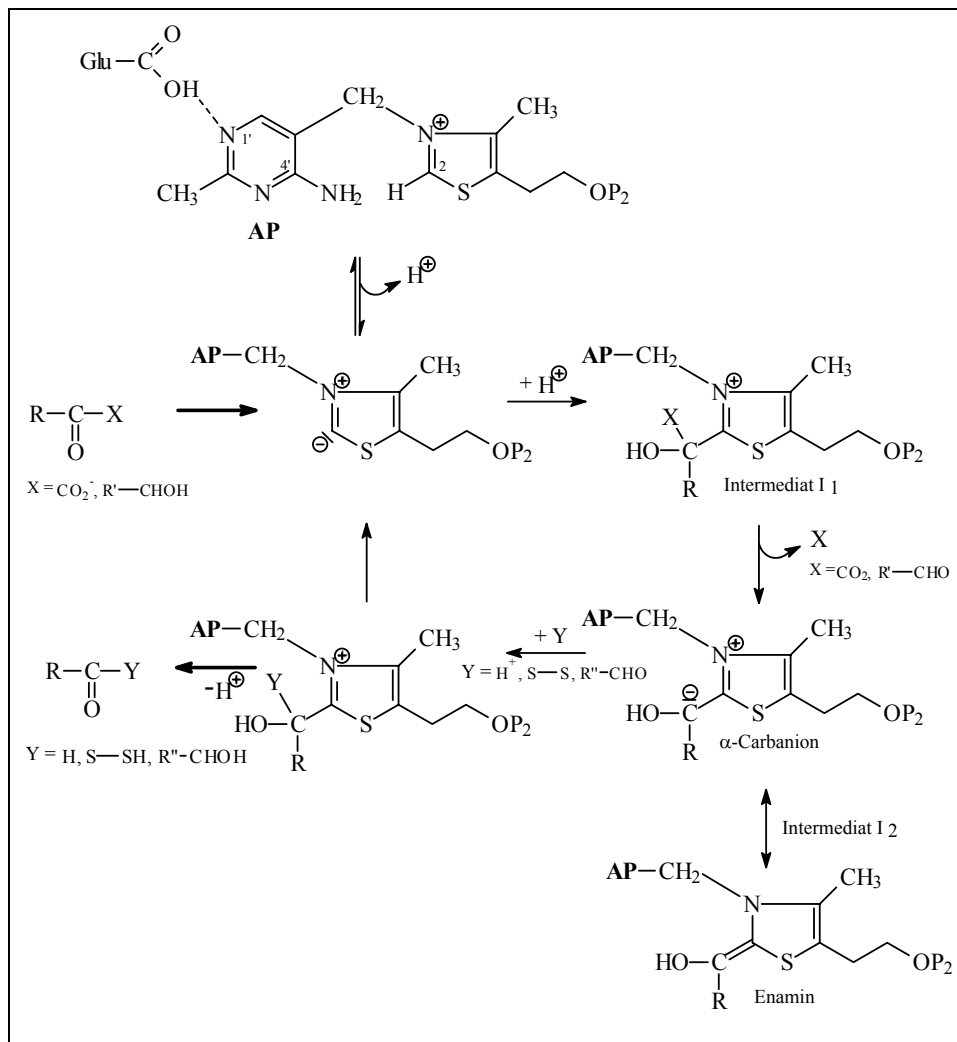
Ein erster Versuch zur Detektion von Reaktionsintermediaten war der chromatographische Nachweis von der durch die Umsetzung von  $^{14}\text{C}$ -markiertem Pyruvat durch die Pyruvat-decarboxylase aus Bierhefe gebildetem 2-(1-Hydroxyethyl)-ThDP durch HOLZER und BEAUCAMP (1959, 1961). Seitdem man Reaktionsintermediate auch spektroskopisch nachweisen konnte, eröffnete sich die Möglichkeit, die Geschwindigkeitskonstanten einzelner Reaktionsschritte zu berechnen. Als Beispiele seien die Analysen der entstehenden Intermediate bei der Umsetzung von konjugierten Substratanalogen durch die Pyruvamid-aktivierte Hefe-Pyruvatdecarboxylase (Menon-Rudolph *et al.*, 1992), von 4-Nitrobenzoylformiat durch die Benzoylformiatdecarboxylase (Sergienko *et al.*, 2000) und die Untersuchungen des radikalischen HETHDP-Reaktionsintermediates der Pyruvat:Ferredoxinoxidoreduktase aus *Chlostridium thermoaceticum* genannt (Menon & Ragsdale, 1997; Charon *et al.*, 1999). Die Analyse der Kohlenstoff-Isotopieeffekte der Umsetzung  $^{13}\text{C}$ -markierter Substrate resultierte ebenfalls in der Bestimmung mikroskopischer Geschwindigkeitskonstanten (Alvarez *et al.*, 1991; Sun *et al.*, 1995). Seit kurzem ist eine Methode etabliert, die es durch die Anwendung der  $^1\text{H}$ -NMR Spektroskopie ermöglicht, Reaktionsintermediate in der Katalyse ThDP-abhängiger Enzyme direkt zu detektieren. TITTMANN *et al.* (2003, 2004) können die ThDP-gebundenen Intermediate qualitativ und quantitativ bestimmen und die Einzelschritte während der Katalyse detailliert untersuchen.

Durch zielgerichtete Mutagenese wichtiger Aminosäurereste im aktiven Zentrum und die Analyse der Auswirkungen auf die Katalyse konnten weitere Hinweise auf die Reaktionsmechanismen verschiedener ThDP-abhängiger Enzyme erlangt werden. Insbesondere sollen die Untersuchungen von Enzymvarianten der Pyruvatdecarboxylase aus *Zymomonas mobilis* und *Saccharomyces cerevisiae* erwähnt werden. Diese Arbeiten zeigen die Bedeutung der innerhalb der Pyruvatdecarboxylasen konservierten AS-Reste Asp27, Glu50, His113, His114 und Glu473 während der Katalyse (Nummerierung entsprechend *ZmPDC*). Auf die Studien der Varianten der Transketolase, der Acetohydroxysäuresynthase und der Benzoylformiatdecarboxylase sei kurz hingewiesen.<sup>7</sup>

---

<sup>7</sup> *ZmPDC* (Diefenbach *et al.*, 1992; Candy & Duggleby, 1994; Bruhn *et al.*, 1995; Candy *et al.*, 1996; Schenk *et al.*, 1997; Pohl *et al.*, 1998; Chang *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2001; Tittmann *et al.*, 2003) und *ScPDC* (Killenberg-Jabs, 1997; Liu *et al.*, 2001; Sergienko & Jordan, 2001<sub>a,b</sub>, Tittmann *et al.*, 2003), TK (Wikner *et al.*, 1994, 1995, 1997; Schneider & Lindqvist, 1998), AHAS (Mendel *et al.*, 2001) und BFD (Sergienko *et al.*, 2000; Polovnikova *et al.*, 2003).

Die strukturellen Untersuchungen, insbesondere die Röntgenkristallstrukturanalyse, die Anwendung gentechnisch-molekularbiologischer Methoden, der Einsatz der Synthesechemie und die kinetisch-spektroskopischen Analysen spielten eine wichtige Rolle bei der Aufklärung von Struktur-Funktionsbeziehungen ThDP-abhängiger Enzyme. Der vorgeschlagene Katalysemechanismus eines ThDP-abhängigen Enzyms ist in Abb. 2 schematisch dargestellt.



**Abb. 2:** *Vorgeschlagener Katalysemechanismus ThDP-abhängiger Enzyme. Abbildung modifiziert nach SCHELLENBERGER (1998). Erläuterungen siehe Text (AP, Aminopyrimidinring).*

Der erste Schritt der Katalyse ist die initiale Deprotonierung des C2-H-Atoms des Thiazoliumrings. Dabei spielt, wie schon erwähnt, die N1'-Glutamat-Interaktion eine wichtige Rolle. Das gebildete C2-Carbanion (Ylid) greift nukleophil am  $C\alpha$ -Atom des Substrates  $R-CO-X$  an. Das Carbonylsauerstoffatom des Substrates wird protoniert und das tetraedrale ThDP-Substrataddukt, das Intermediat  $I_1$  wird gebildet. Die Abspaltung des Restes  $X$  resultiert in der Bildung des zweiten Reaktionsintermediates  $I_2$ , dem  $\alpha$ -Carbanion/Enamin.



Das  $\alpha$ -Carbanion wird durch den Thiazoliumring des ThDP, welcher als Elektronenakzeptor dient, stabilisiert. Dies wird durch die Resonanzstruktur des Enamins verdeutlicht. Durch elektrophile Addition von Y an das  $\alpha$ -Carbanion/Enamin entsteht ein zweites tetraedrales ThDP-Addukt, aus dem unter Deprotonierung das Produkt R-CO-Y freigesetzt wird.

Im Rahmen dieser Dissertationsarbeit wurde die Indolpyruvatdecarboxylase (Indolpyruvat Carboxy-Lyase, IPDC) aus *Enterobacter cloacae* untersucht. Die IPDC wurde erst 1994 durch den Verband „Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry“ (NCIUB) als Enzym unter EC 4.1.1.74 eingetragen. Sie katalysiert die Bildung von Kohlendioxid und Indol-3-acetaldehyd aus Indol-3-pyruvat. Essentiell für die katalytische Aktivität sind die Cofaktoren ThDP und  $Mg^{2+}$ .

In den Proteindatenbanken SWISSPROT und TREMBL (<http://www.expasy.ch>) sind insgesamt 12 IPDC-Gene aus verschiedenen Mikroorganismen aufgeführt.<sup>8</sup> Die bakteriellen IPDC-Gene aus *Enterobacter cloacae*, *Pantoea agglomerans*, *Klebsiella aerogenes*, *Azospirillum brasilense* und *Azospirillum lipoferum* wurden bereits kloniert und hinsichtlich ihrer Indollessigsäuresynthese näher charakterisiert.<sup>9</sup> Die IPDC-Gene codieren für Polypeptidketten, die aus ungefähr 550 Aminosäuren bestehen und einer molaren Masse von circa 60 kDa entsprechen. Die Analyse der Aminosäuresequenzen ergab, dass die Indolpyruvatdecarboxylase eine große Ähnlichkeit zur Enzymklasse der Pyruvatdecarboxylasen hat (Koga *et al.*, 1991<sub>b</sub>).

Die Indolpyruvatdecarboxylase repräsentiert in *Enterobacter cloacae*, ein Mikroorganismus in der Rhizosphäre von Gurken, das Schlüsselenzym im Indol-3-pyruvat Biosyntheseweg zur Darstellung von Indol-3-essigsäure (Koga *et al.*, 1991<sub>a</sub>, 1992, 1995) (Abb. 3). Da sowohl Indolpyruvat als auch Indolacetaldehyd instabil und schwer zu isolieren sind (Moore & Shaner, 1968; Gibson *et al.*, 1972) und Indolpyruvat außerdem auch nichtenzymatisch zu Indol-essigsäure umgewandelt werden kann, war es schwierig zu beweisen, dass die Umwandlung von Indolpyruvat in Indolacetaldehyd enzymatisch erfolgt (Sheldrake, 1973).

---

<sup>8</sup> *Enterobacter cloacae* (P23234), *Azospirillum brasilense* (P51852), *Pantoea agglomerans* (P71323), *Mycobacterium leprae* (Q9CBD6), *Lactococcus lactis* (*Streptococcus lactis*) (Q9CG07), *Bacillus cereus* (Q81DD4), *Methanosarcina acetivorans* (Q8TT45), *Mycobacterium tuberculosis* (O53865), *Salmonella typhimurium* (Q93IM7), *Bacillus anthracis* (Q81QE0), *Pseudomonas putida* (Q9FDC2), *Klebsiella aerogenes* (Q48380).

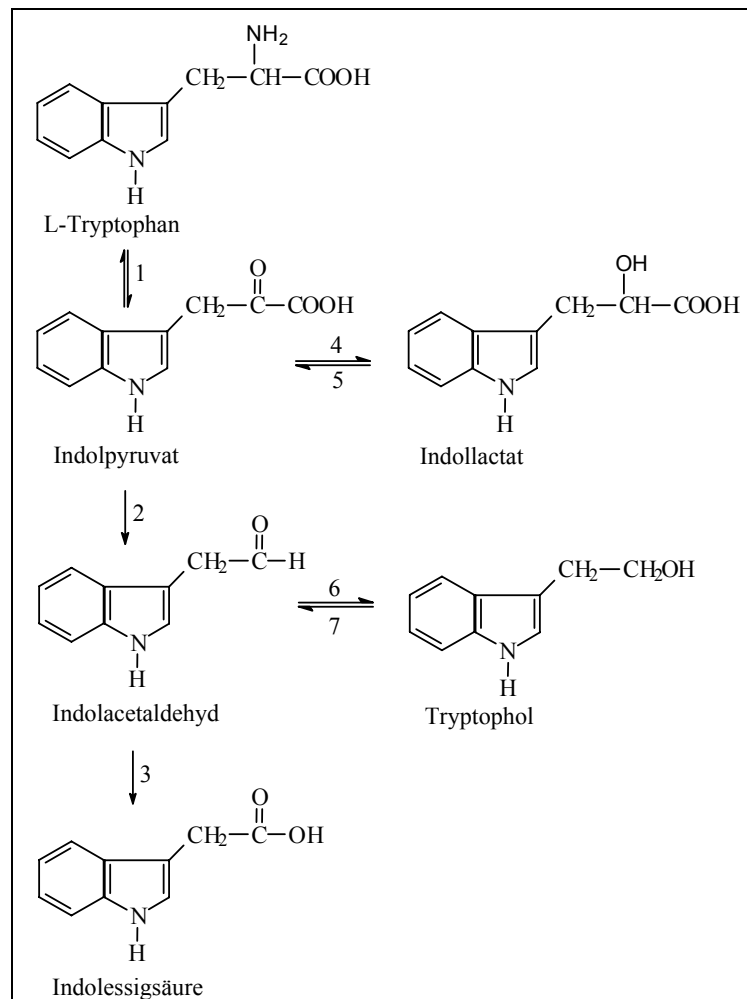
<sup>9</sup> Indolpyruvatdecarboxylasen aus *Enterobacter cloacae* (Koga *et al.*, 1991<sub>b</sub>), *Pantoea agglomerans* bzw. *Erwinia herbicola* (Brandl & Lindow, 1996), *Klebsiella aerogenes* (Zimmer *et al.*, 1994), *Azospirillum brasilense* (Costacurta *et al.*, 1994, Carreno-Lopez *et al.*, 2000), *Azospirillum lipoferum* (Yagi *et al.*, 2001).

KOGA *et al.* (1994, 1995) fanden heraus, dass die Indolpyruvatdecarboxylase in *Enterobacter cloacae* sowohl den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Gesamtreaktion katalysiert, als auch die Synthese von L-Tryptophan und Indolessigsäure reguliert. Der Indolpyruvat-Weg zur Biosynthese von Indolessigsäure beginnt mit der Bildung von Indolpyruvat aus Tryptophan unter Nutzung der L-Tryptophan-Aminotransferase, einem Pyridoxal-abhängigen Enzym (Koga *et al.*, 1994). Durch die Indolpyruvatdecarboxylase (Koga *et al.*, 1991<sub>a</sub>) wird das Indolpyruvat zu Indolacetaldehyd decarboxyliert, welcher nachfolgend durch eine Aldehydoxidase zu Indolessigsäure oxidiert wird (Koga *et al.*, 1991<sub>b</sub>). Während *Enterobacter cloacae* unter anaeroben Bedingungen insbesondere die Reduktionsprodukte Indolactat und Tryptophol anreichert, wird unter aeroben Bedingungen hauptsächlich die Indolessigsäure gebildet (Koga *et al.*, 1991<sub>a</sub>) (Abb. 3). Die Indolessigsäure ist ein Phytohormon der Auxinklasse und besitzt eine zentrale Rolle beim Streckungswachstum, der Förderung der Zellteilung, der Bildung von Seitenwurzeln und bei der Hemmung von Blatt- und Fruchtfall (Sheldrake, 1973). In Pflanzen wird die Indolessigsäure hauptsächlich in Laubblättern, Embryonen und Meristemen gebildet. Hinsichtlich der wichtigen Rolle dieses Pflanzenhormons ist dessen Biosynthese und Regulation von Interesse.

Die Fähigkeit Indolessigsäure zu produzieren, wurde auch für andere Pflanzen-assoziierte Mikroorganismen, sowohl für Pflanzen-pathogene als auch für Pflanzen-stimulierende, beschrieben.<sup>10</sup> Während Pflanzen-pathogene Bakterien die Indolessigsäure über einen Indolacetamid-Biosyntheseweg produzieren, nutzen Pflanzen-stimulierende Bakterien den bereits beschriebenen Indol-3-pyruvat-Biosyntheseweg (Patten & Glick, 1996) (Abb. 3). Die Pflanzen-pathogen Vertreter, in denen die produzierte Indolessigsäure eine krankhafte Gallus- und Knotenbildung induziert, sind am besten untersucht (Yamada, 1993). Die Bedeutung der Indolessigsäureproduktion in anderen Bakterien ist kaum erforscht. Es ist unklar, ob diese Bakterien die Indolessigsäure während der Kolonisierung von Pflanzenoberflächen produzieren und ob die Bildung dieses Metabolit Vorteile beim bakteriellen Wachstum und beim Überleben im Pflanzen-assoziierten Zustand mit sich bringt. Die Produktion von Indolessigsäure könnte bei der Entgiftung von Tryptophan-analogen Verbindungen auf der Oberfläche von Pflanzen von Bedeutung sein, bei der Genregulation von Pflanzenabwehrprozessen beteiligt sein oder die Entwicklung einer hypersensitiven Antwort von Pflanzen inhibieren (Brandl & Lindow, 1998 und Referenzen darin). CARON *et al.* (1995) fanden heraus, dass das Beimpfen von landwirtschaftlichen Nutzpflanzen mit den Indolessigsäure-produzierenden Stämmen *Enterobacter cloacae* und *Pseudomonas putida* das Wachstum von Keimwurzeln fördert.

---

<sup>10</sup> Costacurta & Vanderleyden (1995), Kawaguchi & Syono (1996), Patten & Glick (1996)



**Abb. 3:** *Schema des L-Tryptophan-abhängigen Indol-3-pyruvat-Weges zur Indolessigsäure-Biosynthese in Enterobacter cloacae.*  
 Die Abbildung wurde nach Koga (1991<sub>a</sub>, 1995) modifiziert. 1, L-Tryptophan-Aminotransferase, 2, Indolpyruvatdecarboxylase, 3, Aldehydoxidase, 4, Indolpyruvat-Reduktase, 5, Indollactat-Oxidase, 6, Indolacetaldehyd-Reduktase, 7, Tryptophol-Oxidase.

Während für die *de novo* Biosynthese von Indolessigsäure in Mikroorganismen nur Tryptophan-abhängige Synthesewege beschrieben sind, können Pflanzen auch Tryptophan-unabhängige Biosynthesewege durchlaufen und Indolessigsäure zusätzlich aus Konjugaten freisetzen (Bartel *et al.*, 2001, Cooke *et al.*, 2002). Ein genetischer Beweis für eine in Pflanzen wirkende IPDC wurde bis jetzt noch nicht erbracht. Allerdings deuten der Nachweis von Indolpyruvat (Tam & Normanly, 1998) und der Aldehydoxidase in Pflanzen (Sekimoto *et al.*, 1997, 1998) auf einen Biosyntheseweg über das Indolpyruvat hin. Es ist möglich, dass dieselbe Pflanze in unterschiedlichen Entwicklungsstadien, in unterschiedlichen Geweben und unter unterschiedlichen Umweltbedingungen verschiedene Wege zur Biosynthese von Indolessigsäure nutzen kann (Nonhebel *et al.*, 1993; Bartel, 1997). *Enterobacter cloacae* produziert die Indolessigsäure als Sekundärmetabolit. Im Hinblick auf dessen Isolierung aus der Rhizosphäre von Gurken, äußern KOGA *et al.* (1995) die Hypothese eines möglichen

Gentransfers, ähnlich dem *Rol*-Gen von *Agrobacterium tumefaciens*. Wäre das der Fall, könnte die IPDC die Indolessigsäure-Biosynthese auch in Pflanzen regulieren.

Zur biochemischen Untersuchung der *EcIPDC* wurde das Indolpyruvatdecarboxylase-Gen aus der genomischen Bibliothek von *Enterobacter cloacae* isoliert (Koga *et al.*, 1991<sub>a</sub>). Erste Charakterisierungen der *EcIPDC* sind durch KOGA *et al.* (1992) beschrieben. Die homotetramere *EcIPDC* besteht aus 4×552 Aminosäuren, besitzt eine molare Masse von 240 kDa und hat einen aus der Aminosäuresequenz berechneten isoelektrischen Punkt von 5.67. Erste kinetische Untersuchungen wurden durch Anwendung der quantitativen HPLC-Produktanalyse durchgeführt. KOGA *et al.* bestimmten für die Umsetzung von Indolpyruvat und Pyruvat einen  $K_M$ -Wert von 15  $\mu\text{M}$  bzw. 2.5 mM. L-Tryptophan, Indolactat,  $\beta$ -Phenylpyruvat, Oxalacetat, Oxalat und Acetoacetat werden nicht decarboxyliert. Zudem wurde  $\beta$ -Phenylpyruvat als kompetitiver Inhibitor mit einem  $K_I$ -Wert von 50  $\mu\text{M}$  identifiziert. Für die Cofaktoren wurden  $K_D$ -Werte von 0.6  $\mu\text{M}$  (ThDP) und 2.5 mM ( $\text{Mg}^{2+}$ ) angegeben. Dabei variiert der  $K_D$ -Wert für ThDP mit der Konzentration an  $\text{Mg}^{2+}$  im Bereich von 6 mM (0.01 mM  $\text{MgCl}_2$ ) bis 0.6  $\mu\text{M}$  (5.0 mM  $\text{MgCl}_2$ ). In Abwesenheit der Cofaktoren ThDP und  $\text{Mg}^{2+}$  dissoziiert das Tetramer, welches das aktive Holoenzym darstellt, in Dimere und Monomere.

Ziel der vorliegenden Dissertationsarbeit war die detaillierte Untersuchung der Struktur und des Katalysemechanismus der Indolpyruvatdecarboxylase aus *Enterobacter cloacae*. Es sollte herausgefunden werden, inwieweit die *EcIPDC* anderen ThDP-abhängigen Enzymen ähnelt. Dabei sollten sowohl strukturelle als auch kinetische Aspekte betrachtet werden.

Zunächst werden die Ergebnisse zu den strukturellen Untersuchungen vorgestellt. Diese beinhalten die Kristallisation und die Röntgenkristallstrukturanalyse und resultieren in der Aufklärung der dreidimensionalen Struktur der *EcIPDC*. Röntgenkleinwinkelstreuungsexperimente dienen zur Untersuchung des Oligomerisierungsgrades in Abhängigkeit von Effektoren.

Um die an der Katalyse beteiligten Aminosäurereste im aktiven Zentrum zu identifizieren, wurden die *EcIPDC*-Varianten Asp<sup>29</sup>Glu, Glu<sup>52</sup>Asp, His<sup>115</sup>Lys, Gln<sup>383</sup>Thr und Glu<sup>468</sup>Asp generiert und deren *steady state* Kinetiken analysiert. Die einzelnen Reaktionsintermediate in der *EcIPDC*-katalysierten Umsetzung von Indolpyruvat, Pyruvat und Benzoylformiat wurden durch die Anwendung der <sup>1</sup>H-NMR Spektroskopie qualitativ und quantitativ bestimmt. Anhand der Intermediatverteilung können die mikroskopischen Geschwindigkeitskonstanten der Teilreaktionen in der Katalyse bestimmt werden. Es wird ein Modell zum Katalyseme-

chanismus der *EcIPDC* vorgeschlagen. Die kinetischen Messungen umfassen weiterhin die *stopped-flow* Messungen zur Analyse eines Substrataktivierungsmechanismus, die Untersuchungen der Decarboxylierung 4-substituierter Benzoylformiate und die Prüfung der Umsetzung von Indolpyruvat durch verschiedene Pyruvatdecarboxylasen.

Die strukturellen und kinetischen Ergebnisse werden zusammenhängend diskutiert und vergleichend zu verwandten ThDP-abhängigen Enzymen analysiert.

Die gewonnenen Erkenntnisse bezüglich der Struktur und des Katalysemechanismus der Indolpyruvatdecarboxylase aus *Enterobacter cloacae* wurden in mehreren Publikationen veröffentlicht (Schütz *et al.*, 2003<sub>a</sub>, 2003<sub>b</sub>, 2004).

## 2. Materialien und Methoden

### 2.1. Materialien

#### 2.1.1. Chemikalien

<i>Chemikalie</i>	<i>Hersteller</i>
Acrylamid (30 % wässrige Lösung)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
ADH (Hefe)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
ADH (Pferdeleber)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Agar	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Ammoniumsulfat	VWR International GmbH, Darmstadt
Ampicillin	AppliChem GmbH, Darmstadt, Darmstadt
Benzoylformiat	VWR International GmbH, Darmstadt
Bicin, N,N-Bis-(2-hydroxyethyl)-glycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Bisacrylamid (2 % wässrige Lösung)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
BisTris, (2-[Bis-(2-hydroxyethyl)-imino]-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Bromphenolblau	VWR International GmbH, Darmstadt
BSA (Rinderserumalbumin Fraktion V)	VWR International GmbH, Darmstadt
Caps, (3-[Hydroxyhexylamino]-1-propan-sulfonsäure)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Ches, 2-(Cyclohexylamino)-ethansulfon-säure	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Citrat, Monohydrat	VWR International GmbH, Darmstadt
Coomassie-Brillantblau G250	AppliChem GmbH, Darmstadt
DTE (1,4-Dithioerythritol)	AppliChem GmbH, Darmstadt
D <sub>2</sub> O (99.9 %), Deuteriumoxid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
EDTA, Ethylendiamintetraacetat	VWR International GmbH, Darmstadt
Essigsäure	VWR International GmbH, Darmstadt
Ethanol (96 %)	VWR International GmbH, Darmstadt
Glycerol (87 %)	VWR International GmbH, Darmstadt
Glycin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

---

Hefeextrakt	AppliChem GmbH, Darmstadt
Hepes, N-2-Hydroxyethyl-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Indol-3-pyruvat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
IPTG, Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid	AppliChem GmbH, Darmstadt
Kaliumhydroxid	VWR International GmbH, Darmstadt
Magnesiumsulfat (Heptahydrat)	VWR International GmbH, Darmstadt
Mes, 2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure	AppliChem GmbH, Darmstadt
Mops, Morpholinopropansulfonsäure	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
NADH (97 %), Nikotinsäureamidadenin-dinukleotid, reduziert	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumchlorid	VWR International GmbH, Darmstadt
Natriumhydroxid	VWR International GmbH, Darmstadt
PEG-2000-monomethylether	VWR International GmbH, Darmstadt
Phosphorsäure (85 %)	VWR International GmbH, Darmstadt
Pipes, Piperazin-1,4-bis-(2-ethansulfonsäure)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Pyruvat, Na-Salz	VWR International GmbH, Darmstadt
Salzsäure (37%)	VWR International GmbH, Darmstadt
Schwefelsäure (95-97 %)	VWR International GmbH, Darmstadt
SDS, Sodiumdodecylsulfat	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Streptomycinsulfat	AppliChem GmbH, Darmstadt
TCA, Trichloressigsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Temed, N, N, N', N'-Tetramethylethylen-diamin	VWR International GmbH, Darmstadt
ThDP-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Tricin, N-Tris-(hydroxymethyl)-glycin	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Tris, Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	VWR International GmbH, Darmstadt
Trypton	AppliChem GmbH, Darmstadt

Alle verwendeten Substanzen entsprachen dem höchsten verfügbaren Reinheitsgrad.

### 2.1.2. Geräte

UV-VIS-Spektrometer	Uvikon 940	Kontron Instruments
	U3000	Hitachi
<i>Rapid Quenched-Flow</i>	RQF-3	Kintek, Althouse
NMR-Spektrometer	ARX 400	Bruker Avance
FPLC		Amersham Biosciences
HPLC	Biosys 2000	Beckman Coulter
<i>French<sup>®</sup> Press</i>	Gaulin	APV Homogeniser GmbH
Sequenzierer	ABI PRISM <sup>®</sup> 310	Applera GmbH

#### *Chromatographiesäulen*

Säulenmaterial	Säulenmaß
Sephacryl S200 HR	(5.0×90 cm)
HiPrep 26/10 Desalting	(2.6×10 cm)*
HiLoad <sup>™</sup> 26/10 Q Sepharose <sup>®</sup> HP	(2.6×8 cm)*
Source <sup>™</sup> 15Q	(2.6×7 cm)
QAE-Sephadex A25	(0.5×20 cm)

Alle Säulenmaterialien wurden von *Amersham Biosciences* bezogen.

\* industriell gepackte Säule

## 2.2. Herstellung der Aminosäureaustauschmutanten

Zunächst wurden in einer PCR-Reaktion unter Verwendung spezifischer Primer die Aminosäureaustausche Asp<sup>29</sup>Glu, Glu<sup>52</sup>Asp, His<sup>115</sup>Lys, Gln<sup>383</sup>Thr und Glu<sup>468</sup>Asp durchgeführt. Das entsprechende PCR-Produkt wurde in kompetente Zellen transformiert und die Klone auf selektivem Medium angezogen. Die Richtigkeit der Mutation wurde durch einen spezifischen Restriktionsverdau, einen Expressionstest und eine Sequenzierung der für die *EcIPDC* codierenden Nukleotidsequenz überprüft.

### Plasmidpräparation

Die Plasmidpräparation erfolgte entsprechend dem Protokoll, beschrieben im Handbuch von *QIAprep<sup>®</sup> Spin Miniprep Kit* (QIAGEN GmbH, Hilden). Die Plasmid-DNA wurde sowohl aus dem *EcIPDC*-Wt als auch aus den einzelnen Mutanten isoliert. Das Wildtyp-Plasmid



pip362 (von J. Koga, Bio Science Laboratories, Meiji Seika Kaisha, Ltd., 5-3-1, Chiyoda, Sakado-shi, Saitama 350-02, Japan zur Verfügung gestellt) stellt einen pUC19-Vektor dar, in dem ein 3.8 kbp Indolpyruvatdecarboxylase-Fragment, isoliert aus dem *Enterobacter cloacae* Stamm (Koga *et al.*, 1991<sub>b</sub>), integriert ist. Als Selektionsmarker dient eine Ampicillinresistenz.

### **Mutation**

Die oben aufgeführten Mutanten der *EcIPDC* wurden entsprechend dem Protokoll *Quik Change® Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene GmbH, Heidelberg) hergestellt. In der PCR wurden 20 ng *EcIPDC*-Wt DNA eingesetzt. Die verwendeten Primer (siehe Tab. 13 im Anhang) wurden nach den im Protokoll beschriebenen Anforderungen unter Zuhilfenahme des Programms GENE RUNNER (Version 3.05, Copyright © 1994 Hastings Software Inc., New York, USA) konzipiert. Dabei wurden neben dem Nukleotidaustausch für die gezielte Aminosäuremutation ein oder mehrere Basen eines Triplets so mutiert, dass zusätzliche Restriktionsschnittstellen eingeführt oder bereits vorhandene Schnittstellen entfernt wurden, anhand dessen man später durch einen einfachen Restriktionsverdau den mutierten Klon schnell überprüfen kann.

### **Transformation**

Es wurde die Methode der Elektroporation angewandt. Die kompetente Zellen vom *E. coli* Stamm JM 109 wurden nach dem Protokoll von TUNG & CHOW (1995) hergestellt und bei -80 °C gelagert. Für jede Transformation wurde ein 50 µL Aliquot der kompetenten Zellen und 1.5 µL des jeweiligen PCR-Produktes eingesetzt. Die Transformanden wurden auf Ampicillin-selektiven LB-Agarplatten angezogen.

### **Restriktionsverdau und Gelelektrophorese**

Zur Überprüfung der Mutation wurde das isolierte Plasmid mit dem entsprechenden Restriktionsenzym verdaut und die entstehenden Fragmente in einem Agarose- bzw. Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

### **Expressionstests**

Um die *EcIPDC*-Expression der einzelnen Varianten beurteilen zu können, wurde eine SDS-PAGE durchgeführt. Zunächst wurden 2 mL ampicillinhaltiges Nährmedium mit dem entsprechenden Klon angeimpft und für 24 h bei 30 °C und 200 rpm inkubiert (Induktion mit 1 mM IPTG nach 4h). Nach dem Abzentrifugieren von 100 µl der Zellsuspension wurde das

Pellet in 100 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen, für 5 min bei 95 °C inkubiert und anschließend 10 µL der Probe aufgetragen.

### Sequenzierung

Die zu sequenzierende Plasmid-DNA wurde wie bereits beschrieben isoliert und zur Erhöhung des Reinheitsgrades nochmals mit Ethanol gefällt (*Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System*, Promega GmbH, Mannheim). Die Sequenzierung der *EcIPDC*-codierenden Nukleotidsequenz erfolgte entsprechend dem Protokoll der Gerätebeschreibung des ABI PRISM®310 *Genetic Analyzer* unter Nutzung spezifischer Sequenzierprimer (siehe Tab. 13 im Anhang).

## 2.3. Anzucht der Zellen

Die Anzuchtbedingungen des Wildtyps und der Mutanten sind identisch. Die Aufbewahrung der Bakterienstämme erfolgte bei –80 °C in Form von Glycerinkulturen (0.7 mL Zellen und 0.3 mL Glycerin).

### Nährmedien

Das Anzuchtmedium enthielt 2 % (w/v) Trypton, 1 % (w/v) Hefeextrakt, 0.5 % (w/v) NaCl und 0.15 M Kaliumphosphat pH 6.5. Das Kulturplattenmedium beinhaltete zusätzlich 2 % (w/v) Agar. Die Medien wurden 10 min bei 121 °C sterilisiert.

### Anzuchtbedingungen

Vor dem Animpfen der Kulturen erfolgte die Zugabe von 100 µg/mL Ampicillin, 0.1 mM Thiamin und 0.1 M MgSO<sub>4</sub>. Zunächst wurden Zellen der entsprechenden Glycerinkultur auf einer Ampicillin-selektiven LB-Agarplatte ausplattiert und die Platten bei 37 °C über Nacht inkubiert. Nach dem Animpfen der 150 mL Vorkultur mit einer Kolonie und Inkubation bei 37 °C, 200 rpm, über Nacht, wurden die Zellen in sterilen Röhrchen 10 min bei 3600g, 4 °C abzentrifugiert und das Pellet in 6 mL frischem Nährmedium suspendiert. Danach wurden die 6×1 L Hauptkulturen mit je 1 mL der Zellen angeimpft, für 24 h bei 30 °C, 160 rpm inkubiert (Induktion mit 1 mM IPTG nach 4 h) und die Zellen durch 5 min Zentrifugation bei 16000g, 4 °C geerntet. Die Zellen (circa 25-30 g Feuchtwicht) wurden bei –80 °C aufbewahrt.

## 2.4. Enzympräparation

Die Enzympräparation erfolgte im Kühlraum bei 6-8 °C. Begleitend wurde eine SDS-PAGE durchgeführt und die Proteinkonzentration bestimmt.

### Puffer

Puffer A: 100 mM Mes/NaOH pH 6.5, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM ThDP, 1 mM EDTA, 5 mM DTE

Puffer B: 50 mM Mes/NaOH pH 6.5, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.15 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 mM DTE

Puffer C: 20 mM Mes/NaOH pH 6.5, 1 mM DTE

Puffer D: 20 mM Mes/NaOH pH 6.5, 0.25 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 mM DTE

Die Puffer wurden mit deionisiertem Wasser hergestellt, filtriert (Zellulose-Acetat-Filter, Porengröße 0.45 µm) und entgast. Die angegebenen pH-Werte beziehen sich auf 25 °C.

### Zellaufschluss

Circa 25 g Zellen wurden in 40 mL Puffer A suspendiert und mittels French®Press (ein Durchlauf bei 1200 bar) aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (70000g, 15 min, 4 °C).

### Fällungen

#### *Streptomycinsulfatfällung*

Nach Zugabe von 0.1 % (w/v) Streptomycinsulfat (vorher in deionisiertem Wasser angelöst) zum Rohextrakt und 45 min Inkubation bei 6-8 °C unter Rühren, wurden die präzipitierten Nukleinsäuren abzentrifugiert (70000g, 15 min, 4 °C).

#### *Ammoniumsulfatfällung*

Nach dem Einstellen einer Proteinkonzentration von 20 mg/mL durch Verdünnen mit Puffer B, erfolgte die fraktionierte Ammoniumsulfatfällung im Bereich von 15-30 % (w/v) Ammoniumsulfat. Nach der Zentrifugation (30000g, 5 min, 4 °C) wurde das Proteinpellet in 20 mL Puffer B suspendiert und auf die Säule *Sephacryl® S200 HR* appliziert.

## Säulenchromatographische Reinigungen

Die Trennungen erfolgten mit einer biokompatiblen HPLC- oder mit einer FPLC-Anlage. Vor jeder Trennung wurden die Säulen mit den entsprechenden Puffern äquilibriert und die aufzutragenden Proben zentrifugiert (25000g, 2 min, 4 °C).

### *Gelfiltration*

Es wurde die Säule *Sephacryl® S200 HR* verwendet. Die Elution erfolgte mit dem Puffer B bei einer Flussrate von 1.0 mL/min. Die Fraktionierung (95×6 mL) wurde nach einem Durchlauf von 550 mL gestartet. Die Fraktionen mit dem höchsten *EcIPDC*-Gehalt wurden vereinigt, die Proteine mit 0.5 g Ammoniumsulfat pro mL Lösung ausgefällt und das Pellet nach anschließender Zentrifugation (30000g, 5 min, 4 °C) in 10 mL Puffer C gelöst und unter Verwendung der Säule *HiPrep 26/10 Desalting* entsalzt. Die Elution erfolgte mit dem Puffer C bei einer Flussrate von 2.0 mL/min.

### *Anionenaustauschchromatographie*

Die entsalzte Proteinlösung wurde auf die mit Puffer C voräquilibrierte Säule appliziert (*HiLoad™ 26/10 Q Sepharose® HP* oder *Source 15 Q*). Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten von 0-20 % Puffer D über 380 mL bei einer Flussrate von 2.0 mL/min.

Die so gereinigte *EcIPDC* wird durch Zusatz von 0.2 M Ammoniumsulfat stabilisiert und nach dem Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei –80 °C aufbewahrt.

## SDS-PAGE

Die SDS-PAGE wurde zur Beurteilung des Gehalts und der Reinheit der *EcIPDC* während der Enzympräparation und zur Überprüfung der *EcIPDC*-Expression der Varianten herangezogen. Sie erfolgte nach LAEMMLI (1970) mit der Elektrophoreseeinheit EPS 600 (Amersham Biosciences). Die Acrylamidkonzentration betrug im Trenngel 10 % und im Sammelgel 5 %. Als Laufpuffer wurde 0.19 M Glycin, 0.1 % (w/v) SDS in 25 mM Tris/HCl pH 8.3 verwendet. Nach dem Mischen der Probe mit dem Probenpuffer (0.156 M Tris/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 4 % (v/v) Glycerol, 2.3 % (w/v) SDS, 0.03 % (w/v) DTE, Bromphenolblau), erfolgte die Denaturierung durch Inkubation bei 95 °C für 5 min. Die Gele wurden anschließend mit Coomassie-Brillantblau gefärbt und in Cellophan-Folie (Whatman Biometra GmbH, Göttingen) getrocknet aufbewahrt.

## 2.5. Strukturelle Untersuchungen der *EcIPDC* und Varianten

### 2.5.1. Analyse der Primärstruktur der *EcIPDC*

Die Aminosäuresequenz der *EcIPDC* wurde mit den Sequenzen anderer ThDP-abhängiger Enzyme verglichen. Die Sequenzvergleiche wurden mit dem Programm MULTALIN durchgeführt (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin>).

### 2.5.2. Röntgenkristallstrukturanalyse

Die Kristallisation der Indolpyruvatdecarboxylase wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von PROF. DR. G. SCHNEIDER vom Karolinska Institut in Stockholm durchgeführt (AG Molekulare Strukturbiochemie, Abteilung Medizinische Biochemie und Biophysik am Karolinska-Institut in Stockholm/Schweden).<sup>11</sup> Zunächst wurde das Wildtypenzym der *EcIPDC* kristallisiert und die 3-dimensionale Raumstruktur bestimmt. Danach sollten unter Anwendung der bekannten Kristallisationsbedingungen die *EcIPDC*-Varianten Asp<sup>29</sup>Glu, His<sup>115</sup>Lys, Gln<sup>383</sup>Thr und Glu<sup>468</sup>Asp kristallisiert und die Struktur von verschiedenen Enzym-Ligand-Komplexen bestimmt werden. Die *EcIPDC* wurde nach der Methode der Gasphasendiffusion kristallisiert.

#### Parameter

R-Faktor      allgemeiner kristallographischer R-Faktor (*residual-factor*), ein Maß für die Korrektheit der Struktur eines Modells.

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

|  $F_{obs}$  |    beobachtete Strukturfaktoramplitude  
|  $F_{calc}$  |    berechnete Strukturfaktoramplitude des Modells  
k            Skalierungsfaktor

$R_{sym}$       R-Faktor zum Vergleich der Strukturfaktoramplitude von symmetriebezogenen Reflexen, für  $i$  Beobachtungen von Reflexen von  $n$  unabhängige Reflexen.  $\overline{F(hkl)}$  entspricht dem Durchschnittswert der Strukturfaktoramplitude für  $i$  Beobachtungen eines Reflexes.

$$R_{sym}(F) = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |F_i(hkl) - \overline{F(hkl)}|}{\sum_{hkl} \sum_i F_i(hkl)}$$

<sup>11</sup> Die insgesamt 6 Monate dauernden Forschungsaufenthalte wurden im Rahmen zweier Stipendien des DAAD (Deutscher Akademischer Austauschdienst, Bonn) und eines Stipendiums des Graduiertenkollegs des Landes Sachsen-Anhalt finanziert.

$R_{\text{free}}$  freier R-Faktor, der von der Verfeinerung unbeeinflusst ist. Ein zufällig ausgewählter Teil der Daten (5 % der Reflexe) wird von der Verfeinerung ausgeschlossen und zur Berechnung des freien R-Faktors genutzt (Brünger, 1992). Er beschreibt wie gut das Modell die nicht einbezogenen Daten voraussagt (Vergleichsprüfung).

$$R_{\text{free}} = \frac{\sum_{hkl \in T} \| |F_{\text{obs}}| - k |F_{\text{calc}}| \|}{\sum_{hkl \in T} |F_{\text{obs}}|} \quad hkl \in T \text{ Einzelreflexe, die zum Testset T gehören}$$

B-Faktor Temperatur-Faktor oder Debye-Waller-Faktor.  $U_i^2$  (*mean square displacement*) entspricht der Durchschnittsabweichung der Atomschwingung des  $i$ -ten Atoms. Der B-Faktor kann für jedes Atom oder jede Atomgruppe angegeben werden und beschreibt das Maß der Abweichung der Elektronendichte. Er reflektiert somit die Mobilität eines Atoms und kann Fehler beim Modellieren aufzeigen (hohe B-Faktoren).

$$B_i = 8\pi^2 U_i^2$$

### Kristallisationsbedingungen

Die Tropfen wurden aus gleichen Volumina von Protein- und Reservoirlösung gebildet. Die Reservoirre der Zellkulturplatten enthielten 1 mL (24 Loch-Zellkulturplatten, TPP AG, Trasadingen, Schweiz; hängender Tropfen) bzw. 100  $\mu$ l (*Crystal Growth Chambers*, Hampton Research Laguna Niguel, USA; sitzender Tropfen) Reservoirlösung und wurden nach dem Pipettieren der Tropfen luftdicht unter Verwendung von Baysilone-Paste (mittelviskos, VWR International GmbH) und silanisierten Deckgläsern (hängender Tropfen) bzw. „*Crystal Clear*“-Folie (Hampton Research Laguna Niguel, USA; sitzender Tropfen) verschlossen. Das gereinigte Wildtypenzym wurde unter Verwendung von Vivaspin 500 Zentrifugalkonzentratoren (VWR International GmbH, Darmstadt) aufkonzentriert. Simultan wurde der Puffer auf 20 mM Mes/NaOH pH 6.5, 1 mM DTE gewechselt. Bevor die Tropfen gesetzt wurden, wurde die *EcIPDC* für 30 min bei Raumtemperatur mit den Cofaktoren inkubiert (5 mM ThDP/Mg<sup>2+</sup>). Zunächst wurden die Lösungen von *Crystal Screen*<sup>TM</sup> 1 und 2, *Grid Screen*<sup>TM</sup> *Ammonium Sulfate* und *Grid Screen*<sup>TM</sup> *Polyethylene Glycol 6000* (Hampton Research, Laguna Niguel, USA) als Reservoirlösungen getestet, um geeignete Kristallformen zu finden. Dabei wurde die Proteinkonzentration (2.5, 5.0 und 10 mg/mL *EcIPDC*) und die Inkubationstemperatur (4 °C und 20 °C) variiert. Bei diesen Untersuchungen erwies sich die Verwendung von Polyethylenglycol als präzipitierendes Agens bei 20 °C als Erfolg versprechend.

Anschließende *screens* mit unterschiedlichen PEG-Arten bei unterschiedlichen pH-Werten zeigten die Verwendung von PEG-2000-monomethylether und Natriumcitratpuffer pH 5.0 als am besten geeignet. Die Kristalle des Wildtypenzym wurden unter folgenden Bedingungen erhalten. Die Tropfen enthielten gleiche Volumina (2  $\mu$ L) Reservoir- (0.1 M Natriumcitrat pH 5.0 und 8-12 % (w/v) PEG) und *EcIPDC*-Lösung (4 mg/mL in 20 mM Mes/NaOH pH 6.5, 1 mM DTE, 5 mM ThDP und 5 mM MgSO<sub>4</sub>). Die Kristallisation der *EcIPDC*-Varianten Asp<sup>29</sup>Glu, His<sup>115</sup>Lys, Gln<sup>383</sup>Thr und Glu<sup>468</sup>Asp wurde unter ähnlichen Bedingungen durchgeführt. Die Verwendung der Reservoirlösung bestehend aus 50 mM Natriumcitratpuffer pH 4.7 und 0.5-3 % (w/v) PEG-1000-monomethylether erwies sich als optimal. Weiterführend wurde versucht, die Enzyme in Anwesenheit des Inhibitors  $\beta$ -Phenylpyruvat bzw. der Substrate Pyruvat und Benzoylformiat (je 1-5 mM im Reservoir) zu kristallisieren. Bei der Kristallisation des Wildtypenzym und der Varianten erwies sich die Anwendung des Verfahren zur Aussaat von Nukleationskeimen (so genanntes *seeding*) als notwendig, um die Form und die Größe der Kristalle zu verbessern. Beim *streak seeding* wird mit einem Schnurbarthaar (Katze, Kaninchen) ein bereits vorhandener Kristall oder mikrokristallines Präzipitat berührt und die Nukleationskeime in frische Tropfen überführt. Beim Verfahren des *microseeding* wird ein Kristall in einen frischen Tropfen der Reservoirlösung überführt und zerkleinert, die resultierende Lösung entsprechend verdünnt und 0.5  $\mu$ l dieser verdünnten Lösung zu frischen Tropfen pipettiert. Zur weiteren Optimierung der Kristallisation des Wildtypenzym wurden verschiedene Zusätze (*Additive Screens 1-3*, Hampton Research, Laguna Niguel, USA) eingesetzt. Je 0.5  $\mu$ l der Lösung wurden zum Tropfen pipettiert.

### Datensammlung

Die Datensammlung erfolgte unter Gefrierschutzbedingungen (110 K) mit einem ADSC Quantum-4 CCD-Detektor an der Messstation ID 29, ESRF, Grenoble, Frankreich. Die Kristalle wurden in einer Gefrierschutzlösung bestehend aus der Reservoirlösung und 20 % (v/v) Glycerol für 30s inkubiert und unmittelbar in den Stickstoffstrom überführt. Die Daten wurden bei einer Wellenlänge von 0.979 Å gesammelt und mit dem Programm MOSFLM (Leslie, 1992) bearbeitet. Die Bestimmung der Raumgruppe und der Zelldimensionen der Kristalle erfolgte unter Nutzung der Autoindizierungsoption in MOSFLM und durch Analyse der Beugungsmuster mit dem Programm PATTERN (Lu, 1999). Für die Integration und Skalierung der Daten wurde die CCP4-Sammlung von Programmen (CCP4, 1994) verwendet.

## Strukturbestimmung

Die Struktur der *EcIPDC*-Wt wurde mit Hilfe der Methode des molekularen Ersatzes (Rossmann & Blow, 1962) unter Verwendung des Programmpakets AMORE (Navaza, 1994) aufgelöst. Dabei diente ein Polyserinmodell des *ZmPDC*-Dimers unter Ausschluss der Cofaktor- und Lösungsmittelatome als Suchmodell (1ZPD, Dobritsch *et al.*, 1998). Die beste Lösung hatte nach der „starren-Körper-Verfeinerung“ (*rigid body refinement*) einen Korrelationskoeffizienten von 0.235. Diese Lösung wurde fixiert und die Suche nach dem zweiten Dimer ergab ein Modell mit einem Korrelationskoeffizienten von 0.32 und einen kristallographischen R-Faktor von 50.1 % bei einer Auflösung von 2.65 Å.

## Modellierung und kristallographische Verfeinerung

Die Verfeinerung des Modells wurde mit dem Programm CNS (Brünger *et al.*, 1998) durchgeführt. Für die Berechnung des freien R-Faktors ( $R_{\text{free}}$ ) wurden 5 % der Reflexe des Datensatzes von der Verfeinerung ausgeschlossen (Brünger, 1992). Eine erste Verfeinerung des Modells wurde durch so genanntes *rigid body refinement* (Optimierung der Position zweier Moleküle in der asymmetrischen Einheit) erreicht, zunächst mit dem Dimer und anschließend mit dem Monomer als unabhängiger *rigid body*. Da die asymmetrische Einheit ein Tetramer enthält, wurde während des gesamten Verfeinerungsprozesses die nichtkristallographische Symmetrieeinschränkung (NCS) auf die kristallographisch unabhängigen Monomere bezogen.

## Strukturanalyse

Strukturvergleiche wurden unter Verwendung des Programmes TOP (Lu, 2000) durchgeführt. Das  $\alpha$ -Carbanion/Enamin des ThDP-gebundenen Indolpyruvates wurde mit dem Programm O (Jones *et al.*, 1991) ins aktive Zentrum der *EcIPDC* modelliert (von T. Sandalova durchgeführt). Die Kontaktregionen der einzelnen Untereinheiten wurden mit dem Protein-Protein-Interaktionsserver (<http://www.biochem.ulc.ac.uk/bsm/PP/server/>) analysiert. Abbildungen wurden mit dem Programm PYMOL (DeLano, 2002) erstellt. Stereoabbildungen wurden entsprechend der Kreuzblick-Methode erzeugt.

### 2.5.3. Röntgenkleinwinkelstreuung

Mit Hilfe dieser Methode wurde die pH-Abhängigkeit des Oligomerisierungsgrades der *EcIPDC* in An- und Abwesenheit der Cofaktoren untersucht. Es wurde der Einfluss der Proteinkonzentration auf die Streuparameter analysiert. Die Daten wurden weiterhin zur



Berechnung eines dreidimensionalen Modells der tetrameren *EcIPDC* in Lösung eingesetzt. Die Messungen wurden im Hasylab (Messplatz X33 des EMBL (European Molecular Biology Laboratory) am Deutschen Elektronen Synchrotron (DESY) in Hamburg durchgeführt. Die allgemeinen Messbedingungen entsprachen denen von KÖNIG *et al.* (1998). BSA diente als Molmassenstandard. Die Messungen und die Auswertung wurden in Zusammenarbeit mit DR. S. KÖNIG durchgeführt.

### Allgemeines

Durch Analyse von Röntgenkleinwinkelstreu曲ven können die äußere Molekülform und der Oligomerisierungsgrad der Quartärstruktur eines gelösten Partikels bestimmt werden. Unterschiedliche Konformationen können signifikant unterschiedliche Streumuster ergeben. Die generelle Auflösungsgrenze der Methode liegt bei 10 Å. Durch die Anwendung der Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS, *Small Angle X-ray Scattering*) können inter- und intramolekulare Wechselwirkungen wie z. B. die Zusammenlagerung von Untereinheiten in Lösung unter variablen Bedingungen (pH-Wert, Zusatz von Liganden) untersucht und entsprechende niedrigauflösende Modelle berechnet werden (Koch *et al.*, 2003).

Die aus den Experimenten resultierende Streuintensität setzt sich aus der internen Streudichtefluktuatation von Lösungsmittel und gelöstem Partikel und dem Strukturfaktor des Partikels zusammen. Für verdünnte Lösungen ergibt sich für die experimentelle Streukurve:

$$I(s) = \frac{1}{c} \left[ \frac{I_s(s)}{I_{s,0}} - \frac{I_b(s)}{I_{b,0}} \right] \frac{1}{D(s)}$$

$s$	Streuvektor-Achse	$s = \frac{2 \sin \theta}{\lambda}$	$2\theta$	Streuwinkel
			$\lambda$	Wellenlänge (0.15 nm)
$c$	Konzentration des gelösten Partikels			
$I_s(s)$	Streuintensität der Lösung in Abhängigkeit von $s$			
$I_b(s)$	Streuintensität des Puffers in Abhängigkeit von $s$			
$I_{s,0}, I_{b,0}$	durchschnittliche Intensität des direkten Strahls transmittiert durch die Probe oder den Puffer			
$D(s)$	Detektorrauschen			

Anhand der gemessenen Streuintensitäten  $I(s)$  in Abhängigkeit vom Streuvektor  $s$  können die globalen Strukturparameter  $I(0)$  und  $R_G$  bestimmt werden. Dabei entspricht  $I(0)$  der auf den Streuwinkel 0 extrapolierten Streuintensität. Der Gyrationradius  $R_G$  ist ein Strukturparameter, der von der halblogarithmischen Auftragung der Streudaten entsprechend GUINIER (1939)

abgeleitet werden kann. Er reflektiert den größtmöglichen Abstand zweier Streuzentren innerhalb eines Partikels. In der Auftragung nach GUINIER ( $\ln(I(s))$  gegen  $s^2$ ) entspricht  $I(0)$  dem Schnittpunkt mit der y-Achse und  $R_G$  ist im Anstieg enthalten.

$$I(s) \cong I(0) \exp\left(-\frac{1}{3} R_G^2 s^2\right)$$

#### Auswerteprogramme

Die verwendeten Programme sind unter <http://www.embl-hamburg.de/ExternalInfo/Research/Sax/index.html> frei zugänglich.

OTOKO	Kalibrierung der Streuvektor-Achse ( $s$ ), (Boulin <i>et al.</i> , 1986)
SAPOKO	Subtraktion des Detektorrauschens und der Pufferstreuung, Reduktion und Normierung der Primärdaten (Svergun, D.I. & Koch, M.H.J., unveröffentlicht)
GNOMOKO	Berechnung der Streuparameter $R_G$ und $I(0)$ (Feigin & Svergun, 1987)
OLIGOMER	Berechnung der Volumenanteile unterschiedlicher Komponenten (Sokolova, A.V., Volkov, V.V. & Svergun, D.I., unveröffentlicht)
CRY SOL	Berechnung von Röntgenkleinwinkelstreu曲ven aus der Kristallstruktur unter Berücksichtigung der Streuung der umgebenden Hydrathülle (Svergun <i>et al.</i> , 1995)
MASSHA	Modelling of Atomic Structures and SHape Analysis (Konarev <i>et al.</i> , 2001), unter anderem Vergleich der Proteinstruktur in Lösung und im Kristall

#### Untersuchung der pH-abhängigen Oligomerisierung der *EcIPDC*

Es wurde ein Quadrantendetektor (Boulin *et al.*, 1986, 1988) verwendet. Die Kameralänge betrug 1.9 m. Die Messungen wurden bei 12 °C in 60 mM Puffer des entsprechenden pH-Wertes (Natriumcitrat pH 5.6, Mes pH 6.1, BisTris pH 6.4, Pipes pH 6.8, Mops pH 7.2, Hepes pH 7.5, Tricin pH 8.1, Bicin pH 8.3, Natriumborat pH 9.2, Ches pH 9.5 und Caps pH 10.2), 62.5 mM Ammoniumsulfat, 3 mM DTE und in Gegenwart oder Abwesenheit von Cofaktoren durchgeführt (10 mM ThDP/MgSO<sub>4</sub>). Die Konzentration an *EcIPDC* betrug 5 mg/mL. Die Streukurven wurden in Serien von 15 *frames* zu je 1 min aufgenommen. Die  $s$ -Achse wurde mit Kollagen oder Tripalmitat als Standard kalibriert (OTOKO). Das Programm SAPOKO wurde zur Normierung der Rohdaten an die Intensität des primären Strahls, zur Korrektur des Detektorsignals und zur Subtraktion der Pufferstreuung verwendet. Um die Streuparameter  $I(0)$  und  $R_G$  zu erhalten, wurden die Daten mit dem Programm GNOMOKO prozessiert. Die Molmassen wurden aus dem Verhältnis von  $I(0)$  der Proben und der des Molmassenstandards BSA berechnet. Alle Proteinkonzentrationen und pH-Werte der Original-

proben wurden nach den Messungen bestimmt. Während der SAXS-Experimente wurden keine Denaturierungsprozesse (verursacht durch Strahlungsschäden) beobachtet.

Die experimentelle Streuintensität  $I(s)$  einer Mischung aus verschiedenen Komponenten setzt sich aus dem Beitrag  $w_i$  der Streuintensität jeder Komponente  $I_i(s)$  zusammen. Mit Hilfe des Programm OLIGOMER können die Volumenanteile der einzelnen Komponenten berechnet werden, im Falle der *EcIPDC* Monomere, Dimere und Tetramere.

### **Einfluss der Enzymkonzentration auf die Streuparameter**

Es sollte herausgefunden werden, ob hohe Enzymkonzentrationen Einfluss auf intermolekulare Wechselwirkungen haben. Die Messungen wurden in 60 mM Mes pH 6.5 und 3 mM DTE durchgeführt. Die eingesetzte Enzymkonzentration betrug 2.5-28 mg *EcIPDC*/mL. Die *EcIPDC* wurde mit den Cofaktoren ThDP und  $Mg^{2+}$  (10 mM) gesättigt. Die Analyse der Streukurven wurde mit dem Programm GNOMOKO durchgeführt.

### **Vergleich der Struktur der *EcIPDC* im Kristall und in Lösung**

Es wurden die Strukturen der *EcIPDC* im Kristall und in der Lösung verglichen. Die zugrunde liegende experimentelle Streukurve repräsentiert das tetramere Enzym (4.1 mg/mL *EcIPDC*, pH 5.6, 10 mM Cofaktoren). Mit Hilfe des Programms CRY SOL wurde aus der Kristallstruktur die theoretische Streukurve berechnet. Mit dem Programm MASSHA wurden die Unterschiede zwischen den berechneten und experimentellen Streukurven minimiert (ausgedrückt in der Diskrepanz  $\chi$  des berechneten Modells zum Modell der Kristallstruktur) und ein niedrigauflösendes Modell der tetrameren *EcIPDC* in Lösung berechnet (unter Berücksichtigung der P222 Symmetrie) (Svergun *et al.*, 1999).

$$\chi = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_i \left( \frac{I(s_i) - I_{\text{exp}}(s_i)}{\sigma(s_i)} \right)^2}$$

$N$  Anzahl der Messpunkte

$I(s)_{(\text{CRY SOL})}$  berechnete Streuintensität aus der Kristallstruktur

$I(s)_{(\text{MASSHA})}$  nach *rigid-body-refinement* und *simulated annealing* berechnete Streuintensität aus der Kristallstruktur

$I_{\text{exp}}(s)$  experimentelle Streuintensität

$\sigma(s)$  Standardabweichung

## 2.6. Kinetische Untersuchungen der *EcIPDC*

### 2.6.1. Messmethoden

Die Messungen erfolgten spektrophotometrisch. Die Aktivitätsmessungen wurden mit Enzym gestartet und wurden, wenn nicht abweichend vermerkt, bei einer Temperatur von 30 °C durchgeführt. Die Schichtdicke der Küvette betrug 1 cm.

#### **Proteinbestimmung**

##### *Proteinbestimmung über den Extinktionskoeffizienten*

Von ThDP-freien Proben wurden Spektren im Bereich von 250-340 nm unter Verwendung von Quarzküvetten aufgenommen. Der berechnete Extinktionskoeffizient (Gill & Hippel, 1989) von  $\epsilon_{280} = 259520 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  entspricht einer Absorption von 1.081 für 1 mg/mL tetramere *EcIPDC*.

##### *Proteinbestimmung nach Bradford*

Der Proteingehalt ThDP-haltiger Proben wurde nach der Methode von BRADFORD (1976) ermittelt. Das Absorptionsmaximum wurde bei 595 nm bestimmt. Zur Ermittlung des Proteingehalts diente eine Eichkurve mit BSA.

#### **Bestimmung der Enzymaktivität**

Zur Aktivitätsbestimmung wurde ein mit ADH gekoppelt optischer Test verwendet. Dabei wird der entstehende Aldehyd durch das Kopplungsenzym unter NADH-Verbrauch umgesetzt. Der NADH-Verbrauch wird spektrophotometrisch verfolgt. Die ADH wird in solchen Konzentrationen eingesetzt, dass die Kopplungsreaktion nicht geschwindigkeitsbestimmend ist. Eine Unit (U) ist definiert als die Enzymmenge, die 1  $\mu\text{mol}$  Substrat in einer Minute umsetzt. Die Substrate wurden in 0.2 M Mes/NaOH pH 6.5 gelöst und der pH korrigiert.

##### *Absättigung mit Cofaktoren*

Vor jeder Aktivitätsbestimmung wurde die Enzymprobe mit 15 mM Cofaktoren ThDP/Mg<sup>2+</sup> (mit NaOH auf pH 6.5 eingestellt) für 30 min bei Raumtemperatur präinkubiert.

##### *Pyruvat als Substrat*

Es wurde die Hefe-ADH als Kopplungsenzym entsprechend dem optischen Test nach HOLZER *et al.* (1956) verwendet. Der NADH-Verbrauch wurde bei 340 nm ( $\epsilon_{\text{NADH}} = 6200 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ )

verfolgt. Der Messansatz enthielt 0.1 M Mes/NaOH pH 6.5, 0.19 mM NADH und 15 U/mL Hefe-ADH.

#### *Indolpyruvat, Benzoylformiat und -derivate als Substrat*

Es wurde ein gekoppelt optischer Test mit Pferdeleber-ADH in Anlehnung an WEISS *et al.* (1988) entwickelt (Schütz *et al.*, 2000, 2003<sub>a</sub>). Der NADH-Verbrauch wurde bei 366 nm ( $\epsilon_{\text{NADH}} = 3400 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) verfolgt, da die Substrate bei 340 nm stärker als bei 366 nm absorbieren. Der Messansatz enthielt 0.1 M Mes/NaOH pH 6.5, 0.28 mM NADH und 1 U/mL Pferdeleber-ADH. Die verwendete Indolpyruvatlösung wurde frisch hergestellt und nach 45 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur (Umwandlung der Enol- in die Ketoform) schnellstmöglich vermessen.

### **2.6.2. steady state Kinetiken**

#### **Umsetzung verschieden 4-substituierter Benzoylformiate**

Zur Untersuchungen der Substratspezifität von *EcIPDC*-Wt wurden v-S-Charakteristiken mit den substituierten Benzoylformiaten 4-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>-Bf, 4-CH<sub>3</sub>O-Bf, 4-NO<sub>2</sub>-Bf und 4-F-Bf als Substrate aufgenommen (2.6.1.). Die katalytischen Konstanten wurden durch Auswertung der resultierenden Daten entsprechend einer Michaelis-Menten Kinetik erhalten. Im Falle des Substrates 4-NO<sub>2</sub>-Bf wurde die integrierte Michaelis-Menten-Gleichung angewandt (da zu kleiner  $K_M$  bei kleinem  $k_{\text{cat}}$ ). Die 4-substituierten Benzoylformiate wurden durch Oxidation der entsprechenden Acetophenone mit SeO<sub>2</sub> dargestellt (Hallmann & Hägle, 1963; Sultanov, 1986). Die Synthesen führte Dr. R. GOLBIK durch.

#### **Untersuchung verschiedener *EcIPDC*-Varianten**

Die *EcIPDC*-Varianten Asp<sup>29</sup>Glu, Glu<sup>468</sup>Asp, Glu<sup>52</sup>Asp, His<sup>115</sup>Lys und Gln<sup>383</sup>Thr wurden im Hinblick auf die Decarboxylierung von Indolpyruvat, Pyruvat und Benzoylformiat untersucht. Die kinetischen Konstanten  $k_{\text{cat}}$  und  $K_M$  ergaben sich nach Anpassung der entsprechenden experimentellen Daten an die Michaelis-Menten-Gleichung. Die Messbedingungen entsprachen denen in 2.6.1.. Der  $K_M$ -Wert für IPyr wurde unter Berücksichtigung des Tautomerengleichgewichtes (85 % effektive Substratkonzentration; Schütz *et al.*, 2003<sub>a</sub>) berechnet.

#### **Untersuchung der Decarboxylierung von Indolpyruvat durch *ZmPDC* und *ScPDC***

Es wurde die Fähigkeit zur Decarboxylierung von Indolpyruvat durch die Pyruvatdecarboxylase aus *Zymomonas mobilis* und *Saccharomyces cerevisiae* untersucht.

Die Messbedingungen entsprachen denen für *EcIPDC* (siehe 2.6.1.). Die maximal eingesetzte Konzentration an *ZmPDC* betrug 2.3 mg/mL. Bei der Untersuchung der *ScPDC* wurden 90 µg/mL verwendet. Die Präparation der *ScPDC* und der *ZmPDC* (freundlicherweise von Fr. Seliger durchgeführt) erfolgte nach bereits etablierten Reinigungsprotokollen (Dobritzsch *et al.*, 1998). Die aus den Messungen mit *ScPDC* resultierenden Daten wurden entsprechend dem Mechanismus für Substrataktivierung ausgewertet (Krieger *et al.*, 2002).

$$v([S]) = \frac{V_{\max} \cdot [S]^2}{A + B \cdot [S] + S^2} \quad (\text{Gleichung 1})$$

$$S_{0.5} = \frac{B}{2} + \sqrt{\frac{B^2}{4} + A} \quad (\text{Gleichung 2})$$

### Bestimmung der katalytischen Konstanten der *EcIPDC*

Die Bestimmung der katalytischen Konstanten der *EcIPDC* erfolgte durch die Anpassung der gemessenen Daten an die Michaelis-Menten-Gleichung (Gleichung 3).

$$v([S]) = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{[S] + K_M} \quad (\text{Gleichung 3})$$

Im Falle einer Substratüberschusshemmung wurde die Gleichung 4 angewandt.

$$v([S]) = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{[S] \cdot \left(1 + \frac{[S]}{K_I}\right) + K_M} \quad (\text{Gleichung 4})$$

An dieser Stelle sei festgehalten, dass die Erniedrigung eines  $K_M$ -Wertes einer Variante nicht unbedingt mit einer besseren Affinität des Substrates interpretiert werden muss, sondern vielmehr auf das veränderte Verhältnis der mikroskopischen Geschwindigkeitskonstanten, welche sich im  $K_M$ -Wert widerspiegeln, zurückgeführt werden könnte.

Die Berechnung von  $k_{\text{cat}}$  ergibt sich aus Gleichung 5, wobei  $E_0$  der eingesetzten Enzymkonzentration (Monomer, aktives Zentrum) entspricht.

$$k_{\text{cat}} = \frac{V_{\max}}{E_0} \quad (\text{Gleichung 5})$$

### 2.6.3. Substrataktivierung

Es wurde die Umsetzung der Substrate Indolpyruvat, Pyruvat und Benzoylformiat durch den *EcIPDC*-Wt mit Hilfe der *stopped-flow*-Technik untersucht. Es sollte festgestellt werden, ob eine Aktivierungskinetik zu beobachten ist. Die Experimente wurden in 10 mM Mes/NaOH pH 6.5 und 0.55 mM NADH bei 10 °C und 30 °C unter Substratsättigung durchgeführt (0.5 mM IPyr, 25 mM Pyr, 20 mM Bf). Bei der Umsetzung von Indolpyruvat und Benzoylformiat wurden 160 U/mL bzw. 115 U/mL Pferdeleber-ADH eingesetzt. Im Falle von Pyruvat wurden 450 U/mL Hefe-ADH als Kopplungsenzym verwendet. Die eingesetzten *EcIPDC*-Konzentrationen betragen bei der Umsetzung von IPyr 0.55 mg/mL, bei der Umsetzung von Bf 6.5 µg/mL und im Falle von Pyr 0.4 mg/mL. Die Progresskurven wurden bei 366 nm (Bf, IPyr) bzw. 340 nm (Pyr) aufgenommen.

### 2.6.4. <sup>1</sup>H-NMR-Untersuchungen

Mit Hilfe der eindimensionalen <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie wurden die ThDP-gebundenen Intermediate, welche im Verlauf der *EcIPDC*-Katalyse gebildet werden, entsprechend der Methode von TITTMANN *et al.* (2003) qualitativ und quantitativ bestimmt. Zur Bestimmung der Deprotonierungsgeschwindigkeitskonstanten am C2-Atom des enzymgebundenen ThDP wurden H/D Austauschexperimente durchgeführt (Kern *et al.*, 1997). Die Messungen und die Auswertung wurden in Zusammenarbeit mit JUNIOR-PROF. DR. K. TITTMANN durchgeführt.

Zunächst wurde das gereinigte Apoenzym unter Verwendung von Vivaspin 500 Zentrifugalkonzentratoren (Vivascience, Sartorius AG, Göttingen) auf 15 mg/mL (Intermediatanalyse) bzw. 10 mg/mL (Bestimmung der Deprotonierungsgeschwindigkeitskonstanten) aufkonzentriert und simultan auf 0.1 M Mes/NaOH pH 6.5 umgepuffert. Zur Ausbildung des katalytisch aktiven Holoenzym wurde die Proteinlösung mit zu den aktiven Zentren äquimolarer Konzentration an ThDP und 5 mM Mg<sup>2+</sup> für 30 min bei Raumtemperatur präinkubiert. Die Experimente wurden entweder manuell (Reaktionszeiten ≥ 2 s) oder in einer *Rapid Quenched-flow* RQF-3 Apparatur bei 30 °C durchgeführt.

### Synthese der Standards

Die bei der Umsetzung von Pyruvat gebildeten kovalenten ThDP-Addukte LThDP und HETHDP wurden entsprechend KLUGER *et al.* (1981<sub>a</sub>) und KRAMPITZ *et al.* (1969) chemisch synthetisiert. Die Synthese von HBzTHDP, einem Intermediat bei der Umsetzung von Benzoylformiat, erfolgte nach MIEYAL *et al.* (1971) und JORDAN *et al.* (1999).

Die chemische Synthese von IndHETHDP, einem Intermediat in der Umsetzung von IPyr, wurde entsprechend dem Protokoll für HBzThDP durchgeführt. Da die chemische Ligation von Indol-3-acetaldehyd und ThDP nur zu geringen Ausbeuten führte, wurde die enzymatische Synthese unter Zuhilfenahme der *EcIPDC*-Variante Asp<sup>29</sup>Glu, die in Gegenwart von IPyr und Überschusskonzentrationen an Cofaktoren ausreichende Mengen an IndHETHDP produziert, angewandt. Der Reaktionsansatz (1 mL) enthielt 5 mg/mL *EcIPDC*-Variante Asp<sup>29</sup>Glu, 15 mM ThDP/Mg<sup>2+</sup> und 5 mM IPyr in 200 mM Mes/NaOH pH 6.5. Nach einer Inkubation von 2 h bei 25 °C wurde das Protein durch Zugabe von 50 µL konzentrierter HCl ausgefällt und anschließend abzentrifugiert (15000g, 15 min). Nach Einstellen des pH-Wertes von 5.5 wurde der Überstand auf die mit 0.5 M Natriumacetat pH 6.7 voräquilibrierte Säule *QAE-Sephadex A25* appliziert. Unter diesen Bedingungen binden ThDP und seine Addukte an die Säulenmatrix und die Substrate, Produkte und Puffersubstanzen können durch mehrmaliges Waschen mit Wasser eluiert werden. Die Elution von ThDP und dem ThDP-Addukt IndHETHDP erfolgte mit einem isokratischen Gradienten von 0-50 mM Acetat über 100 mL. Die Reinheit der Syntheseprodukte und deren chemische Stabilität unter sauren Bedingungen wurden mit Hilfe der <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie überprüft. Die chemischen Synthesen wurden von Dr. R. GOLBIK durchgeführt.

### Zuordnung der Signale

Die in der Umsetzung von IPyr, Pyr und Bf gebildeten ThDP-Addukte wurden qualitativ und quantitativ bestimmt. Zur Unterscheidung der kovalent am C2-Atom des ThDP-Moleküls gebundenen Intermediate diente eine <sup>1</sup>H-NMR-chemische Verschiebung des C6'-H Singulets der Aminopyrimidinumgebung (Tittmann *et al.*, 2003) (Tab. 1). Da die aromatischen Protonensignale der Substrate Indolpyruvat und Benzoylformiat mit dem C6'-H-Signal des ThDP interferieren (siehe Abb. 39 im Anhang), wurden zur Auswertung die C2-H-Resonanz des ThDP herangezogen (9.7 ppm).

	<sup>1</sup> H-NMR-chemische Verschiebung (ppm) C(6')-H
ThDP	8.01
LThDP	7.27
HETHDP	7.33
MThDP	6.72
HBzTHDP	6.61
IndLThDP	6.80
IndHETHDP	6.37

**Tab. 1:** <sup>1</sup>H-NMR-chemische Verschiebungen zur Identifizierung der Intermediate.



### Intermediatanalyse

200  $\mu\text{l}$  der Enzymlösung wurden mit 200  $\mu\text{l}$  der entsprechenden Substratlösung (Pyr und Bf in  $\text{H}_2\text{O}$ , IPyr in 10 mM Mes/NaOH pH 6.5) bei 30 °C inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 200  $\mu\text{l}$  12.5 % (w/v) TCA/1 M DCl (in  $\text{D}_2\text{O}$ ) gestoppt. Dabei denaturiert das Enzym unter Dissoziation der Cofaktoren. Nach dem Abzentrifugieren des präzipitierten Proteins (2 min, 13000g) wurde der Überstand filtriert (Nalgene® Spritzenvorsatzfilter, Celluloseacetat-Membran, 0.45  $\mu\text{m}$ , VWR International GmbH, Darmstadt) und mittels  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie im Hinblick auf die Verteilung der ThDP-gebundenen Reaktionsintermediate analysiert (bei 30 °C). Diese Untersuchungen wurden sowohl für den *EcIPDC*-Wt als auch für die Varianten Asp<sup>29</sup>Glu, Glu<sup>52</sup>Asp, His<sup>115</sup>Lys, Gln<sup>383</sup>Thr und Glu<sup>468</sup>Asp durchgeführt. Die Substrate wurden in Sättigungskonzentrationen eingesetzt. Die Endkonzentrationen betragen 2.5 mM IPyr, 40 mM Bf, 29 mM 4-CH<sub>3</sub>O-Bf, 33 mM 4-Br-Bf und 25 mM Pyr (10 mM für die Varianten Asp<sup>29</sup>Glu, Glu<sup>52</sup>Asp). Die Enzymreaktion wurde nach Erreichen des *steady state* abgestoppt. Für die Umsetzung von Indolpyruvat entspricht das einer Reaktionszeit von 100 ms (Gln<sup>383</sup>Thr), 2 s (Wt, Glu<sup>52</sup>Asp und His<sup>115</sup>Lys) bzw. 60 s (Asp<sup>29</sup>Glu, Glu<sup>468</sup>Asp), für Pyruvat 1-2 s (Wt und Gln<sup>383</sup>Thr), 15 s (Glu<sup>52</sup>Asp), 30 s (His<sup>115</sup>Lys) bzw. 60 s (Asp<sup>29</sup>Glu und Glu<sup>468</sup>Asp), für Benzoylformiat 20 ms (Wt), 500 ms (Glu<sup>52</sup>Asp), 2 s (Gln<sup>383</sup>Thr) bzw. 60 s (Asp<sup>29</sup>Glu, Glu<sup>468</sup>Asp und His<sup>115</sup>Lys) und für 4-CH<sub>3</sub>O-Bf und 4-Br-Bf 2-3 s.

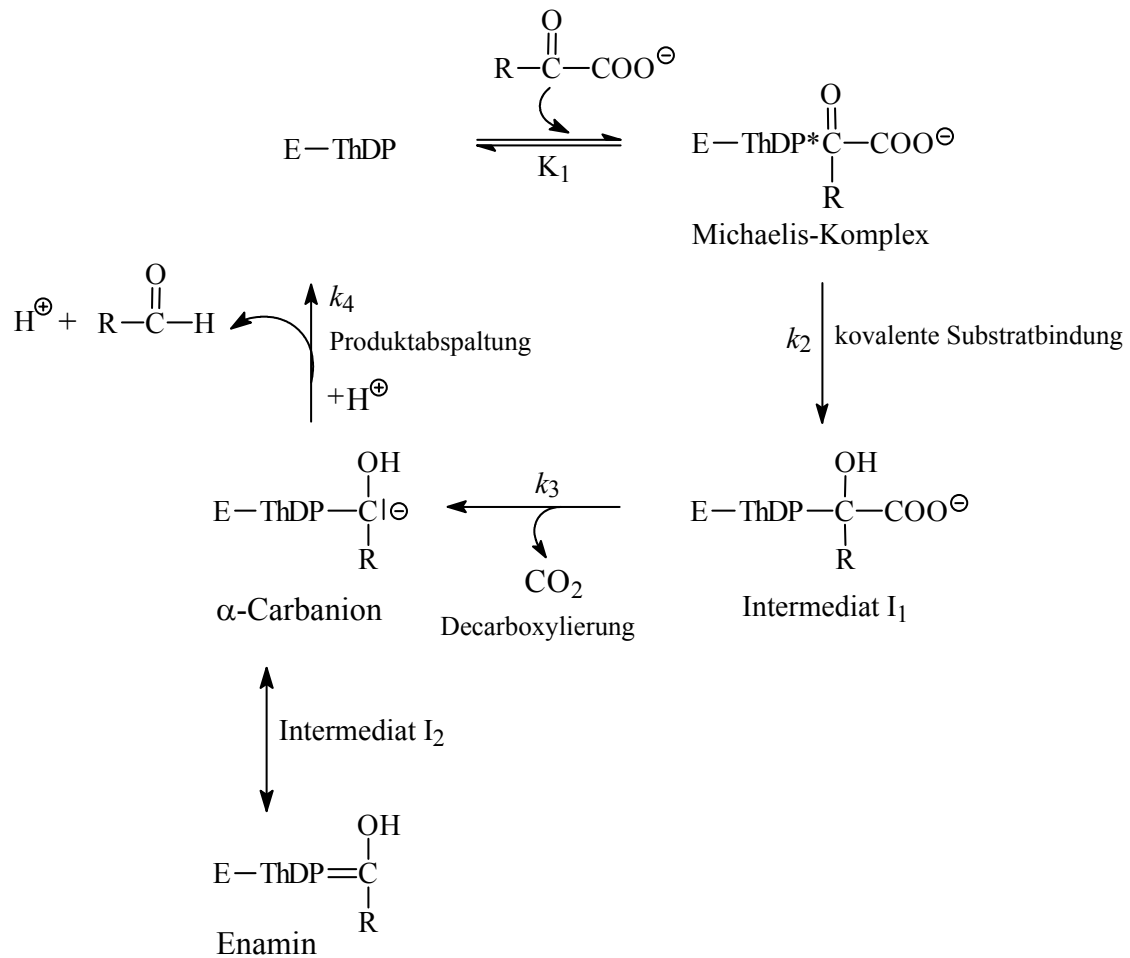
### Berechnung der mikroskopischen Geschwindigkeitskonstanten der *EcIPDC*

Für die Berechnung der mikroskopischen Geschwindigkeitskonstanten liegt folgendes Minimalmodell der *EcIPDC*-Katalyse zugrunde (Abb. 4). Nach der reversiblen und nichtkovalenten Bindung des Substrates ( $K_1$ , Michaelis-Komplex) erfolgt die Bildung eines kovalenten ThDP-Substratadduktes, das Intermediat  $I_1$  entsteht ( $k_2$ ). Die Decarboxylierung des Intermediates  $I_1$  resultiert in der Bildung des Intermediates  $I_2$ , dem  $\alpha$ -Carbanion/Enamin ( $k_3$ ).

Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass die experimentellen Bedingungen (Säuredenaturierung) keine Diskriminierung zwischen dem  $\alpha$ -Carbanion/Enamin und seiner konjugierten Säure, dem 2-R-hydroxyethyl(oder aryl)-ThDP, erlaubt, da das Enamin nach dem Austreten aus dem aktiven Zentrum sofort protoniert wird. Deshalb fließen in die Geschwindigkeitskonstante der Produktabspaltung  $k_4$  sowohl die Protonierung des  $\alpha$ -Carbanion/Enamins als auch die Deprotonierung der C $\alpha$ -Hydroxylgruppe des Substrates ein. Die chemischen Strukturen der postulierten Reaktionsintermediate  $I_1$  und  $I_2$  in der Umsetzung von IPyr, Pyr und Bf sind Tab. 2 zusammenfassend dargestellt.

Unter Bedingungen der Substratsättigung setzt sich der  $k_{\text{cat}}$ -Wert aus den mikroskopischen Geschwindigkeitskonstanten entsprechend Gleichung 6 zusammen.

$$k_{\text{cat}} = \frac{k_2 k_3 k_4}{k_2 k_3 + k_2 k_4 + k_3 k_4} \quad \text{und} \quad \frac{1}{k_{\text{cat}}} = \frac{1}{k_2} + \frac{1}{k_3} + \frac{1}{k_4} \quad (\text{Gleichung 6})$$



**Abb. 4:** *Schema der EcIPDC-Katalyse.*  
Erläuterungen siehe Text.

Unter *steady state* Bedingungen und  $[\text{S}] \gg K_M$  ist das Verhältnis der Bildung und des Zerfalls aller enzymatisch gebildeten Intermediate  $I$  unverändert (Gleichung 7).

$$\frac{d[I]}{dt} = 0 \quad (\text{Gleichung 7})$$

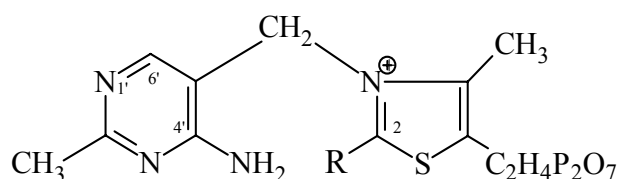
Deshalb kann die relative Intermediatkonzentration direkt mit den Geschwindigkeitskonstanten ihrer Umwandlung korreliert werden. Unter *steady state* Bedingungen ergeben sich für die EcIPDC-Katalyse folgende Korrelationen:

$$\frac{[I_1]}{[\text{ThDP}]} = \frac{k_2}{k_3} = a \quad \text{und} \quad \frac{[I_2]}{[I_1]} = \frac{k_3}{k_4} = b \quad (\text{Gleichung 8})$$

Unter Verwendung der experimentell bestimmten Intermediatverteilungen werden anhand der Gleichungen 6-8 die mikroskopischen Geschwindigkeitskonstanten wie folgt berechnet:

$$k_2 = k_{\text{cat}}(1 + a + ab) \quad k_3 = k_{\text{cat}} \frac{(1 + a + ab)}{a} \quad k_4 = k_{\text{cat}} \frac{(1 + a + ab)}{ab} \quad (\text{Gleichung 9})$$

**Tab. 2:** Chemische Struktur verschiedener durch die  $^1\text{H-NMR-Spektroskopie}$  detektierbarer ThDP-Intermediate in der EcIPDC-Katalyse.



Substrat	R: $I_1$	R: konjugierte Säure von $I_2$
Indolpyruvat (IPyr) 	2-(2-Indolyl-lactyl)-ThDP (IndLThDP) 	2-(2-Indolyl-1-hydroxyethyl)-ThDP (IndHETThDP) 
Pyruvat (Pyr) 	2-Lactyl-ThDP (LThDP) 	2-(1-Hydroxyethyl)-ThDP (HETThDP) 
Benzoylformiat (Bf) 	2-Mandelyl-ThDP (MThDP) 	2-Hydroxybenzyl-ThDP (HBzThDP) 

In Anbetracht der Präinkubation der Proteinlösung mit zu den aktiven Zentren äquimolarer Konzentration an ThDP, entspricht die Summe der Konzentration an freien ThDP und seinen Addukten der Konzentration an aktiven Zentren (Gleichung 10).

$$[E_{\text{aktive Zentren}}] = \sum [\text{ThDP}] + [I_1] + [I_2] \quad (\text{Gleichung 10})$$

Der durch  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie detektierte Anteil an freiem ThDP wurde unter Berücksichtigung der unvollständigen Sättigung des Enzyms mit Substrat (auf mikroskopischer Ebene) entsprechend der Michaelis-Menten-Gleichung korrigiert (Gleichung 11).

$$[S] = i \cdot K_M \quad v([S]) = \frac{V_{\text{max}} \cdot [S]}{K_M + [S]} = \frac{V_{\text{max}} \cdot i K_M}{K_M + i K_M} \quad (\text{Gleichung 11})$$

Dabei ist der Sättigungsfaktor  $\alpha$  definiert als:

$$\alpha = \frac{i}{i + 1} \quad (\text{Gleichung 12})$$

Die effektive Konzentration an aktiven Zentren entspricht somit Gleichung 13.

$$[E_{\text{aktive Zentren}}]_{\text{eff}} = \alpha \cdot [E_{\text{aktive Zentren}}] \quad (\text{Gleichung 13})$$

Die effektive Konzentration an ThDP als eine Übergangsform in der Katalyse ergibt sich aus:

$$[\text{ThDP}]_{\text{eff}} = [\text{ThDP}] - ([E_{\text{aktive Zentren}}] - [E_{\text{aktive Zentren}}]_{\text{eff}}) \quad (\text{Gleichung 14})$$

Bei den Messungen muss zudem der Anteil an nichtgebundenem ThDP infolge möglicher unterschiedlicher Rekombinationseigenschaften der einzelnen Varianten berücksichtigt werden. Dazu wurde die Aktivität sowohl unter zu den aktiven Zentren äquimolaren Konzentrationen und unter Sättigungskonzentrationen an ThDP bestimmt. Die Aktivität der *Ec*IPDC-Varianten war dabei um max. 10 % erniedrigt. Der Fehler liegt somit in dem Bereich des Fehlers der Methode der Bestimmung der mikroskopischen Geschwindigkeitskonstanten unter Anwendung der  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie und wurde vernachlässigt.

### Korrektur der relativen Intermediatkonzentration

Wie im Kapitel 3.4.2.1. später erläutert wird, sind die in der Umsetzung von Benzoylformiat und Indolpyruvat gebildeten Intermediate MThDP bzw. IndLThDP unter den sauren Messbedingungen nicht stabil und unterliegen einer spontanen Decarboxylierung zu HBzThDP bzw. IndHETHDP. Deshalb müssen zur Berechnung der mikroskopischen Geschwindigkeitskonstanten die durch die  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie bestimmten relativen Intermediatkonzentrationen entsprechend korrigiert werden.

Der einfach exponentielle Zerfall des Intermediates  $I_1$  (MThDP bzw. IndLThDP) zu Kohlendioxid und  $I_2$  (HBzThDP bzw. IndHETHDP) kann zur Extrapolation der relativen Intermediatkonzentrationen auf den Zeitpunkt  $t_0$  nach der Isolierung herangezogen werden.

$$\frac{[I_1]}{[I_1]+[I_2]}(t) = \frac{[I_1]}{[I_1]+[I_2]}(t_0) \cdot e^{-k \cdot t} \quad (\text{Gleichung 15})$$

Da die Konzentration der aktiven Zentren der Summe aller isolierten ThDP-Spezies entspricht (siehe Gleichung 10) und im *steady state* die Konzentration der Intermediate  $I_1$  und  $I_2$  als konstant angesehen werden kann, folgt:

$$\Sigma ([\text{HBzThDP}] + [\text{MThDP}]) = [\text{E}_{\text{as}}] - [\text{ThDP}] \quad (\text{Gleichung 16})$$

Für die Konzentration der Intermediate zum Zeitpunkt  $t_0$  nach der Isolierung ergibt sich demzufolge:

$$[I_1](t_0) = \frac{[I_1]}{[I_1]+[I_2]}(t_0) \cdot ([\text{E}_{\text{aktive Zentren}}] - [\text{ThDP}]) \quad (\text{Gleichung 17})$$

$$[I_2](t_0) = \left(1 - \frac{[I_1]}{[I_1]+[I_2]}\right)(t_0) \cdot ([\text{E}_{\text{aktive Zentren}}] - [\text{ThDP}]) \quad (\text{Gleichung 18})$$

Die so korrigierten Intermediatkonzentrationen können nun zur Berechnung der mikroskopischen Geschwindigkeitskonstanten in der Umsetzung von Bf und IPyr eingesetzt werden (Gleichungen 8, 9). Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass das MThDP und das IndLThDP nur dann nachgewiesen werden kann, wenn die *steady state* Konzentration des Intermediates  $\geq 20\%$  der Konzentration an aktiven Zentren ist. Ursache dafür sind die für die zeitaufgelöste Beobachtung der Zerfallsreaktion notwendigen kurzen Akkumulationszeiten ( $t = 20$  min). Diese führen zu einem schlechteren Signal-Rausch-Verhältnis der Intermediat-signale verglichen zur Analyse der Signale stabiler Intermediate ( $t \approx 4-6$  h).

### Bestimmung der Deprotonierungsgeschwindigkeitskonstanten

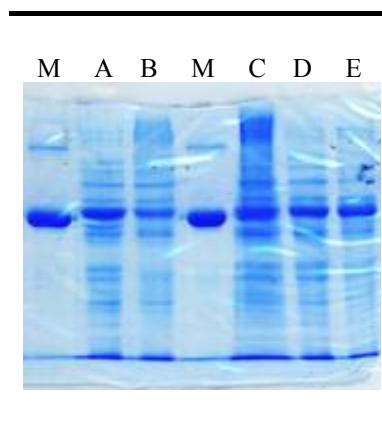
Die Deprotonierungsgeschwindigkeitskonstanten des C2-Atoms des enzymgebundenen ThDP wurden durch H/D Austauschexperimente entsprechend KERN *et al.* (1997) bestimmt. Gleiche Volumina (0.2 mL) an Enzymlösung (10 mg/mL) und 99.9 % (v/v)  $\text{D}_2\text{O}$  wurden gemischt, die Reaktion nach definierten Inkubationszeiten durch Zugabe von 0.2 mL 12.5 % (w/v) TCA/1 M DCl (in  $\text{D}_2\text{O}$ ) gestoppt, das präzipitierte Protein abzentrifugiert und der Überstand mittels  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie analysiert. Für den *EcIPDC*-Wt wurden Reaktionszeiten von 10 ms, 50 ms und 2 s gewählt, für die Variante Glu<sup>52</sup>Asp 3 s, 20 s und 40 s. Die Bestimmung der Deprotonierungsgeschwindigkeitskonstante erfolgte durch die Anpassung der experimentellen Daten entsprechend einer Reaktion erster Ordnung.

### 3. Ergebnisse und Diskussion

Zunächst werden die Ergebnisse der molekularbiologischen Arbeiten und der Enzympräparation vorgestellt. Es folgen die detaillierten strukturellen und kinetischen Untersuchungen der *EcIPDC*.

#### 3.1. Herstellung der *EcIPDC*-Varianten

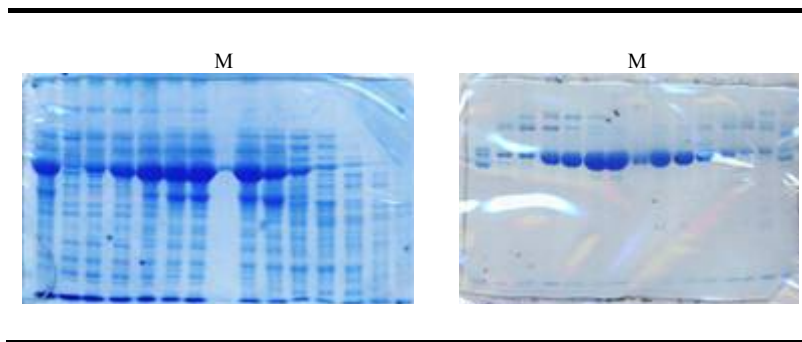
Es wurden die *EcIPDC*-Varianten Asp<sup>29</sup>Glu, Glu<sup>52</sup>Asp, His<sup>115</sup>Lys, Gln<sup>383</sup>Thr und Glu<sup>468</sup>Asp generiert. Die Richtigkeit der Mutationen wurde durch einen spezifischen Restriktionsverdau, durch einen Expressionstest (Abb. 5) und durch die Sequenzierung der für die *EcIPDC* codierenden Nukleotidsequenzen überprüft (siehe 2.2.). Die homotetramere *EcIPDC* hat eine molare Masse von 240 kDa. Das entspricht einer Bande bei 60 kDa in der SDS-PAGE. Die *EcIPDC*-Mutanten exprimieren die Indolpyruvatdecarboxylase nach der Induktion mit 1 mM IPTG im *E. coli* Stamm JM109 (Abb. 5).



**Abb. 5:** *SDS-PAGE zur Beurteilung der Expression der EcIPDC-Varianten. Die aufgetragenen Proteine entsprechen der EcIPDC der Varianten Asp<sup>29</sup>Glu (A), Glu<sup>52</sup>Asp (B), His<sup>115</sup>Lys (C), Gln<sup>383</sup>Thr (D) und Glu<sup>468</sup>Asp (E). Als Marker (M) wurde die Glutamatdehydrogenase (56 kDa) verwendet.*

#### 3.2. Enzympräparation

Die Reinigungsprotokolle für den Wildtyp und die Varianten der *EcIPDC* sind identisch und umfassen einen Zellaufschluss, eine Streptomycinsulfatfällung, eine fraktionierte Ammoniumsulfatfällung, eine Gelfiltration, eine Entsalzung und eine Anionenaustauschchromatographie. Begleitend zur Enzympräparation wurde eine SDS-PAGE durchgeführt und die Proteinkonzentrationen bestimmt. In Abb. 6 ist die Verfolgung der Reinigungsprozedur an einem Beispiel dargestellt.



**Abb. 6:** *SDS-PAGE zum Verlauf der Reinigungsprozedur der EcIPDC. Gezeigt sind ausgewählte Fraktionen der Gelfiltration (links) und der Anionenaustauschchromatographie (rechts) in der Reinigung von Gln<sup>383</sup>Thr. Als Marker (M) diente die Glutamatdehydrogenase (56 kDa).*

Aus den *E. coli*-Zellen einer Anzucht von 6 L Medium können circa 100 mg *EcIPDC* isoliert werden. Das entspricht einer Ausbeute von 5 % bezogen auf den Gesamtproteingehalt im Rohextrakt. Die so gereinigte *EcIPDC* liegt als Apoenzym vor.

### 3.3. Strukturelle Untersuchungen der *EcIPDC*

Die strukturellen Untersuchungen der *EcIPDC* umfassen die vergleichende Analyse der Primärstruktur der *EcIPDC* mit anderen ThDP-abhängigen Enzymen, die Bestimmung der dreidimensionalen Struktur und die Experimente mit Röntgenkleinwinkelstreuung.

#### 3.3.1. Analyse der Primärstruktur der *EcIPDC*

Die Analyse der Aminosäuresequenz eines Proteins ist hilfreich bei der Identifizierung von verwandten Proteinklassen und ermöglicht erste Aussagen über die Natur des zu untersuchenden Proteins.

Erste kinetische Untersuchungen der *EcIPDC* zeigten, dass neben Indolpyruvat auch Pyruvat und Benzoylformiat decarboxyliert werden (Koga *et al.*, 1992; Schütz, Diplomarbeit, 2000). Pyruvat und Benzoylformiat stellen die physiologischen Substrate der Pyruvatdecarboxylase bzw. der Benzoylformiatdecarboxylase dar (PDC, Holzer *et al.*, 1956; BFD, Weiss *et al.*, 1988). Die nachfolgenden vergleichenden Analysen der Primärstrukturen von verschiedenen Indolpyruvatdecarboxylasen, Pyruvatdecarboxylasen, der BFD und anderen ThDP-abhängigen Enzymen geben erste Hinweise auf die Ähnlichkeit dieser Enzyme (Abb. 7).

In den Proteindatenbanken SWISSPROT und TREMBL (<http://www.expasy.ch>) sind 12 IPDC-Strukturgene aus verschiedenen Organismen beschrieben. Neben den Indolpyruvatdecarboxylasen aus *Enterobacter cloacae* (P23234), *Azospirillum brasilense* (P51852), *Pantoea agglomerans* (P71323), *Mycobacterium leprae* (Q9CBD6), *Lactococcus lactis* (*Streptococcus lactis*) (Q9CG07), *Bacillus cereus* (Q81DD4) und *Methanosarcina acetivorans* (Q8TT45), werden die putativen Indolpyruvatdecarboxylasen aus *Mycobacterium tuberculosis* (O53865), *Salmonella typhimurium* (Q93IM7) und *Bacillus anthracis* (Q81QE0) und die IPDC-Fragmente aus *Pseudomonas putida* (Q9FDC2) und *Klebsiella aerogenes* (Q48380) aufgeführt.

EcIPDC	MRTPYCVADY	LLDRLTDCGA	DHLFGVPGDY	NLQFLDHVID	SPDICWVGCA	50
ScPDC	..SEITLQKY	LFERLQVNV	NTVFGLPGDF	NLSLLDKIYE	VEGMRWAGNA	48
ZmPDC	..MSYTVGTY	LAERLVQIGL	KHFFAVAGDY	NLVLLDNLLL	NKNMEQVYCC	48
BFD	...MASVHGT	TYELLRRQGI	DTVFGNPGSN	ELPFLKDF..	PEDFRYILAL	45
Consensus	.....v..y	l.#rL...g.	dtvFg.pGd.	#L.fLd....	.ed.r.....	
EcIPDC	NELNAYAAD	GYARCKGFAA	LLTTFGV.GE	LSAMNGIAGS	YAEHVPVLHI	99
ScPDC	NELNARYAAD	GYARIKGMSC	IITTFGV.GE	LSALNGIAGS	YAEHVGVLHV	97
ZmPDC	NELNCGFSAD	GYARAKGAAA	AVVTYSV.GA	LSAFDAIGGA	YAENLPVILI	97
BFD	QACVVGIAE	GYAQASRQPA	FINLHSAAGT	GNAMGALSNA	WNSHSP LIVT	95
Consensus	#Eln....A#	GYArakg..a	.i.t.sv.G.	lsAm.ai.ga	yaeh.pvi..	
EcIPDC	VGAPGTAAQQ	RGELLHHTLG	DGEFRHFYHM	SEPITVAQAV	LTEQ.NACYE	148
ScPDC	VGVPSSISQA	KQLLLHHTLG	NGDFTVFRHM	SANISSETTAM	ITDICTAPE	147
ZmPDC	SGAPNNNDHA	AGHVLHHTALG	KTDYHYQLEM	AKNITAAAEA	IYTPBEAPAK	147
BFD	AGQOTRAMIG	VEALLTNVDA	ANLPRPLVKW	SYEPASAAEV	PHAMSA...	142
Consensus	.G.p..a...	...lLhh.lg	....r....m	s..i...aev	.....A...	
EcIPDC	IDRVLTTMLR	ERRPGYMLLP	ADVAKKAATP	PV..NALTHK	QAHADSACLK	196
ScPDC	IDRCIRTTYV	TQRPVYLGLP	ANLVDLNVPA	KLLQTPIDMS	LKPNDASEEK	197
ZmPDC	IDHVIKTALR	EKKPVYLEIA	CNIASMPCAA	PGPASALFND	EA.SDEASLN	196
BFD	...IHMASMA	PQGPVYLSVP	YDDWDKADDP	QS..HHLFDR	HVSSSVRLND	187
Consensus	id....t...	.q.PvYL..p	...#.dk.a.p	.....lf..	...sd.....	
EcIPDC	AFRDAENKLL	AMSKRTALLA	DFLVLRHGLK	HALQKWVKEV	PMAHATMLMG	246
ScPDC	EVIDTILVLA	KDAKNPVILA	DACCSRHDVK	AETKKLIDLTL	QFPAFVTPMG	247
ZmPDC	AAVEETLKFV	ANRDKVAVLV	GSKLRAAGAE	EAAVKFADAL	GGAVATMAAA	246
BFD	QDLDLVKAL	NSASNPAIVL	GPDVDAANAN	ADCVMLAERL	KAPVWVAPSA	237
Consensus	...#.k.l	..a.npail.	g..v.aa.a.	a..vkla..l	..pv.v.p.a	
EcIPDC	.KGFDERQA	GFYGTYSGSA	STGAVKEAIE	GADTVLCVGT	RFTDITLTA	295
ScPDC	.KGSISEQHP	RYGGVYVGTL	SKPEVKEAVE	SADLILSVGA	LLSDFNTGSF	296
ZmPDC	.KSFPEENP	HYIGTSWGEV	SYPGVEKTMK	EADAVIALAP	VFNDSSTGTG	295
BFD	PRCFPFTRHP	CFRGLMPAGI	A..AISQLE	GHDVVLVIGA	PVFRYHQYDP	285
Consensus	.k..fperhp	.%G...g..	s..a!....e	gaD.!l..ga	...dy.t....	
EcIPDC	THQLTPAQTI	EVQPHAARVG	DVWFTGIPMN	QAIETLV...	.ELCKQHVHA	341
ScPDC	SYSYKTKNIV	EFHSDHMKIR	NATFPQVQMK	FVLQKLLTNI	ADAACKYKPV	346
ZmPDC	TDIPDPKLV	LAEPKRVVNV	GIRFPSVHLK	DYLTRLAQKV	SKKTGALDF	345
BFD	GQYLKPGTRL	ISVTCDPLEA	ARAPMGDAIV	ADIGAMASAL	ANLVE..ESS	333
Consensus	...lqp....	.....	...f.g....	..i..\$a...	a.l.....	
EcIPDC	GLMSSSSGAI	PPFQ.PDGSL	TQENFWRTLQ	TFIRPGDIIL	ADQGTSAFGA	390
ScPDC	AVPARTPANA	AVPA.ST.PL	KQEWMMNQLG	NFLQEGDVVI	AETGTSAFGI	394
ZmPDC	KSLNAGELKK	AAPADPSAPL	VNAEAIARQVE	ALLTPNNTVI	AETGDSIFNA	395
BFD	RQLPTAAPEP	AKVDQDAGRL	HPETVFDTLN	DMAPENAIYL	NESTSTTAQM	383
Consensus	..l.....	a.p.....g.L	...e.....tl.	....en.i.l	a#.g.s.f..	
EcIPDC	IDLRLPADV	FIVQPLWST	GYT...LAA	AFGAQTACPN	RRVIVLTGG	436
ScPDC	NQTTFPNNTY	GISQVLWST	GFTTGATLGA	AFAAEEIDPK	KRVILFVGG	444
ZmPDC	QRMKLPNGAR	VEYEMQWHL	GWS...VPA	AFGYAVGAP	RRNIMLVGG	441
BFD	WQRLNMRNPG	SYFFCAAGL	GFA...LPA	AIGVQLAEPE	RQVIAVIGG	429
Consensus	.q...p.n...	..y...wG.i	Gf.....lpA	Afg.q.a.Pe	rrvI..iGDG	
EcIPDC	AAQLTIQELG	SMLRDKQHP	ILVLNDEGYT	VERAIHGAEQ	RYNDIALWNW	486
ScPDC	SLQLTVQEIS	TMIRWGLKPY	LFVLNDEGYT	IEKLIHGPKA	QYNEIQGDWH	494
ZmPDC	SFQLTAQEVA	QMVRLKLPVI	IFLINDEGYT	IEVMIH..DG	PYNNIKNWDY	489
BFD	SANYSISALW	TAAQYNIPTI	FVIMNDEGYT	ALRWFAG.VL	EAENVPGLDV	478
Consensus	sa#ltiqel.	tm.r...p.i	....NN.gYt	.er.ihg...	.y##!.gw#.	



EcIPDC	THI.PQALS	DPQSECW...	..RVSEAEQL	ADVLEKVAHH	ERLSLIEVML	530
ScPDC	LSLLPTFGAK	DYETHRV...	..ATTGEWDK	LTQDKSFNDN	SKIRMI EVML	539
ZmPDC	AGLMEVFNGN	GGYDSGAGKG	LKAKTGGELA	EAIKVALANT	DGPTLIECFI	539
BFD	PGIDFRALAK	GYGVQAL...	..KADNLEQL	KGSLQEALSA	KGPV LIEVST	523
Consensus	.gi...alak	gy.....	.....eql	...l.....	.gp.\$IEV..	
EcIPDC	PKADIPPLLG	ALTKALEACN	NA.....	552		
ScPDC	PVFDAPQNLV	EQAKLTAATN	AKQ.....	562		
ZmPDC	GREDCTEELV	KWGKRVAAN	SRKPVNKL	568		
BFD	VSPVK.....	.....	.....	528		
Consensus	...d...l.	...k...a.n	.....			

**Abb. 7:** *Vergleich der Primärstrukturen verschiedener ThDP-abhängiger Enzyme. In der Zeile der EcIPDC signalisieren die roten Buchstaben konservierte AS in verschiedenen Indolpyruvatdecarboxylasen (P23234, P51852, O53865, P71323, Q93IM7, Q9CBD6, Q9FDC2, Q81DD4, Q81QE0 und Q8TT45). Konservative AS-Austausche sind durch blaue Buchstaben dargestellt. In der zweiten Zeile sind die Sequenzvergleiche von ScPDC zu anderen Pyruvatdecarboxylasen aus Hefen und Bakterien gezeigt (Q12629, P33149, Q9P4E4, Q9UUT6, P34734, O43106, Q09737, P87208, O94185, Q93EN4, Q97TS2, P51844 und P33287). Die dritte Zeile veranschaulicht den Vergleich der Primärstrukturen von ZmPDC mit pflanzlichen Pyruvatdecarboxylasen (P28516, P51847, P51846, O82647, Q8W2B3, Q9FVE1 und P51850). Die vierte Zeile zeigt den Sequenzvergleich von BFD mit anderen ThDP-abhängigen Enzymen (P37063, P08142, P51853, P78093, P06672, P23234 und P17109). Die Consensus-Sequenz gibt die Ergebnisse der Sequenzvergleiche von EcIPDC, ScPDC, ZmPDC und BFD an. Grün unterlegte AS sind an der ThDP-Bindung beteiligt. Gelb unterlegte AS sind in die Katalyse involviert. Blau unterlegte AS sind für die Restriktion der Substratbindungsstelle verantwortlich. Die Analysen wurden mit dem Programm MULTALIN durchgeführt.*

Wie aus Abb. 7 ersichtlich wird, ergibt sich die Zugehörigkeit der Indolpyruvatdecarboxylasen zur Klasse der ThDP-abhängigen Enzyme durch das Vorhandensein der ThDP-Fingerprint-Sequenz X<sub>5</sub>-Gly-Asp-Gly-Y<sub>25-28</sub>-Asn (Hawkins *et al.*, 1989). Die Analyse der bereits bestimmten Strukturen ThDP-abhängiger Enzyme (siehe Einleitung) zeigte, dass diese Reste an der Bindung des Diphosphatankers des Cofaktors beteiligt sind (Abb. 7). In EcIPDC entsprechen diese AS-Reste dem Gly434, Asp435, Gly436 und dem Asn 462.

Der Vergleich der AS-Sequenz der EcIPDC zu anderen ThDP-abhängigen Enzymen zeigt, dass die größte Ähnlichkeit zur Klasse der Pyruvatdecarboxylasen besteht. Die AS-Sequenz der EcIPDC ist zu 40 % identisch zur PDC aus *Kluyveromyces lactis* (Q12629), zu 38 % zur PDC aus *Saccharomyces cerevisiae* (P06169) und sie hat ungefähr 32 % Identität zur PDC aus *Zea mays* (P28516), *Oryza sativa* (P51847), *Pisum sativum* (P51850) und *Zymomonas mobilis* (P06672). AS-Reste die in den bereits untersuchten PDC-Strukturen als Schlüssel-aminosäurereste in der Katalyse identifiziert wurden, sind auch in den IPDC-Sequenzen zu finden (Asp29, Glu52, His115, His116 und Glu468; EcIPDC Nummerierung). Somit ist anzunehmen, dass in PDC und IPDC ein ähnlicher Katalysemechanismus vorliegt.

Vergleicht man dagegen die AS-Sequenzen von PDC und IPDC mit der von BFD, scheinen in der BFD andere AS-Reste in der Katalyse beteiligt zu sein (Abb. 7). Tatsächlich wurde gefunden, dass durch eine spezielle Faltung der AS-Ketten die Position funktioneller Gruppen im aktiven Zentrum konserviert ist. So sind die beiden Histidine (in ScPDC His114 und

His115) ebenfalls im aktiven Zentrum der BFD zu finden (His70 und His281). Anstelle des Asp28 (*ScPDC* Nummerierung) tritt in der BFD das Ser26 (Hasson *et al.* 1998). Dies verdeutlicht, dass allein durch einen AS-Sequenzvergleich keine eindeutige Aussage über die an der Katalyse beteiligten AS-Reste getroffen werden kann.

Innerhalb der IPDC-Familie gibt es eine Reihe konservierter AS-Reste. Da diese jedoch größtenteils auch in den *ScPDC*- und *ZmPDC*-ähnlichen Pyruvatdecarboxylasen konserviert sind, ist eine Zuordnung bestimmter AS-Reste, die eine IPDC eindeutig definieren, nicht möglich. Die Tatsache, dass eine Differenzierung zwischen einer PDC und einer IPDC anhand von AS-Sequenzvergleichen schwierig ist, sei an dem folgenden Beispiel weiterhin verdeutlicht. Im Genom von *Arabidopsis thaliana* sind vier scheinbare Decarboxylasen, die der PDC ähnlich sind, codiert. Da jedoch die Sequenzen der bakteriellen Indolpyruvatdecarboxylasen eher den Sequenzen der bakteriellen Pyruvatdecarboxylasen als irgendeinem Pflanzenprotein ähneln, ist nicht ersichtlich, ob irgendeines dieser Enzyme einer IPDC entspricht (Bartel *et al.*, 2001). Die Untersuchungen von Sequenzhomologien sind somit zur Identifizierung pflanzlicher Indolpyruvatdecarboxylasen ungeeignet. Ob eine Möglichkeit besteht, anhand der Aminosäuresequenz eine IPDC-Aktivität einer PDC zu postulieren, sei an späterer Stelle weiterführend diskutiert (Kapitel 3.4.4.). In diesem Zusammenhang ergibt sich auch die Bedeutung der Einteilung der PDC-Enzyme in zwei Gruppen, den *ScPDC*-ähnlichen (Bakterien und Hefen) und den *ZmPDC*-ähnlichen Pyruvatdecarboxylasen (Pflanzen) (Abb. 7).

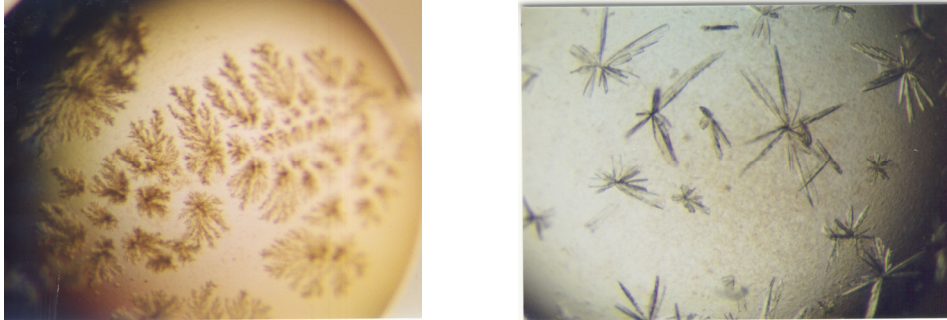
### 3.3.2. Röntgenkristallstrukturanalyse

Die Kristallisation der Indolpyruvatdecarboxylase wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von PROF. DR. G. SCHNEIDER vom Karolinska Institut in Stockholm durchgeführt. Zunächst wurde das Wildtypenzym der *EcIPDC* kristallisiert und die Raumstruktur mit gebundenen Cofaktoren bestimmt. Die Koordinaten der Atome sind in der Proteindatenbank Brookhaven ([www.rcsb.org/pdb](http://www.rcsb.org/pdb)) unter dem Zugangscode 1OVM deponiert. In Anlehnung an die etablierten Kristallisationsbedingungen des Wildtypenzyms wurden die *EcIPDC*-Varianten Asp<sup>29</sup>Glu, His<sup>115</sup>Lys, Gln<sup>383</sup>Thr und Glu<sup>468</sup>Asp kristallisiert. Es wurde angestrebt, eine Struktur mit gebundenem Liganden zu bestimmen.

#### 3.3.2.1. Kristallisationsbedingungen und Datenaufnahme

Die Kristallisation des Wildtypenzyms wurde nach der Methode der Gasphasendiffusion im hängenden Tropfen durchgeführt. Die Tropfen enthielten gleiche Volumina (2 µL) Reservoir- (0.1 M Natriumcitrat pH 5.0 und 8-12 % (w/v) PEG-2000-monomethylether) und

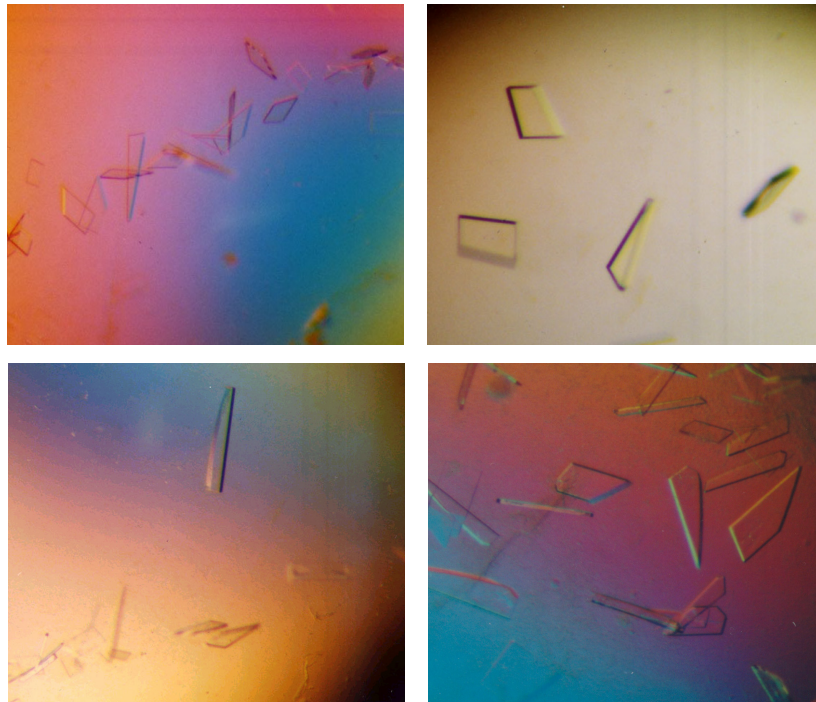
*EcIPDC*-Lösung (4 mg/mL in 20 mM Mes/NaOH pH 6.5, 1 mM DTE, 5 mM ThDP und 5 mM MgSO<sub>4</sub>). Die besten Kristalle wurden bei PEG-Konzentrationen von 9-10 % (w/v) erhalten. Innerhalb von 3 bis 4 Tagen erschienen Nadelbüschel (Abb. 8).



**Abb. 8:** *Primäre Kristalle des EcIPDC-Wt.*  
Die Kristalle wurden in 0.1 M Natriumcitrat pH 5.0 und 9% (rechts) bzw. 12 % (w/v) (links) PEG-2000-monomethylether nach 3-4 Tagen Inkubation bei 20 °C erhalten. Die *EcIPDC*-Konzentration lag bei 5 mg/mL (5 mM ThDP/Mg<sup>2+</sup>).

Das Verfahren zur Aussaat von Nukleationskeimen (*seeding*) erwies sich als notwendig, um aus den primär gewachsenen Kristallbüscheln für die Röntgenkristallstrukturanalyse geeignete Kristalle zu erhalten. Nachdem Nukleationskeime in frische Tropfen überführt wurden, erschienen innerhalb von einem Tag Kristalle, die nach 3 Tagen bis zu einer Maximalgröße von 0.6×0.4×0.2 mm wuchsen (Abb. 9). Zur Verbesserung der Kristallqualität wurden auch verschiedene Additive getestet, was jedoch keine Änderungen zeigte (siehe 2.5.2.).

Die herangezogenen Kristalle unterscheiden sich in ihrer Morphologie. Die platten- und stäbchenförmigen Kristalle sind jedoch hinsichtlich ihrer Streueigenschaften vergleichbar. Es sei an dieser Stelle festgehalten, dass nur jeder zehnte Kristall eine Auflösung von mehr als 4 Å zeigte und dass die Qualität der Kristalle schlechter wurde, je älter der Kristall war. Deshalb sollten *EcIPDC*-Kristalle innerhalb einer Woche nach Anwendung des *seeding* Verfahrens vermessen werden. Vor der eigentlichen Datenaufnahme mussten geeignete Gefrierschutzbedingungen etabliert werden, die das Schockgefrieren der Kristalle auf 110 K ohne Beschädigung erlaubt. Der Vorteil dieser Methode liegt in der längeren Haltbarkeit der Proteinkristalle während der Datensammlung. Der Zusatz von 20 % (v/v) Glycerol erwies sich als beste Methode, während PEG 400, 2-Methyl-2,4-pentandiol und Ethylenglycol entweder zum Auflösen der Kristalle (Ethylenglycol) oder zu einer schlechteren Streuung führten. Die Kristalle wurden an verschiedenen Messstationen getestet (*beam line* ID29, ESRF, Grenoble, Frankreich; *beam line* 711, MAX II Laboratorien in Lund, Schweden; EMBL *beam line* X13/BW7B, DORIS, DESY, Hamburg, Deutschland).



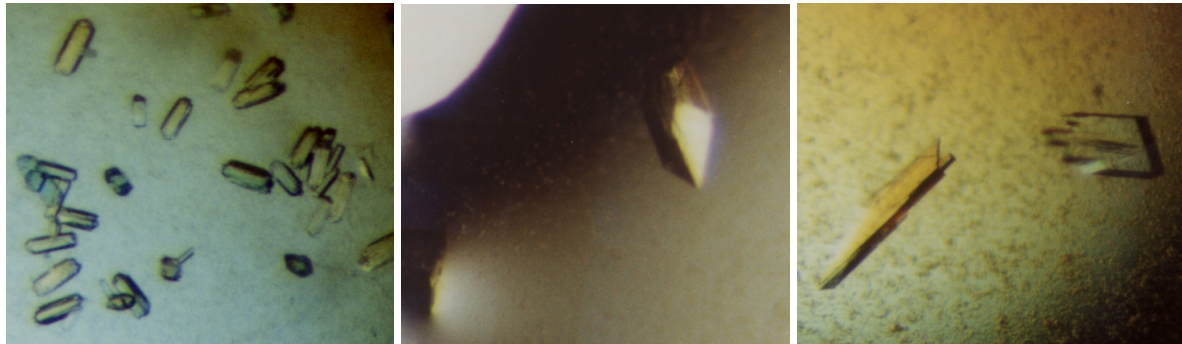
**Abb. 9:** *Kristalle des EciPDC-Wt nach Anwendung des Verfahrens zur Aussaat von Nukleationskeimen („seeding“). Die Kristalle wuchsen in 0.1 M Natriumcitrat pH 5.0 und 8-9 % (w/v) PEG-2000-monomethylether. Die EciPDC-Konzentration lag bei 4 mg/mL (5 mM ThDP/Mg<sup>2+</sup>). Das obere linke Bild veranschaulicht die „seeding“-Linie.*

Die Kristallisation der EciPDC-Varianten wurde unter ähnlichen Bedingungen durchgeführt. Die Kristalle wuchsen unter Verwendung von 0.5-3 % (w/v) PEG-1000-monomethylether und 50 mM Natriumcitratpuffer pH 4.7 als Reservoirolösung. Aus den primären nadelförmigen Kristallen und Kristallbüscheln (Abb. 10) konnten nach Durchführung des *seeding*-Verfahrens geeignete Kristalle erhalten werden (Abb. 11).



**Abb. 10:** *Primäre Kristalle verschiedener EciPDC Varianten. Die Kristalle wurden in 0.1 M Natriumcitrat pH 4.7 und 3% (w/v) PEG-1000-monomethylether nach 3-4 Tagen Inkubation bei 20 °C erhalten (von links nach rechts: Glu<sup>468</sup> Asp, Asp<sup>29</sup> Glu und Gln<sup>383</sup> Thr). Die EciPDC-Konzentration lag bei 4 mg/mL (5 mM ThDP/Mg<sup>2+</sup>).*

Dabei kristallisierten die Varianten der *EcIPDC* nur unter sehr genau eingestellten Kristallisationsbedingungen. Schon geringe Abweichungen im pH-Wert von 0.1-0.2 pH-Einheiten und Erhöhungen der PEG-Konzentration um 2-3 % (w/v) verhinderten die Kristallbildung und führten zur Erhöhung des Anteils an Präzipitat. Die Kristalle der Varianten sind fragiler als die des Wildtyps. Die Streueigenschaften sind zwar ähnlich, jedoch zeigt hier nur einer von etwa 15 Kristallen eine Auflösung besser als 4 Å.



**Abb. 11:** *Kristalle der EcIPDC Varianten nach Anwendung des Verfahrens zur Aussaat von Nukleationskeimen („seeding“). Die Kristalle wuchsen in 0.1 M Natriumcitrat pH 4.7 und 0.5-2 % (w/v) PEG-1000-monomethyl-ether. Die EcIPDC-Konzentration der Varianten (von links nach rechts: His<sup>115</sup>Lys, Asp<sup>29</sup>Glu und Glu<sup>468</sup>Asp) lag bei 2.5 mg/mL (5 mM ThDP/Mg<sup>2+</sup>).*

Weiterführend wurde versucht, die *EcIPDC*-Enzyme mit dem Inhibitor  $\beta$ -Phenylpyruvat bzw. den Substraten Pyruvat oder Benzoylformiat (je 1-5 mM im Reservoir) zu kristallisieren.<sup>12</sup> Die Cokristallisation mit  $\beta$ -Phenylpyruvat konnte sowohl mit dem Wildtypenzym als auch mit den Varianten erfolgreich durchgeführt werden. Die getesteten Kristalle zeigten jedoch eine Auflösung schlechter als 4 Å. Deshalb wurde kein Datensatz aufgenommen. Die Cokristallisation mit Pyruvat war nur bei der Variante Glu<sup>468</sup>Asp möglich, während Benzoylformiat zusammen mit den Varianten His<sup>115</sup>Lys und Glu<sup>468</sup>Asp kristallisiert werden konnte. Auch hier liegt aufgrund der schlechten Streueigenschaften der Kristalle kein Datensatz zur Auswertung vor. Bei den übrigen Enzymvarianten und beim Wildtypenzym verhinderte der Zusatz von Substrat zur Reservoirlösung die Kristallbildung. Dies ist ein Hinweis darauf, dass diese Enzyme das zugesetzte Substrat umsetzen und kein stabiles Intermediat bilden. Die Kristallisation von allen *EcIPDC*-Enzymen mit dem natürlichen Substrat Indolpyruvat wurde nicht durchgeführt, da Indolpyruvat instabil ist (Schütz, Diplomarbeit, 2000).

<sup>12</sup>  $\beta$ -Phenylpyruvat liegt in saurer und neutraler wässriger Lösung in seiner Enolform vor. Eine spontane Tautomerisierung in die reaktive Ketoform erfolgt in wässrig-basischer Lösung. Das Natriumsalz entspricht der Ketoform (Sciacovelli *et al.*, 1977). Die Tautomerisierung kann auch durch eine Tautomerase induziert werden (Knox & Pitt, 1957).

Eine weitere etablierte Methode zur Bestimmung der Raumstruktur mit gebundenem Liganden ist der Zusatz von Substrat zur Gefrierschutzlösung. Durch Inkubation des Holoenzymkristalls mit Substrat wird dieses gebunden und die entsprechenden Reaktionsintermediate gebildet. Durch anschließendes Schockfrieren wird die Reaktion abgestoppt, wodurch die Aufnahme einer Raumstruktur mit gebundenem Liganden möglich wird (so genanntes *soaking*-Verfahren). Diese Experimente wurden auch mit den Kristallen der *EcIPDC* durchgeführt. Die mit Substrat präinkubierten Kristalle streuen jedoch nur zu einer Auflösung von bestenfalls 3.2 Å. Eine wahrscheinliche Ursache der schlechteren Streueigenschaften liegt in der mit der Inkubation mit Substrat verbundenen strukturellen Änderungen im Kristall. Die Kristallisation des Apoenzyms war sowohl beim Wildtypenzym als auch bei den Varianten unter den oben genannten Bedingungen nicht möglich.

### 3.3.2.2. Allgemeine Struktur

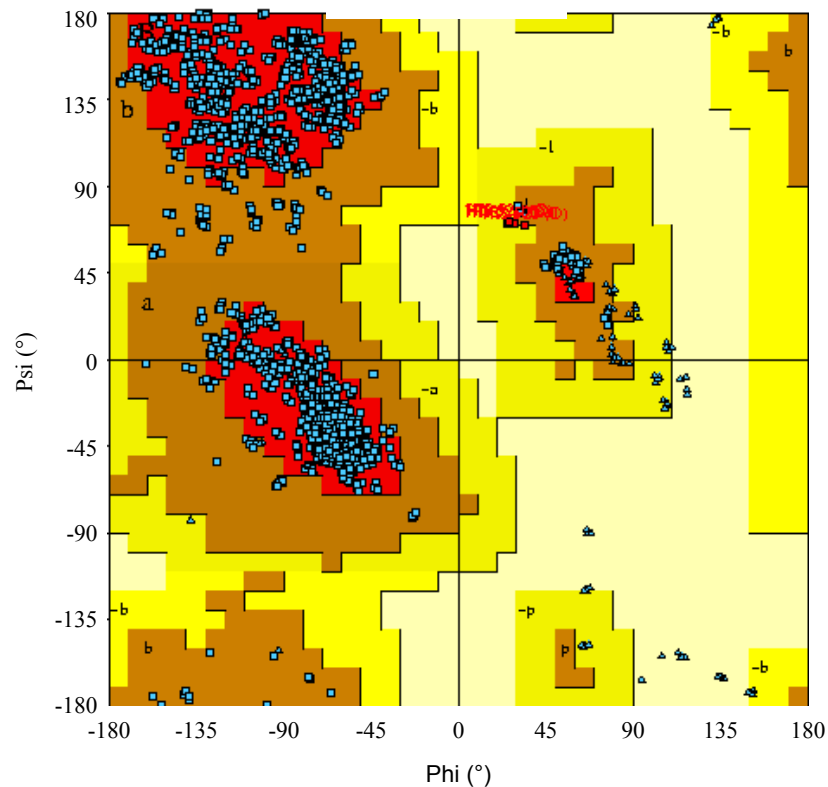
Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Raumstruktur des Wildtypenzym der Indolpyruvatdecarboxylase aus *Enterobacter cloacae* mit Hilfe der Methode des molekularen Ersatzes gelöst.

**Tab. 3:** *Statistik der Datensammlung und Verfeinerung.*  
Die Werte in Klammern entsprechen denen für die höchste Auflösung (2.77-2.65 Å).

Raumgruppe	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2
Dimensionen der Einheitszelle a, b, c (Å)	132.2, 151.6, 107.6
Auflösung (Å)	2.65
Vollständigkeit (%)	99.9 (99.9)
gemessene Reflexe	315465
einmalige Reflexe	63376
I/σ	7.8 (2.0)
R <sub>sym</sub> (%)	8.7 (36.9)
R (%)	20.5
R <sub>free</sub> (%)	23.6
Anzahl der Proteinatome	16404
Anzahl an Lösungsmittelmolekülen	347
Standardabweichung vom Idealwert (r.m.s)	
Bindungslängen (Å)	0.008
Bindungswinkel (°)	1.30
B-Faktoren (Å <sup>2</sup> )	
gesamt	33.42
ThDP	26.0
Lösungsmittel	22.12

Das resultierende Modell besitzt einen kristallographischen R-Faktor von 20.5 % bei 2.65 Å Auflösung. Die Kristalle des Holoenzym der *EcIPDC* enthalten ein Tetramer in der asymmetrischen Einheit. Das verfeinerte *EcIPDC*-Modell beinhaltet die Aminosäurereste

3–341 und 356–551, vier Moleküle der Cofaktoren ThDP und  $Mg^{2+}$ , vier Citratmoleküle und 347 Wassermoleküle. Für die Aminosäureschleife (*loop*), die innerhalb eines Monomers die mittlere und die C-terminale Domäne miteinander verbindet (AS-Reste 342–355), ist keine durchgehende Elektronendichte ausgeprägt. Dieser Bereich wurde vom Modell ausgeschlossen. Die Statistik der Datensammlung und der Verfeinerung ist in Tab. 3 zusammengefasst. Die Abb. 12 zeigt die Ramachandran-Auftragung.



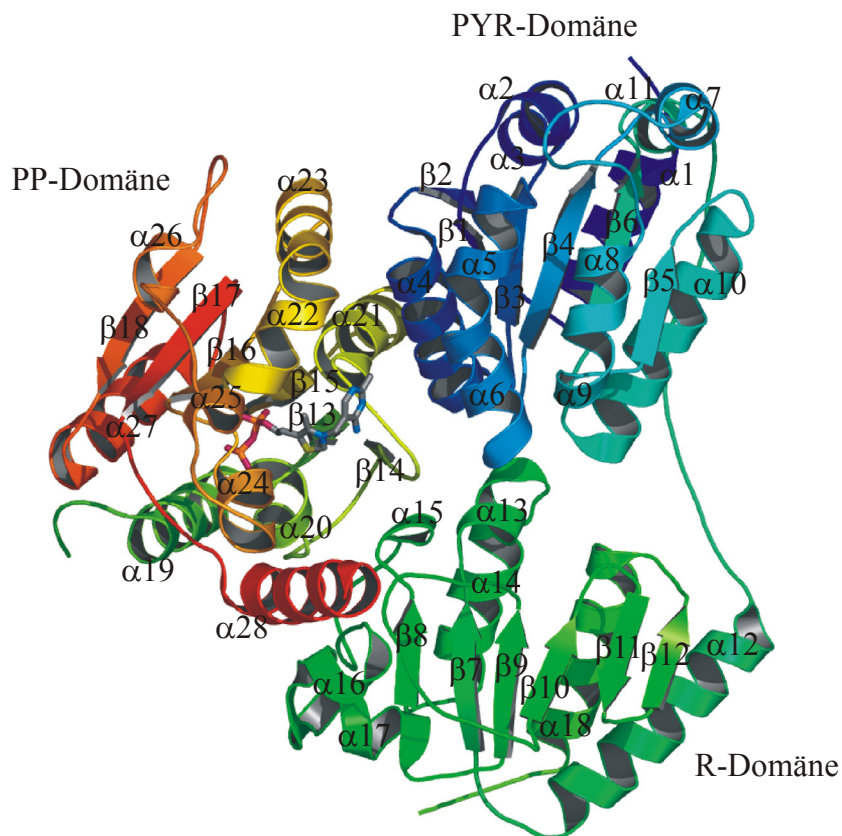
**Abb. 12:** *Ramachandran-Plot für ein EcIPDC-Tetramer.*  
 Der Plot wurde mit dem Programm PROCHECK (Laskowski et al., 1993) erstellt.

	<u>Reste</u>	<u>(%)</u>
bevorzugte Regionen (rot)	1668	89.5
zusätzlich erlaubte Regionen (braun)	192	10.3
generell erlaubte Regionen (gelb)	4	0.2
verbotene Regionen (beige)	<u>0</u>	<u>0.0</u>
Reste außer Gly und Pro	1864	100.0
End-Reste (ohne Gly and Pro)	12	
Glycin-Reste (Δ)	164	
Prolin-Reste	<u>100</u>	
Gesamtanzahl der Reste	2140	

Bis auf den C-Terminus und die Seitenketten der AS-Reste His227, Asp278, Arg367, Ile379 und Arg394 zeigen alle Reste eine nichtkristallographische Symmetrie. Die Superposition der Untereinheiten zeigt, dass die Standardabweichung (r.m.s.) zwischen allen  $C_{\alpha}$ -Atomen zweier Monomere in einem Dimer  $0.13^{\circ}$  und für zwei Dimere  $0.17^{\circ}$  beträgt.

### 3.3.2.3. Monomer

Jedes *EcIPDC*-Monomer besteht aus 3 Domänen, der N-terminalen PYR-Domäne (AS-Reste 3-187), die an der Bindung des Pyrimidinrings des ThDP beteiligt ist, der intermediären R-Domäne (AS-Reste 188-341) und der C-terminalen PP-Domäne (AS-Reste 356-551), die die Diphosphatgruppierung des ThDP bindet. Alle drei Domänen sind in etwa gleich groß und triangulär angeordnet (Abb. 13).



**Abb. 13:** *Schema eines EcIPDC-Monomers.*  
Das ThDP ist als „stick“-Modell einbezogen. Die Sekundärstrukturelemente entsprechen denen in 1OVM. Die AS-Reste 342-355, die die R- und die PP-Domäne verbinden, sind aufgrund mangelnder Elektronendichte vom Modell ausgeschlossen. Die Farbcodierung zeigt den Verlauf vom N- zum C-Terminus (blau → rot). Die Abbildung wurde mit dem Programm PYMOL erstellt (DeLano, 2002).

Die PYR- und die PP-Domäne bestehen aus je einem sechssträngigen parallelen  $\beta$ -Faltblatt, die R-Domäne aus einem viersträngigen parallelen und einem zweisträngigen antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt, welche von mehreren Helices umgeben sind (Tab. 14 im Anhang). Die PYR-Domäne besitzt mit durchschnittlich  $23 \text{ \AA}^2$  den kleinsten B-Faktor. Das bedeutet, verglichen mit den anderen Domänen, eine kleinere Beweglichkeit dieser Domäne. Dagegen zeigt die mittlere R-Domäne mit einem durchschnittlichen B-Faktor von  $37 \text{ \AA}^2$  die höchste Flexibilität.



Der Monomeraufbau der *EcIPDC* ähnelt dem anderer ThDP-abhängiger Enzyme. Die größte Ähnlichkeit ist zwischen *EcIPDC* und der Klasse der Pyruvatdecarboxylasen zu beobachten (Tab. 4). Die Superposition eines *EcIPDC*-Monomers mit einer Untereinheit der entsprechenden PDC resultiert in einer Standardabweichung (r.m.s.) von 1.24° für 470 von 563 C $_{\alpha}$ -Atomen (*ScPDC*) und 1.48° für 496 von 568 C $_{\alpha}$ -Atomen (*ZmPDC*).

**Tab. 4:** *Superposition eines EcIPDC Monomers und eines Monomers der BFD, POX und verschiedenen Pyruvatdecarboxylasen.*  
Die Zugangscodes in der Proteindatenbank entsprechen 1POW (*POX Lactobacillus plantarum*; Muller et al., 1994), 1PVD (*ScPDC*; Arjunan et al., 1996), 1ZPD (*ZmPDC*; Dobritzsch et al., 1998), und 1BFD (*Pseudomonas putida*; Hasson et al. 1998). Die Superposition wurde mit dem Programm Top (Lu, 2000) durchgeführt.

	<i>ScPDC</i>	<i>ZmPDC</i>	<i>BFD</i>	<i>POX</i>
<b>r.m.s. (°)</b>	1.24	1.48	1.72	1.77
<b>identische Reste</b>	187	163	80	74
<b>Identität (%)</b>	39.7	33.1	25.0	22.0

Vergleicht man die Strukturen der *EcIPDC* mit *ZmPDC* und *ScPDC*, so befinden sich alle Insertionen bzw. Deletionen der *EcIPDC* in Aminosäureschleifen (*loop*)-Regionen, die an Dimerisierungs- und Tetramerisierungskontakten beteiligt sind. In der Nähe des aktiven Zentrums sind keine Insertionen bzw. Deletionen zu finden (siehe auch Abb. 7, S. 41).

### 3.3.2.4. Dimer

Im Dimer sind die zwei Monomere über zweifache, nichtkristallographische Symmetrie fest assoziiert. Die Monomer-Monomer-Kontaktregion ist meist unpolar, beinhaltet 26 potentielle Wasserstoffbrückenbindungen, zwei Salzbrückenbindungen und ist 3455 Å<sup>2</sup> groß (Tab. 5). Die zugängliche Oberfläche in einem Dimer ist bei der *EcIPDC* und der aktivierten Form der *ScPDC*<sup>(B)</sup> vergleichbar. Dagegen ist die Monomer-Monomer-Kontaktregion in der *ZmPDC* größer und die in der nativen *ScPDC*<sup>(A)</sup> kleiner. Die Anzahl der Wasserstoffbrücken im Interaktionsbereich der *EcIPDC* ist im Vergleich zur *ZmPDC* erheblich geringer. Zum Teil ist das auf die kürzere C-terminale Helix der *EcIPDC* zurückzuführen, zum anderen führen einige Deletionen und verschiedene AS-Austausche zu einer verminderten Anzahl an Wasserstoffbrückenbindungen in der *EcIPDC* (Schütz et al., 2003<sub>b</sub>). Alle 3 Domänen des Monomers sind am Dimeraufbau beteiligt, wobei die meisten Reste zur PYR und PP-Domäne gehören. Es sind insgesamt 94 AS-Reste beteiligt. Davon sind 47 identische Reste auch am Dimeraufbau in der *ScPDC* (Form B), bzw. 46 Reste in der *ScPDC* (Form A) und 39 identische Reste in der *ZmPDC* beteiligt. Insgesamt 15 dieser AS-Reste sind in allen IPDC- und PDC-Sequenzen

konserviert. Die am Dimeraufbau beteiligten potentiellen Wasserstoffbrücken- und Salzbrückenbindungen sind in Tab. 15 (Anhang) aufgeführt.

**Tab. 5:** *Vergleich der Interaktionen zwischen den Untereinheiten in EcIPDC und verschiedenen Pyruvatdecarboxylasen. Die verschiedenen Strukturen wurden unter Verwendung des Protein-Protein-Interaktions-servers analysiert. Bei der ScPDC wird zwischen der Form A (nativ) und der Form B (gebundener Aktivator Pyruvamid) unterschieden. Die Polarität der Reste in der Kontaktregion ist entweder meist unpolar (u) oder gleichermaßen polar bzw. unpolar (u/p).*

	<i>EcIPDC</i>	<i>ScPDC</i> <sup>(A)</sup>	<i>ScPDC</i> <sup>(B)</sup>	<i>ZmPDC</i>
Monomer-Monomer-Interaktion in einem funktionellen Dimer				
Oberfläche in der Kontaktregion:				
(Å <sup>2</sup> )	3455	2780	3132	4227
(%)	16	13	14	19
Polarität der Reste in der Kontaktregion	u	u	u	u
Wasserstoffbrücken	26	29	23	60
Salzbrücken	2	2	1	3
Dimer-Dimer-Interaktionen in einem Tetramer				
Oberfläche in der Kontaktregion:				
(Å <sup>2</sup> )	2040	840	1605	3863
(%)	9.5	4	7	17
Polarität der Reste in der Kontaktregion	u/p	u	u/p	u
Wasserstoffbrücken	12	12	10	60
Salzbrücken	0	0	0	0

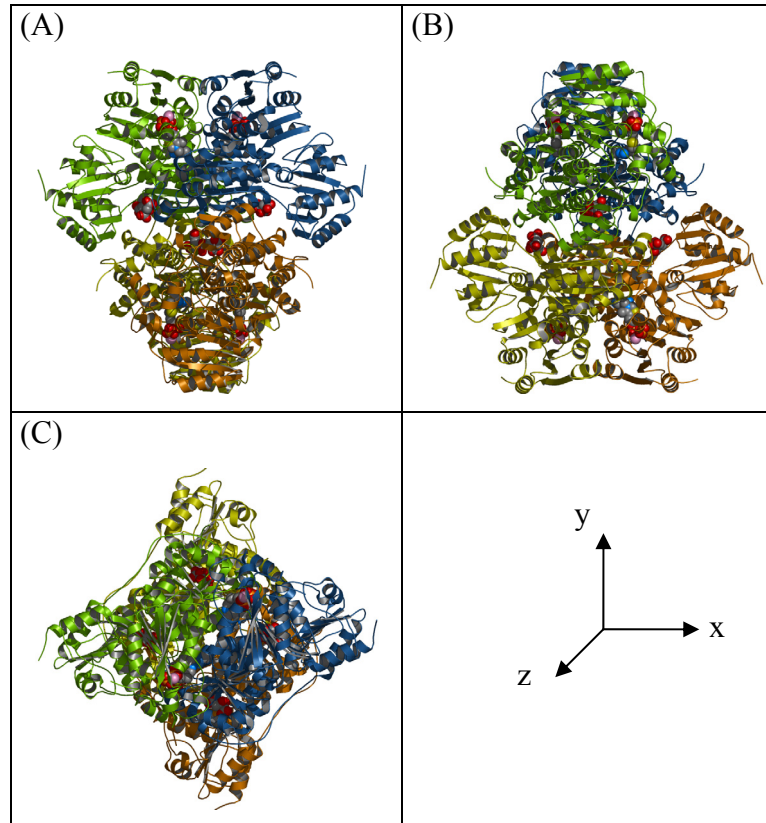
### 3.3.2.5. Tetramer

Die *EcIPDC* ist ein Homotetramer mit der Größe 92×94×116 Å. Das Tetramer besitzt eine *pseudo* 222 Symmetrie und kann als ein Dimer aus Dimeren betrachtet werden (Abb. 14).

Die Dimer-Dimer-Kontaktregion ist viel kleiner als die Monomer-Monomer-Kontaktregion innerhalb eines Dimers. Nur rund 2000 Å<sup>2</sup> der zugänglichen Dimeroberfläche sind an der Tetramerbildung beteiligt. Das ist ungefähr zweimal weniger als für *ZmPDC* gefunden wurde (Dobritzsch *et al.*, 1998), zweimal mehr als bei nativer *ScPDC*<sup>(A)</sup> und in etwa so viel wie bei aktivierter *ScPDC*<sup>(B)</sup> (Lu *et al.*, 2000) (Tab. 5). Nur die PYR- und die R-Domäne tragen zum Tetrameraufbau bei. Dabei sind 35 AS-Reste je Untereinheit involviert. Keiner dieser Reste ist in der IPDC/PDC-Familie konserviert. Die Stabilisierung des Tetramers der *EcIPDC* erfolgt durch 12 Wasserstoffbrückenbindungen (Tab. 16 im Anhang).

Während der Modellierung und Verfeinerung konnte in der Dimer-Dimer-Kontaktregion eine gut ausgeprägte Elektronendichte gefunden werden, die vier Citratmolekülen zugeordnet wurde. Die Citratmoleküle tragen sowohl durch die Ausbildung von Salzbrückenbindungen

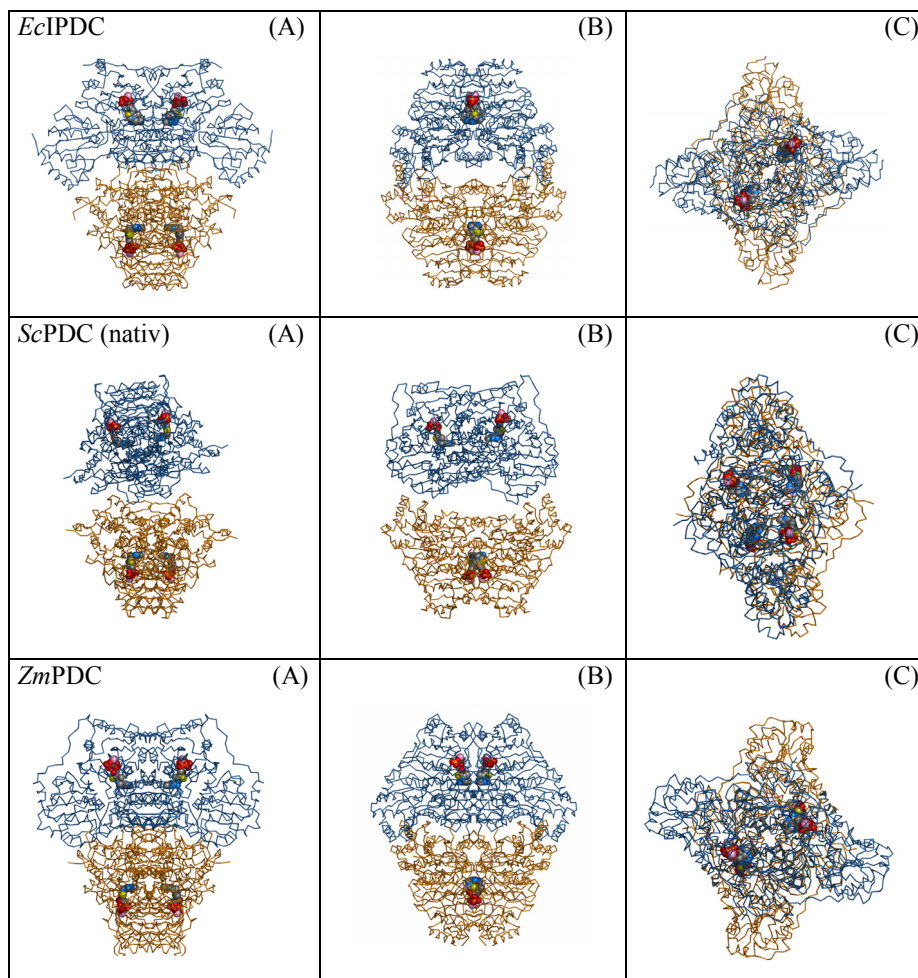
zu den AS-Resten Arg161, Arg286 und His93 einer Untereinheit, als auch durch die über die assoziierten Wassermoleküle vermittelten Wasserstoffbrückenbindungen zu Proteinatomen der benachbarten Untereinheit, zum Aufbau des Tetramers bei.



**Abb. 14:** *Struktur des EcIPDC Tetramers.*

Gezeigt sind die 3 orthogonalen Ansichten. Dabei entsprechen (B) und (C) einer 90° Rotation von (A) um die y- bzw. um die x-Achse. Die Cofaktoren ThDP und  $Mg^{2+}$  und die in der Dimer-Dimer-Kontaktregion gebundenen vier Citratmoleküle sind als raumfüllende Modelle einbezogen. Die vier Untereinheiten sind farblich unterschiedlich dargestellt. Die Abbildung wurde mit dem Programm PVMOL erstellt (DeLano, 2002).

Der Tetrameraufbau der *EcIPDC* unterscheidet sich hinsichtlich der Anordnung der Dimere im Tetramer nur wenig von dem anderer tetramerer ThDP-abhängiger Enzyme. Am ähnlichsten ist das *EcIPDC*-Tetramer dem *ZmPDC*-Tetramer, wo, superpositioniert man ein Dimer, das zweite Dimer um 20 ° gedreht ist (Schütz *et al.*, 2003<sub>b</sub>). Während die Dimere im Tetramer der *EcIPDC*, *ZmPDC*, *POX* und *BFD* zueinander gedreht sind, besitzt die native *ScPDC*<sup>(A)</sup> eine planare Anordnung der Dimere. Die Abb. 15 verdeutlicht die unterschiedliche Packung der Tetramere in *EcIPDC*, *ScPDC* und *ZmPDC*. Im Tetramer der *ZmPDC* sind die Dimere kompakt assoziiert. Dagegen ist in der *ScPDC*<sup>(A)</sup> eine eher lose Assoziation der Dimere zu beobachten. Die *EcIPDC* nimmt in dieser Hinsicht eine Mittelstellung ein.

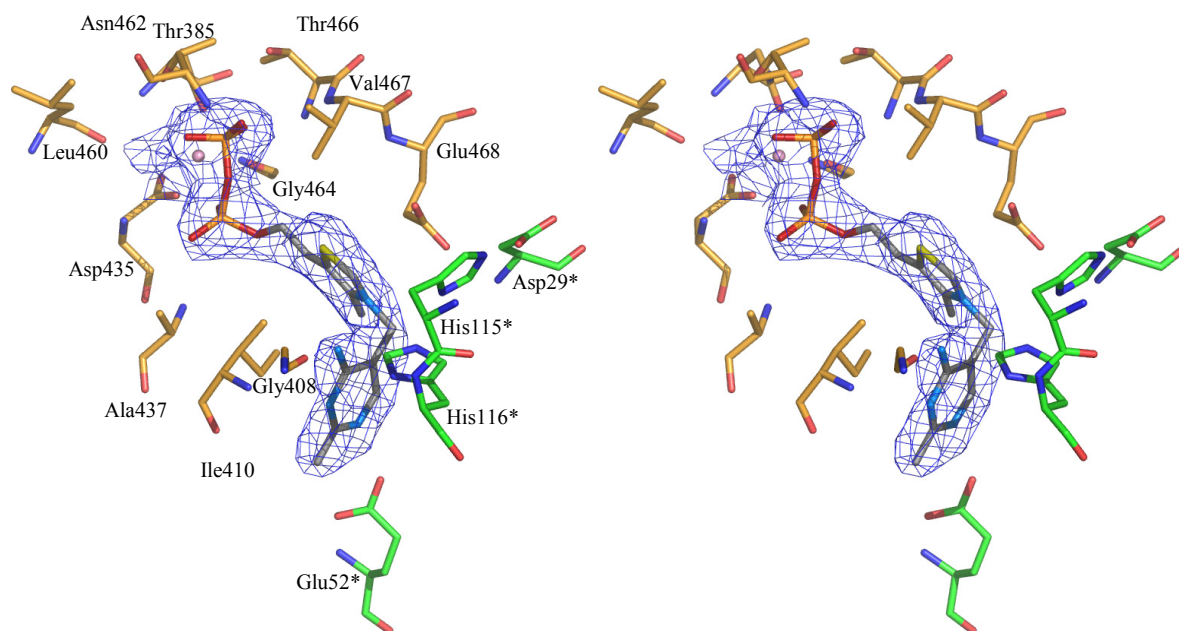


**Abb. 15:** *Vergleich der Tetramerstrukturen von EcIPDC, ScPDC und ZmPDC. Dabei entsprechen die Abbildungen (B) einer 45° Rotation von (A) um die y-Achse und (C) einer 90° Rotation von (A) um die x-Achse. Die Cofaktoren ThDP und Mg<sup>2+</sup> sind als raumfüllende Modelle einbezogen. Die funktionellen Dimere sind farblich unterschiedlich dargestellt. Die Abbildung wurde mit dem Programm PYMOL erstellt (DeLano, 2002).*

### 3.3.2.6. Cofaktorbindung

Die homotetramere *EcIPDC* bindet zwei Moleküle der Cofaktoren ThDP und Mg<sup>2+</sup> pro Dimer. Das ThDP ist in einer hydrophoben Spalte in der Kontaktregion zwischen der PP-Domäne und der PYR-Domäne zweier benachbarter Untereinheiten gebunden (Abb. 13).

Die ThDP-Bindung in *EcIPDC* ist vergleichbar mit der in anderen ThDP-abhängigen Enzymen (Muller *et al.*, 1993). Der Cofaktor wird in einer V-Konformation, die bereits 1967 von SCHELLENBERGER als biologische Konformation vorgeschlagen wurde, gebunden (Abb. 16). Die Ausbildung der V-Konformation, durch die das reaktive C2-Atom des Thiazoliumrings in die Nähe der 4'-Amino-Gruppe des Pyrimidinrings gebracht wird, wird durch eine große hydrophobe AS-Seitenkette unterstützt (Shin *et al.*, 1977). In der *EcIPDC*, *ScPDC* und *ZmPDC* ist dies ein Isoleucin-Rest. In der POX und in der TK bzw. BFD wirken ein Methionin bzw. ein Leucin als ausrichtender AS-Rest.



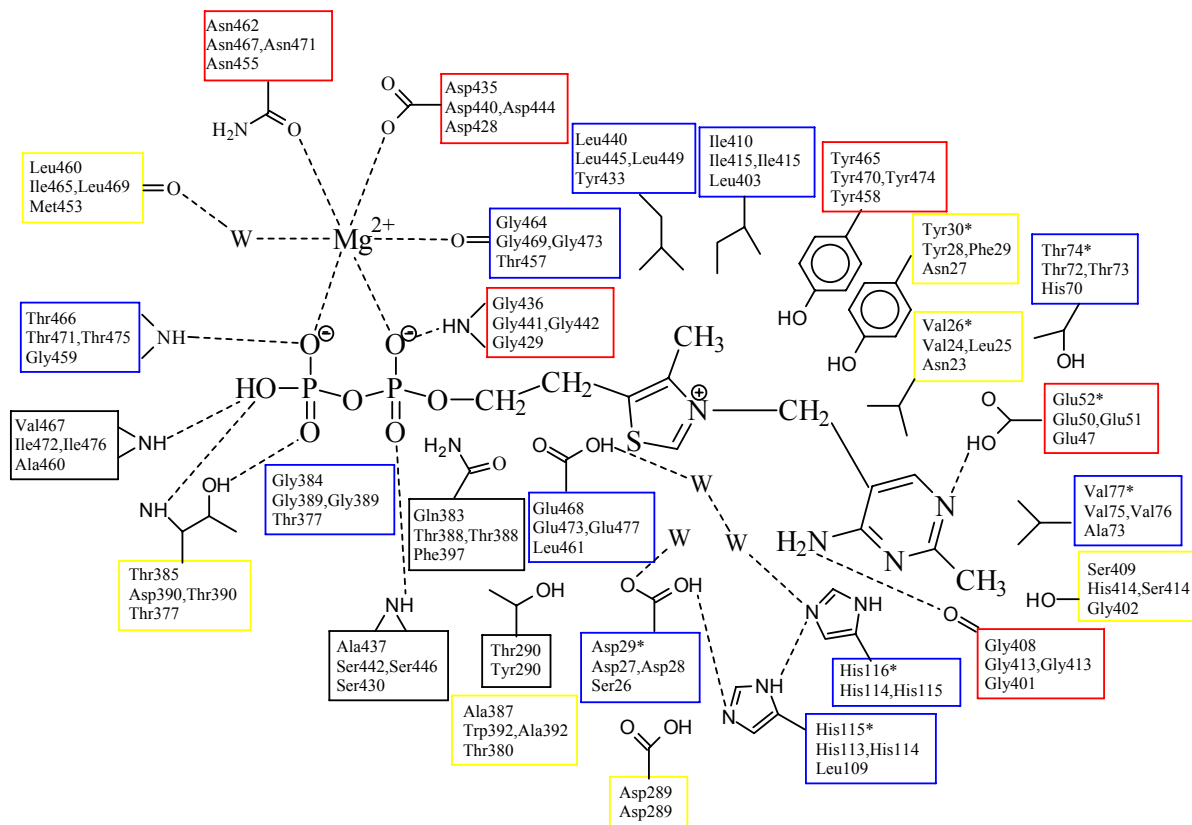
**Abb. 16:** *Stereobild der ThDP-Bindung im aktiven Zentrum der EcIPDC. Gezeigt ist die initiale, unverfeinerte 2Fo-Fc-Elektronendichtekarte für das gebundene ThDP und  $Mg^{2+}$ -Ion (rosa Kugel) bei 1.0  $\sigma$  und ausgewählte Reste des verfeinerten Proteinmodells. Die mit (\*) markierten Reste stammen von der anderen Untereinheit im funktionellen Dimer (grün). Die Abbildung wurde mit dem Programm Pymol erstellt (DeLano, 2002).*

Einige AS-Reste, die an der Bindung und Orientierung des Pyrimidinrings beteiligt sind, sind konserviert (siehe Tab. 17 Anhang). So interagiert das N1'-Atom mit einer Glutamat-Seitenkette der benachbarten Untereinheit, im Falle der *EcIPDC* das Glu52. Diese Interaktion mit dem hoch konservierten Glutamat-Rest wird im Zusammenhang mit der Tautomerisierung der 4'-Aminogruppe des Pyrimidinrings in die Iminogruppe diskutiert, ein Prozess der wahrscheinlich bei der Protonenabstraktion vom C2-Atom des Thiazoliumrings involviert ist und die Aktivierung des Cofaktors (Ylid-Bildung) bewirkt (Schneider & Lindqvist, 1993; Kern *et al.*, 1997; Jordan *et al.*, 2003). Der Abstand der 4'-Aminogruppe vom C2-Atom des ThDP beträgt in den jeweiligen Untereinheiten 3.22-3.29 Å. Das N3'- und das N4'-Atom des Pyrimidinrings kann Wasserstoffbrückenbindungen zum Sauerstoffatom der Peptidbindung der AS-Reste Gly408 und Ile410 ausbilden. Die Diphosphatgruppierung des ThDP ist sowohl durch direkte Bindungen zwischen den Sauerstoffatomen der Phosphatgruppe und den N-Atomen der Peptidbindung der AS-Reste Thr385, Gly436, Ala437, Gly464 und Thr466 als auch durch Bindungen, die über das  $Mg^{2+}$ -Ion vermittelt werden, mit der PP-Domäne einer Untereinheit verbunden. Das  $Mg^{2+}$ -Ion ist in einer oktahedralen Symmetrie mit je einem Sauerstoffatom beider Phosphatgruppen des ThDP, mit dem Asp435-OD1, dem Asn462-OD1, dem Gly464-O und mit einem Wassermolekül (Abb. 16, Tab. 17 im Anhang) verbunden. Innerhalb der Gruppe ThDP-abhängiger Enzyme sind das Aspartat und das Asparagin hoch

konservierte Aminosäuren. Sie repräsentieren den ersten und den letzten AS-Rest in der ThDP-Fingerprint-Sequenz X<sub>5</sub>-Gly-Asp-Gly-Y<sub>25-28</sub>-Asn und sind an der Bindung des Diphosphatanteils des ThDP beteiligt (Hawkins *et al.*, 1989).

### 3.3.2.7. Das aktive Zentrum der *Ec*IPDC

Die Untersuchung der AS-Sequenz der *Ec*IPDC zeigte, dass einige AS-Reste, die in der Katalyse der Pyruvatdecarboxylasen eine wichtige Rolle spielen, auch in der *Ec*IPDC konserviert sind (Abb. 7). Die Bestimmung der Kristallstruktur der *Ec*IPDC bestätigt, dass die Position dieser AS-Reste nicht nur in der Primär- sondern auch in der Quartärstruktur konserviert ist.

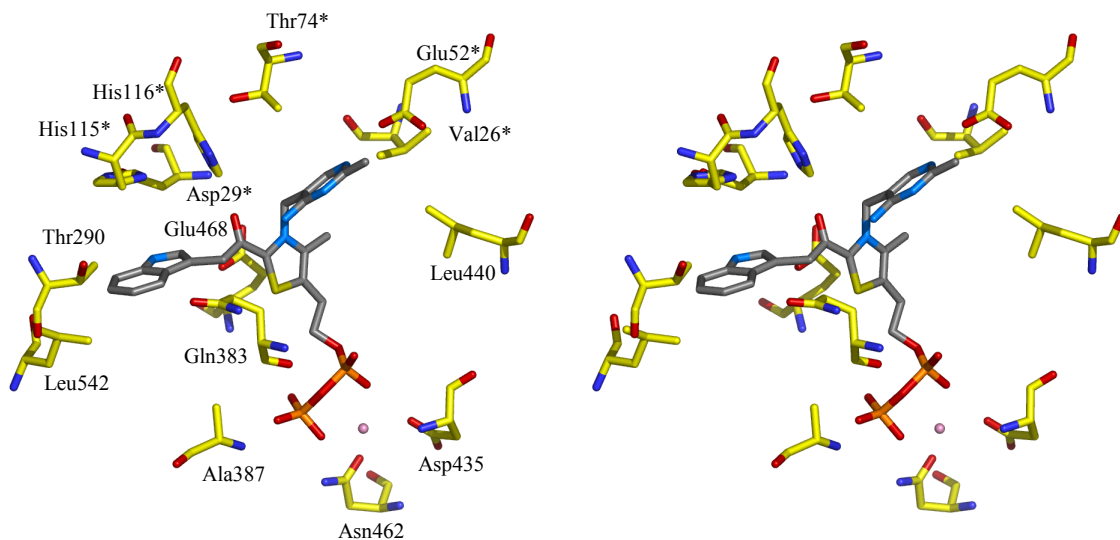


**Abb. 17:** Schematische Darstellung des aktiven Zentrums der *Ec*IPDC. Die AS-Reste in der ersten Zeile entsprechen denen der *Ec*IPDC. Die Reste in der zweiten Zeile entsprechen den korrespondierenden AS in *Zm*PDC (links) und *Sc*PDC (rechts) und die in der unteren Zeile denen der BFD. AS-Reste, die in allen vier Enzymen konserviert sind, sind rot markiert. AS-Reste, die nur in *Ec*IPDC und den Pyruvatdecarboxylasen konserviert sind, sind blau hervorgehoben. AS-Reste der *Ec*IPDC, die entweder in *Zm*PDC, *Sc*PDC oder BFD konserviert sind, sind gelb markiert. Die 3 Wassermoleküle (W) in der Nähe des C2-Atoms des Thiazoliumrings veranschaulichen die Substratbindungsstelle. Potentielle Wasserstoffbrückenbindungen sind durch gestrichelte Linien dargestellt. Die mit (\*) markierten AS-Reste stammen von der anderen Untereinheit im funktionellen Dimer.

In Abb. 17 ist die Topologie des aktiven Zentrums der *Ec*IPDC mit der der *Sc*PDC, *Zm*PDC und BFD vergleichend dargestellt. Ein signifikanter Unterschied in den aktiven Zentren von PDC und *Ec*IPDC ist das Gln383, welches in den meisten Pyruvatdecarboxylasen durch ein

Threonin ersetzt ist (siehe Abb. 7). Das aktive Zentrum des ThDP-abhängigen Enzyms BFD ist im Hinblick auf die AS-Reste, die an der Bindung des Cofaktors beteiligt sind, dem der *EcIPDC* ähnlich. Jedoch ist aus der Abb. 17 ersichtlich, dass in der Nähe des Reaktionszentrums eine unterschiedliche Topologie herrscht und andere AS-Reste in der Katalyse involviert sein müssen.

Das aktive Zentrum der *EcIPDC* ist ausgekleidet von meist hydrophoben Aminosäureresten. In der Nähe des C2-Atoms des Thiazoliumrings des ThDP wurde eine zusätzliche Elektrendichte gefunden, die mit zwei oder drei Wassermolekülen, die Bindungen zu den Aminosäuren Asp29, His116 und Glu468 eingehen, interpretiert wurde (Abb. 17). Nach Substratbindung werden diese Wassermoleküle wahrscheinlich verdrängt.



**Abb. 18:** *Stereobild ausgewählter Aminosäurereste im aktiven Zentrum der EcIPDC. Das modellierte ThDP-gebundene intermediäre  $\alpha$ -Carbanion/Enamin (grau) der Umsetzung von IPyr ist einbezogen. Die mit (\*) markierten Reste stammen von der anderen Untereinheit im funktionellen Dimer. Das  $Mg^{2+}$ -Ion ist durch eine rosa Kugel dargestellt. Die Abbildung wurde mit dem Programm PYMOL erstellt (DeLano, 2002).*

Das Substrat Indolpyruvat kann leicht ins aktive Zentrum der *EcIPDC* modelliert werden. Der Indolring des Substrates liegt in einer großen hydrophoben Tasche, die von den AS-Resten Phe388, Val467, Ile471, Leu538, Leu542 und Leu546 ausgekleidet wird. Die Aminosäuren Asp29, His115, His116, Glu468 (konserviert in *ZmPDC* und *ScPDC*) und Gln383 sind nahe dem Reaktionszentrum gelegen (Abb. 17). In der Struktur der *EcIPDC* zeigen die Seitenketten der AS-Reste Asp29 und Gln383 weg vom Reaktionszentrum (Abb. 18). Durch eine Seitenkettenbewegung (Ausbildung eines anderen Konformer) oder über Lösungsmittelmoleküle vermittelte Kontakte, könnten diese Aminosäuren mit dem gebundenen Substrat wechselwirken und eine Rolle während der Katalyse wäre denkbar.

Einige dem C2-Atom des Thiazoliumrings nahe gelegenen AS-Reste können Wasserstoffbrückenbindungen eingehen. In Tab. 6 werden diese potentiellen Wasserstoffbrückenbindungen aufgeführt. Es sei an dieser Stelle auf die Wechselwirkung der AS-Seitenkette von Asp29 zum His115 derselben Untereinheit hingewiesen. Die Seitenkette des Asp29 geht außerdem eine schwache Interaktion mit dem Asn550 der anderen Untereinheit im funktionellen Dimer ein, einem AS-Rest der C-terminalen Helix.

**Tab. 6:** *Potentielle Wasserstoffbrückenbindungen ausgewählter AS-Reste im aktiven Zentrum der EcIPDC.*  
*Die AS-Reste, die Wechselwirkungen mit einem AS-Rest einer anderen Untereinheit im funktionellen Dimer eingehen, sind markiert (\*).*

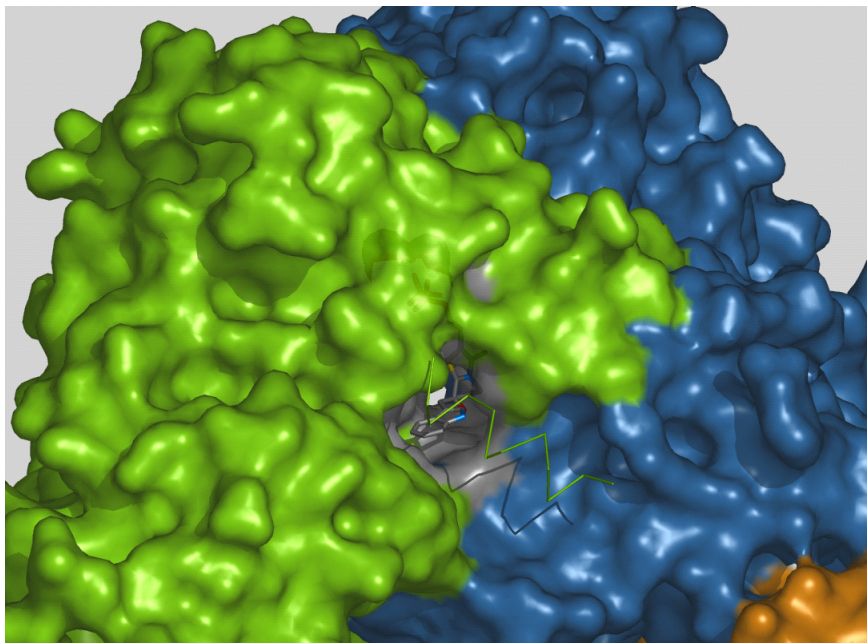
Molekül	Atom	Abstand (Å)	Rest	Atom
Asp29	N	3.1	Glu468*	OE2
		2.8	His115	NE2
	O	2.2	Tyr30	N
		3.3	Asn31	N
		3.4	Asn550*	ND2
His115	OD1	2.8	His115	NE2
	N	3.1	Asp289*	OD1
		2.3	His116	N
	O	3.3	Tyr30	OH
		3.3	His116	NE2
		2.8	Asp29	OD2
	His116	N	3.0	Tyr 30
2.9			Leu406*	O
O		2.2	Thr117	N
		2.7	Trp407*	O
		3.3	His115	ND1
Gln383	N	2.8	Asp382	OD1
	O	2.2	Gly384	N
		3.4	Gln404	O
Glu468	N	3.1	Tyr465	O
		2.3	Arg469	N
	O	2.8	His472	N
		2.9	Ile471	N
		3.1	Asp29*	N

Die C-terminale Helix ( $\alpha 28$ ) ist direkt über dem Zugang zum aktiven Zentrum an der Proteinoberfläche positioniert und schottet die Substratbindungstasche der EcIPDC gegenüber dem äußeren Milieu ab (Abb. 19). Die C-terminale Helix einer Untereinheit interagiert beim Verschieben des Substratkanals mit der Helix  $\alpha 3$  (AS-Reste 31-41) und  $\alpha 11$  (AS-Reste 169-174) der anderen Untereinheit im funktionellen Dimer. Die C-terminale Helix ist somit auch an Monomer-Monomer-Interaktionen beteiligt (siehe Tab. 15 im Anhang) und stabilisiert das



funktionelle Dimer. Das Verschließen des aktiven Zentrums zur Gewährleistung des Ausschluss von Lösungsmittel ist für die Katalyse notwendig (Chang *et al.*, 2000 und Referenzen darin).

Eine Rolle des C-Terminus während der Katalyse wurde auch für andere ThDP-abhängige Enzyme beschrieben. In der *ZmPDC* sind die Verhältnisse vergleichbar wie in der *EcIPDC*. Alle aktiven Zentren liegen auch ohne Zusatz von Substrat in einer für die Katalyse notwendigen geschlossenen Konformation vor, wobei die C-terminale Helix an der Abschottung des aktiven Zentrums beteiligt ist. In *ZmPDC* wird die C-terminale Helix im Zusammenhang mit der Substratspezifität diskutiert (Chang *et al.*, 2000). In der nativen *ScPDC* verhindert die Interaktion der Aminosäureschleife zwischen den  $\beta$ -Faltblättern  $\beta_{11}$  und  $\beta_{12}$ , dass sich die C-terminale Helix  $\alpha_{23}$  dem aktiven Zentrum annähern kann und somit ist die Substratbindungstasche der *ScPDC* zugänglicher (Schütz *et al.*, 2003<sub>b</sub>).



**Abb. 19:** *Darstellung des Substratkanals der EcIPDC. Die C-terminale Helix  $\alpha_{28}$ , die das aktive Zentrum (hier mit gebundenem  $\alpha$ -Carbanion/Enamin des Indolpyruvates, Modell) verschließt, ist von der Darstellung der Oberfläche ausgeschlossen und als „ribbon“-Modell gezeigt. Die Färbung der Untereinheiten entspricht denen in Abb. 14. Der Substratkanal ist grau dargestellt. Die Abbildung wurde mit dem Programm PYMOL erstellt (DeLano, 2002).*

### 3.3.3. Röntgenkleinwinkelstreuung

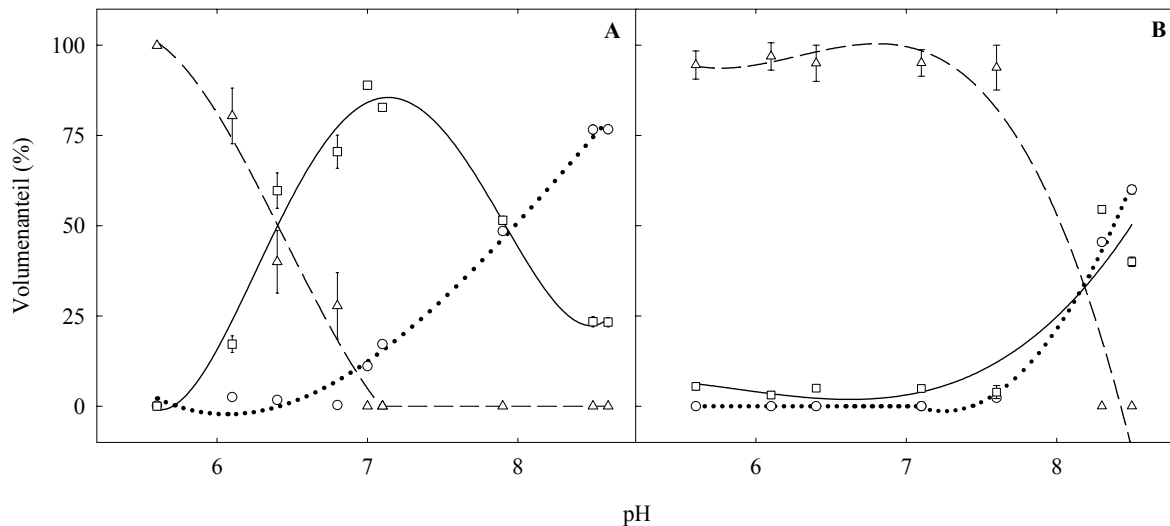
Durch Anwendung der Röntgenkleinwinkelstreuung wurde die pH-Abhängigkeit des Oligomerisierungsgrades der *EcIPDC* in An- und Abwesenheit der Cofaktoren untersucht. Es wurde der Einfluss der Proteinkonzentration auf die Streuparameter analysiert. Die Daten wurden weiterhin zur Berechnung eines niedrigauflösenden dreidimensionalen Modells der tetrameren *EcIPDC* in Lösung eingesetzt.

#### 3.3.3.1. Untersuchung der pH-abhängigen Oligomerisierung der *EcIPDC*

Es wurden Streukurven der *EcIPDC* bei unterschiedlichen pH-Werten (in An- und Abwesenheit der Cofaktoren) aufgenommen und die Streuparameter  $R_G$  und  $I(0)$  bestimmt (Tab. 7). Die Qualität der Streukurven erlaubte die Berechnung der Volumenfraktion unterschiedlicher Oligomerisierungsgrade der *EcIPDC* (Programm OLIGOMER). Die Analyse der Daten weisen auf ein pH-abhängiges Gleichgewicht zwischen Tetrameren und Dimeren bei niedrigen pH-Werten bzw. zwischen Dimeren und Monomeren bei höheren pH-Werten hin (Abb. 20).

**Tab. 7:** *pH-Abhängigkeit der Streuparameter.*  
 Die Messungen wurden in 60 mM Puffer, 60 mM Ammoniumsulfat und 3 mM DTE in An- und Abwesenheit der Cofaktoren (15 min Präinkubation mit 10 mM ThDP/MgSO<sub>4</sub>; mit (\*) markiert) durchgeführt. Die Konzentration an *EcIPDC* betrug 5 mg/mL. Die Bestimmung des pH-Wertes und der *EcIPDC*-Konzentration erfolgten nach der Messung. Die molare Masse wurde unter Verwendung des Standards BSA berechnet. Dabei liegen die berechneten Molmassen unter dem erwarteten Wert des Tetramers (240 kDa), was auf die verwendete Enzymkonzentration zurückzuführen ist. Bei einer Extrapolation der konzentrationsabhängigen  $I(0)$ -Werte auf die Konzentration 0, ergibt sich der Wert des Tetramers (Abb. 21).

pH	[ <i>EcIPDC</i> ] (mg/mL)	$I(0)$	$R_G$ (nm)	$I(0)/c$	berechnete molare Masse (kDa)
5.6	3.5	13470 ± 271	4.05 ± 0.127	3849	215
6.1	6.3	13790 ± 78	3.95 ± 0.018	2189	122
6.4	4.9	12440 ± 78	3.79 ± 0.017	2539	142
6.7	4.7	10760 ± 116	3.74 ± 0.048	2289	128
6.8	5.0	11580 ± 110	3.81 ± 0.040	2316	129
7.8	4.5	6738 ± 73	3.47 ± 0.046	1497	83
7.9	4.8	6333 ± 67	3.23 ± 0.044	1319	74
8.5	3.7	3929 ± 45	3.07 ± 0.036	1062	59
8.6	4.5	4914 ± 74	3.05 ± 0.073	1092	61
5.6*	4.1	13840 ± 105	3.91 ± 0.026	3376	188
6.1*	3.8	13890 ± 157	3.91 ± 0.065	3655	204
6.4*	4.1	13010 ± 90	3.92 ± 0.018	3173	178
7.1*	4.5	13850 ± 110	3.87 ± 0.028	3078	172
7.6*	3.0	12640 ± 105	3.83 ± 0.033	4213	235
8.3*	3.1	7287 ± 54	3.42 ± 0.020	2429	136



**Abb. 20:** *pH-Abhängigkeit des Oligomerisierungsgrades der EcIPDC.*  
 Die Volumenanteile wurden mit Hilfe des Programms OLIGOMER (Sokolova, Volkov & Svergun, unveröffentlicht) berechnet: (A) in Abwesenheit der Cofaktoren und (B) in Gegenwart von 10 mM ThDP/Mg<sup>2+</sup> (○ Monomer, □ Dimer, △ Tetramer).

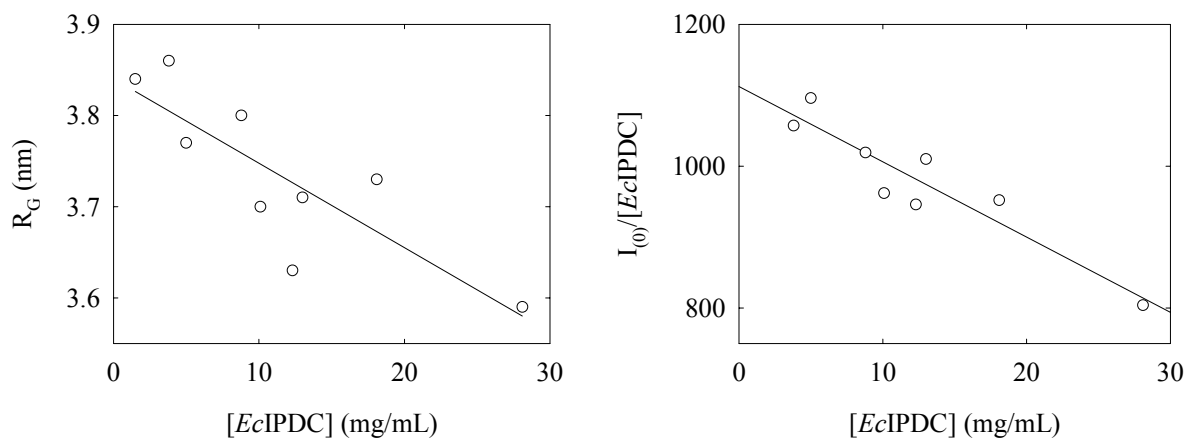
Bei pH-Werten zwischen 5.6 und 6.0 dominiert die tetramere Form der *EcIPDC* ( $R_G$  von 3.95 bis 4.1 nm). Dagegen überwiegt bei pH-Werten zwischen 6.7 und 7.4 die dimere Form ( $R_G$  von 3.6 nm). Bei pH-Werten über 8.5 weisen  $R_G$ -Werte unter 3.1 nm auf das monomere Enzym hin. In Gegenwart der Cofaktoren wird die Akkumulation von Dimeren verhindert und das tetramere Holoenzym wird im Bereich von pH 5.6-7.5 stabilisiert. Bei höheren pH-Werten kann das tetramere Enzym nicht weiter durch die Cofaktoren stabilisiert werden (König *et al.*, 2000). Die Untersuchungen verdeutlichen, dass das *EcIPDC*-Tetramer in wässriger Lösung auch ohne Cofaktoren stabil ist und dass dieses Oligomer in Gegenwart der Cofaktoren das katalytisch aktive Enzym darstellt. Diese Ergebnisse stimmen mit den Aussagen von KOGA *et al.* (1992) überein. Ein ähnliches pH-abhängiges Gleichgewicht wurde auch für die Pyruvatdecarboxylasen aus anderen Organismen beschrieben (König *et al.*, 1992, 1993, 1998). Jedoch war das Gleichgewicht nicht in einem so engen pH-Bereich ausgeprägt und es konnten keine signifikanten Mengen an Monomeren nachgewiesen werden. Für die *ScPDC* ist eine Stabilisierung des tetrameren Enzyms bis pH 8.5 durch Zusatz von Cofaktoren beschrieben (König *et al.*, 1993). Eine Ausnahme stellt die *ZmPDC* dar, deren Tetramer von pH 5 bis 9 auch ohne Zusatz von Cofaktoren stabil ist (König *et al.*, 1998).

### 3.3.3.2. Einfluss der Enzymkonzentration auf die Streuparameter

Es wurde der Einfluss der Enzymkonzentration auf die Streuparameter untersucht. Die Analyse der Streukurven zeigen eine starke Abhängigkeit von  $I(0)/c$  und  $R_G$  von der Enzymkonzentration (Tab. 8, Abb. 21). Die  $R_G$ -Werte nehmen um 7 % und  $I(0)/c$  um 44 % ab.

**Tab. 8:** *Einfluss der Enzymkonzentration auf die Streuparameter.*  
 Die Messungen wurden in 50 mM Mes pH 6.5, 0.1 M Ammoniumsulfat, 3 mM DTE und 10 mM ThDP/MgSO<sub>4</sub> durchgeführt. Die Bestimmung der EcIPDC-Konzentration erfolgte nach der Messung entsprechend der Methode von Bradford (1976). Die Berechnung der Streuparameter erfolgte mit dem Programm GNOMOKO. Während der Messungen zeigten sich keine unspezifischen Aggregationen des Enzyms.

[EcIPDC] (mg/mL)	I(0)	R <sub>G</sub> (nm)	I(0)/c
1.5	2173 ± 15	3.84 ± 0.018	1449
3.8	4018 ± 22	3.86 ± 0.017	1057
5.0	5479 ± 23	3.77 ± 0.010	1096
8.8	8965 ± 28	3.80 ± 0.009	1019
10.1	9719 ± 30	3.70 ± 0.009	962
12.3	11630 ± 49	3.63 ± 0.014	946
13.0	13130 ± 32	3.71 ± 0.005	1010
18.1	17240 ± 37	3.73 ± 0.004	952
28.1	22600 ± 55	3.59 ± 0.007	804



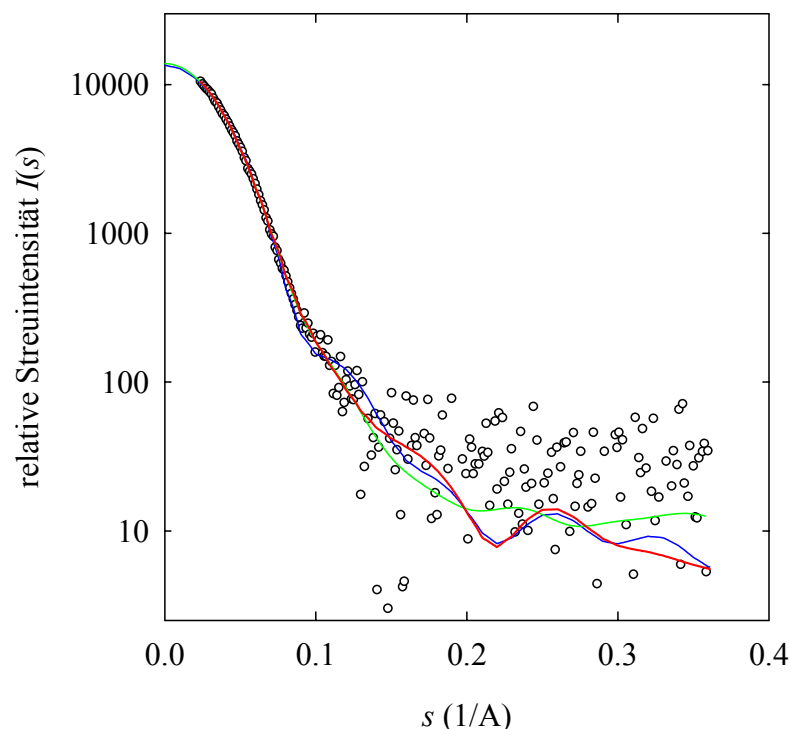
**Abb. 21:** *Abhängigkeit der Streuparameter von der Konzentration an EcIPDC.*  
 Die Messungen wurden in 50 mM Mes pH 6.5, 0.1 M Ammoniumsulfat, 3 mM DTE und 10 mM ThDP/MgSO<sub>4</sub> durchgeführt.

Ähnliche Studien wurden mit der ScPDC und der ZmPDC durchgeführt (König *et al.*, 1999). Die eingesetzten Enzymkonzentrationen lagen bei 2-45 mg/mL. Im Falle der ZmPDC nahmen die R<sub>G</sub>-Werte um etwa 1.5 % ab, I(0)/c um etwa 17 %. Dieses Verhalten ist bei der ScPDC noch verstärkt: R<sub>G</sub> nimmt um 6 % ab, und I(0)/c um 35 %.

Die Ergebnisse zeigen, dass das Ausmaß des Einflusses der Enzymkonzentration auf die Streuparameter für EcIPDC und ScPDC ähnlich, aber für ZmPDC unterschiedlich ist. Die abstoßenden intermolekularen Wechselwirkungen, welche sich in den veränderten Streuparametern widerspiegeln, sind für EcIPDC und ScPDC stärker ausgeprägt als für ZmPDC. Dies könnte auch mit den pH-abhängigen Oligomerisierungsgleichgewichten (ähnlich für EcIPDC und ScPDC, konträr zu ZmPDC) im Zusammenhang stehen.

### 3.3.3.3. Vergleich der Lösungsstruktur mit der Kristallstruktur

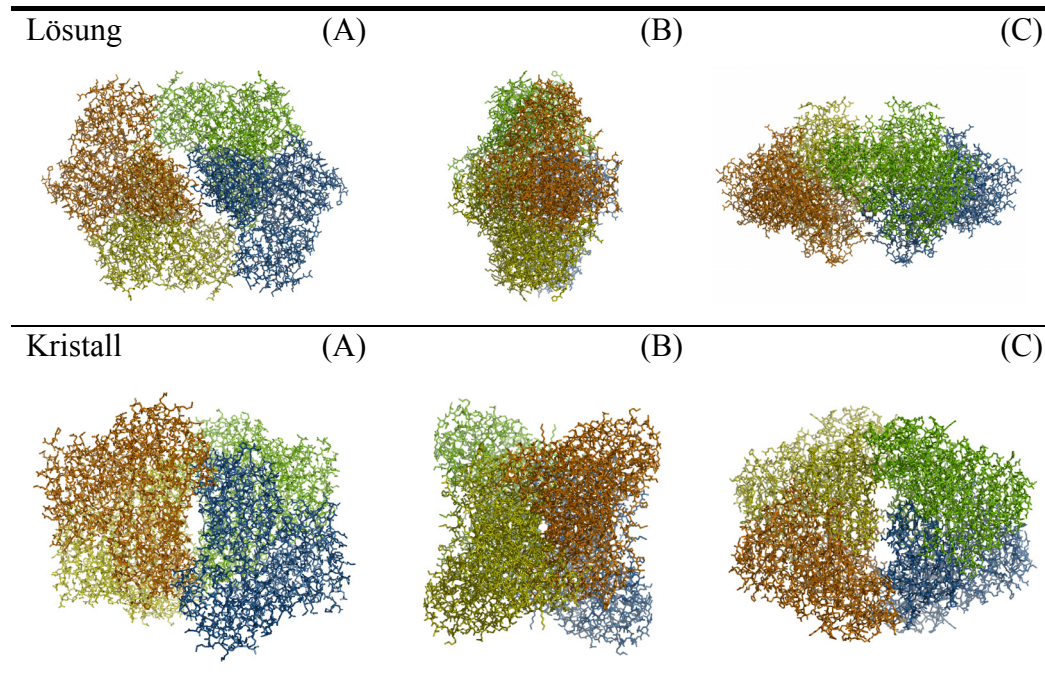
Es sollen die Strukturen der tetrameren *EcIPDC* in Lösung und im Kristall miteinander verglichen werden. Zunächst wurde aus der Kristallstruktur eine theoretische Streukurve berechnet (Abb. 22). Ausgehend von der berechneten Streukurve erfolgte durch Anwendung der Methoden der „starren-Körper-Verfeinerung“ (*rigid body refinement*) und der „simulierten Aufheizung“ (*simulated annealing*) die Anpassung an die experimentelle Streukurve und die Berechnung eines niedrigauflösenden Modells der *EcIPDC* in Lösung. Die Auflösung des berechneten Modells der *EcIPDC* entspricht dabei der Auflösung der Streukurve ( $d = 2\pi/s_{\max} = 18 \text{ \AA}$ ). Wie Abb. 23 zeigt, scheint die Struktur der tetrameren *EcIPDC* in Lösung „aufgelockerter“ zu sein als die im Kristall. Das weist auf eine höhere Flexibilität des Enzyms in Lösung hin, was für die Katalysefunktion notwendig sein könnte. Um das Modell der Kristallstruktur in das Modell der Lösungsstruktur umzuwandeln, bedarf es einer Rotation des einen Dimers um  $47^\circ$  gegenüber dem anderen Dimer und einer Translation um  $3 \text{ \AA}$ . Das Lösungsstrukturmodell der *EcIPDC* ist hinsichtlich der Assoziation der Dimere im Tetramer vergleichbar zur Struktur der nativen *ScPDC* im Kristall (siehe Abb. 15).



**Abb. 22:** Vergleich der experimentellen und der aus der Kristallstruktur berechneten Streukurve.

Die experimentellen Daten (offene Kreise) entsprechen der tetrameren *EcIPDC* (4.1 mg/mL, pH 5.6, 10 mM Cofaktoren). Die grüne Linie entspricht der Anpassung der experimentellen Daten mit dem Programm GNOMOKO, die blaue Linie entspricht der aus der Kristallstruktur berechneten theoretischen Streukurve (Programm CRY SOL) und die rote Linie entspricht der mit dem Programm MASSHA berechneten Anpassung der theoretischen an die experimentelle Streukurve.

Im Falle unterschiedlicher Lösungs- und Kristallmodelle könnte das Vorhandensein eines Gleichgewichtes zwischen mehreren Konformationen in Lösung diskutiert werden. Während der Kristallisation wird eines dieser Konformere „eingefroren“ und die wirkenden Kristallgitterkräfte verhindern weitere Konformationsänderungen (Fersht, 2002, S. 45).



**Abb. 23:** *Vergleich der tetrameren Struktur der EcIPDC in Lösung und im Kristall. Gezeigt sind die 3 orthogonalen Ansichten. Dabei entsprechen (B) und (C) einer 90° Rotation von (A) um die y- bzw. um die x-Achse. Die vier Untereinheiten sind farblich unterschiedlich dargestellt. Die Abbildung wurde mit dem Programm PVMOL erstellt (DeLano, 2002).*

Der Vergleich von Strukturen im Kristall und in Lösung ist auch von anderen ThDP-abhängigen Enzymen systematisch analysiert worden (Svergun *et al.*, 2000; König *et al.*, 2004). Es wurde eine Korrelation zwischen dem Ausmaß der Abweichung zwischen den Strukturen und der Kontaktfläche der Untereinheiten im Kristall beobachtet. Für die sehr kompakte *ZmPDC* wurde keine signifikante Abweichung der Struktur im Kristall von der in Lösung beobachtet. Für POX aus *Lactobacillus plantarum* und TK aus *Saccharomyces cerevisiae*, die im Kristall auch relativ enge Kontakte zwischen den Untereinheiten ausbilden, waren nur geringe Modifikationen in der Quartärstruktur notwendig, um den experimentellen Daten zu entsprechen. Dagegen zeigen Enzyme mit einer weniger kompakten Assoziation der Untereinheiten (*ScPDC* Form A und B) größere Abweichungen zwischen Kristall- und Lösungsstruktur. SVERGUN *et al.* (2000) diskutieren weiterführend, dass ein Zusammenhang zwischen der hohen Flexibilität einer Struktur und der schlechten Streueigenschaften der Kristalle bestehen könnte (Tab. 9).

**Tab. 9:** Strukturelle Parameter der Kristall- und Lösungsmodelle verschiedener ThDP-abhängiger Enzyme.

Die Tabelle ist modifiziert nach Svergun *et al.* (2000). Die Parameter  $\chi_{\text{cryst}}$  und  $\chi_{\text{sol}}$  beschreiben die Diskrepanz der Anpassung an die experimentellen Streudaten ausgehend vom Kristall- bzw. Lösungsmodell.

	<i>EcIPDC</i>	<i>ScPDC</i>		<i>ZmPDC</i>
		Form A	Form B	
Auflösung im Kristall (Å)	2.65	2.3	2.4	1.9
zugängliche Oberfläche in der Dimer-Dimer-Kontaktregion im Kristall (Å <sup>2</sup> )	2040	840	1605	3863
Diskrepanz				
$\chi_{\text{cryst}}$	0.88	1.68	3.50	0.88
$\chi_{\text{sol}}$	0.74	0.94	1.38	-
Standardabweichung (r.m.s.d.) der Atomkoordinaten im Kristall- und Lösungsmodell (nm)	1.48	0.58	1.53	-

Die in der Tab. 9 angegebene geringere Diskrepanz  $\chi_{\text{sol}}$  der ausgehend vom Lösungsmodell berechneten Streukurve ist ein Hinweis darauf, dass diese Modelle die native Struktur in Lösung besser repräsentieren als die Kristallmodelle. Jedoch sollte man sich bei der Interpretation der Lösungsmodelle der Grenzen der SAXS-Methode bewusst sein. Die Lösungsmodelle der *EcIPDC* basieren auf einer niedrigauflösenden Verfeinerungsprozedur im Sinne der Rotation und Translation von Dimeren entlang einer Achse und repräsentieren nur eine Schätzung der nativen Struktur (König *et al.*, 2004). Informationen über intramolekulare Wechselwirkungen, die z.B. die Lage der Untereinheiten zueinander definieren, sind hauptsächlich aus den Streudaten bei höheren Streuwinkeln zugänglich, einem Bereich in denen die Genauigkeit der Daten geringer ist (Abb. 22).

### 3.4. Kinetische Untersuchungen

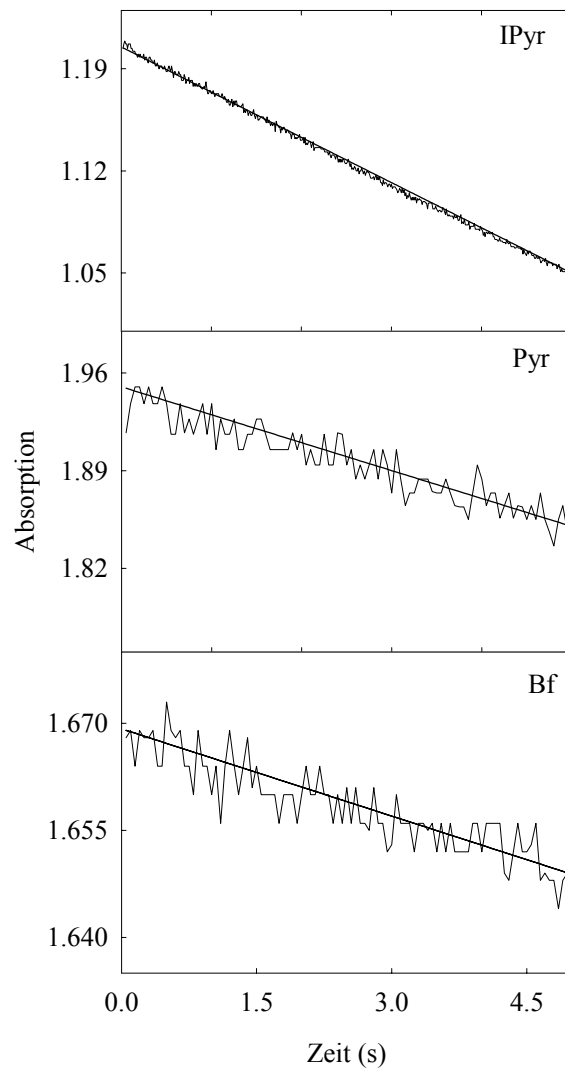
Die Analyse der Primärsequenz der *EcIPDC* zeigte, dass die Aminosäurereste, die in den Pyruvatdecarboxylasen als Schlüsselaminosäurereste in der Katalyse identifiziert wurden oder eine Rolle bei der Cofaktorbindung zugeschrieben bekommen haben, auch in den Indolpyruvatdecarboxylasen konserviert sind. Deshalb wurde angenommen, dass sowohl die Bindung der Cofaktoren als auch der katalytische Mechanismus der Indolpyruvatdecarboxylasen und der Pyruvatdecarboxylasen ähnlich sind. Die Röntgenkristallstrukturanalyse bestätigte die strukturelle Ähnlichkeit der *EcIPDC* zur Klasse der Pyruvatdecarboxylasen. Nachfolgende kinetische Untersuchungen sollen Analogien in der Funktionsweise aufzeigen und den Katalysemechanismus der *EcIPDC* näher erklären.

Erste kinetische Untersuchungen der *EcIPDC* zeigten, dass neben dem physiologischen Substrat Indolpyruvat auch Pyruvat, Benzoylformiat und seine 4-substituierten Derivate umgesetzt werden können (Koga *et al.*, 1992; Schütz, 2000, 2003<sub>a</sub>). Im Folgenden werden die kinetischen Eigenschaften der *EcIPDC* weiterführend untersucht. Zunächst werden die Ergebnisse der Untersuchungen zur Substrataktivierung vorgestellt. Die Analyse 4-substituierter Benzoylformiate diente zur Untersuchung des Einflusses der elektronischen und sterischen Anforderungen der Substituenten auf die Katalyse. Um die in der *EcIPDC*-Katalyse beteiligten Aminosäurereste im aktiven Zentrum zu identifizieren, wurden verschiedene Varianten der *EcIPDC* generiert und deren kinetischen Konstanten bestimmt. Es wurden die einzelnen Reaktionsintermediate in der *EcIPDC*-katalysierten Umsetzung von Indolpyruvat, Pyruvat und Benzoylformiat unter Nutzung der <sup>1</sup>H-NMR Spektroskopie direkt identifiziert. Anhand der Intermediatverteilung im *steady state* können die mikroskopischen Geschwindigkeitskonstanten der Teilreaktionen in der Katalyse bestimmt werden. Es wird ein Modell zum Katalysemechanismus für die Indolpyruvatdecarboxylase aus *Enterobacter cloacae* vorgestellt. Die Ergebnisse werden mit den Mechanismen ähnlicher ThDP-abhängiger Enzyme, insbesondere der Pyruvatdecarboxylasen und der Benzoylformiatdecarboxylasen, vergleichend diskutiert. In diesem Zusammenhang erfolgte auch die Überprüfung der Umsetzung von Indolpyruvat durch verschiedene Pyruvatdecarboxylasen.

### 3.4.1. Untersuchungen zur Substrataktivierung der *EcIPDC*

Die bereits in der Diplomarbeit untersuchten v-S-Charakteristiken der Decarboxylierung verschiedener Substrate durch die *EcIPDC* (Schütz, 2000) zeigten hyperbole Abhängigkeiten der katalytischen Aktivität von der Substratkonzentration. Dies und die Geraden in den Sekundärauftragungen entsprechend HANES *et al.* (1932) (siehe Abb. 40 im Anhang) sind ein Hinweis darauf, dass die *EcIPDC* keine Substrataktivierung zeigt. Um einen Substrataktivierungsmechanismus endgültig auszuschließen, wurden schnelle Kinetiken mit Hilfe der *stopped-flow*-Technik aufgenommen. In Abb. 24 sind die beobachteten Progresskurven der Decarboxylierung von Indolpyruvat, Pyruvat und Benzoylformiat durch *EcIPDC*-Wt dargestellt. Das Fehlen einer lag-Phase im Verlauf dieser Produktbildungskurven bestätigt die Abwesenheit einer Substrataktivierung.





**Abb. 24:** *Progresskurven der Decarboxylierung von Indolpyruvat, Pyruvat und Benzoylformiat durch EcIPDC-Wt. Die Messungen wurden bei 30 °C durchgeführt. Die Absorption wurde bei 340 nm (Pyr) bzw. 366 nm (IPyr, Bf) verfolgt. Die Geraden entsprechen den linearen Anpassungen. Die Progresskurven bei 10 °C zeigten ebenfalls keine lag-Phasen.*

Für die IPDC-verwandten Pyruvatdecarboxylasen aus Hefen und Pflanzen, die katalytische und regulatorische Substratbindungsstellen besitzen, sind dagegen sigmoide Abhängigkeiten der Aktivität von der Substratkonzentration und lag-Phasen in den Produktbildungskurven zu beobachten.<sup>13</sup> Zur Aufklärung des Mechanismus der Substrataktivierung der Pyruvatdecarboxylasen wurden zahlreichen Untersuchungen durchgeführt. HÜBNER *et al.* (1978) schlugen ein Modell vor, in dem das Substratmolekül schnell am regulatorischem Zentrum bindet und die vollständige Aktivierung des Enzyms in einer langsamen, nachgeschalteten Reaktion erfolgt. Für die ScPDC wird ein Cystein-Rest (Cys221) als regulatorisches Zentrum während

<sup>13</sup> Davies (1967), Boiteux & Hess (1970), Hübner *et al.* (1978), Lee & Langston-Unkefer (1985), Mücke *et al.* (1995), Killenberg-Jabs *et al.* (1996), Dietrich & König (1997), Neuser *et al.* (2000), Krieger *et al.* (2002)

des Prozesses der Substrataktivierung angenommen (Hübner *et al.*, 1988; Barburina *et al.*, 1994, 1998). Die Analysen der durch die Röntgenkleinwinkelstreuung erhaltenen Lösungsmodelle der ScPDC in An- und Abwesenheit des Aktivatormoleküls Pyruvamid gaben einen ersten Hinweis darauf, dass die Substrataktivierung mit einer Änderung der Lage der Dimere im Tetramer einhergeht (Hübner *et al.*, 1990; König *et al.*, 2004). Nachdem die Kristallstrukturen der nativen und der aktivierten ScPDC (gebundener Aktivator Pyruvamid) zugänglich wurden (Arjunan *et al.*, 1996, Lu *et al.*, 1997, 2000), wurde festgestellt, dass die Rotation eines Dimers um 30 ° zur Ausbildung einer neuen Dimer-Dimer-Interaktionsfläche und zur Umorientierung zweier Aminosäureketten führt, was in der Abschottung von zwei der vier aktiven Zentren resultiert. Im nichtaktivierten Enzym verhindern diese Aminosäureketten, dass sich die C-terminale Helix dem aktiven Zentrum annähern kann und somit besitzen alle aktiven Zentren eine offene Topologie. Während der Substrataktivierung der ScPDC wird ein Signalübertragungsweg vom regulatorischen zum aktiven Zentrum postuliert. Der vorgeschlagene Mechanismus sieht eine Beteiligung der AS-Reste Cys221, His92, Glu91, Trp412 und Gly413 vor (Sergienko & Jordan, 2001<sub>b</sub>, 2002; Jordan *et al.*, 2004). Dabei ist der Carbonylsauerstoff der Peptidkette des letztgenannten Restes im Wasserstoffbrückenbindungsabstand zur 4'-Aminogruppe des Cofaktors.

Eine Ausnahme innerhalb der Klasse der Pyruvatdecarboxylasen stellt die PDC aus *Zymomonas mobilis* dar. Sie folgt wie auch die EcIPDC einer hyperbolen Michaelis-Menten-Kinetik und zeigt keinen Substrataktivierungsmechanismus (Bringer-Meyer *et al.*, 1986; Sun *et al.*, 1995). Wie bereits in Kapitel 3.3.2.5. beschrieben wurde, sind die Dimer-Dimer-Assoziationen in der EcIPDC weniger kompakt als in der ZmPDC. Die Dimere sind aber auch nicht so lose wie in der nichtaktivierten ScPDC<sup>(A)</sup> angeordnet, sie sind vergleichbar zur aktivierten ScPDC<sup>(B)</sup>. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass der Prozess der Substrataktivierung mit der Packung der Untereinheiten im Tetramer zusammenhängt. Enzyme wie die ScPDC mit einer eher losen Assoziation der Untereinheiten erlauben größere Konformationsänderungen während der Katalyse und die Möglichkeit einer Kooperativität ist gegeben. Dagegen sind in ZmPDC und EcIPDC, die eine kompaktere Anordnung der Dimere aufweisen, größere Konformationsänderungen energetisch ungünstig.

### 3.4.2. Kinetische Konstanten der *EcIPDC*-Katalyse

Die Aminosäurereste Asp29, Glu52, His115 und Glu468 im aktiven Zentrum der *EcIPDC* sind durch ihre Lage zum Reaktionszentrum wahrscheinlich am Katalysemechanismus beteiligt (3.3.2.7.). Diese AS-Reste sind dabei sowohl in den Indolpyruvatdecarboxylasen als auch in den Pyruvatdecarboxylasen konserviert. Um den Einfluss dieser AS-Reste auf die *EcIPDC*-Katalyse zu untersuchen, wurden die konservativen AS-Austauschvarianten Asp<sup>29</sup>Glu, Glu<sup>52</sup>Asp, His<sup>115</sup>Lys und Glu<sup>468</sup>Asp, die veränderte  $pK_a$ -Werte und Abstände zum Reaktionszentrum besitzen, generiert. Die Konstruktion der AS-Variante Gln<sup>383</sup>Thr ergibt sich aus den Strukturvergleichen von *EcIPDC* und den Pyruvatdecarboxylasen. Während in vielen IPDC-Sequenzen an dieser Stelle ein Glutamin konserviert ist, weisen die meisten Pyruvatdecarboxylasen ein Threonin auf (siehe Abb. 7). Die Untersuchungen der *steady state* Kinetiken dieser Varianten in Kombination mit der <sup>1</sup>H-NMR-spektroskopischen Analyse der Intermediate ermöglichten erste Aussagen über die Beteiligung dieser Seitenketten während verschiedener Katalyseschritte.

Der vorgeschlagene Katalysemechanismus eines ThDP-abhängigen Enzyms beinhaltet das Durchlaufen des intermediären tetrahedralen ThDP-Substratadduktes und des  $\alpha$ -Carbanion/Enamins (siehe Abb. 2, S. 8 und Abb. 4, S. 34). Bei der nichtoxidativen Decarboxylierung von Indolpyruvat, Pyruvat und Benzoylformiat durch die *EcIPDC* würde das tetrahedrale ThDP-Substrataddukt dem 2-(2-Indolyl-lactyl)-ThDP (IndLThDP), dem 2-Lactyl-ThDP (LThDP) bzw. dem 2-Mandelyl-ThDP (MThDP) entsprechen. Das nach der Decarboxylierung entstehende  $\alpha$ -Carbanion/Enamin würde nach seiner Protonierung in das 2-(2-Indolyl-1-hydroxyethyl)-ThDP (IndHETThDP), das 2-(1-Hydroxyethyl)-ThDP (HETThDP) bzw. in das 2-(1-Hydroxybenzyl)-ThDP (HBzThDP) umgewandelt werden (siehe Tab. 2).

Die Detektion von Reaktionsintermediaten kann auf unterschiedliche Weise erfolgen (siehe Einleitung, S. 7). Während bisher hauptsächlich indirekte Methoden zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten von Teilreaktionen genutzt wurden, können ThDP-gebundene Intermediate auch direkt durch die Anwendung der <sup>1</sup>H-NMR Spektroskopie qualitativ und quantitativ bestimmt werden (Tittmann *et al.*, 2003). Im Gegensatz zu den transienten Kinetiken können die mikroskopischen Geschwindigkeitskonstanten eindeutig zugeordnet und direkt mit der gemessenen katalytischen Aktivität korreliert werden. Dabei werden die in der ThDP-Katalyse gebildeten Intermediate durch Säuredenaturierung isoliert und <sup>1</sup>H-NMR-spek-

trokopisch analysiert. Die Identifizierung der in der Decarboxylierung von Pyruvat gebildeten Intermediate HETHDP, LThDP (PDC, AHAS, POX), 2-Acetyl-ThDP (POX) und 2-[(1,2-Dihydroxy-2-carboxy-1,2-dimethyl)-ethyl]-ThDP (AHAS) und die Detektion der Intermediate in der Transketolase-Reaktion ausgehend von Zuckersubstraten und -analogen (2-(1,2-Dihydroxyethyl)-ThDP) wurde bereits erfolgreich durchgeführt (Tittmann *et al.*, 2003; 2004). In den nachfolgenden Untersuchungen diente die  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie zur Identifizierung der durch die *EcIPDC* katalysierten Umsetzung von Pyruvat und der aromatischen Substrate Indolpyruvat und Benzoylformiat gebildeten kovalenten ThDP-Intermediate. Die Verteilung der im *steady state* der Umsetzung dieser Substrate gebildeten Intermediate wird zur Berechnung der mikroskopischen Geschwindigkeitskonstanten der Teilschritte der Katalyse herangezogen (siehe 2.6.4.). Aufgrund der Säuredenaturierung ist die Differenzierung des nach der Decarboxylierung entstehenden  $\alpha$ -Carbanion/Enamins und dessen konjugierter Säure nicht möglich. Die Geschwindigkeitskonstante der Produktabspaltung ( $k_4$ ) umfasst somit sowohl die Protonierung des  $\alpha$ -Carbanion/Enamins, die Deprotonierung der  $C\alpha$ -Hydroxylgruppe des Substrates und die C-C-Bindungsspaltung (siehe 2.6.4.). Neben den ThDP-Substrataddukten IndLThDP, LThDP und MThDP können mit dieser Methode somit das IndHETHDP, HETHDP und das HBzThDP nachgewiesen werden (siehe Tab. 2).

Zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstante der C2-H-Deprotonierung des *EcIPDC*-gebundenen ThDP wurden H/D-Austauschexperimente entsprechend KERN *et al.* (1997) durchgeführt.

#### 3.4.2.1. Synthese und Analyse der Standards

Um die durch die *EcIPDC* gebildeten Intermediate eindeutig identifizieren zu können, wurden die im Verlauf der Umsetzung von Indolpyruvat, Pyruvat und Benzoylformiat postulierten Intermediate chemisch bzw. chemoenzymatisch synthetisiert und die  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren dieser Standards analysiert (siehe 2.6.4.). In Anbetracht der Isolation der enzymgebundenen ThDP-Intermediate durch eine Säuredenaturierung wurde die Stabilität der ThDP-Addukte unter sauren Bedingungen überprüft.

##### *Standards für das Intermediat $I_1$*

Das LThDP wurde chemisch synthetisiert (2.6.4.). Die Untersuchung seiner Säurestabilität zeigte, dass in dem Zeitraum der Akkumulation der  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren (6 h) keine Decarboxylierung einsetzt (Crosby *et al.*, 1970; Tittmann *et al.*, 2003). Die chemischen Synthesen von MThDP und IndLThDP schlugen bis jetzt fehl. Vor kurzem wurde die Synthese von 2-Mandelylthiamin durch Kluger *et al.* (2004) beschrieben. Die Analyse der chemischen

Eigenschaften von 2-Mandelylthiamin wies auf einen extrem niedrigen  $pK_a$  von 0.2 der Carboxylgruppe hin. Unter der Annahme, dass der  $pK_a$ -Wert des MThDP dem des 2-Mandelylthiamins entspricht, und unter Beachtung, dass während der Intermediatanalyse ein pH von 0.75 vorliegt, ist eine spontane Decarboxylierung des MThDP vorherzusagen. Für das 2-Mandelylthiamin wurde unter sauren Bedingungen eine Halbwertszeit der spontanen Decarboxylierung mit 20 min angegeben (Kluger *et al.*, 2004). Die  $^1\text{H-NMR}$ -Analyse zeigte, dass das Signal des MThDP im Laufe der Akkumulierung (ca. 4-6 h) abnimmt und das Signal des HBzThDP proportional zunimmt. Dies spricht für eine spontane Decarboxylierung des MThDP unter den sauren Messbedingungen (siehe Abb. 37 im Anhang). Die beobachtete Geschwindigkeitskonstante des MThDP-Zerfalls ( $k_{\text{obs}} = 3.12 \cdot 10^{-4} \pm 3.6 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  bei 25 °C) stimmt dabei gut mit der des Mandelylthiamins überein. Hinsichtlich des nichtenzymatischen Zerfalls des MThDP müssen die beobachteten relativen Intermediatkonzentrationen zur Berechnung der mikroskopischen Geschwindigkeitskonstanten entsprechend korrigiert werden (siehe 2.6.4.). Die spontane Decarboxylierung könnte zwar durch das Einstellen von pH-Werten  $\leq 0.5$  verlangsamt werden, aber unter diesen Bedingungen würde das gebildete ThDP-Addukt unter Abspaltung von Phosphat in seine Monophosphatform zerfallen und die Zuordnung aller intermediären Spezies erschweren. Ähnlich dem MThDP zeigt auch IndLThDP eine Instabilität unter den sauren Messbedingungen ( $k_{\text{obs}} = 2.2 \cdot 10^{-4} \pm 1.4 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ; siehe Abb. 38 im Anhang), was bei der Berechnung der mikroskopischen Geschwindigkeitskonstanten berücksichtigt wurde.

#### *Standards für das Intermediat $I_2$*

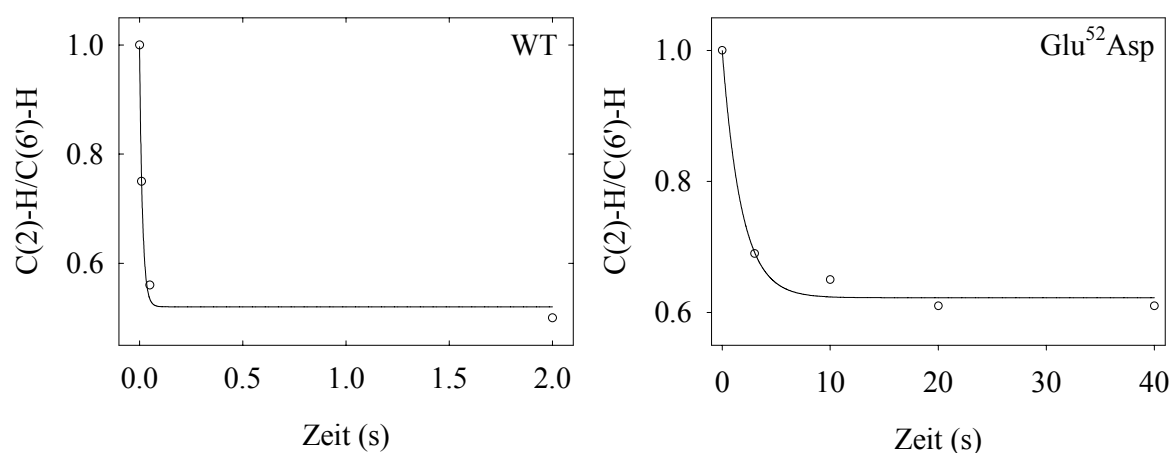
HETHDP (Pyr), HBzThDP (Bf) und IndHETHDP (IPyr) wurden erfolgreich chemisch bzw. chemoenzymatisch synthetisiert (siehe 2.6.4.). Die Zuordnung der  $^1\text{H-NMR}$ -Spinsysteme der aromatischen ThDP-Addukte HBzThDP und IndHETHDP stimmen dabei mit den jeweiligen chemischen Strukturen der Intermediate überein. Die  $^1\text{H-NMR}$ -chemische Verschiebung der detektierten aromatischen Protonen des C6'-H des Aminopyrimidinrings und des C $\alpha$ -H sind im Anhang (Abb. 39) dargestellt. Die  $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopischen Messungen zeigten, dass unter den Messbedingungen (pH von 0.75) sowohl HBzThDP als auch IndHETHDP stabil sind. Die Zuordnung der  $^1\text{H-NMR}$ -Signale und die Säurestabilität von HETHDP wurden bereits von TITTMANN *et al.* (2003) beschrieben.

### 3.4.2.2. Aktivierung von ThDP in *EcIPDC*

Zum Mechanismus der Aktivierung des enzymgebundenen ThDP sind zahlreiche Untersuchungen durchgeführt wurden. Gestützt durch die Informationen, die aus den Raumstrukturen verschiedener ThDP-abhängiger Enzyme zugänglich wurden, wurde vorgeschlagen, dass die Interaktion der Seitenkette eines hoch konservierten Glutamats mit dem N1'-Atom des Aminopyrimidinrings des ThDP das Schlüsselereignis der initialen Deprotonierung des C2-H-Atoms darstellt (Schneider & Lindqvist, 1993). Experimente mit cofaktoranalogen ThDP-Verbindungen (Golbik *et al.*, 1991) und die kinetischen Studien von Varianten, in denen das hoch konservierte Glutamat ausgetauscht wurde, bestätigten diese Annahme (Wikner *et al.*, 1994; Candy *et al.*, 1996; Killenberg-Jabs *et al.*, 1997). H/D-Austauschexperimente mit unterschiedlichen ThDP-abhängigen Enzymen zeigten, dass die C2-H-Deprotonierung durch die Proteinkomponente beschleunigt ist (Kern *et al.*, 1997; Hübner *et al.*, 1998).

Es wurden die Geschwindigkeitskonstanten des H/D-Austausches der *EcIPDC*-Wt und der *EcIPDC*-Variante Glu<sup>52</sup>Asp entsprechend KERN *et al.* (1997) bestimmt. Es sei festgehalten, dass diese Experimente in Abwesenheit von Substrat durchgeführt werden.

Die H/D-Austauschexperimente zeigen, dass die beobachtete Geschwindigkeitskonstante der C2-H-Dissoziation für das Wildtypenzym ( $k_{\text{obs}}(\text{H/D}) = 69.7 \pm 17.2 \text{ s}^{-1}$ ) um zwei Größenordnungen größer ist als für die Variante Glu<sup>52</sup>Asp ( $k_{\text{obs}}(\text{H/D}) = 0.57 \pm 0.12 \text{ s}^{-1}$ ) (Abb. 25). Durch die Verkürzung der Seitenkette des Glutamats um eine CH<sub>2</sub>-Gruppe ist die Wechselwirkung mit dem N1'-Atom des ThDP abgeschwächt, was eine Verlangsamung der initialen Ylidbildung des Cofaktors zur Folge hat.



**Abb. 25:** Bestimmung der C2-H-Deprotonierungsgeschwindigkeitskonstanten von *EcIPDC*-gebundenem ThDP.

Die Messungen wurden für den *EcIPDC*-Wt und die Variante Glu<sup>52</sup>Asp durchgeführt. Für den Wt wurden Reaktionszeiten von 10 ms, 50 ms und 2 s gewählt, für die Variante Glu<sup>52</sup>Asp 3 s, 20 s und 40 s. Die Messungen erfolgten mit 10 mg/mL *EcIPDC* in 0.1 M Mes pH 6.5 bei 30 °C.

Die C2-H-Dissoziationskonstanten des enzymgebundenen Cofaktors wurden auch für die der *EcIPDC* ähnlichen ThDP-abhängigen Pyruvatdecarboxylasen aus *Zymomonas mobilis* und *Saccharomyces cerevisiae* bestimmt (Kern *et al.*, 1997; Tittmann *et al.*, 2003). KERN *et al.* (1997) fanden heraus, dass der Substrataktivierungsprozess der *ScPDC* mit einer schnelleren C2-H-Dissoziation verbunden ist. Während die Ylidbildung in der nativen *ScPDC*<sup>(A)</sup> geschwindigkeitsbestimmend ist ( $k_{\text{obs (H/D)}} = 0.97 \text{ s}^{-1}$ ), ist die C2-H-Ionisation in aktivierter *ScPDC*<sup>(B)</sup> für die Katalyse nicht limitierend ( $k_{\text{obs (H/D)}} > 600 \text{ s}^{-1}$ ). In *ZmPDC*, die wie die *EcIPDC* keine Substrataktivierung zeigt, ist die C2-H-Ionisation nicht geschwindigkeitsbestimmend ( $k_{\text{obs (H/D)}} = 110 \text{ s}^{-1}$ ). Die Analyse der Ylidbildung verschiedener Varianten der *ZmPDC* zeigte weiterhin, dass außer im Falle der Glu50-Variante weitere Austausche wichtiger AS-Reste im aktiven Zentrum keinen Einfluss auf die C2-H-Ionisation hatten (Tittmann *et al.*, 2003). Analog dazu wurden im Falle der *EcIPDC* nur das Wildtypenzym und die Variante Glu<sup>52</sup>Asp für die H/D-Austauschexperimente eingesetzt.

### 3.4.2.3. Bestimmung kinetischer Konstanten der *EcIPDC*

Die *EcIPDC*-Varianten Asp<sup>29</sup>Glu, Glu<sup>52</sup>Asp, His<sup>115</sup>Lys, Gln<sup>383</sup>Thr und Glu<sup>468</sup>Asp wurden hinsichtlich der Decarboxylierung von Indolpyruvat, Pyruvat und Benzoylformiat untersucht. Für die Messung der katalytischen Aktivität diente ein gekoppelt optischer Test mit ADH und NADH (2.6.1.). Alle Varianten zeigen eine hyperbole Abhängigkeit der katalytischen Aktivität von der Substratkonzentration und die linearisierten Auftragungen nach HANES *et al.* (1932) resultieren in Geraden (Abb. 40 im Anhang). Die Bestimmung der katalytischen Konstanten erfolgte durch die Anpassung der gemessenen Daten an die Michaelis-Menten-Gleichung. Im Falle der Umsetzung von Pyruvat ist die Substratüberschusshemmung berücksichtigt worden (2.6.2.). Die berechneten Werte sind in Tab. 10 zusammengefasst.

#### *Wildtyp*

Die *EcIPDC* decarboxyliert neben dem physiologischen Substrat Indolpyruvat auch Pyruvat und Benzoylformiat. Dabei besitzt die *EcIPDC* für das Indolpyruvat die höchste Spezifität ( $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$  am höchsten). Die höchste katalytische Aktivität zeigt die *EcIPDC* dagegen mit dem Substrat Benzoylformiat. Pyruvat wird relativ unspezifisch umgesetzt. Interessanterweise sind die ermittelten  $k_{\text{cat}}$ -Werte der Umsetzung von Indolpyruvat und Pyruvat ähnlich.

#### *Asp<sup>29</sup>Glu*

Während Pyruvat und Benzoylformiat von dieser *EcIPDC*-Variante umgesetzt werden, ist bei der Verwendung des physiologischen Substrates Indolpyruvat keine Aktivität im gekoppelt

optischen Test detektierbar (im Sinne einer abnehmenden Absorption bei 366 nm; siehe 2.6.1.) Tatsächlich wurde sogar eine langsame Zunahme der Absorption bei 366 nm beobachtet, was mit der Bildung eines stabilen Intermediates interpretiert werden könnte (siehe Abb. 41 im Anhang). Eine  $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopische Analyse dieses Reaktionsansatzes bestätigt diese Aussage (Nachweis des IndHEThDP). Die *EcIPDC*-Variante Asp<sup>29</sup>Glu kann somit für die chemoenzymatische Synthese des Standards IndHEThDP eingesetzt werden (siehe 3.4.2.1., 2.6.4., Abb. 38). Der AS-Austausch Asp<sup>29</sup>Glu hat ferner signifikante Auswirkungen auf die katalytische Aktivität mit dem Substrat Benzoylformiat ( $k_{\text{cat}}$  1160-fach verringert). Welcher Schritt in der Katalyse so dramatisch beeinflusst wird, wird im späteren Abschnitt der Intermediatanalyse deutlich. Wie aus der Tab. 10 ersichtlich wird, sind die ermittelten  $K_{\text{M}}$ -Werte für Benzoylformiat und Pyruvat deutlich kleiner als die des Wildtypenzym. Obwohl die Seitenkette des Asp<sup>29</sup> in der Röntgenkristallstruktur weg vom Reaktionszentrum gerichtet ist (siehe 3.3.2.7.), weisen die katalytischen Konstanten auf eine Beteiligung dieses AS-Restes an der Katalyse hin.

### *Glu*<sup>52</sup>*Asp*

Die Untersuchung der Kristallstruktur zeigte, dass die Seitenkette des Glutamats eine Wasserstoffbrücke zum N1'-Atom des ThDP eingeht und dass diese Wechselwirkung wahrscheinlich am initialen Schritt der Katalyse, der Protonenabstraktion vom C2-H-Atom des Thiazoliumrings, beteiligt ist. Vergleicht man die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten des H/D-Austausches ( $k_{\text{obs}}(\text{H/D}) = 69.7 \text{ s}^{-1}$ ) mit den experimentell bestimmten  $k_{\text{cat}}$ -Werten, ist festzustellen, dass die C2-H-Ionisation für das Wildtypenzym nicht geschwindigkeitsbestimmend ist (Tab. 10). Für die Umsetzung von Indolpyruvat und Pyruvat durch die *EcIPDC*-Variante Glu<sup>52</sup>Asp scheint diese Reaktion ebenfalls nicht geschwindigkeitsbestimmend zu sein ( $k_{\text{cat}} \leq k_{\text{obs}}(\text{H/D})$ ). Der  $k_{\text{cat}}$ -Wert der Umsetzung des Substrates Benzoylformiat durch die *EcIPDC*-Variante Glu<sup>52</sup>Asp ( $k_{\text{cat}} = 0.87 \pm 0.02 \text{ s}^{-1}$ ) ist dagegen etwas größer als die Geschwindigkeitskonstante der Ylidbildung ( $k_{\text{obs}}(\text{H/D}) = 0.57 \pm 0.12 \text{ s}^{-1}$ ). Dies könnte ein Hinweis auf eine Beteiligung des in einer *docking*-Position gebundenen Substrates (Michaelis-Menten-Komplex) an der C2-H-Deprotonierung sein. Es sei festgehalten, dass die  $k_{\text{cat}}$ -Werte der Umsetzung aller Substrate durch die *EcIPDC*-Variante Glu<sup>52</sup>Asp um einen Faktor der gleichen Größenordnung (10-15-mal) kleiner sind als die des Wildtypenzym, während die beobachtete Geschwindigkeitskonstante des H/D-Austausches um den Faktor 100 langsamer ist. Dies deutet darauf hin, dass die Wechselwirkung von Glu<sup>52</sup>Asp mit dem N1'-Atom neben der C2-H-Ionisation auch andere Schritte in der Katalyse beeinflusst.



Ob identische Reaktionsschritte beeinflusst sind und inwieweit dieser initiale Katalyseschritt in Bezug zur allgemeinen katalytischen Aktivität steht, wird später näher erläutert. Es sei erwähnt, dass die  $K_M$ -Werte für Indolpyruvat und Pyruvat im Vergleich zum Wildtypenzym kleiner sind, während der  $K_M$ -Wert für Benzoylformiat leicht erhöht ist.

#### *His<sup>115</sup>Lys*

Die katalytischen Konstanten dieser Variante zeigen hinsichtlich der Umsetzung aller drei Substrate ein unterschiedliches kinetisches Verhalten (Tab. 10). Während die katalytische Aktivität mit Indolpyruvat im Vergleich zum Wildtypenzym nur um den Faktor 3 verringert ist, ist bei den Substraten Benzoylformiat und Pyruvat eine 40- bzw. 55-fache Abnahme des  $k_{cat}$ -Wertes zu beobachten. Dabei sind die  $k_{cat}$ -Werte für Benzoylformiat und Indolpyruvat erstaunlicherweise identisch ( $\sim 0.3 \text{ s}^{-1}$ ) und die Aktivität mit Pyruvat ist um den gleichen Faktor ( $\sim 50$ ) verringert, wie bei der *EcIPDC*-Variante Asp<sup>29</sup>Glu. Der  $K_M$ -Wert für Indolpyruvat und Pyruvat ist im Vergleich zum Wildtypenzym unverändert, der für Benzoylformiat ist erniedrigt.

#### *Gln<sup>383</sup>Thr*

Das Gln383, welches in den meisten Pyruvatdecarboxylasen durch ein Thr ersetzt ist, stellt einen signifikanten Unterschied in den aktiven Zentren von *EcIPDC* und den Pyruvatdecarboxylasen dar. Der Austausch von Gln383 gegen den weniger voluminösen Threonin-Rest, wie er auch in den aktiven Zentren der *ZmPDC* und *ScPDC* zu finden ist, resultiert in einer höheren Spezifität ( $k_{cat}/K_M$ ) für Pyruvat (Faktor 11). Erstaunlicherweise ist auch die Spezifität für das physiologische Substrat Indolpyruvat erhöht (Faktor 1.7) (Tab. 10). Dabei ist sowohl für Pyruvat als auch für Indolpyruvat eine Verdopplung der katalytischen Aktivität ( $k_{cat}$ ) im Vergleich zum Wildtypenzym zu beobachten. Interessanterweise ist der  $k_{cat}$ -Wert für alle drei Substrate nahezu identisch ( $\sim 2 \text{ s}^{-1}$ ). Im Wildtypenzym unterscheiden sich die katalytischen Aktivitäten für die drei Substrate, wobei Benzoylformiat am schnellsten umgesetzt wird. Diese Eigenschaft geht in der *EcIPDC*-Variante Gln<sup>383</sup>Thr verloren. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass das Gln383 eine Schlüsselrolle in der Differenzierung zwischen Benzoylformiat auf der einen und Indolpyruvat und Pyruvat auf der anderen Seite spielt.

**Tab. 10:** *Katalytische Konstanten der Decarboxylierung von Indolpyruvat, Benzoylformiat und Pyruvat durch EcIPDC und Varianten. Die  $k_{cat}$ -Werte beziehen sich auf das Monomer. Die kursiv dargestellten Werte entsprechen dem reduzierten Faktor im Vergleich zum Wt ( $^{red}$ ). Die Grenzwerte für  $k_2$  und  $k_3$  spiegeln die Auflösungsgrenze der  $^1H$ -NMR-Spektren wider. Im Vergleich zum Wt signifikant veränderte Konstanten sind hervorgehoben. Die Variante Asp<sup>29</sup>Glu zeigt im gekoppelt optischen Test mit IPyr keine Aktivität (Nachweis von IndHThDP) (\*).*

IPyr	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )		C-C-Bindungs- bildung		Decarboxylierung von IndLThDP		Indolacetaldehyd- abspaltung		$K_M$ ( $\mu$ M)	$k_{cat}/K_M$ (s <sup>-1</sup> ·mM)
	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$(k_{cat})^{red}$	$k_2$ (s <sup>-1</sup> )	$(k_2)^{red}$	$k_3$ (s <sup>-1</sup> )	$(k_3)^{red}$	$k_4$ (s <sup>-1</sup> )	$(k_4)^{red}$		
<b>Wt</b>	0.98 ± 0.02	-	2.18	-	≥ 7.5	-	2.3	-	20 ± 1.3	49.0
<b>Asp<sup>29</sup>Glu</b>	nicht messbar	-	-	-	-	-	*	-	-	-
<b>Glu<sup>52</sup>Asp</b>	0.10 ± 1.3·10 <sup>-2</sup>	10	<b>0.14</b>	16	≥ 1.38	-	0.55	4	4.5 ± 1.4	22.2
<b>His<sup>115</sup>Lys</b>	0.31 ± 1.3·10 <sup>-2</sup>	3	0.65	3	≥ 4	-	0.68	3	32.6 ± 4.1	9.5
<b>Gln<sup>383</sup>Thr</b>	2.05 ± 0.07	(2) <sup>-1</sup>	<b>8.6</b>	(4) <sup>-1</sup>	4.75	-	<b>6.15</b>	(2.7) <sup>-1</sup>	24.0 ± 2.7	<b>85.4</b>
<b>Glu<sup>468</sup>Asp</b>	0.04 ± 2.1·10 <sup>-3</sup>	25	<b>0.055</b>	40	<b>0.20</b>	≥ 38	<b>0.25</b>	9	18.6 ± 2.9	2.2

Bf	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )		C-C-Bindungs- bildung		Decarboxylierung von MThDP		Benzaldehyd- abspaltung		$K_M$ (mM)	$k_{cat}/K_M$ (s <sup>-1</sup> ·mM)
	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$(k_{cat})^{red}$	$k_2$ (s <sup>-1</sup> )	$(k_2)^{red}$	$k_3$ (s <sup>-1</sup> )	$(k_3)^{red}$	$k_4$ (s <sup>-1</sup> )	$(k_4)^{red}$		
<b>Wt</b>	11.60 ± 0.31	-	18.5	-	≥ 93	-	37	-	1.65 ± 0.03	7.03
<b>Asp<sup>29</sup>Glu</b>	0.01 ± 2.5·10 <sup>-4</sup>	1160	<b>0.018</b>	1028	<b>0.025</b>	≥ 3720	<b>0.103</b>	359	0.024 ± 3.6·10 <sup>-3</sup>	0.42
<b>Glu<sup>52</sup>Asp</b>	0.87 ± 2.1·10 <sup>-2</sup>	13	<b>1.28</b>	14	≥ 38	-	19	2	2.72 ± 0.18	0.32
<b>His<sup>115</sup>Lys</b>	0.29 ± 5.0·10 <sup>-3</sup>	40	<b>0.58</b>	32	<b>0.7</b>	≥ 133	<b>2.9</b>	13	0.27 ± 0.02	1.07
<b>Gln<sup>383</sup>Thr</b>	2.25 ± 0.05	5	2.85	6	≥ 50	-	14	3	1.71 ± 0.14	1.32
<b>Glu<sup>468</sup>Asp</b>	0.07 ± 1.6·10 <sup>-3</sup>	166	<b>0.1</b>	185	<b>0.26</b>	≥ 358	<b>2.25</b>	16	0.14 ± 0.01	0.50

Pyr	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )		C-C-Bindungs- bildung		Decarboxylierung von LThDP		Acetaldehyd- abspaltung		$K_M$ (mM)	$k_{cat}/K_M$ (s <sup>-1</sup> ·mM)	$K_I$ (mM)
	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$(k_{cat})^{red}$	$k_2$ (s <sup>-1</sup> )	$(k_2)^{red}$	$k_3$ (s <sup>-1</sup> )	$(k_3)^{red}$	$k_4$ (s <sup>-1</sup> )	$(k_4)^{red}$			
<b>Wt</b>	0.88 ± 0.02	-	1.25	-	≥ 19.1	-	3.47	-	3.38 ± 0.18	0.26	164 ± 16
<b>Asp<sup>29</sup>Glu</b>	0.019 ± 1.2·10 <sup>-3</sup>	46	≥ 0.31	-	≥ 0.31	-	<b>0.022</b>	158	0.63 ± 0.10	0.03	61 ± 21
<b>Glu<sup>52</sup>Asp</b>	0.06 ± 2.5·10 <sup>-3</sup>	15	<b>0.10</b>	13	≥ 1.21	-	<b>0.16</b>	22	0.77 ± 0.10	0.08	71 ± 15
<b>His<sup>115</sup>Lys</b>	0.016 ± 0.7·10 <sup>-3</sup>	55	≥ 0.27	-	<b>0.14</b>	≥ 136	<b>0.020</b>	174	3.48 ± 0.33	0.005	141 ± 30
<b>Gln<sup>383</sup>Thr</b>	2.06 ± 0.04	(2.3) <sup>-1</sup>	<b>6.52</b>	(5.2) <sup>-1</sup>	40.7	≤ (2.13) <sup>-1</sup>	3.24	1	0.73 ± 0.06	<b>2.82</b>	8.5·10 <sup>7</sup> ± 1.7·10 <sup>7</sup>
<b>Glu<sup>468</sup>Asp</b>	0.07 ± 2.5·10 <sup>-3</sup>	13	<b>0.11</b>	11	<b>0.34</b>	≥ 56	0.35	10	3.16 ± 0.32	0.02	247 ± 59

### *Glu<sup>468</sup>Asp*

Den größten Effekt hat dieser AS-Austausch auf die Umsetzung von Benzoylformiat. Die katalytische Aktivität ist hier 166-mal kleiner als die des Wildtypenzym. In der Umsetzung von Indolpyruvat durch die *EcIPDC* ist bei dieser Variante die gemessene katalytische Aktivität im Vergleich zu den anderen Varianten am stärksten verringert (Faktor 25). Die ermittelten  $k_{\text{cat}}$ -Werte der drei Substrate liegen in der gleichen Größenordnung. Dies könnte darauf hindeuten, dass ein Reaktionsschritt, an dem die Seitenkette des Glu468 beteiligt ist, in der *Glu<sup>468</sup>Asp*-Variante allein geschwindigkeitsbestimmend wird. Die  $K_{\text{M}}$ -Werte von Indolpyruvat und Pyruvat sind im Vergleich zum Wildtypenzym unverändert, der von Benzoylformiat ist verringert.

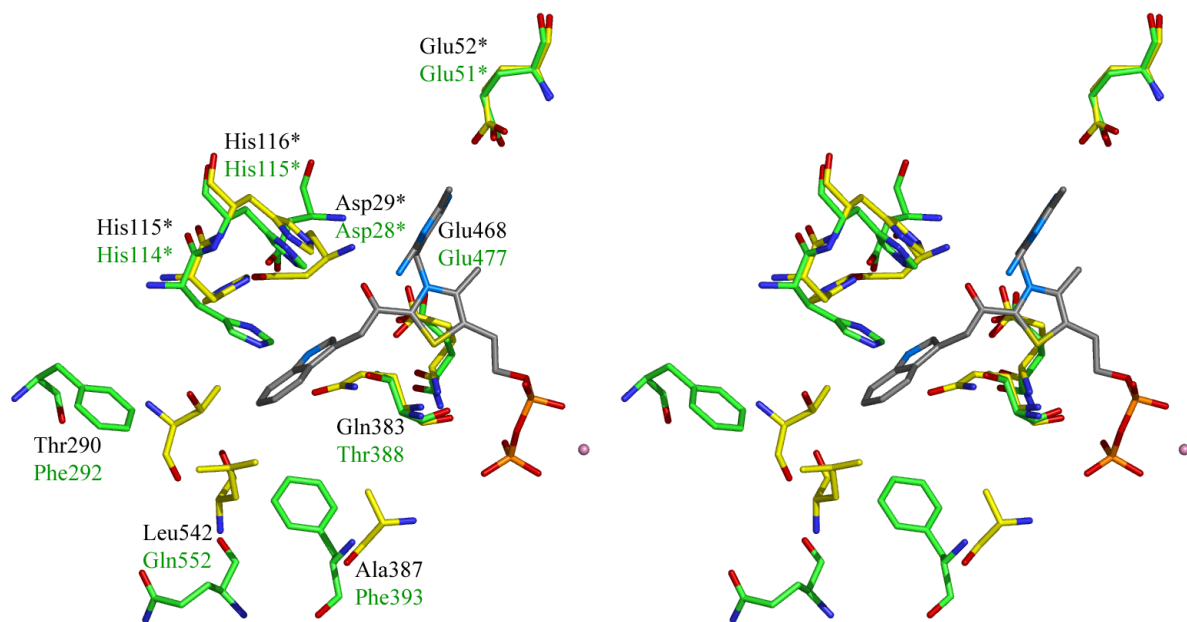
#### 3.4.2.4. Intermediatverteilung bei der Umsetzung von Pyruvat

Es wurde die Intermediatverteilung der Umsetzung von Pyruvat durch die *EcIPDC* und deren Varianten analysiert. Die einzelnen <sup>1</sup>H-NMR-Spektren sind im Anhang dargestellt (Abb. 42). Die berechneten mikroskopischen Geschwindigkeitskonstanten sind in Tab. 10 aufgeführt.

Im *steady state* der Umsetzung von Pyruvat durch die *EcIPDC*-Wt können nur ThDP und HETHDP detektiert werden. Das bedeutet, dass sowohl die Substratbindung als auch die Produktabspaltung partiell geschwindigkeitsbestimmend sind. Die Decarboxylierung dagegen scheint sehr schnell zu verlaufen, da kein LThDP detektiert werden konnte. In der Reaktion der Varianten His<sup>115</sup>Lys und *Glu<sup>468</sup>Asp* wird indessen LThDP akkumuliert, was für eine verlangsamte Decarboxylierungsreaktion und eine Rolle dieser AS-Seitenketten in diesem Reaktionsschritt spricht. Die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten der Decarboxylierung ( $k_3$ ) sind dabei um zwei Größenordnungen kleiner als die des Wildtypenzym (Tab. 10). Der Nachweis von freiem ThDP als Hauptintermediat in der Umsetzung von Pyruvat durch die Varianten *Glu<sup>468</sup>Asp* und *Glu<sup>52</sup>Asp* weist auf eine verschlechterte Substratbindung an das C2-Atom des ThDP hin und impliziert eine Rolle dieser Seitenketten bei der C-C-Bindungsbildung zum LThDP. Die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten  $k_2$  der Bildung des LThDP sind dabei um das circa 10-fache im Vergleich zum Wildtyp reduziert. An der Produktabspaltung sind vermutlich die AS-Seitenketten von Asp29 und His115 beteiligt. Diese Aussage lässt sich mit der vorwiegenden Detektion des Intermediates HETHDP im *steady state* der entsprechenden *EcIPDC*-Varianten begründen. Dabei sprechen die ähnlichen Geschwindigkeitskonstanten der Acetaldehydabspaltung von Asp<sup>29</sup>Glu und His<sup>115</sup>Lys für eine Asp/His-Duade ( $k_4 \sim 0.02 \text{ s}^{-1}$ ). Die Produktfreisetzung scheint auch mit der Wechselwirkung der

AS-Seitenkette von Glu52 mit dem N1'-Atom im Zusammenhang zu stehen. Interessanterweise sind in der *EcIPDC*-Variante Gln<sup>383</sup>Thr, einer „pseudo-PDC“, die Geschwindigkeitskonstanten der C-C-Bindungsbildung und der Decarboxylierung im Vergleich zum Wildtypenzym signifikant erhöht.

Die Analyse der Kristallstruktur der *EcIPDC* zeigte die Ähnlichkeit zur Klasse der ThDP-abhängigen Pyruvatdecarboxylasen, deren physiologisches Substrat das Pyruvat ist (Kapitel 3.3.2.). Die umfangreichen kinetischen Untersuchungen der Pyruvatdecarboxylasen aus *ZmPDC* und *ScPDC* beschreiben eine Beteiligung der AS-Seitenketten von Asp27, Glu50, His113 und Glu473 im Katalysezyklus (Nummerierung entsprechend der *ZmPDC*) (Tittmann *et al.*, 2003; Fußnote 7 auf S. 7). Diese Reste sind in den Aminosäuresequenzen der Pyruvatdecarboxylasen und Indolpyruvatdecarboxylasen konserviert (siehe Abb. 7) und nehmen identische Positionen im aktiven Zentrum ein. In der *ScPDC* entsprechen diese Reste dem Asp28, Glu51, His114 und Glu477, in der *EcIPDC* dem Asp29, Glu52, His115 und dem Glu468 (siehe Abb. 26, Abb. 27).

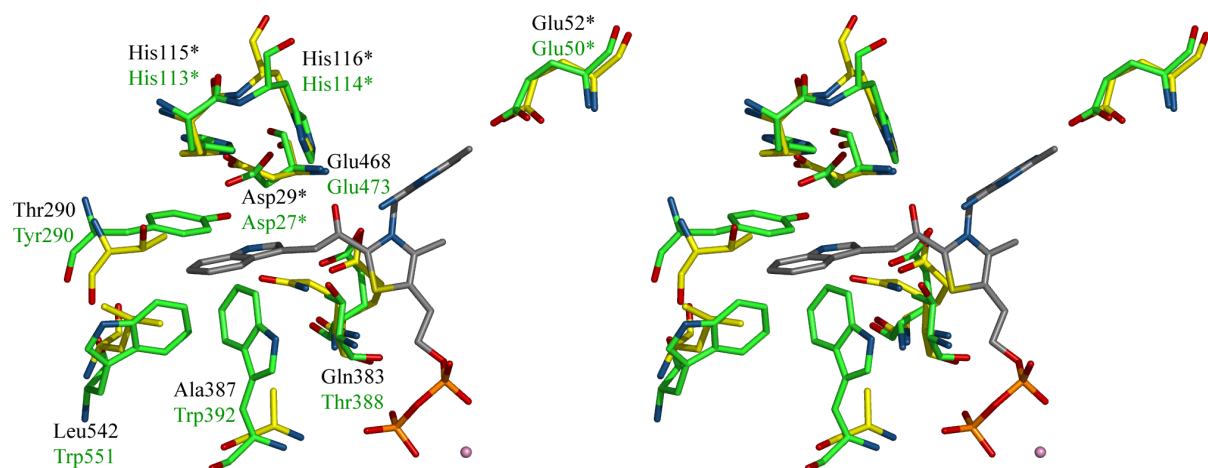


**Abb. 26:** Stereobild der Superposition der aktiven Zentren von *EcIPDC* und nativer *ScPDC*<sup>(A)</sup>.

Die gelb dargestellten Reste beziehen sich auf die *EcIPDC*, die grünen auf *ScPDC*. Das modellierte ThDP-gebundene intermediäre  $\alpha$ -Carbanion/Enamin (grau) der Umsetzung von IPyr ist einbezogen. Die mit (\*) markierten Reste stammen von der anderen Untereinheit im funktionellen Dimer. Das  $Mg^{2+}$ -Ion ist durch eine rosa Kugel dargestellt. Die Abbildung wurde mit dem Programm PYMOL erstellt (DeLano, 2002).

Die Untersuchungen der primären Kohlenstoff- und der sekundären Wasserstoffisopieeffekte, sowie die  $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopische Analyse der Intermediate zeigten, dass in der Katalyse der Pyruvatdecarboxylasen die Decarboxylierungsreaktion und die Aldehydfreisetzung partiell geschwindigkeitsbestimmend sind (Tittmann *et al.*, 2003; Alvarez *et al.*, 1991; Sun *et al.*, 1995). Dabei beeinflusst das Glu50 die Ylidbildung, die Substratbindung und die Aldehydabspaltung. An der Substratbindung ist das Glu473 beteiligt. Dieser AS-Rest spielt zudem die entscheidende Rolle in der Decarboxylierungsreaktion. Bei der Produktabspaltung sind neben der Wechselwirkung des Glu50 die Interaktionen der AS-Reste Asp27 und His113 von Bedeutung (Nummerierung entsprechend der *ZmPDC*; Tittmann *et al.*, 2003).

Der Vergleich der Umsetzung von Pyruvat durch die *EcIPDC* und die *PDC* zeigt, dass in den Enzymen unterschiedliche Reaktionsschritte geschwindigkeitsbestimmend sind. In den Pyruvatdecarboxylasen sind die Decarboxylierung und die Aldehydfreisetzung partiell geschwindigkeitsbestimmend. In der *EcIPDC*-Katalyse sind dagegen die Substratbindung und die Produktfreisetzung limitierend. Die *EcIPDC*, die das aromatische Indolpyruvat als physiologisches Substrat umsetzt, bindet das nichtaromatische Pyruvat somit schlechter als die *PDC*.



**Abb. 27:** *Stereobild der Superposition der aktiven Zentren von EcIPDC und ZmPDC. Die gelb dargestellten Reste beziehen sich auf die EcIPDC, die grünen auf ZmPDC. Das modellierte ThDP-gebundene intermediäre  $\alpha$ -Carbanion/Enamin (grau) der Umsetzung von IPyr ist einbezogen. Die mit (\*) markierten Reste stammen von der anderen Untereinheit im funktionellen Dimer. Das  $\text{Mg}^{2+}$ -Ion ist durch eine rosa Kugel dargestellt. Die Abbildung veranschaulicht die Restriktion der Substratbindungstasche in ZmPDC (entsprechende AS sind kursiv dargestellt). Die Abbildung wurde mit dem Programm PYMOL erstellt (DeLano, 2002).*

Während in der Decarboxylierungsreaktion der *PDC* die Interaktion mit einem Glutamatrest von Bedeutung ist, spielt in der *EcIPDC* auch das His115 eine wichtige Rolle. In den Teilschritten der C-C-Bindungsbildung und in der Aldehydabspaltung sind die gleichen AS-Reste

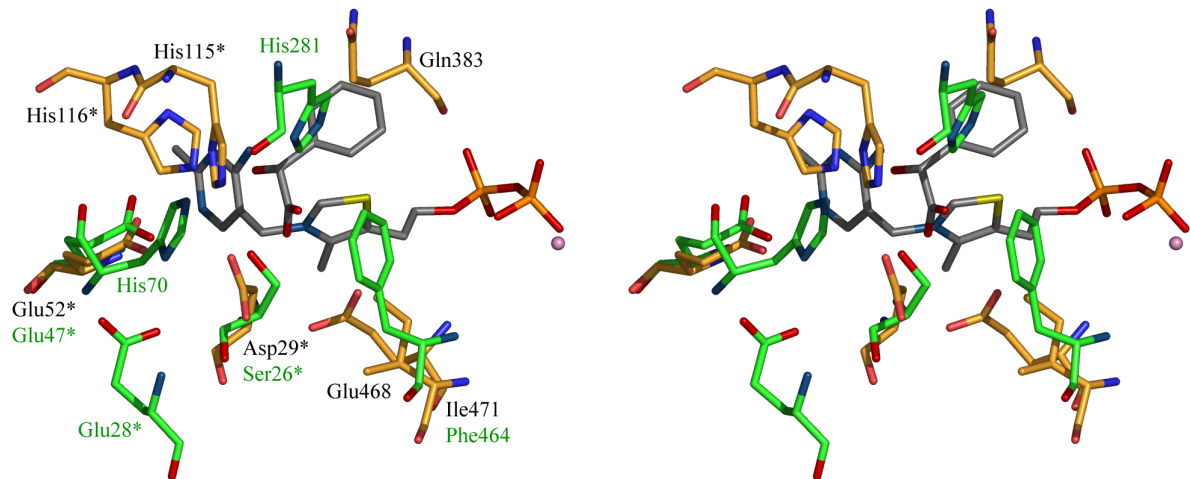
beteiligt. Bei der Acetaldehydabspaltung ist sowohl in *EcIPDC* als auch in *PDC* eine Asp/His-Duade von Bedeutung. Es sei festgehalten, dass die *EcIPDC* das Pyruvat im Vergleich zu den Pyruvatdecarboxylasen wesentlich schlechter umsetzt ( $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$  von  $0.26 \text{ s}^{-1}\cdot\text{mM}^{-1}$  versus  $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}^{(\text{ZmPDC})} = 450 \text{ s}^{-1}\cdot\text{mM}^{-1}$  und  $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}^{(\text{ScPDC})} = 129 \text{ s}^{-1}\cdot\text{mM}^{-1}$ ). Somit sind die einzelnen Teilschritte in der *EcIPDC*-Katalyse signifikant verlangsamt.

### 3.4.2.5. Intermediatverteilung bei der Umsetzung von Benzoylformiat

Die  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren der Umsetzung von Benzoylformiat durch *EcIPDC*-Wt zeigen, dass im *steady state* nur ThDP und HBzThDP detektiert werden können (siehe Abb. 43 im Anhang). Dies weist darauf hin, dass die C-C-Bindungsbildung und die Benzaldehydfreisetzung partiell geschwindigkeitsbestimmend sind (Tab. 10, S. 74). Während im Wildtypenzym kein MThDP isoliert wurde, konnte die Akkumulation von MThDP in der Katalyse der Varianten Asp<sup>29</sup>Glu, His<sup>115</sup>Lys und Glu<sup>468</sup>Asp nachgewiesen werden. Somit zeigen diese Enzyme eine im Vergleich zum *EcIPDC*-Wt veränderte Decarboxylierungsreaktion (Tab. 10). Die dramatisch reduzierte Geschwindigkeitskonstante  $k_2$  der C-C-Bindungsbildung (um Faktor 1028) durch die *EcIPDC*-Variante Asp<sup>29</sup>Glu weist darauf hin, dass die Seitenkette des Asp29 an der Bindung des Benzoylformiates beteiligt ist. Neben diesem AS-Rest scheint auch die Seitenkette des Glu468 eine Rolle in der Bildung des MThDP zu spielen. Die Decarboxylierung dieses Intermediates ist vermutlich durch die Wechselwirkungen mit den AS-Seitenketten Asp29, Glu468 und His115 beeinflusst. Dafür sprechen die Akkumulation von MThDP im *steady state* der Umsetzung von Benzoylformiat durch die entsprechenden Varianten und die damit verbundenen reduzierten mikroskopischen Geschwindigkeitskonstanten von  $k_3$ . Bei der Benzaldehydabspaltung ist vor allem die Bedeutung der AS-Seitenkette Asp29 hervorzuheben (Tab. 10). Aber auch die Seitenketten von His115 und Glu468 scheinen am Schritt der Produktabspaltung beteiligt zu sein.

Für das ThDP-abhängige Enzym Benzoylformiatdecarboxylase stellt das Benzoylformiat das physiologische Substrat dar (Hegeman, 1966). Ein struktureller Vergleich von *EcIPDC* und BFD aus *Pseudomonas putida* (Hasson *et al.*, 1998) zeigt sowohl gemeinsame Eigenschaften wie die Bindung des ThDP in seiner V-Konformation und die Interaktion einer Glutamatseitenkette mit dem N1'-Atom des Aminopyrimidinrings als auch Unterschiede im Aufbau des aktiven Zentrums (siehe auch Abb. 17). Die BFD besitzt, wie auch die Pyruvatdecarboxylasen und die Indolpyruvatdecarboxylasen, zwei Histidine im aktiven Zentrum (His70 und His281). In der BFD stammen die Histidine jedoch von verschiedenen Untereinheiten und die räum-

liche Orientierung dieser Reste ist unterschiedlich im Vergleich zur *EcIPDC* und PDC (siehe Abb. 28). Das strukturelle Analogon zum Asp-Rest der IPDC/PDC (Asp29 in *EcIPDC*) ist in der BFD das Ser26. Da die Topologien der aktiven Zentren von IPDC/PDC und BFD verschieden sind, sind sowohl für den Glutamat-Rest (Glu468 in *EcIPDC*) als auch für den His281-Rest der BFD keine analogen Aminosäuren zu finden.



**Abb. 28:** *Stereobild der Superposition der aktiven Zentren von *EcIPDC* und BFD. Das durch die BFD gebundene ThDP und R-Mandelat ist integriert (grau). Die gelb dargestellten Reste beziehen sich auf die *EcIPDC*, die grünen auf BFD. Die mit (\*) markierten Reste stammen von der anderen Untereinheit im funktionellen Dimer. Das gebundene  $Mg^{2+}$  ist durch eine rosa Kugel dargestellt. Die Abbildung wurde mit dem Programm PVMOL erstellt (DeLano, 2002).*

Transiente *stopped-flow* kinetische Untersuchungen des chromophoren Substratanalogen 4-Nitrobenzoylformiat (Sergienko *et al.*, 2000), die Analyse spezifischer AS-Austauschvarianten und die strukturellen Daten der Kristallstruktur des enzymgebundenen Inhibitors R-Mandelat resultierten in einem Reaktionsmechanismus der BFD, in dem die AS-Reste His70 und Ser26 am Schritt der Substratbindung und Decarboxylierung beteiligt sind, während His281 eine Rolle bei der Protonierung des  $\alpha$ -Carbanion/Enamins spielt (Polovnikova *et al.*, 2003). Während der Substratbindung bewirken die AS-Reste Ser26 und His70 eine optimale Orientierung des Substrates. Das His70 assistiert bei der Bildung des MThDP, indem es mit Hilfe der 4'-Aminogruppe des Cofaktors die Protonierung der Carbonylgruppe des Substrates bewirkt. Das His70 wird auch im Zusammenhang mit der Deprotonierung des HBzThDP im Schritt der Produktabspaltung diskutiert. Der Ionisierungsgrad des His70 könnte dabei über eine Wechselwirkung mit dem Glu28 reguliert werden (Protonenrelais-System). Die AS-Seitenkette des Ser26 ist nicht nur an der Substratbindung beteiligt, sondern beeinflusst auch andere Teilreaktionen der Katalyse (Protonierung des Enamins, Benzaldehyd- und Kohlendioxidfreisetzung). In der BFD Katalyse sind die der Decarboxylierung nachfolgenden

Schritte, welche zur Produktabspaltung führen, geschwindigkeitsbestimmend (Polovnikova *et al.*, 2003).

Der Vergleich der Umsetzung von Benzoylformiat der *EcIPDC* und BFD zeigt, dass Unterschiede in der Substratbindung bestehen. Während in BFD dieser Reaktionsschritt für die Katalyse nicht limitierend ist, ist die Bildung des ThDP-Substratadduktes in der *EcIPDC*-Katalyse partiell geschwindigkeitsbestimmend. Dabei unterscheidet sich das physiologische Substrat der *EcIPDC* (Indolpyruvat) von dem ebenfalls aromatischen Benzoylformiat unter anderem in einer zusätzlichen aliphatischen CH<sub>2</sub>-Gruppe, wodurch der Rest am C $\alpha$ -Atom des Substrates im Falle von Benzoylformiat in seiner Lage weniger flexibel ist (siehe Tab. 2). Die unterschiedliche Affinität des Benzoylformiates zeigt sich auch in den K<sub>M</sub>-Werten. Der K<sub>M</sub>-Wert der BFD gegenüber Benzoylformiat wird mit 0.34 mM (pH 6.1; Weiss *et al.*, 1988) angegeben. Die *EcIPDC* bindet das Benzoylformiat dagegen weniger spezifisch (K<sub>M</sub> = 1.65 mM). Während der einzelnen Teilschritte der Katalyse sind in den beiden Enzymen unterschiedliche AS-Seitenketten beteiligt. Dabei beeinflussen die positionell konservierten AS-Reste Asp29 (*EcIPDC*) und Ser26 (BFD) ähnliche Teilschritte.

An dieser Stelle sei auf die Arbeiten von KLUGER und Mitarbeiter hingewiesen (1993). Studien an chemisch synthetisiertem 2-(1-Hydroxybenzyl)thiamin, zeigten, dass dessen Carbanion/Enamin-Form in neutraler Lösung einer irreversiblen Oka-Fragmentierungsreaktion unterliegt. Dabei wird die Methylenbrücke zwischen den beiden Ringen des Cofaktors gespalten und es entstehen Pyrimidin und Phenylthiazolketon. Untersuchungen von N1'-derivatierten 2-(1-Hydroxybenzyl)thiaminen zeigten, dass diese Fragmentierungsreaktion unabhängig vom Protonierungszustand des N1'-Atoms erfolgt. Hu & Kluger (2004) diskutieren, dass die Spaltungsreaktion, die eine Konkurrenzreaktion zur Protonierung des entstehenden Carbanions darstellt, erst durch eine Überlappung der Orbitale des Enamins möglich ist, und dass in der BFD, die Benzaldehyd als Produkt entlässt, diese Überlappung durch die V-Konformation des Cofaktors und durch die mit dem Intermediat wechselwirkenden AS-Reste des aktiven Zentrums verhindert wird. In der *EcIPDC* wurde eine solche Fragmentierungsreaktion des in der Umsetzung von Benzoylformiat entstehenden Carbanions ebenfalls nicht nachgewiesen (keine entsprechenden Produkte in der <sup>1</sup>H-NMR-Analyse).



### 3.4.2.6. Intermediatverteilung bei der Umsetzung von Indolpyruvat

Um den Einfluss von AS-Seitenketten auf die mikroskopischen Teilschritte in der Umsetzung von Indolpyruvat zu identifizieren, wurden die im *steady state* von *EcIPDC* und deren Varianten akkumulierten Intermediate analysiert. Die einzelnen  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren sind im Anhang (Abb. 44) dargestellt. Die berechneten mikroskopischen Geschwindigkeitskonstanten sind in Tab. 10 (S. 74) aufgeführt.

Da im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Umsetzung von Indolpyruvat durch das Wildtypenzym der *EcIPDC* neben freiem ThDP nur noch IndHETHDP detektiert wird, stellen die kovalente Substratbindung und die Indolacetaldehydabspaltung die geschwindigkeitsbestimmenden Schritte in der Katalyse dar. Die Analyse der *EcIPDC*-Varianten zeigte, dass die Geschwindigkeitskonstante der Substratbindung für die Varianten Glu<sup>468</sup>Asp und Glu52Asp signifikant verringert ist (Tab. 10). Die Seitenketten der Aminosäuren Glu468 und Glu52 scheinen somit in den Prozess der Bildung des ersten Reaktionsintermediates IndLThDP involviert zu sein. Die direkte  $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopische Detektion des IndLThDP erfolgte nur im Falle der Variante Glu<sup>468</sup>Asp. Die Seitenkette des Glu468 ist somit an der Decarboxylierungsreaktion beteiligt. Der letzte Schritt der Reaktion, die Abspaltung des Indolacetaldehyds, wird hauptsächlich durch eine Wechselwirkung der Seitenkette des Asp29 beeinflusst. Wird diese Seitenkette um eine  $\text{CH}_2$ -Gruppe verlängert (Asp<sup>29</sup>Glu), ist eine Produktabspaltung in dem mit ADH gekoppelt optischen Test nicht mehr messbar und das Intermediat  $I_2$ , das IndHETHDP, wird  $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopisch detektiert. Aber auch die AS-Reste Glu468, Glu52 und His115 scheinen an der Produktfreisetzung beteiligt zu sein. Die gegenüber dem Wildtypenzym 3-9-fach reduzierten Geschwindigkeitskonstanten  $k_4$  der Aldehydabspaltung sind ein Hinweis darauf (Tab. 10, S. 74). Die Indolacetaldehydabspaltung ist im Falle der *EcIPDC*-Variante Gln<sup>383</sup>Thr verbessert ( $k_4$  verdreifacht). Die AS-Seitenkette von Gln383 scheint somit die für die Produktabspaltung notwendige sterische Orientierung des IndHE-Restes im IndHeThDP-Intermediat zu verändern.

### 3.4.2.7. Umsetzung 4-substituierter Benzoylformiate durch die *EcIPDC*

Die Umsetzung verschieden 4-substituierter Benzoylformiate wurde hinsichtlich der unterschiedlichen elektronischen und sterischen Anforderungen der Substituenten untersucht. Es wurde der elektronenziehende und elektronendrückende Einfluss der Substituenten auf die katalytischen Konstanten analysiert. Die Umsetzung von Benzoylformiat und den 4-substituierten Derivaten 4-Cl-Bf, 4-Br-Bf und 4-CH<sub>3</sub>-Bf wurde bereits während der Diplomarbeit

untersucht (Schütz, 2000). Weiterführend wurde die Decarboxylierung der substituierten Benzoylformiate 4-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>-Bf, 4-CH<sub>3</sub>O-Bf, 4-NO<sub>2</sub>-Bf und 4-F-Bf analysiert. Es zeigt sich eine hyperbole Abhängigkeit der katalytischen Aktivität von der Konzentration der 4-substituierten Benzoylformiate (Abb. 45 im Anhang). Die berechneten katalytischen Konstanten ergeben sich durch die Anpassung der Messdaten an die Michaelis-Menten-Gleichung (2.6.2.) und sind in Tab. 11 zusammengefasst.

**Tab. 11:** *Katalytische Konstanten der Decarboxylierung von 4-substituierten Benzoylformiaten durch die EcIPDC.*

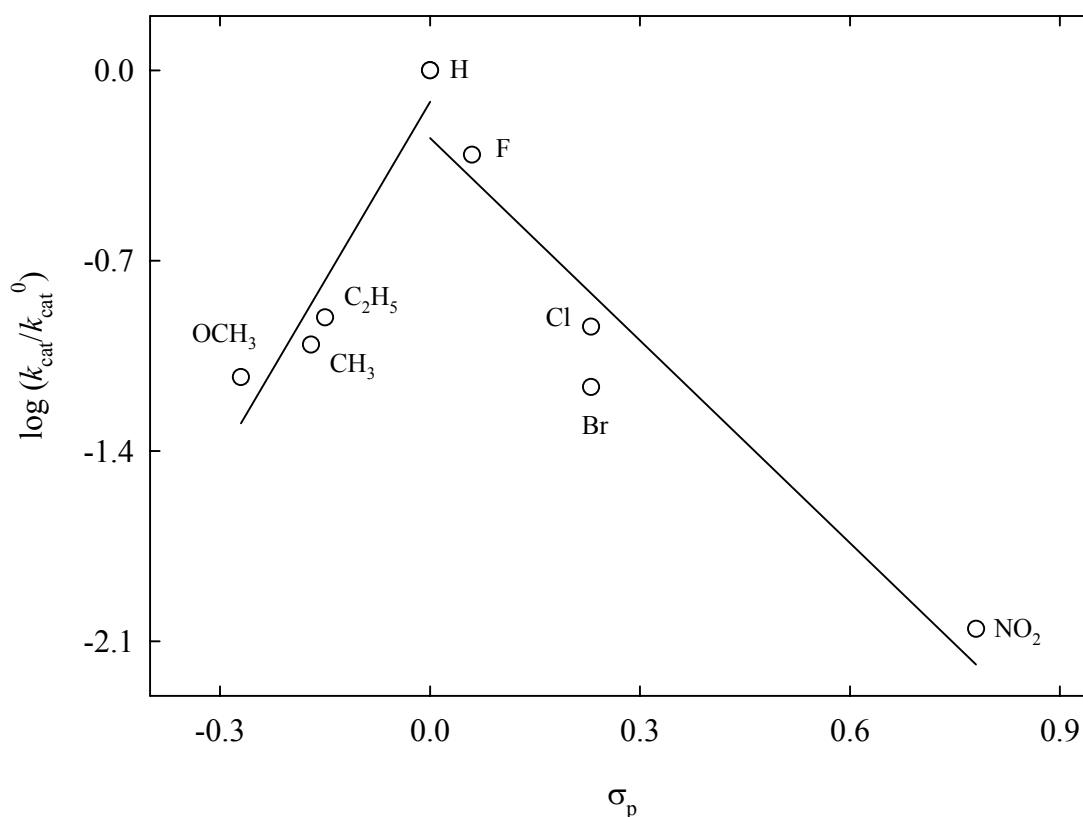
*Die angegebenen Substituentenkonstanten  $\sigma_p$  entsprechen Hansch et al., 1973. Die berechneten Konstanten ergeben sich aus der Anpassung der Messdaten an die Michaelis-Menten-Gleichung. Im Falle von 4-NO<sub>2</sub>-Bf wurde die integrierte Michaelis-Menten-Gleichung angewandt. Die  $k_{cat}$ -Werte beziehen sich auf das Wildtypenzym der monomeren EcIPDC.*

Substrat	$\sigma_p$	Van-der-Waals- radien (Å <sup>3</sup> )	K <sub>M</sub> (μM)	$k_{cat}$ (1/s)	$k_{cat}/K_M$ (1/s·mM)
4-NO <sub>2</sub> -Bf	0.78	24.9	5 ± 0.5	0.10 ± 2.5·10 <sup>-3</sup>	20
4-Br-Bf	0.23	24.2	19 ± 1.0	0.79 ± 7.5·10 <sup>-3</sup>	42
4-Cl-Bf	0.23	19.8	48 ± 2.0	1.32 ± 0.01	28
4-F-Bf	0.06	10.4	617 ± 32.0	5.68 ± 0.14	9.2
4-H-Bf	0	7.6	1646 ± 32.0	11.6 ± 0.31	7.1
4-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> -Bf	- 0.15	40.7	111 ± 3.5	1.43 ± 0.02	13
4-CH <sub>3</sub> -Bf	- 0.17	24.5	127 ± 7.0	1.14 ± 0.02	9.0
4-CH <sub>3</sub> O-Bf	- 0.27	30.1	1043 ± 33.0	0.87 ± 0.02	0.83

L.P. HAMMETT (1937) entwickelte ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung des Einflusses der Substituenten durch die Untersuchung der Dissoziation von verschiedenen substituierten Benzoesäuren unter standardisierten Bedingungen (wässrige Lösung, 25 °C). Die korrespondierenden Substituentenkonstanten  $\sigma$  sind nur bedingt auf andere Reaktionen anwendbar. Während der Datenauswertung zeigten sich die modifizierten Substituentenkonstanten  $\sigma_p$  entsprechend HANSCH *et al.* (1973) als am besten geeignet. Aus Tab. 11 ist zu entnehmen, dass elektronendrückende Substituenten negative, elektronenziehende Substituenten dagegen positive  $\sigma_p$ -Konstanten besitzen. Dabei stellt z. B. die Methoxy-Gruppe einen besonders starken Elektronendonator dar, die Nitro-Gruppe ist ein starker Elektronenakzeptor.

Die ermittelten katalytischen Konstanten zeigen, dass die Bindung umso besser erfolgt (K<sub>M</sub>-Werte kleiner) und die Umsatzrate umso schlechter ist ( $k_{cat}$ -Werte kleiner), je stärker der elektronenziehende Effekt des Substituenten ist (F<Cl<Br<NO<sub>2</sub>). Dagegen ist die Bindung und die katalytische Aktivität umso schlechter (K<sub>M</sub>-Werte größer,  $k_{cat}$ -Werte kleiner), je höher der elektronendrückende Effekt (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub><CH<sub>3</sub><CH<sub>3</sub>O) des Substituenten ist. Unabhängig von

der Art der Substitution zeigen alle 4-substituierten Benzoylformiate eine scheinbar bessere Affinität zur *EcIPDC* ( $K_M$ -Werte kleiner) und eine schlechtere Umsatzrate ( $k_{cat}$ -Werte kleiner) als unsubstituiertes Benzoylformiat, welches am schnellsten von der *EcIPDC* umgesetzt wird. Die logarithmische Auftragung von  $k_{cat}/k_{cat}^0$  gegen die entsprechende Substituentenkonstante (Abb. 29) resultiert in zwei Geraden mit unterschiedlichen Anstiegen, eine Gerade für die elektronendrückenden Substituenten (Anstieg = 4.4) und eine Gerade für die elektronenziehenden Substituenten (Anstieg = -2.5). Dieses Verhalten weist darauf hin, dass die Substituenten entsprechend ihrer elektronischen Natur unterschiedliche geschwindigkeitsbestimmende Schritte in der *EcIPDC*-Katalyse beeinflussen.



**Abb. 29:** *Abhängigkeit von  $\log(k_{cat}/k_{cat}^0)$  der Decarboxylierung 4-substituierter Benzoylformiate von der Substituentenkonstante  $\sigma_p$ . Die Substituentenkonstante entspricht HANSCH et al. (1973).  $k_{cat}^0$  bezieht sich auf unsubstituiertes Benzoylformiat.*

Neben den elektronischen Effekten, die sich in den Substituentenkonstanten widerspiegeln, könnten auch sterische Effekte eine Rolle spielen. Die Tab. 11 verdeutlicht jedoch, dass die Van-der-Waals-Radien der Substituenten in keinem direkten Zusammenhang mit den ermittelten katalytischen Konstanten stehen. Die offene Topologie der Substratbindungstasche der *EcIPDC* erlaubt somit die Bindung der mit voluminösen Resten substituierten Benzoyl-

formiate. Für die Katalyse von Bedeutung sind, wie bereits erläutert, vielmehr die elektronischen Effekte der Substituenten.

Unter Anwendung der  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie wurden die in der Umsetzung von 4-Br-Bf und 4- $\text{CH}_3\text{O-Bf}$  gebildeten Intermediate bestimmt. Die Wahl dieser beiden Substrate ergibt sich durch den ähnlichen  $k_{\text{cat}}$ -Wert bei unterschiedlicher elektronischer Anforderungen der Substituenten. Die jeweilige  $^1\text{H-NMR}$ -chemische Verschiebung der gebildeten kovalenten ThDP-Intermediate entspricht dabei in etwa denen von MThDP und HBzThDP (siehe Abb. 46 im Anhang, max. 0.01 ppm Abweichung). Die bestimmten Geschwindigkeitskonstanten der Teilreaktionen sind in Tab. 12 dargestellt.

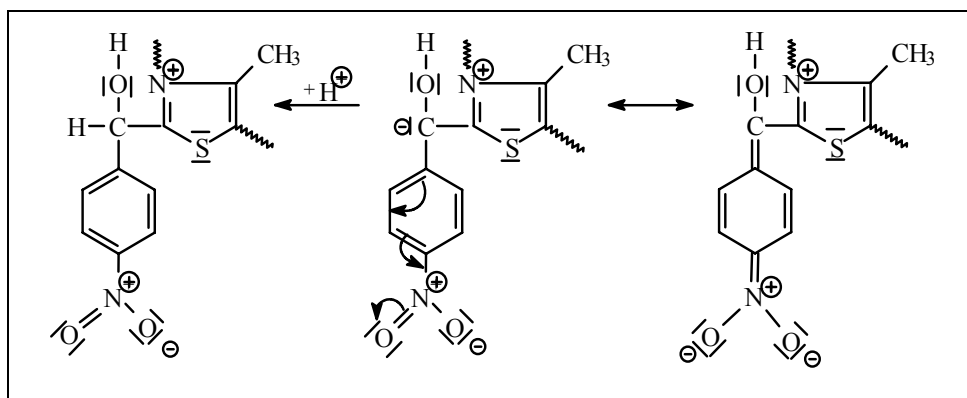
Die Ergebnisse zeigen, dass in der durch die EcIPDC katalysierten Umsetzung von mit elektronendrückenden Substituenten derivatisierten Benzoylformiaten sowohl die C-C-Bindungs- bildung als auch die Decarboxylierung partiell geschwindigkeitsbestimmend sind. Dagegen sind bei der Umsetzung von mit elektronenziehenden Substituenten substituierten Benzoylformiaten die Bindungsknüpfung und die Produktabsplattung für die Katalyse limitierend. Die bestimmten Geschwindigkeitskonstanten aller Teilschritte sind, unabhängig von der Art des Substituenten, für die 4-substituierten Benzoylformiate im Vergleich zur Umsetzung von unmodifiziertem Benzoylformiat erniedrigt.

**Tab. 12:** *Mikroskopische Geschwindigkeitskonstanten elementarer Schritte in der Decarboxylierung von 4-substituierten Benzoylformiaten durch EcIPDC-Wt. Die angegebenen  $k_{\text{cat}}$ -Werte resultieren aus den Messungen im gekoppelt optischen Test. Die Geschwindigkeitskonstanten für die Elementarschritte ergeben sich aus der durch  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie ermittelten Intermediatverteilung. Die kursiv dargestellten Werte entsprechen dem reduzierten Faktor im Vergleich zum unsubstituierten Bf ( $^{\text{red}}$ ). Die geschwindigkeitsbestimmenden Teilreaktionen sind hervorgehoben.*

Wt	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )		C-C-Bindungs- bildung		Decarboxylierung		Aldehyd- absplattung	
	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$(k_{\text{cat}})^{\text{red}}$	$k_2$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$(k_2)^{\text{red}}$	$k_3$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$(k_3)^{\text{red}}$	$k_4$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$(k_4)^{\text{red}}$
4- $\text{CH}_3\text{O-Bf}$	$0.87 \pm 0.02$	13	<b>1.5</b>	12	<b>2.32</b>	$\geq 40$	21	1.8
4-H-Bf	$11.6 \pm 0.31$	-	18.5	-	$\geq 93$	-	37	-
4-Br-Bf	$0.79 \pm 7.5 \cdot 10^{-3}$	14	<b>2.1</b>	9	$\geq 6.5$	-	<b>1.6</b>	23

Wie aus der Tab. 12 ersichtlich wird, scheint die Bindung der Substrate von den elektronischen Eigenschaften des Substituenten unbeeinflusst zu sein ( $k_2$  ähnlich erniedrigt). Der unterschiedliche Einfluss der elektronischen Eigenschaften der Substituenten spiegelt sich vielmehr in der Decarboxylierungsreaktion und in der Produktabsplattung wider. Die elektronenziehenden Substituenten erleichtern im Vergleich zu den elektronendrückenden

Substituenten die Decarboxylierungsreaktion, so dass deren  $k_2$  weniger reduziert ist. Dies lässt sich damit erklären, dass die elektronegativen Substituenten besser zur Stabilisierung des bei der Decarboxylierung entstehenden  $\alpha$ -Carbanions beitragen können. Der unterschiedliche Einfluss der elektronischen Eigenschaften der Substituenten auf die Produktabspaltung ist in Abb. 30 dargestellt. Während elektronendrückende Substituenten die Aldehydfreisetzung erleichtern, erschweren elektronenziehende Substituenten diese.



**Abb. 30:** Einfluss elektronenziehender Substituenten auf die Umsetzung 4-substituierter Benzoylformiate.  
Es ist der elektronische Effekt einer elektronenziehenden Gruppe am Beispiel der Nitrogruppe dargestellt.

Die Umsetzung 4-substituierter Benzoylformiate wurde auch für die Pyruvatdecarboxylase aus *Saccharomyces cerevisiae* (Lehmann *et al.*, 1973; Hübner *et al.*, 1986) und die Benzoylformiatdecarboxylase aus *Pseudomonas putida* untersucht (Weiss *et al.*, 1988; Sergienko *et al.*, 2000). In der ScPDC binden, ähnlich wie in EcIPDC, alle 4-substituierten Benzoylformiate mit einer scheinbar höheren Affinität an das Enzym ( $K_M$ -Werte kleiner). Unterschiede bestehen in der Auswirkung der Substituenten auf die katalytische Aktivität. In der ScPDC zeigen die mit elektronenziehenden Substituenten substituierten Benzoylformiate eine höhere und elektronendrückende Substituenten eine niedrigere Umsatzrate im Vergleich zu unsubstituiertem Benzoylformiat. Dabei besteht ein linearer Zusammenhang von  $\log(k_{cat})$  und der Substituentenkonstante. Je stärker der elektronenziehende Effekt, desto größer ist  $k_{cat}$ . In der ScPDC zeigt sich der Einfluss der Substituenten somit direkt auf die gemessene katalytische Aktivität. Unter der Annahme, dass die Decarboxylierungsreaktion durch den Elektronenzug am Carbonylkohlenstoffatom des Substrates beschleunigt und die Protonierung des  $\alpha$ -Carbanion/Enamins (Aldehydabspaltung) verlangsamt ist, scheint in der Umsetzung 4-substituierter

Benzoylformiate durch die *ScPDC* somit die Decarboxylierungsreaktion partiell geschwindigkeitsbestimmend zu sein.

WEISS *et al.* (1988) fanden durch die Analyse der  $^{13}\text{C}$ -Isotopieeffekte heraus, dass, wie auch in der *EcIPDC*-katalysierten Umsetzung 4-substituierter Benzoylformiate, der geschwindigkeitsbestimmende Schritt durch die Veränderung der elektronischen Natur des Substituenten beeinflusst wird. In der BFD-Reaktion ist die ermittelte katalytische Aktivität umso kleiner, je stärker der elektronendrückende bzw. -ziehende Effekt des Substituenten ist. Dabei stabilisieren die elektronenziehenden Substituenten das intermediäre  $\alpha$ -Carbanion und die Geschwindigkeitskonstanten der Decarboxylierungsreaktion sind erhöht. Elektronendonatorsubstituenten destabilisieren dagegen das  $\alpha$ -Carbanion. Sie stabilisieren vielmehr das tetraedrale Intermediat  $I_1$ , was sich in einer signifikant verlangsamten Geschwindigkeitskonstante der Decarboxylierung äußert. Der Einfluss der elektronischen Eigenschaften der Substituenten auf die Katalyse ist somit für die BFD und die *EcIPDC* ähnlich und für *ScPDC* unterschiedlich.

### 3.4.3. Vorgeschlagerener Katalysemechanismus der *EcIPDC*

Die präsentierten kinetischen Untersuchungen zeigen, dass der Katalysemechanismus der *EcIPDC* dem anderer ThDP-abhängiger Decarboxylasen ähnlich ist. Die einzelnen mikroskopischen Teilschritte der *EcIPDC*-Katalyse werden nachfolgend dargestellt. Der Einfluss wichtiger AS-Reste im aktiven Zentrum der *EcIPDC* wird diskutiert.

#### *Schritt 1: Aktivierung des Cofaktors (Ylidbildung).*

Der initiale Schritt der Katalyse ist die Deprotonierung des C2-H-Atoms des Thiazoliumrings. Dabei ist die 4'-Amino-Gruppe, die während der Katalyse als intramolekulares Protonenrelais agiert, an der Abstraktion des Protons vom C2-Atom beteiligt. Dabei führt die Wechselwirkung des hoch konservierten Glu52 zur Protonierung des N1'-Atoms des Cofaktors (Abb. 31). Als Folge dieser Azidifizierung des Aminopyrimidinringsystems kommt es zur Ausbildung eines Iminotautomers (Jordan *et al.*, 2003).

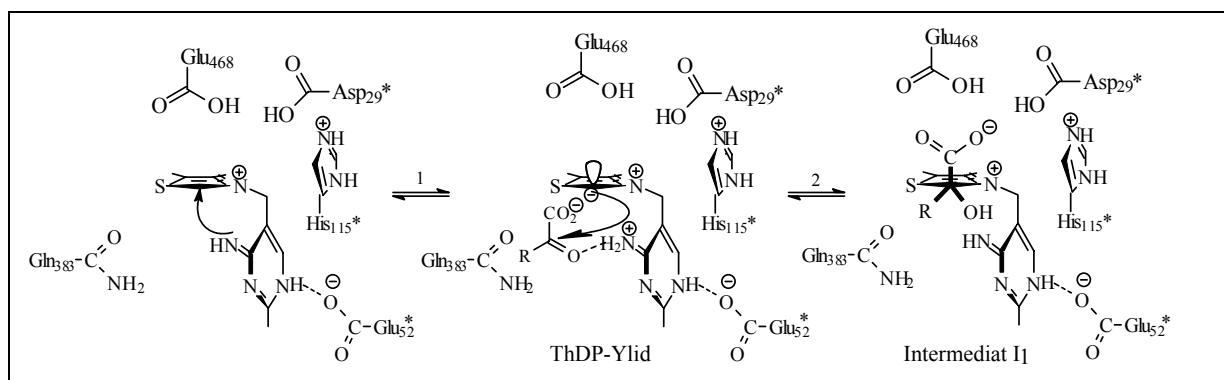
#### *Schritt 2: C-C-Bindungsbildung.*

Das Substrat ist zunächst in einer *docking*-Position im aktiven Zentrum der *EcIPDC* gebunden. Dabei erfolgt die räumliche Orientierung des Substrates durch die Wechselwirkung mit bestimmten AS-Seitenketten. Die Untersuchung verschiedener *EcIPDC*-Varianten weist auf die Beteiligung der AS-Seitenkette Glu468 bei der Bindung von allen drei untersuchten

Substraten hin. Im Falle der Bindung des Benzoylformiates spielt neben diesem AS-Rest vor allem das Asp29 eine wichtige Rolle. Diese AS-Reste gehen dabei wahrscheinlich eine Wechselwirkung mit der Carboxylgruppe des Substrates ein (Abb. 31, Abb. 32).

Auch der AS-Rest Gln383 beeinflusst die Bindung des Indolpyruvates und des Pyruvates. Erfolgt ein Austausch dieser Aminosäure gegen einen Threonin-Rest, bindet die so generierte *pseudo*-PDC diese Substrate besser. Bei der Umsetzung von Benzoylformiat dagegen bewirkt der Austausch des Gln383 eine schlechtere Bindung. Dies spricht für eine Rolle dieses AS-Restes bei der Differenzierung von Indolpyruvat und Pyruvat auf der einen und Benzoylformiat auf der anderen Seite. In diesem Zusammenhang sei nochmals darauf hingewiesen, dass sich Benzoylformiat unter anderem durch das Fehlen einer dem Carbonylkohlenstoffatom benachbarten aliphatischen CH<sub>2</sub>-Gruppe vom Indolpyruvat und Pyruvat unterscheidet.

Ist das Substrat optimal positioniert, greift das C2-Carbanion des ThDP nukleophil am Carbonylkohlenstoffatom des Substrates an (Abb. 31). Das tetrahedrale Intermediat I<sub>1</sub> entsteht. Im Falle der Umsetzung von Indolpyruvat entspricht dies dem 2-(2-Indolyl-lactyl)-ThDP (IndLThDP). Bei der Verwendung der Substrate Pyruvat bzw. Benzoylformiat wird das 2-Lactyl-ThDP (LThDP) bzw. das 2-Mandelyl-ThDP (MThDP) gebildet.



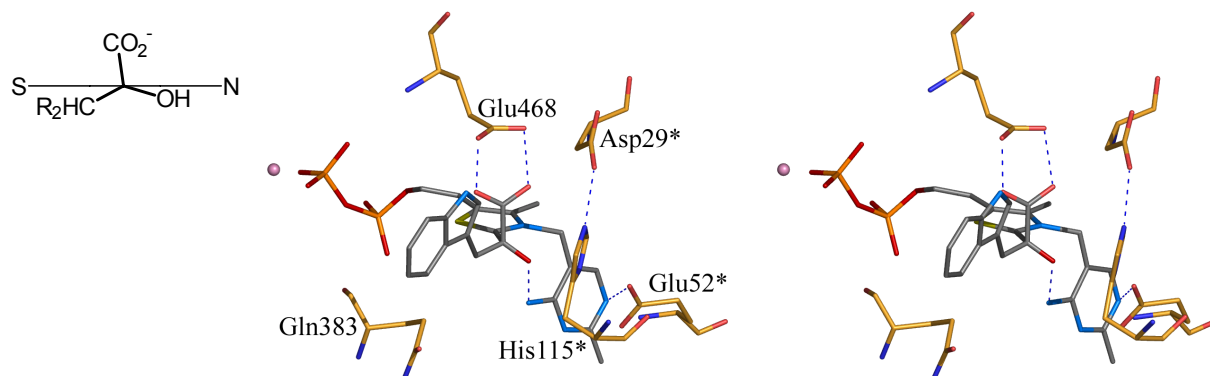
**Abb. 31:** *Möglicher Mechanismus der Substratbindung in EcIPDC. Die mit (\*) markierten Reste stammen von der anderen Untereinheit im funktionellen Dimer. Das tetrahedrale ThDP-Addukt ist in der 1'-4'-Iminopyrimidin-tautomeren Form gezeigt, welche durch die N1'-Glutamat-Interaktion stabilisiert ist (Nemeria et al., 2004).*

Die Bindung aller drei Substrate an das C2-Atom des ThDP scheint zudem durch die N1'-Glutamat-Interaktion beeinflusst zu sein. Die im Vergleich zum Wildtypenzym ähnlich reduzierten mikroskopischen Geschwindigkeitskonstanten  $k_2$  der *EcIPDC*-Variante Glu<sup>52</sup>Asp deuten darauf hin, dass diese Wechselwirkung einen Schritt beeinflusst, der für alle drei Substrate identisch ist (Tab. 10, S. 74). Die durch die N1'-Glu52-Wechselwirkung aktivierte

4'-Aminogruppe des Cofaktors könnte somit während der Substratbindung das Carbonylsauerstoffatom des Substrates protonieren (Abb. 31). Es sei festgehalten, dass die Bildung des kovalenten ThDP-Substratadduktes unabhängig von der Art des Substrates in der Katalyse des Wildtypenzym der *EcIPDC* partiell geschwindigkeitsbestimmend ist.

*Schritt 3: Decarboxylierung.*

Bevor es zur Abspaltung des Kohlendioxids kommen kann, wird die abzusplattende Carboxylgruppe des Substrates optimal orientiert (stereochemische Kontrolle). Modellstudien und Untersuchungen im nichtenzymatischen System favorisieren dabei eine zum Thiazoliumring senkrechte Anordnung der Carboxylgruppe (Kluger, 1987; Lobell & Crout, 1996). Im Falle der Umsetzung von Indolpyruvat durch die *EcIPDC* könnte die AS-Seitenkette des Glu468 eine Wasserstoffbrückenbindung zur Carboxylgruppe des Substrates ausbilden. Die orientierende Wechselwirkung wird in Abb. 32 verdeutlicht. Während der Decarboxylierungsreaktion von Pyruvat ist neben dem Glu468 vor allem das His115 beteiligt. In der Umsetzung von Benzoylformiat scheinen dagegen die AS-Reste Asp29, Glu468 und His115 einen Einfluss auf die Decarboxylierung zu haben (Tab. 10).



**Abb. 32:** *Stereobild des modellierten IndLThDP im aktiven Zentrum der EcIPDC. Das gebundene IndLThDP ist entsprechend Lobell & Crout (1996) in seiner S-Konfiguration modelliert worden (grau). Die mit (\*) markierten Reste stammen von der anderen Untereinheit im funktionellen Dimer. Die gestrichelten Linien sind zwischen den Resten gezeigt, die im Wasserstoffbrückenbindungsabstand sind. Das gebundene  $Mg^{2+}$  ist durch eine rosa Kugel dargestellt. Die Abbildung wurde mit dem Programm PYMOL erstellt (DeLano, 2002).*

Bei der Abspaltung des Kohlendioxids vom Intermediat  $I_1$  verbleibt das Bindungselektronenpaar am Carbonylkohlenstoffatom. Das Intermediat  $I_2$  entsteht. Im Falle der Umsetzung von Indolpyruvat entspricht dies der  $\alpha$ -Carbanion/Enamin-Form des 2-(2-Indolyl-1-hydroxyethyl)-ThDP (IndHETThDP) (Abb. 33). Im Falle der Umsetzung der Substrate Pyruvat bzw.

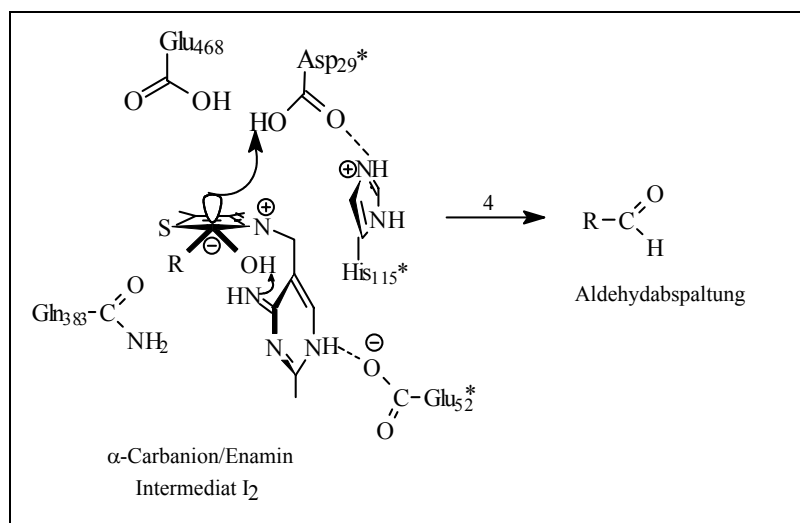


Benzoylformiat wird die  $\alpha$ -Carbanion/Enamin-Form des 2-(1-Hydroxyethyl)-ThDP (HEThDP) bzw. des 2-(1-Hydroxybenzyl)-ThDP (HBzThDP) gebildet.

*Schritt 4: Produktabspaltung.*

Die Aldehydabspaltung ist, unabhängig von der Art des Substrates, in der Katalyse des Wildtypenzym der *EcIPDC* partiell geschwindigkeitsbestimmend. Die Protonierung des  $\alpha$ -Carbanion/Enamins, die Ionisierung der  $C\alpha$ -Hydroxylgruppe des Substrates und die C-C-Bindungsspaltung zwischen dem C2-Atom des ThDP und dem  $C\alpha$ -Atom des Substrates führen zur Freisetzung des Produktes, des entsprechenden Aldehyds (IPyr, Indolacetaldehyd; Pyr, Acetaldehyd; Bf, Benzaldehyd). Dabei ist die kinetische Signifikanz der einzelnen Schritte, die zur Produktfreisetzung führen, für die untersuchten Substrate unterschiedlich.

Die Produktfreisetzung ist vor allem durch den AS-Rest Asp29 beeinflusst. Der Austausch dieses AS-Restes gegen ein Glutamat, dessen Seitenkette um eine  $CH_2$ -Gruppe verlängert ist, verhindert dabei im Falle der Umsetzung von Indolpyruvat die Aldehydabspaltung. Eine Rolle des Asp29 bei der Protonierung des  $\alpha$ -Carbanion/Enamins ist somit denkbar (Abb. 33).

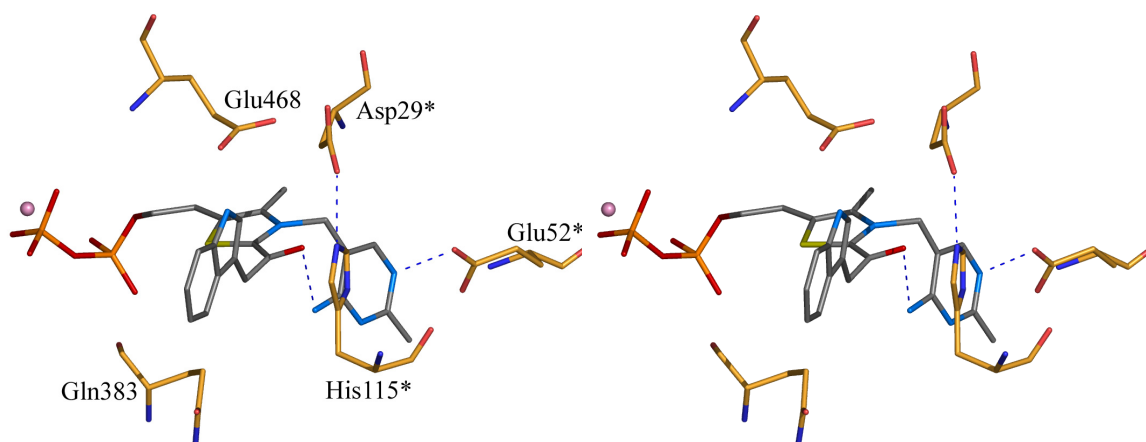


**Abb. 33:** *Möglicher Mechanismus der Aldehydabspaltung in EcIPDC. Die mit (\*) markierten Reste stammen von der anderen Untereinheit im funktionellen Dimer. Erläuterungen siehe Text.*

Bei der Freisetzung des in der Umsetzung von Pyruvat entstehenden Acetaldehyds ist eine funktionelle Asp29/His115-Duade, wie sie auch für die *ZmPDC* beschrieben wurde (Tittmann *et al.*, 2003), zu finden. Die Analyse der Kristallstruktur zeigte, dass zwischen Asp29 und His115 eine potentielle Wasserstoffbrückenbindung besteht (Abb. 34). Die Wirkung eines Protonrelais bei den Protonentransferschritten ist deshalb möglich. Die Wechselwirkung

könnte aber auch eine optimale Ausrichtung des Asp-Restes bewirken, was für die effektive Protonierung des  $\alpha$ -Carbanion/Enamins notwendig ist. Bei der Indolacetaldehydabspaltung spielen neben dem AS-Rest Asp29 auch das Glu468 und das Gln383 eine Rolle. Letzterer AS-Rest scheint die Produktabspaltung infolge eines sterischen Einflusses zu verlangsamen. Die Benzaldehydabspaltung ist neben dem AS-Rest Asp29 durch das His115 und das Glu468 beeinflusst.

Die durch die N1'-Glutamat-Interaktion aktivierte 4'-Aminogruppe des ThDP ist, wie bereits schon erwähnt, bei der Protonierung des Carbonylsauerstoffatoms des Substrates beteiligt. Im Sinne der mikroskopischen Reversibilität ist es möglich, dass diese Interaktion auch bei der Produktabspaltung von Bedeutung ist. Hinsichtlich der Umsetzung von Pyruvat durch die EcIPDC scheint dies der Fall zu sein. Die durch die N1'-Glu52-Interaktion aktivierte 4'-Iminogruppe des Cofaktors könnte die C $\alpha$ -Hydroxylgruppe des Substrates deprotonieren und somit bei der Acetaldehydfreisetzung assistieren (Abb. 33, Abb. 34). Bei der Abspaltung der aromatischen Aldehyde dagegen, scheint diese Wechselwirkung einen geringeren kinetischen Einfluss zu haben. Dies könnte, wie schon angedeutet, auf die unterschiedliche kinetische Signifikanz der Schritte der Produktfreisetzung zurückgeführt werden.



**Abb. 34:** *Stereobild der modellierten  $\alpha$ -Carbanion/Enamin-Form des IndHETHDP im aktiven Zentrum der EcIPDC. Die mit (\*) markierten Reste stammen von der anderen Untereinheit im funktionellen Dimer. Die gestrichelten Linien sind zwischen den Resten gezeigt, die im Wasserstoffbrückenbindungsabstand sind. Das gebundene  $Mg^{2+}$  ist durch eine rosa Kugel dargestellt. Die Abbildung wurde mit dem Programm PYMOL erstellt (DeLano, 2002).*

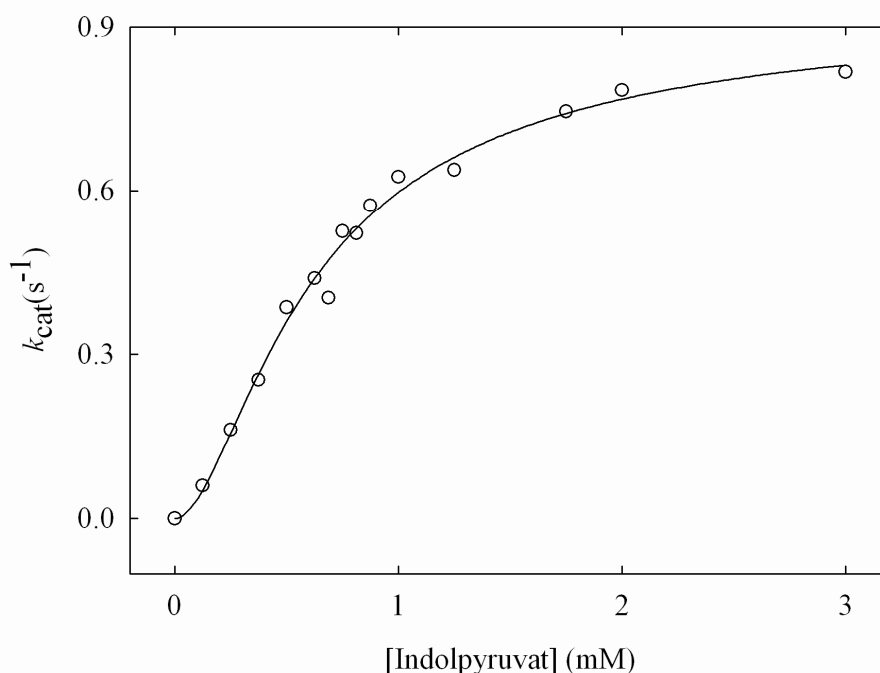
Es sei nochmals darauf hingewiesen, dass mit der  $^1H$ -NMR-Methode nicht zwischen dem gebildeten  $\alpha$ -Carbanion/Enamin und der entsprechenden konjugierten Säure differenziert werden kann. Deshalb kann nicht eindeutig festgelegt werden, welche der genannten Gruppen

im aktiven Zentrum der *EcIPDC* bei der Protonierung des  $\alpha$ -Carbanion/Enamins und bei der Deprotonierung der C $\alpha$ -Hydroxylgruppe des Substrates beteiligt sind.

### 3.4.4. Decarboxylierung von Indolpyruvat durch *ZmPDC* und *ScPDC*

Die Kristallstruktur der *EcIPDC* weist Ähnlichkeiten zur Struktur verschiedener Pyruvatdecarboxylasen auf. Die *EcIPDC* und die *ScPDC* teilen dabei eine offene Topologie der Substratbindungstasche. *ZmPDC* und *EcIPDC* ähneln sich in der Anordnung der Dimere im Tetramer. Nachfolgend wurde überprüft, ob solche strukturell ähnlichen Pyruvatdecarboxylasen wie die PDC aus *Zymomonas mobilis* und *Saccharomyces cerevisiae* das für die *EcIPDC* physiologische Substrat Indolpyruvat umsetzen können.

In Abb. 26 (S. 76) ist die Superposition der aktiven Zentren von *EcIPDC* und *ScPDC* dargestellt. Durch die offene Topologie des aktiven Zentrums sollte die *ScPDC* in der Lage sein, Indolpyruvat zu binden und zu decarboxylieren. Die kinetischen Untersuchungen bestätigten, dass die *ScPDC* Indolpyruvat umsetzen kann. Die *ScPDC* zeigt dabei eine sigmoide Abhängigkeit der katalytischen Aktivität von der Konzentration an Indolpyruvat (Abb. 35).

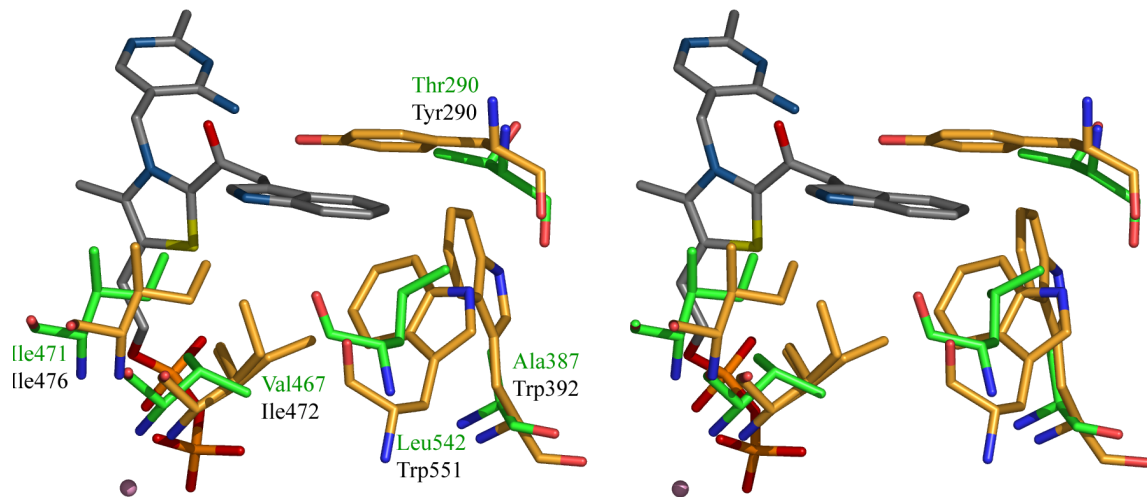


**Abb. 35:** *Abhängigkeit der katalytischen Aktivität der ScPDC von der Konzentration an Indolpyruvat.*  
Die Messungen wurden bei 30 °C durchgeführt. Der Messansatz enthielt 90  $\mu\text{g/mL}$  ScPDC in 0.1 mM Mes/NaOH pH 6.5 (Kreise: experimentelle Daten, Linie: Anpassung an Substrataktivierungskinetik entsprechend Krieger et al., 2002).

Aus der Anpassung der Messdaten an eine Substrataktivierungskinetik resultiert ein  $k_{\text{cat}}$ -Wert von  $0.95 \pm 0.06 \text{ s}^{-1}$  und ein  $S_{0.5}$ -Wert von  $0.7 \text{ mM}$ . Während die *ScPDC* eine sigmoide Abhängigkeit der Aktivität von der Substratkonzentration zeigt, folgt die *EcIPDC* einer hyperbolen Michaelis-Menten-Kinetik (siehe Abb. 40 im Anhang). Dabei bindet die *EcIPDC* das Indolpyruvat sehr spezifisch ( $K_M = 20 \text{ }\mu\text{M}$ ). Die *ScPDC* besitzt gegenüber Indolpyruvat eine ähnliche Affinität wie zu ihrem physiologischen Substrat Pyruvat ( $S_{0.5}$ -Wert von  $1.1 \text{ mM}$  bei pH 6.0; Krieger *et al.*, 2002). Die katalytische Aktivität der *ScPDC* gegenüber Indolpyruvat ist verglichen zum Pyruvat relativ schlecht (nur 1-2 %;  $k_{\text{cat}}$  für Pyr =  $60 \text{ s}^{-1}$ ). Allerdings ist der für die *ScPDC* ermittelte  $k_{\text{cat}}$ -Wert der Umsetzung von Indolpyruvat dem der *EcIPDC* ( $0.98 \pm 0.02 \text{ s}^{-1}$ ) nahezu identisch. In der *EcIPDC* scheint somit im Vergleich zur *ScPDC* vor allem die Affinität und Spezifität ( $K_M$ ) für das aromatische Substrat Indolpyruvat optimiert zu sein. In der *ScPDC*-Katalyse des physiologischen Substrates Pyruvat dagegen, ist eine Optimierung gegenüber  $k_{\text{cat}}$  zu beobachten.

Die Analyse der Raumstruktur der *ZmPDC* zeigt im Vergleich zu anderen ThDP-abhängigen Decarboxylasen eine verkleinerte Substratbindungstasche (Dobritzsch *et al.*, 1998). Die Topologie des aktiven Zentrums der *ZmPDC* favorisiert somit die Umsetzung kleiner aliphatischer Substrate. Untersuchungen verschiedener AS-Austauschvarianten der *ZmPDC* zeigten, dass unter anderem die AS-Reste Ile472 und Ile476 im aktiven Zentrum eine Auswirkung auf die Substratspezifität der *ZmPDC* haben (Abb. 36). Während das Wildtypenzym der *ZmPDC* nicht in der Lage ist Benzoylformiat zu decarboxylieren, zeigt die Doppelvariante Ile<sup>472</sup>Ala/Ile<sup>476</sup>Phe in der Umsetzung von Benzoylformiat 25 % der Aktivität im Vergleich zum physiologischen Substrat Pyruvat (Siegert *et al.*, 2004). BRUHN *et al.* (1995) zeigten, dass die Mutation des Trp392 gegen den weniger voluminösen AS-Rest Alanin in einer erhöhten Produktion von Carboligaseprodukten resultiert.

Die Umsetzung von Indolpyruvat durch die *ZmPDC* sollte aus sterischen Gründen nicht möglich sein. Diese Annahme wurde bereits von Sprenger *et al.* (1999) bestätigt. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen der Umsetzung von Indolpyruvat bei höheren *ZmPDC*-Konzentrationen resultierten im gleichen Ergebnis. Die Abb. 27 (S. 77) veranschaulicht, dass im aktiven Zentrum der *ZmPDC* eine Reihe voluminöser AS-Seitenketten vorhanden sind, die die Größe der Substratbindungstasche reduzieren. In allen IPDC-Sequenzen sind diese voluminösen Aminosäurereste durch kleinere ausgetauscht (Abb. 36 und Abb. 27) (Tyr290→Thr290, Trp551→Leu542 und Trp392→Ala387).



**Abb. 36:** *Stereobild der Superposition der aktiven Zentren von EcIPDC und ZmPDC. Die grün dargestellten Reste beziehen sich auf die EcIPDC, die gelben auf ZmPDC. Die Abbildung veranschaulicht die Restriktion der Substratbindungstasche in ZmPDC (IZPD, Dobritzsch et al., 1998). Das modellierte ThDP-gebundene intermediäre  $\alpha$ -Carbanion/Enamin (grau) der Umsetzung von IPyr ist einbezogen. Das Ile472 der ZmPDC besitzt eine Doppelkonformation. Das  $Mg^{2+}$ -Ion ist durch eine rosa Kugel dargestellt. Die Abbildung wurde mit dem Programm PYMOL erstellt (DeLano, 2002).*

Da die raumfüllenden AS-Reste Trp392, Tyr290 und Trp551 in ZmPDC und in pflanzlichen Pyruvatdecarboxylasen konserviert sind (siehe Abb. 7, Kapitel 3.3.1.), ist es möglich, dass auch pflanzliche Pyruvatdecarboxylasen eine Restriktion des aktiven Zentrums zeigen und somit nicht in der Lage sind, Indolpyruvat umzusetzen. Für die Synthese von Indolessigsäure wären dann andere, spezifischere Enzyme notwendig. Dabei ist die Beteiligung einer pflanzlichen IPDC nicht auszuschließen. In Analogie dazu sei die Vermutung geäußert, dass einige der ScPDC homologen Pyruvatdecarboxylasen aus verschiedenen Hefen und Bakterien ebenfalls eine IPDC-Aktivität besitzen könnten und Indolpyruvat umsetzen (siehe Abb. 7).

### 3.5. Weitere Aspekte der EcIPDC-Katalyse

Im folgenden Kapitel werden weiterführende Aspekte der EcIPDC aufgeführt. Dabei werden die Eigenschaften der EcIPDC mit denen anderer ThDP-abhängiger Enzyme verglichen.

#### Stereochemische Aspekte

Die ermittelten kinetischen Konstanten weisen darauf hin, dass die Wechselwirkung der AS-Seitenkette von Glu52 mit dem N1'-Atom im Sinne einer Aktivierung der 4'-Aminogruppe des Cofaktors für die Substratbindung notwendig ist. Diese Beobachtung favorisiert die Ausbildung einer S-Konfiguration des tetrahedralen ThDP-Substratadduktes, in der sich

die 4'-Amino/Iminogruppe des Cofaktors in räumlicher Nähe zur Hydroxylgruppe des Substrates befindet. Diese räumliche Anordnung würde somit die Protonierung der Carbonylgruppe des Substrates während der Substratbindung erklären. Entsprechende Modellstudien der Hefe-PDC unterstützen diese Aussagen (Lobell & Crout, 1996). Zudem würde die putative S-Konfiguration des Intermediates  $I_1$  in einer räumlichen Nähe der Methylgruppe des Substrates zur Seitenkette des Gln383 resultieren, was die veränderte Substratspezifität der entsprechenden AS-Austauschvariante erklären würde (siehe auch Abb. 32, S. 88).

### Carboligasereaktion

Analysiert man die Raumstruktur der *EcIPDC*, ist eine Carboligasenebenreaktion im Falle des physiologischen Substrates Indolpyruvat aufgrund sterischer Effekte unwahrscheinlich. Eine Carboligasereaktion bei der Umsetzung von Pyruvat und Benzoylformiat ist dagegen denkbar. Im *steady state* der Umsetzung von Indolpyruvat, Pyruvat und Benzoylformiat durch die *EcIPDC* wurden in den  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren jedoch keine ThDP-Addukte identifiziert, die durch eine Carboligasereaktion gebildet werden würden. Bei der Anwendung der analytisch sensitiven Methode der HPLC-Produktanalyse im Rahmen der Aktivitätsmessungen von Indolpyruvat und Pyruvat (Koga *et al.*, 1992) wurden ebenfalls keine entsprechenden Produkte erwähnt. Genauere Untersuchungen stehen allerdings noch aus.

Für das Wildtypenzym der *ScPDC* macht diese Nebenreaktion 1 % der Gesamtreaktion aus. Studien von AS-Austauschvarianten zeigten, dass die Mutation des Asp28 gegen einen neutralen AS-Rest wie Alanin oder Asparagin, eine Steigerung der Synthese an Carboligaseprodukten zur Folge hat (Sergienko & Jordan, 2001<sub>a</sub>). Dabei ist durch die fehlende Seitenkette des Aspartats die Protonierung des intermediären  $\alpha$ -Carbanion/Enamin verhindert, was den Angriff eines zweiten Substratmoleküls ermöglicht und in der Synthese von Carboligaseprodukten resultiert (Tittmann *et al.*, 2003). Die Mutation des Asp27 führt auch im Falle der *ZmPDC* zu einer erhöhten Synthese von Carboligaseprodukten wie Acetolactat (Wu *et al.*, 2000). Im aktiven Zentrum der Acetohydroxysäuresynthase, die Acetolactat als Produkt bildet, fehlen der Aspartat- und Histidin-Rest im aktiven Zentrum. Die Möglichkeit eine Protonierung des  $\alpha$ -Carbanion/Enamins des HETHDP ist somit nicht gegeben. Ein zweites Pyruvatmolekül kann angreifen und das Carboligaseprodukt Acetolactat wird gebildet (Tittmann *et al.*, 2004). Eine Analyse entsprechender AS-Austauschvarianten der *EcIPDC* (Asp<sup>29</sup>Ala, Asp<sup>29</sup>Asn) sei in diesem Zusammenhang vorgeschlagen.

### Substratspezifität

Die *EcIPDC* decarboxyliert neben dem physiologischen Substrat Indolpyruvat auch Pyruvat und Benzoylformiat. Über eine mögliche physiologische Bedeutung dieser Eigenschaft der *EcIPDC* ist nichts bekannt.

An dieser Stelle sei auf die Arbeiten von KOGA *et al.* (1992) hingewiesen. Diese zeigen, dass  $\beta$ -Phenylpyruvat nicht decarboxyliert wird und ein kompetitiver Inhibitor der *EcIPDC* ist. Da die *EcIPDC* jedoch sowohl Pyruvat als auch Benzoylformiat umsetzen kann, ist es nicht ersichtlich, warum Phenylpyruvat kein Substrat der *EcIPDC* ist. Eine mögliche Erklärung dieser Ergebnisse liegt in der Keto-Enol-Tautomerie von Phenylpyruvat. Diese Substanz liegt in saurer und neutraler wässriger Lösung in seiner Enolform vor. Eine spontane Tautomerisierung in die Ketoform erfolgt nur in wässrig-basischer Lösung (Sciacovelli *et al.*, 1977).

$^1\text{H}$ -NMR-spektroskopische Untersuchungen bestätigten, dass Phenylpyruvat unter den Messbedingungen (pH 6.5) ausschließlich in seiner Enolform vorliegt (Schütz & Tittmann, Spektren nicht gezeigt). Das enolische Phenylpyruvat kann zwar in der *docking*-Position im aktiven Zentrum der *EcIPDC* gebunden werden und somit als kompetitiver Inhibitor agieren, aber eine kovalente Substratbindung und eine Decarboxylierung erfolgt nur mit der Ketoform.

Entsprechende Experimente unter Nutzung einer Tautomerase könnten weitere Erkenntnisse liefern (Knox & Pitt, 1957).

### Freisetzung des Kohlendioxids

Inwieweit die AS-Reste im aktiven Zentrum der *EcIPDC* an der Freisetzung des zweiten Produktes, dem Kohlendioxid, beteiligt sind, ist spekulativ. Bislang wurde die Theorie vertreten, dass das gebildete Kohlendioxid aus dem aktiven Zentrum diffundiert und keinen weiteren Einfluss auf die Katalyse hat. Die Kristallstrukturen der Pyruvat:Ferredoxinoxidoreduktase aus *Desulfovibrio africanus* mit einem Kohlendioxid im aktiven Zentrum (1KEK; Chabrière *et al.*, 2001) und die bislang noch nicht veröffentlichte Struktur der Benzoylformiatdecarboxylase aus *Pseudomonas putida* mit gebundenem Bicarbonat/Carbonat sprechen für einen möglichen Einfluss des Kohlendioxids auf spätere Katalyseschritte, insbesondere auf die Aldehydfreisetzung. Im Falle der BFD sind die AS-Reste Ser26, His70 und His281 an der Bindung des Bicarbonats beteiligt (McLeish *et al.*, 2004). Weiterführende Publikationen zu dieser Thematik werden erwartet.

### Konformationsänderungen in der Katalyse

Die präsentierten kinetischen Daten der *EcIPDC* sprechen für eine Rolle der AS-Seitenketten von Asp29 und Glu383 in der Katalyse. Die Analyse der Röntgenkristallstruktur zeigte jedoch, dass diese Seitenketten im Grundzustand weg vom Reaktionszentrum gerichtet sind (Abb. 18, S. 55). Eine Konformationsänderung während der Katalyse ist daher wahrscheinlich. Welches Ausmaß diese Änderungen haben und welche anderen AS-Reste dabei involviert sind, könnte durch die Bestimmung einer Struktur mit gebundenem Intermediat geklärt werden. Die Bemühungen in dieser Hinsicht blieben bislang jedoch ohne Erfolg. In diesem Zusammenhang sei ein „soaking“-Experiment der Kristalle der *EcIPDC*-Variante Asp<sup>29</sup>Glu mit dem physiologischen Substrat Indolpyruvat vorgeschlagen, da diese Variante ein stabiles Intermediat (das  $\alpha$ -Carbanion/Enamin des IndHET<sub>h</sub>DP) bildet. Alternativ könnte eine Cokristallisation mit dem Intermediatanalogon Thiaminthiazolondiphosphat versucht werden. Beim Thiaminthiazolondiphosphat ist das C2-H-Proton des Thiazoliumrings durch ein Sauerstoffatom ersetzt. Die Ladungsverteilung in dessen Resonanzstrukturen entspricht somit der des  $\alpha$ -Carbanion/Enamin-Intermediates (Shin & Kim, 1986).

An dieser Stelle sei nochmals die schwache Wechselwirkung der Seitenkette des Asp29 mit Asn550, einem Rest der C-terminalen Helix, erwähnt. Welche Auswirkungen die Dynamik der C-terminalen Helix auf die Topologie des aktiven Zentrums während der *EcIPDC*-Katalyse hat, und inwieweit eine Beteiligung des Asn550 an der primären Substratbindung und an der Produktfreisetzung denkbar ist, ist spekulativ. Eine Studie von C-terminalen Deletionsvarianten, wie sie auch für die *ZmPDC* durchgeführt wurden (Chang *et al.*, 2000), könnte weitere Erkenntnisse liefern.

Das Auftreten von Konformationsänderung wurde auch für die Katalyse anderer ThDP-abhängiger Enzyme beschrieben. Einige entsprechende Kristallstrukturen, die diese Aussage belegen, werden nachfolgend vorgestellt.

Die Analysen der Strukturen der E1-Komponente der verzweigtkettigen  $\alpha$ -Ketosäuredehydrogenase aus *Thermus thermophilus* weisen auf Konformationsänderungen während der Bildung des ES-Komplexes hin (Nakai *et al.*, 2004). Dabei sind die AS-Reste der mobilen Region an der Erkennung der Carboxylgruppe des Substrates beteiligt. In der Kristallstruktur der Benzoylformiatdecarboxylase aus *Pseudomonas putida* mit dem gebundenen Inhibitor R-Mandelat zeigt die Helix 460-470 zwei verschiedene Konformationen, wobei die Änderung der Lage der gesamten Helix mit einer Veränderung der Konformation zweier AS-Reste



(W463 und F464) einhergeht, was zur besseren Bindung des Substrates/Inhibitors führt (Polovnikova *et al.*, 2003). Die Untersuchung der Strukturen der E1-Komponente des Pyruvatdehydrogenasekomplexes aus *E. coli* zeigt, dass, wenn statt dem ThDP der Inhibitor Thiaminthiazolondiphosphat gebunden ist, sich die Konformation und Position einiger Aminosäurereste im aktiven Zentrum ändert. In der Raumstruktur mit diesem gebundenem Intermediat analogon ist eine Modifikation der Hydratisierungsstellen und der V-Konformation des Cofaktors zu beobachten, und die Anzahl an potentiellen Wasserstoffbrückenbindungen ist erhöht. Die dabei beteiligten AS-Reste sind nicht konserviert (Arjunan *et al.*, 2004).

Es gibt aber auch Strukturen ThDP-abhängiger Enzyme, die eine Konformationsänderung eher unwahrscheinlich erscheinen lassen. Die Struktur der Transketolase aus *Saccharomyces cerevisiae* mit gebundenem Thiaminthiazolondiphosphat zeigt beispielsweise keine signifikanten Änderungen im Vergleich zur Raumstruktur mit ThDP (Nilsson *et al.*, 1993). Auch die Raumstruktur dieses Enzyms mit dem wahren  $\alpha$ -Carbanion/Enamin (Dihydroxyethyl-ThDP) zeigt keine Veränderungen. Dabei ist das Intermediat in seiner planaren  $sp^2$ -hybridisierten Enamin-Form stabilisiert (Fiedler *et al.*, 2002).

Auf die mögliche Bedeutung von Konformationsänderungen während der Katalyse wird im Folgenden eingegangen (in Anlehnung an Kluger, 1987; Schowen, 1998; Fersht, 2002; S.167; Arjunan *et al.*, 2004 und Frey *et al.*, 2004).

Es sind nur wenige Fälle dokumentiert, in denen die Proteinisomerisierung selbst der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist. Meist sind die Konformationsänderungen eines Proteins mit langsamen Reaktionsschritten verbunden. Dabei könnte die Bildung von Intermediaten und Übergangszuständen während der Katalyse die für die Konformationsänderungen notwendige Energie liefern. Enzyme können somit strukturelle Umorganisationen zur Kontrolle der Substratbindung und Produktfreisetzung nutzen. Dabei resultieren diese Strukturänderungen in veränderten Wasserstoffbrückenbindungen zwischen AS-Resten im aktiven Zentrum auf der einen und zwischen Enzym und Substrat/Intermediat/Produkt auf der anderen Seite. Da die Fähigkeit zur Wasserstoffbrückenbildung abhängig von der AS-Sequenz des entsprechenden Enzyms ist, sind die strukturellen Änderungen bei den verschiedenen ThDP-abhängigen Enzymen unterschiedlich, was sich in der Diversität ihrer Katalyse widerspiegelt. Während der Reaktionsmechanismus ThDP-abhängiger Enzyme bis hin zur Bildung des  $\alpha$ -Carbanion/Enamins ähnlich ist, entscheidet die Stabilität dieses Intermediates über den weiteren Reaktionsweg. Die Struktur des entsprechenden Enzyms und die

Natur des Substituenten am  $\alpha$ -Atom entscheiden dabei über den weiteren Verlauf der Reaktion. Im Gegensatz zum Reaktionsweg der Decarboxylasen müssen andere ThDP-abhängige Enzyme wie die Transketolase, die Acetohydroxysäuresynthase und die Pyruvatoxidase die Protonierung des  $\alpha$ -Carbanion/Enamins verhindern und das reaktive Intermediat stabilisieren, was die in der Reaktion folgende C-C-Bindungsbildung oder die Oxidation des Intermediates ermöglicht. Für die Decarboxylasen hingegen erfolgt im Schritt der Produktabspaltung die Übertragung eines Protons auf dieses Intermediat. Dabei repräsentieren das  $\alpha$ -Carbanion und das Enamin mesomere Strukturen, die sich hinsichtlich ihres Hybridisierungsgrades am  $\alpha$ -Atom unterscheiden. Die  $\alpha$ -Atome sind entweder  $sp^3$  (Carbanion, tetrahedrale Anordnung) oder  $sp^2$  (Enamin, planare Anordnung) hybridisiert. Hinsichtlich der in der Reaktion ThDP-abhängiger Decarboxylasen notwendigen Protonierung, wäre die Beibehaltung einer  $sp^3$  Hybridisierung des  $\alpha$ -Atoms nach erfolgter Decarboxylierung des tetrahedralen ThDP-Substratadduktes (ebenfalls  $sp^3$ , somit würde das Proton im gleichen Übergangszustand übertragen werden) sinnvoller als der Wechsel des Hybridisierungsgrades. Ein solcher Mechanismus würde somit eine Destabilisierung des Enamins bzw. eine Stabilisierung des energiereichen  $\alpha$ -Carbanions voraussetzen. Untersuchungen der Umsetzung des Übergangszustandanalogen (E)-4-(4-chlorophenyl)-2-keto-3-butenolat durch die Pyruvatdecarboxylase unterstützen diese Aussage. Dieses Übergangszustandanalogon wird zwar von der PDC gebunden und decarboxyliert, aber infolge der elektronischen Eigenschaft dieses Substrates, insbesondere die Stabilisierung der Enamin-Struktur, ist eine Protonierung nicht möglich und es kommt zu einer irreversiblen Inaktivierung des Enzyms (Kuo & Jordan, 1983<sub>a,b</sub>). Andererseits implizieren Modellstudien einen neutralen Übergangszustand, was dem Enamin entsprechen würde, in dem das Elektronenpaar delokalisiert vorliegt (Kluger, 1987; Schowen, 1998). Die bis jetzt noch nicht veröffentlichten Strukturen der Pyruvatoxidase aus *Aerococcus viridans* mit einem Intermediat der Umsetzung mit Pyruvat (Hossain *et al.*; 1V5G)<sup>14</sup> und die Raumstruktur der Benzoylformiatdecarboxylase aus *Pseudomonas putida* mit gebundenem Thiaminthiazolondiphosphat (Bera & Hasson; 1Q6Z) könnten in diesem Zusammenhang weitere interessante Ergebnisse hervorbringen.

---

<sup>14</sup> Hossain, M.T., Suzuki, K., Yamamoto, T., Imamura, S., Sekiguchi, T. & Takenaka, A. (2004) Crystal structure of pyruvate oxidase from *Aerococcus viridans* containing FAD, TPP and reaction intermediate with substrate pyruvate. unveröffentlicht.

## 4. Zusammenfassung

Die ThDP-abhängige Indolpyruvatdecarboxylase stellt in *Enterobacter cloacae* das Schlüsselenzym in der Biosynthese des Phytohormons Indolelessigsäure dar und katalysiert die nichtoxidative Decarboxylierung von Indolpyruvat zu Indolacetaldehyd und Kohlendioxid. Neben dem physiologischen Substrat werden auch Pyruvat und Benzoylformiat umgesetzt. Die aus den kinetischen Untersuchungen der Umsetzung dieser Substrate resultierende hyperbole Abhängigkeit der katalytischen Aktivität der *EcIPDC* von der Substratkonzentration und das Fehlen einer lag-Phase in den Produktbildungskurven lassen einen Substrataktivierungsmechanismus ausschließen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Raumstruktur des Holoenzym der *EcIPDC* mit einer Auflösung von 2.65 Å bestimmt. Die Röntgenkristallstrukturanalyse zeigte, dass die homotetramere *EcIPDC* in ihrem Aufbau anderen ThDP-abhängigen Enzymen ähnelt. So ist in jeder Untereinheit ein Molekül ThDP in einer V-Konformation gebunden. Die Monomere eines funktionellen Dimers sind dabei über zwei ThDP-Moleküle miteinander assoziiert. An der Cofaktorbindung sind hoch konservierte Aminosäurereste beteiligt. Diese binden vor allem den Diphosphatanker und den Aminopyrimidinring des ThDP. Auf die Wechselwirkung des N1'-Atoms mit einem hoch konservierten Glutamat (Glu52 in *EcIPDC*) sei insbesondere verwiesen. Diese Interaktion beeinflusst einen wichtigen Schritt in der Katalyse aller ThDP-abhängigen Enzyme, die initiale Aktivierung des Cofaktors, die die C2-H-Ionisation beinhaltet. Die Analyse der Kristallstruktur zeigt weiterhin, dass der Aufbau des aktiven Zentrums der *EcIPDC* besonders dem der ThDP-abhängigen Pyruvatdecarboxylasen ähnlich ist. Dabei sind die AS-Seitenketten Asp29, Glu52, His115 und Glu468 in der Nähe des Reaktionszentrums gelegen und können im Sinne ihre Säure-Base-Eigenschaften einen Einfluss auf bestimmte Katalyseschritte nehmen. Ein wichtiger Unterschied in den aktiven Zentren von *EcIPDC* und PDC, stellt das Gln383 dar.

Röntgenkleinwinkelstreuungsexperimente dienten der Untersuchung des Oligomerisierungsgrades der *EcIPDC* in Abhängigkeit von Effektoren. Für das Apoenzym der *EcIPDC* wurde ein pH-abhängiges Gleichgewicht zwischen Tetrameren und Dimeren bei niedrigen pH-Werten bzw. zwischen Dimeren und Monomeren bei höheren pH-Werten gefunden. Der Zusatz von ThDP resultiert in der Stabilisierung der tetrameren Form der *EcIPDC*. Die Daten wurden weiterhin zur Berechnung eines dreidimensionalen Modells der tetrameren *EcIPDC* in

Lösung eingesetzt. Dabei zeigt das aus den Streukurven berechnete niedrigauflösende Modell der *EcIPDC* in Lösung eine, im Vergleich zum Kristallmodell, „aufgelockerte“ Struktur.

Klassische kinetische Untersuchungen und die  $^1\text{H}$ -NMR-Analyse der Intermediate spezifisch konstruierter AS-Austauschvarianten (Asp<sup>29</sup>Glu, Glu<sup>52</sup>Asp, His<sup>115</sup>Lys, Gln<sup>383</sup>Thr und Glu<sup>468</sup>Asp) dienen zur Identifizierung der an der Katalyse beteiligten Aminosäureseitenketten im aktiven Zentrum der *EcIPDC*. Die während der Umsetzung von Indolpyruvat, Pyruvat und Benzoylformiat entstehenden ThDP-gebundenen Intermediate wurden unter Anwendung der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie qualitativ und quantitativ bestimmt. Dabei zeigen die nachgewiesenen Reaktionsintermediate, dass die *EcIPDC* dem allgemeinen Katalysemechanismus ThDP-abhängiger Enzyme folgt. Die Bindung des Substrates an das C2-Atom des Thiazoliumrings führt zur Bildung des kovalenten ThDP-Substratadduktes, des Intermediates  $I_1$  (IPyr, IndLThDP; Pyr, LThDP; Bf, MThDP). Nach der Decarboxylierung entsteht das Intermediat  $I_2$ , die  $\alpha$ -Carbanion/Enamin-Form des IndHETHP (IPyr), HETHP (Pyr) bzw. des HBzThDP (Bf). Die Abspaltung des entsprechenden Aldehyds aus dem enzymgebundenen Intermediat  $I_2$  erfordert die Protonierung des  $\alpha$ -Carbanion/Enamins, die Deprotonierung der C $\alpha$ -Hydroxylgruppe des Substrates und die C-C-Bindungsspaltung.

Die aus der *steady state* Verteilung dieser ThDP-Addukte resultierenden mikroskopischen Geschwindigkeitskonstanten einzelner Katalyseschritte wurden ermittelt. Es zeigte sich, dass unabhängig von der Art des Substrates sowohl die kovalente Substratbindung als auch die Produktabspaltung partiell geschwindigkeitsbestimmend in der *EcIPDC*-Katalyse ist. Die Decarboxylierungsreaktion ist dagegen mindestens um eine Größenordnung schneller. Die AS-Seitenketten von Glu468, Asp29 und His115 sind an der Bindung und Decarboxylierung des Indolpyruvates, des Pyruvates und des Benzoylformiates beteiligt. Dabei gehen diese Seitenketten wahrscheinlich eine Wechselwirkung mit der Carboxylgruppe des Substrates ein. Diese Interaktion dient der Orientierung des Substrates, gewährleistet eine optimale Bindung an das ThDP-Ylid und ermöglicht die für die Decarboxylierung notwendige Ausrichtung der abzuspaltenden Carboxylgruppe senkrecht zum Thiazoliumring (Kluger *et al.*, 1987). Die kinetische Signifikanz der einzelnen Schritte, die zur Produktabspaltung führen, ist für die drei Substrate unterschiedlich. Im Falle der Acetaldehydabspaltung sind die Asp29/His115-Duade und die durch die N1'-Glu52-Interaktion aktivierte 4'-Amino/Iminogruppe des ThDP von Bedeutung. Bei der Abspaltung der aromatischen Aldehyde scheinen vielmehr die Seitenketten der AS-Reste Asp29 und Glu468 beteiligt zu sein. Dem Asp29 wird dabei eine

---

Rolle bei der Protonierung des  $\alpha$ -Carbanion/Enamins zugeschrieben. Die AS-Seitenkette des Gln383 wurde im Zusammenhang mit der Substratspezifität der *Ec*IPDC diskutiert.

Die Analyse 4-substituierter Benzoylformiate diente zur Untersuchung des Einflusses der elektronischen und sterischen Anforderungen der Substituenten auf die Katalyse. Die ermittelten kinetischen Konstanten zeigten einen Einfluss der chemischen Reaktivität der Substrate auf die Decarboxylierungsreaktion und die Produktabspaltung. Dabei tragen die elektro-negativen Substituenten zur Stabilisierung des bei der Decarboxylierung entstehenden  $\alpha$ -Carbanions bei. Elektronendrückende Substituenten destabilisieren dieses Intermediat und erleichtern die Aldehydfreisetzung.

Die strukturellen und kinetischen Ergebnisse wurden zusammenhängend diskutiert und vergleichend zu verwandten ThDP-abhängigen Enzymen analysiert. Dabei unterstützen und erweitern die präsentierten Ergebnisse die vorgeschlagenen Reaktionsmechanismen der Benzoylformiatdecarboxylase und der Pyruvatdecarboxylase, sowie die Modellstudien relevanter Schlüsselintermediate.

## Literaturverzeichnis

- AEvarsson, A.**, Seger, K., Turley, S., Sokatch, J.R. & Hol, W.G. (1999) Crystal structure of 2-oxoisovalerate and dehydrogenase and the architecture of 2-oxo acid dehydrogenase multienzyme complexes. *Nat. Struct. Biol.* **6**, 785–792.
- AEvarsson, A.**, Chuang, J.L., Wynn, R.M., Turley, S., Chuang, D.T. & Hol, W.G. (2000) Crystal structure of human branched-chain alpha-ketoacid dehydrogenase and the molecular basis of multienzyme complex deficiency in maple syrup urine disease. *Structure* **8**, 277–291.
- Alvarez, F.J.**, Ermer, J., Hübner, G. Schellenberger, A. & Schowen, R.L. (1991) Catalytic power of pyruvate decarboxylase. Rate-limiting events and microscopic rate constants from primary carbon and secondary hydrogen isotope effects. *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 8402–8409.
- Arjunan, P.**, Umland, T., Dyda, F., Swaminathan, S., Furey, W., Sax, M., Farrenkopf, B., Gao, Y., Zhang, D. & Jordan, F. (1996) Crystal structure of the thiamine diphosphate-dependent enzyme pyruvate decarboxylase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* at 2.3 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **256**, 590–600.
- Arjunan, P.**, Nemeria, N., Brunskill, A., Chandrasekhar, K., Sax, M., Yan, Y., Jordan, F., Guest, J.R. & Furey, W. (2002) Structure of the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex E1 component from *Escherichia coli* at 1.85 Å resolution. *Biochemistry* **41**, 5213–5221.
- Arjunan, P.**, Chandrasekhar, K., Sax, M., Brunskill, A., Nemeria, N., Jordan, F. & Furey, W. (2004) Structural determinants of enzyme binding affinity: The E1 component of Pyruvate dehydrogenase from *Escherichia coli* in complex with the inhibitor thiamin thiazolone diphosphate. *Biochemistry* **43**, 2405–2411.
- Auhagen, E.** (1932) Co-carboxylase, ein neues Co-enzym der alkoholischen Gärung. *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **204**, 149–167.
- Baburina, I.**, Gao, Y., Hu, Z., Jordan, F., Hohmann, S. & Furey, W. (1994) Substrate activation of brewers' yeast pyruvate decarboxylase is abolished by mutation of cysteine 221 to serine. *Biochemistry* **33**, 5630–5635.
- Baburina, I.**, Li, H., Bennion, B., Furey, W. & Jordan, F. (1998) Interdomain information transfer during substrate activation of yeast pyruvate decarboxylase: the interaction between cysteine 221 and histidine 92. *Biochemistry* **37**, 1235–1244.
- Bartel, B.** (1997) Auxin biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Mol. Biol.* **48**, 51–66.
- Bartel, B.**, LeClere, S., Magidin, M. & Zolman, B.K. (2001) Inputs to the active indole-3-acetic acid pool: De novo synthesis, conjugate hydrolysis, and indole-3-butyric acid  $\beta$ -oxidation. *J. Plant Growth Regul.* **20**, 198–216.
- Bera, A.K. & Hasson, M.S.** High resolution structure of E28A mutant benzoylformate decarboxylase from *Pseudomonas putida* complexed with thiamin thiazolone diphosphate. unveröffentlicht.
- Berman, H.M.**, Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N. & Bourne, P.E. (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research* **28**, 235–242.
- Boiteux, A. & Hess, B.** (1970) Allosteric properties of yeast pyruvate decarboxylase. *FEBS Lett.* **9**, 293–296.
- Boulin, C.J.**, Kempf, R., Koch, M.H.J. & McLaughlin, S.M. (1986) Data appraisal, evaluation and display for synchrotron radiation experiments: hardware and software. *Nucl. Instrum. Methods* **A249**, 399–407.
- Boulin, C.J.**, Kempf, R., Gabriel, A. & Koch, M.H.J. (1988) Data acquisition systems for linear and area X-ray detectors using delay line readout. *Nucl. Instrum. Methods* **A269**, 312–320.
- Bradford, M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254.

- Brandl, M. & Lindow, S.E.** (1996) Cloning and characterization of a locus encoding an indolepyruvate decarboxylase involved in indole-3-acetic acid synthesis in *Erwinia herbicola*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 4121-4128.
- Brandl, M. & Lindow, S.E.** (1998) Contribution of indole-3-acetic acid production to the epiphytic fitness of *Erwinia herbicola*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 3256-3263.
- Breslow, R.** (1957) Rapid deuterium exchange in thiazolium salts. *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 1762-1763.
- Breslow, R.** (1958) On the mechanism of thiamine action. IV. Evidence from studies on model systems. *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 3719-3726.
- Breslow, R. & McNelis, E.** (1959) Studies on model systems for thiamine action. Synthesis of reactive intermediates, and evidence on the function of the pyrimidine ring. *J. Am. Chem. Soc.* **81**, 3080-3082.
- Bringer-Meyer, S., Schimz, K.L. & Sahn, H.** (1986) Pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis*. Isolation and partial characterization. *Arch. Microbiol.* **146**, 105-110.
- Bruhn, H., Pohl, M., Grötzinger, J. & Kula, M.R.** (1995) The replacement of Trp392 by alanine influences the decarboxylase/carboligase activity and stability of pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis*. *Eur. J. Biochem.* **234**, 650-655.
- Brünger, A.T.** (1992) Free R value: a novel statistical quantity assessing the accuracy of crystal structure. *Nature* **355**, 472-475.
- Brünger, A.T., Adams, P.D., Clore, G.M., DeLano, W.L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R.W., Jiang, J.-S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N.S., Read, R.J., Rice, L.M., Simonson, T. & Warren, G. L.** (1998) Crystallography & NMR System: A New Software Suite for Macromolecular Structure Determination. *Acta Crystallogr.* **D54**, 905-921.
- Caines, M.E., Elkins, J.M., Hewitson, K.S. & Schofield, C.J.** (2004) Crystal structure and mechanistic implications of N<sup>2</sup>-(2-carboxyethyl)arginine synthase, the first enzyme in the clavulanic acid biosynthesis pathway. *J. Biol. Chem.* **279**, 5685-5692.
- Candy, J.M. & Duggleby, R.G.** (1994) Investigation of the cofactor-binding site of *Zymomonas mobilis* pyruvate decarboxylase by site-directed mutagenesis. *Biochem. J.* **300**, 7-13.
- Candy, J.M., Koga, J., Nixon, P.F. & Duggleby, R.G.** (1996) The role of residues glutamate-50 and phenylalanine-496 in *Zymomonas mobilis* pyruvate decarboxylase. *Biochem. J.* **315**, 745-751.
- Carlisle, C.H. & Cook, D.S.** (1969) The crystal structure of thiamine pyrophosphate. *Acta Crystallogr.* **B25**, 1359-1367.
- Caron, M., Patten, C.L., Ghosh, S. & Glick, B.R.** (1995) Effects of the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 on the physiology of canola roots. *Plant Growth Reg. Soc. Of Amer. Quart.*: 297-302.
- Carreno-Lopez, R., Campos-Reales, N., Elmerich, C. & Baca, B.E.** (2000) Physiological evidence for differently regulated tryptophan-dependent pathways for indole-3-acetic acid synthesis in *Azospirillum brasilense*. *Mol. Gen. Genet.* **264**, 521-30.
- Chabrière, E., Charon, M.H., Volbeda, A., Pieulle, L., Hatchikian, E.C. & Fontecilla-Camps, J.F.** (1999) Crystal structures of the key anaerobic enzyme 2-pyruvate:ferredoxin oxidoreductase, free and in complex with pyruvate. *Nat. Struct. Biol.* **6**, 182-190.
- Chabrière, E., Vernède, X., Guigliarelli, B., Charon, M.H., Hatchikian, E.C. & Fontecilla-Camps, J.F.** (2001) Crystal structure of the free radical intermediate of 2-pyruvate:ferredoxin oxidoreductase. *Science* **294**, 2559.
- Chang, A.K., Nixon, P.F. & Duggleby, R.G.** (1999) Aspartate-27 and glutamate-473 are involved in catalysis by *Zymomonas mobilis* pyruvate decarboxylase. *Biochem. J.* **339**, 255-260.

- Chang, A.K.**, Nixon, P.F. & Duggleby, R.G. (2000) Effects of deletions at the carboxyl terminus of *Zymomonas mobilis* pyruvate decarboxylase on the kinetic properties and substrate specificity. *Biochemistry* **39**, 9430-9437.
- Charon, M.H.**, Volbeda, A., Chabrière, E., Pieulle, L. & Fontecilla-Camps, J.C. (1999) Structure and electron transfer mechanism of pyruvate:ferredoxin oxidoreductase. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9**, 663-669.
- Ciszak, E.M.**, Korotchkina, L.G., Dominiak, P.M., Sidhu, S. & Patel, M.S. (2003) Structural basis for flip-flop action of thiamin pyrophosphate-dependent enzymes revealed by human pyruvate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **278**, 21240-21246.
- Cline, J.K.**, Williams, R.R. & Finkelstein, J. (1937) Studies of crystalline vitamin B1. XVIII. Synthesis of vitamin B1. *J. Am. Chem. Soc.* **59**, 1052-1054.
- Collaborative Computational Project, Number 4.** (1994) The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography. *Acta Crystallogr.* **D50**, 760-763.
- Cooke, T.J.**, Poli, D., Sztein, A.E. & Cohen, J.D. (2002) Evolutionary patterns in auxin action. *Plant Mol. Biol.* **49**, 319-338.
- Costacurta, A.**, Keijers, V. & Vanderleyden, J. (1994) Molecular cloning and sequence analysis of an *Azospirillum brasilense* indole-3-pyruvate decarboxylase gene. *Mol. Gen. Genet.* **243**, 463-472.
- Costacurta, A. & Vanderleyden, J.** (1995) Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* **21**, 1-18.
- Crosby, J.**, Stone, R. & Lienhard, G.E. (1970) Mechanisms of thiamine-catalyzed reactions. Decarboxylation of 2-(1-carboxy-1-hydroxyethyl)-3,4-dimethylthiazolium chloride. *J. Am. Chem. Soc.* **92**, 2891-2900.
- Crosby, J. & Lienhard, G.E.** (1970) Mechanism of thiamin-catalyzed reactions. A kinetic analysis of decarboxylation of pyruvate by 3,4-Dimethylthiazolium ion in water and ethanol. *J. Am. Chem. Soc.* **92**, 5707-5716.
- Crout, D.H.G.** (1990) *Biosynthesis of branched chain amino acids* (ed. Barak, Z., Chipman, D.M. & Schloss, J.V.), Verlag Chemie Weinheim, 199-242.
- Davies, D.D.** (1967) Glyoxylate as a substrate for PDC. *Proc. Biochem. Soc.* **104**, 50P.
- DeLano, W.L.** (2002) *The PyMol Molecular Graphics System*, DeLano Scientific, San Carlos, USA.
- Diefenbach, R.J.**, Candy, J.M., Mattick, J.S. & Duggleby, R.G. (1992) Effects of substitution of aspartate-440 and tryptophan-487 in the thiamin diphosphate binding region of pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis*. *FEBS Lett.* **296**, 95-98.
- Dietrich, A. & König, S.** (1997) Substrate activation behaviour of pyruvate decarboxylase from *Pisum sativum* cv. Miko. *FEBS Lett.* **400**, 42-44.
- Dobritzsch, D.**, König, S., Schneider, G. & Lu, G. (1998) High resolution crystal structure of pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis*. *J. Biol. Chem.* **273**, 20196-20204.
- Dyda, F.**, Furey, W., Swaminathan, S., Sax, M., Farrenkopf, B. & Jordan, F. (1990) Multiple crystal forms of brewer's yeast pyruvate decarboxylase: Characterization and preliminary crystallographic analysis. *J. Biol. Chem.* **265**, 17413-17415.
- Dyda, F.**, Furey, W., Swaminathan, S., Sax, M., Farrenkopf, B. & Jordan, F. (1993) Catalytic centers in the thiamin diphosphate-dependent enzyme pyruvate decarboxylase at 2.4 Å resolution. *Biochemistry* **32**, 6165-6170.
- Eigen, M.** (1964) Proton transfer, acid base catalysis and enzymatic hydrolysis: I: Elementary processes. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **3**, 1.



- Feigin, L.A. & Svergun, D.I. (1987)** *Structur analysis by small angle X-ray and neutron scattering*. New York: Plenum Press.
- Fersht, A. (2002)** *Structure and mechanism in protein science*. W.H. Freeman and Company, New York. 4. Auflage.
- Fiedler, E., Thorell, S., Sandalova, T., Golbik, R., König, S. & Schneider, G. (2002)** Snapshot of a key intermediate in enzymatic thiamin catalysis: Crystal structure of the  $\alpha$ -carbanion of ( $\alpha,\beta$ -dihydroxyethyl)-thiamin diphosphate in the active site of transketolase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 591-595.
- Frey, P.A. (1989)** 2-Acetylthiamin pyrophosphate: an enzyme-bound intermediate in thiamin pyrophosphate-dependent reactions. *Biofactors*. **2**, 1-9.
- Frey, P.A. (2004)** Chemical intermediates in catalysis by thiamine diphosphate. *Thiamine: Catalytic mechanism in normal and disease states*. (ed. Jordan, F. & Patel, M.S.) Marcel Dekker Inc., 1-13.
- Friedemann, R. & Neef, H. (1998)** Theoretical studies on the electronic and energetic properties of the aminopyrimidine part of thiamin diphosphate. *Biochim. Biophys. Acta* **1385**, 245-50.
- Funk, C. (1911)** On the chemical nature of the substance which cures polyneuritis in birds induced by a diet of polished rice. *J. Physiol.* **43**, 395.
- Furey, W., Arjunan, P., Chen, L., Dyda, F., Umland, T., Swaminathan, S., Sax, M., Jordan, F., Farrenkopf, B., Gao, Y. & Zhang, D. (1996)** Multiple modes of tetramer assembly and insight into allosteric activation revealed by X-ray crystal structures of pyruvate decarboxylase. In *Biochemistry and Physiology of Thiamine Diphosphate Enzymes, Proc. Int. Meet. 4<sup>th</sup>* (Bisswanger, H. & Schellenberger, A., eds), A.u.C. Intemann Wissenschaftlicher Verlag, Prien, Germany, 103-124.
- Gerhardt, S., Echt, E., Busch, M., Freigang, J., Auerbach, G., Bader, G., Martin, W.F., Bacher, A., Huber, R. & Fischer, M. (2003)** Structure and properties of an engineered transketolase of maize. *Plant Physiol.* **132**, 1941-1949.
- Gibson, R. A., Schneider, E. A. & Wightman, F. (1972)** Biosynthesis and metabolism of IAA. part 2: in-vivo experiments with C-14 labeled resources of IAA in tomato-D and barley-M shoots. *J. Exp. Bot.* **23**, 381.
- Gill, S.C. & v. Hippel, P.H. (1989)** Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* **182**, 319-326.
- Golbik, R., Neef, H., Hübner, G., König, S., Seliger, B., Meshalkina, L., Kochetov, G.A. & Schellenberger, A. (1991)** Function of the aminopyrimidine part in thiamine pyrophosphate enzymes. *Bioorg. Chem.* **19**, 10-17.
- Gruys, K.J., Halkides, C.J. & Frey, P.A. (1987)** Synthesis and properties of 2-acetylthiamin pyrophosphate: an enzymatic reaction intermediate. *Biochemistry* **26**, 7575-7585.
- Guinier, A. (1939)** La diffraction de rayons X aux très petits angles: application à l'étude de phénomènes ultramicroscopiques. *Ann. Phys. (Paris)* **12**, 161-237.
- Hallmann, G. & Hägle, H. (1963)** Benzofuranderivate: Tryptamin-, Serotonin- und Melatonin-Analoga. *Liebigs Ann. Chem.* **662**, 147-159.
- Hammett, L.P. (1937)** The effect of structure upon the reactions of organic compounds. Benzene derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* **59**, 96-103.
- Hanes, C.S. (1932)** Studies on plant amylases. 1. The Effect of starch concentration upon the velocity of hydrolysis by the amylase of germinated barley. *Biochem. J.* **26**, 1406-1421.
- Hansch, C., Leo, A., Unger, S.H., Kim, K.H., Nikaitani, D. & Lien, E.J. (1973)** Aromatic substituent constants for structure-activity correlations. *J. Med. Chem.* **16**, 1207-1216.

- Hasson, M. S.**, Muscate, A., McLeish, M. J., Polovnikova, L. S., Gerlt, J. A., Kenyon, G. L., Petsko, G. A. & Ringe, D. (1998) The crystal structure of benzoylformate decarboxylase at 1.6 Å resolution: Diversity of catalytic residues in thiamine diphosphate-dependent enzymes. *Biochemistry* **37**, 9918-9930.
- Hawkins, C.F.**, Borges, A. & Pernam R.N. (1989) A common structural motif in thiamin pyrophosphate-binding enzymes. *FEBS Lett.* **255**, 77-82.
- Hegeman, G.D.** (1966) Synthesis of the enzymes of the mandelate pathway by *Pseudomonas putida*. I. Synthesis of enzymes by the wild type. *J. Bacteriol.* **91**, 1140-1154.
- Holzer, H.**, Schultz, G., Villar-Palasi, C. & Jüntgen-Sell, J. (1956) Isolierung der Hefecarboxylase und Untersuchung über die Aktivität des Enzyms in lebenden Zellen. *Biochem. Z.* **327**, 331-344.
- Holzer, H. & 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. & Beaucamp, K.** (1961) Nachweis und Charakterisierung von  $\alpha$ -Lactyl-Thiaminpyrophosphat („Aktives Pyruvat“) und  $\alpha$ -Hydroxyäthyl-Thiaminpyrophosphat („Aktiver Acetaldehyd“) als Zwischenprodukte der Decarboxylierung von Pyruvat mit Pyruvatdecarboxylase aus Bierhefe. *Biochim. Biophys. Acta* **46**, 225-243.
- Hu, Q. & Kluger, R.** (2004) Fragmentation of the conjugate base of 2-(1-hydroxybenzyl)thiamin: Does benzoylformate decarboxylase prevent orbital overlap to avoid it? *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 68-69.
- Huang, C.Y.**, Chang, A.K., Nixon, P.F. & Duggleby, R.G. (2001) Site-directed mutagenesis of the ionizable groups in the active site of *Zymomonas mobilis* pyruvate decarboxylase: effect on activity and pH dependence. *Eur. J. Biochem.* **268**, 3558-3565.
- Hübner, G.**, Schellenberger, A., Stelmaschuk, V.Y. & Kiselev, N.A. (1975) Electron microscopic investigation of the subunit structure of yeast pyruvate decarboxylase. *Acta Biol. Med. Ger.* **34**, 699-701.
- Hübner, G.**, Weidhase, R. & Schellenberger, A. (1978) The mechanism of substrate activation of pyruvate decarboxylase: a first approach. *Eur. J. Biochem.* **92**, 175-181.
- Hübner, G.**, Atanassova, M. & Schellenberger, A. (1986) Investigations on the pyruvate decarboxylase catalysed oxidative decarboxylation of 2-oxoacids by 2,6-dichlorophenolindophenol. *Biomed. Biochim. Acta* **45**, 823-832.
- Hübner, G.**, König, S. & Schellenberger, A. (1988) The functional role of thiol groups of pyruvate decarboxylase from brewer's yeast. *Biomed Biochim Acta* **47**, 9-18.
- Hübner, G.**, König, S., Schellenberger, A. & Koch, M.H.J. (1990) An X-ray solution scattering study of the cofactor and activator-induced structural changes in yeast pyruvate decarboxylase (PDC). *FEBS Lett.* **266**, 17-20.
- Hübner, G.**, Tittmann, K., Killenberg-Jabs, M., Schäffner, J., Spinka, M., Neef, H., Kern, D., Kern, G., Schneider, G., Wikner, C. & Gishla, S. (1998) Activation of thiamin diphosphate in enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* **1385**, 221-228.
- Jones, T.A.**, Zou, J.Y., Cowan, S.W. & Kjeldgaard, M. (1991) Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallogr.* **A47**, 110-119.
- Jordan, F.** (1974) Semiempirical calculations on the electronic structure and preferred conformations of thiamine (vitamine B1) and thiamine pyrophosphate (cocarboxylase). *J. Am. Chem. Soc.* **96**, 3623-3630.
- Jordan, F.** (1976) Theoretical calculations on thiamine and related compounds. II. Conformational analysis and electronic properties of 2-( $\alpha$ -hydroxyethyl)thiamine. *J. Am. Chem. Soc.* **98**, 808-813.

- Jordan, F.**, Li, H. & Brown, A. (1999) Remarkable stabilization of zwitterionic intermediates may account for a billion-fold rate acceleration by thiamin diphosphate-dependent decarboxylases. *Biochemistry* **38**, 6369-6373.
- Jordan, F.** (2003) Current mechanistic understanding of thiamin diphosphate-dependent enzymatic reactions. *Nat. Prod. Rep.* **20**, 184-201.
- Jordan F.**, Nemeria, N.S., Zhang, S., Yan, Y., Arjunan, P. & Furey, W. (2003) Dual catalytic apparatus of the thiamin diphosphate coenzyme: Acid-base via the 1',4'-imino-pyrimidine tautomer along with its electrophilic role. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 12732-12738.
- Jordan, F.**, Liu, M., Sergienko, E. & Zhang, Z. (2004) Yeast pyruvate decarboxylase: New features of the structure and mechanism. *Thiamine: Catalytic mechanism in normal and disease states*. (ed. Jordan, F. & Patel, M.S.) Marcel Dekker Inc., 173-215.
- Karle, I.L. & Britts, K.** (1966) The crystal and molecular structure of hydrolyzed cocarboxylase. *Acta Crystallogr.* **20**, 118-124.
- Kawaguchi, M. & Syono, K.** (1996) The excessive production of indole-3-acetic acid and its significance in studies of the biosynthesis of this regulator of plant growth and development. *Plant Cell Physiol.* **37**, 1043-1048.
- Kemp, D.S. & O'Brien, J.T.** (1970) Base catalysis of thiazolium hydrogen exchange and its implications for enzymatic thiamine cofactor catalysis. *J. Am. Chem. Soc.* **92**, 2554-2555.
- Kern, D.**, Kern, G., Neef, H., Tittmann, K., Killenberg-Jabs, M., Wikner, C., Schneider, G. & Hübner, G. (1997) How thiamine diphosphate is activated in enzymes. *Science* **275**, 67-70.
- Kerscher, L. & Oesterhelt, D.** (1982) *Trends Biochem. Sci.* **7**, 371.
- Killenberg-Jabs, M.**, König, S., Hohmann, S. & Hübner, G. (1996) Purification and characterisation of the pyruvate decarboxylase from a haploid strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biol. Chem. Hoppe-S.* **377**, 313-317.
- Killenberg-Jabs, M.**, König, S., Eberhardt, I., Hohmann, S. & Hübner, G. (1997) Role of Glu51 for cofactor binding and catalytic activity in pyruvate decarboxylase from yeast studied by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* **36**, 1900-1905.
- Kluger, R.**, Chin, J. & Smyth, T. (1981<sub>a</sub>) Thiamin-catalyzed decarboxylation of pyruvate. Synthesis and reactivity analysis of the central, elusive intermediate,  $\alpha$ -lactylthiamin. *J. Am. Chem. Soc.* **103**, 884-888.
- Kluger, R. & Smyth, T.** (1981<sub>b</sub>) Interaction of pyruvate-thiamin diphosphate adducts with pyruvate decarboxylase. Catalysis through "closed" transition states. *J. Am. Chem. Soc.* **103**, 1214-1218.
- Kluger, R.** (1987) Thiamin diphosphate: a mechanistic update on enzymatic and nonenzymatic catalysis of decarboxylation. *Chem. Rev.* **87**, 863-876.
- Kluger, R.**, Hu, Q. & Moore, I.F. (2004) Benzoylformate decarboxylase: Intermediates, transition states, and diversions. *Thiamine: Catalytic mechanism in normal and disease states*. (ed. Jordan, F. & Patel, M.S.) Marcel Dekker Inc., 291-308.
- Knox, W.E. & Pitt, B.M.** (1957) Enzymic catalysis of the keto-enol tautomerization of phenylpyruvic acids. *J. Biol. Chem.* **225**, 675-688.
- Koch, M.H.J. & Bordas, J.** (1983) X-ray diffraction and scattering on disordered systems using synchrotron radiation. *Nucl. Instrum. Methods* **208**, 461-469.
- Koch, M.H.J.**, Vachette, P. & Svergun, D.I. (2003) Small-angle scattering: a view on the properties, structures and structural changes of biological macromolecules in solution. *Quarterly Reviews of Biophysics* **36**, 147-227.

- Koga, J.**, Adachi, T. & Hidaka, H. (1991<sub>a</sub>) IAA biosynthetic pathway from tryptophan via indole-3-pyruvic acid in *Enterobacter cloacae*. *Agric. Biol. Chem.* **55**, 701-706.
- Koga, J.**, Adachi, T. & Hidaka, H. (1991<sub>b</sub>) Molecular cloning of the gene for indolepyruvate decarboxylase from *Enterobacter cloacae*. *Mol. Gen. Genet.* **226**, 10-16.
- Koga, J.**, Adachi, T. & Hidaka, H. (1992) Purification and characterization of indolepyruvate decarboxylase. *J. Biol. Chem.* **267**, 15823-15828.
- Koga, J.**, Syono, K., Ichikawa, T. & Adachi, T. (1994) Involvement of L-tryptophan aminotransferase in indole-3-acetic acid biosynthesis of *Enterobacter cloacae*. *Biochim. Biophys. Acta* **1209**, 241-247.
- Koga, J.** (1995) Structure and function of indolepyruvate decarboxylase, a key enzyme in indole 3-acetic acid biosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* **1249**, 1-13.
- Konarev, P.V.**, Petoukhov, M.V. & Svergun, D.I. (2001) MASSHA – a graphics system for rigid-body modelling of macromolecular complexes against solution scattering data. *J. Appl. Cryst.* **34**, 527-532.
- König, S.**, Svergun, D., Koch, M.H.J., Hübner, G. & Schellenberger, A. (1992) Synchrotron radiation solution X-ray scattering study of the pH dependence of the quaternary structure of yeast pyruvate decarboxylase. *Biochemistry* **31**, 8726-8731.
- König, S.**, Svergun, D., Koch, M.H.J., Hübner, G. & Schellenberger, A. (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.**, Schellenberger, A., Neef, H. & Schneider, G. (1994) Specificity of coenzyme binding in thiamin diphosphate-dependent enzymes: crystal structures of yeast transketolase in complex with analogs of thiamin diphosphate. *J. Biol. Chem.* **269**, 10879-10882.
- König, S.**, Svergun, D.I., Volkov, V.V., Feigin, L.A. & Koch, M.H.J. (1998) Small-angle X-ray solution scattering studies on ligand induced subunit interactions of the thiamine diphosphate dependent enzyme pyruvate decarboxylase from different organisms. *Biochemistry* **37**, 5329-5334.
- König, S. & Koch, M.H.J.** (1999) The effect of high protein concentration on the SAXS scattering behaviour of two different species of pyruvate decarboxylase. *Hasylab Annual Report* 991-992.
- König, S.**, Schütz, A., Svergun, D.I. & Koch, M.H.J. (2000) First SAXS measurements on indolepyruvate decarboxylase. *Hasylab Annual Report* 295-296.
- König, S.**, Spinka, M., Fiedler, E., Wille, G., Brauer, J., Koch, M.H.J. & Svergun, D.I. (2004) Ligand-induced conformational changes in thiamine diphosphate-dependent enzymes: Comparison between crystal and solution structures. *Thiamine: Catalytic mechanism in normal and disease states*. (ed. Jordan, F. & Patel, M.S.) Marcel Dekker Inc., 93-112.
- Krampitz, L.O.**, Greull, G., Miller, C.S., Bicking, J.B., Skeggs, H.R. & Sprague, J.M. (1958) An active acetaldehyde-thiamine intermediate *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 5893-5894.
- Krampitz, L.O. & Votaw, R.** (1966) Alpha-hydroxyethylthiamine diphosphate and alpha, beta dihydroxyethylthiamine diphosphate. *Meth. Enzymol.* **9**, 65-70.
- Krampitz, L.O.** (1969) Catalytic functions of thiamin diphosphate. *Annu. Rev. Biochem.* **38**, 213-240.
- Krieger, F.**, Spinka, M., Golbik, R., Hübner, G. & König, S. (2002) Pyruvate decarboxylase from *Kluyveromyces lactis*. An enzyme with an extraordinary substrate activation behaviour. *Eur. J. Biochem.* **269**, 3256-3263.
- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

- Langenbeck, W. & Hutschenreuther, R.** (1930) *Z. Anorg. Allg. Chem.* **188**, 1-13.
- Langenbeck, W.** (1932) *Angew. Chem.* **45**, 97-99.
- Laskowski, R.A.,** McArthur, M.W., Moss, D.S. & Thornton, J.M. (1993) PROCHECK: a program to check the quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.* **26**, 282-291.
- Lehmann, H.,** Fischer, G., Hübner, G., Kohnert, K.D. & Schellenberger, A. (1973) The influence of steric and electronic parameters on the substrate behavior of oxo acids to yeast pyruvate decarboxylase. *Eur. J. Biochem.* **32**, 83-87.
- Leslie, A.G.W.** (1992) in Joint CCP4 and ESF-EACMB Newsletter on Protein Crystallography No. 26, Daresbury Laboratory, Warrington, UK.
- Lindqvist, Y.,** Schneider, G., Ermler, U. & Sundström, M. (1992) Three-dimensional structure of transketolase, a thiamine diphosphate dependent enzyme, at 2.5 Å resolution. *EMBO J.* **11**, 2373-2379.
- Liu, M.,** Sergienko, E.A., Guo, F., Wang, J., Tittmann, K., Hübner, G., Furey, W. & Jordan, F. (2001) Catalytic acid-base groups in yeast pyruvate decarboxylase. 1. Site-directed mutagenesis and steady-state kinetic studies on the enzyme with the D28A, H114F, H115F, and E477Q substitutions. *Biochemistry* **40**, 7355-7368.
- Lobell, M. & Crout, D.H.G.** (1996) Pyruvate Decarboxylase: A molecular modeling study of pyruvate decarboxylation and acyloin formation. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 1867-1873.
- Lohmann, W. & Schuster, G.** (1937) Untersuchungen über die Cocarboxylase. *Biochem. Z.* **294**, 188-193.
- Lu, G.,** Dobritzsch, D., König, S. & Schneider, G. (1997) Novel tetramer assembly of pyruvate decarboxylase from brewer's yeast observed in a new crystal form. *FEBS Lett.* **403**, 249-253.
- Lu, G.** (1999) PATTERN: a precession simulation programme for displaying reciprocal-space diffraction data. *J. Appl. Crystallogr.* **32**, 375-376.
- Lu, G.** (2000) TOP: A new method for protein structure comparisons and similarity searches. *J. Appl. Crystallogr.* **33**, 176-183.
- Lu, G.,** Dobritzsch, D., Baumann, S., Schneider, G. & König, S. (2000) The structural basis of substrate activation in yeast pyruvate decarboxylase: A crystallographic and kinetic study. *Eur. J. Biochem.* **267**, 861-868.
- McLeish, M.J.,** Kenyon, G.L., Polovnikova, E.S., Bera, A.K., Anderson, N.L. & Hasson, M.S. (2004) Benzoylformate decarboxylase: Lessons in enzymology. *Thiamine: Catalytic mechanism in normal and disease states.* (ed. Jordan, F. & Patel, M.S.) Marcel Dekker Inc., 131-141.
- Mendel, S.,** Elkayam, T., Sella, C., Vinogradov, V., Vyazmensky, M., Chipman, D.M. & Barak, Z. (2001) Acetohydroxyacid synthase: a proposed structure for regulatory subunits supported by evidence from mutagenesis. *J. Mol. Biol.* **307**, 465-477.
- Menon-Rudolph, S.,** Nishikawa, S., Zeng, X. & Jordan, F. (1992) Rate of decarboxylation, monitored via the key enzyme-bound enamine, of conjugated  $\alpha$ -keto acids by pyruvamide activated pyruvate decarboxylase is kinetically competent with turnover. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 10110-10112.
- Menon, S. & Ragsdale, S.W.** (1997) Mechanism of the *Chlostridium thermoaceticum* pyruvate:ferredoxin oxidoreductase: evidence for the common catalytic intermediacy of the hydroxyethylthiamine pyrophosphate radical. *Biochemistry* **36**, 8484-8494.
- Mieyal, J.J.,** Bantle, G., Votaw, R.G., Rosner, I.A. & Sable, H.Z. (1971) Coenzyme interactions. V. The second carbanion in reactions catalyzed by thiamine. *J. Biol. Chem.* **246**, 5213-5219.
- Moore, T. C. & Shaner, C. A.** (1968) *Arch. Biochem. Biophys.* **127**, 613-621.

- Mücke, U., König, S. & Hübner, G.** (1995) Purification and characterisation of pyruvate decarboxylase from pea seeds (*Pisum sativum* cv. Miko). *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **376**, 111-117.
- Muller, Y.A. & Schulz, G.E.** (1993) Structure of the thiamine- and flavin-dependent enzyme pyruvate oxidase. *Science* **259**, 965-967.
- Muller, Y.A., Lindqvist, Y., Furey, W., Schulz, G.E., Jordan, F. & Schneider, G.** (1993) A thiamin diphosphate binding fold revealed by comparison of the crystal structures of transketolase, pyruvate oxidase and pyruvate decarboxylase. *Structure* **1**, 95-103.
- Muller, Y.A., Schumacher, G., Rudolph, R. & Schulz, G.E.** (1994) The refined structures of a stabilized mutant and of wild-type pyruvate oxidase from *Lactobacillus plantarum*. *J. Mol. Biol.* **237**, 315-335.
- Nakai, T., Nakagawa, N., Maoka, N., Masui, R., Kuramitsu, S. & Kamiya, N.** (2004) Ligand-induced conformational changes and a reaction intermediate in branched-chain 2-oxo acid dehydrogenase (E1) from *Thermus thermophilus* HB8, as revealed by X-ray crystallography. *J. Mol. Biol.* **337**, 1011-1033.
- Navaza, J.** (1994) AMoRe: an automated package for molecular replacement. *Acta Crystallogr.* **A50**, 157-163.
- Nemeria, N., Baykal, A., Joseph, E., Zhang, S., Yan, Y., Furey, W. & Jordan, F.** (2004) Tetrahedral intermediates in thiamin diphosphate-dependent decarboxylations exists as a 1'-4'-imino tautomeric form of the coenzyme, unlike the Michaelis complex or the free coenzyme. *J. Am. Chem. Soc.* **43**, 6565-6575.
- Nilsson, U., Lindqvist, Y., Kluger, R. & Schneider, G.** (1993) Crystal structure of transketolase in complex with thiamine thiazolone diphosphate, an analogue of the reaction intermediate, at 2.3 Å resolution. *FEBS Lett.* **326**, 145-148.
- Nixon, P.F., Diefenbach, R.J. & Duggleby, R.G.** (1992) Inhibition of transketolase and pyruvate decarboxylase by omeprazole. *Biochem. Pharmacol.* **44**, 177-179.
- Nonhebel, H. M., Cooney, T.P. & Simpson, R.** (1993) The route, control and compartmentation of auxin synthesis. *Aust. J. Plant Physiol.* **20**, 527-539.
- Ohta, H. & Sugai, T.** (2000) Enzyme-mediated decarboxylation reactions in organic synthesis. *Stereoselective Biocatalysis*. Edited by Patel, R.N. New York: Marcel Dekker Inc., 487-526.
- Pang, S.S., Duggleby, R.G. & Guddat, L.W.** (2002) Crystal structure of the catalytic subunit of yeast aceto-hydroxyacid synthase: A target for herbicidal inhibitors. *J. Mol. Biol.* **317**, 249-262.
- Pang, S.S., Guddat, L.W. & Duggleby, R.G.** (2003) Molecular basis of sulfonylurea herbicide inhibition of aceto-hydroxyacid synthase. *J. Biol. Chem.* **278**, 7639-7644.
- Pang, S.S., Duggleby, R.G., Schowen, R.L. & Guddat, L.W.** (2004) The crystal structures of *Klebsiella pneumoniae* acetolactate synthase with enzyme-bound cofactor and with an unusual intermediate. *J. Biol. Chem.* **279**, 2242-2253.
- Pang, S.S., Guddat, L.W. & Duggleby, R.G.** (2004) Crystallization of *Arabidopsis thaliana* aceto-hydroxyacid synthase in complex with the sulfonylurea herbicide chlorimuron ethyl. *Acta Crystallogr.* **D60**, 153-155.
- Patten, C.L. & Glick, B.R.** (1996) Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Can. J. Microbiol.* **42**, 207-220.
- Pletcher, J. & Sax, M.** (1966) Thiamine pyrophosphate hydrochloride: stereochemical aspects from an x-ray diffraction study. *Science* **154**, 1331-1333.
- Pletcher, J. & Sax, M.** (1972) Crystal and molecular structure of thiamine pyrophosphate hydrochloride. *J. Am. Chem. Soc.* **94**, 3998-4005.

- Pohl, M.,** Siegert, P., Mesch, K., Bruhn, H. & Grotzinger, J. (1998) Active site mutants of pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis* - a site-directed mutagenesis study of L112, I472, I476, E473, and N482. *Eur. J. Biochem.* **257**, 538-546.
- Polovnikova, E.S.,** McLeish, M.J., Sergienko, E.A., Burgner, J.T., Anderson, N.L., Bera, A.K., Jordan, F., Kenyon, G.L. & Hasson, M.S. (2003) Structural and kinetic analysis of catalysis by a thiamin diphosphate-dependent enzyme, benzoylformate decarboxylase. *Biochemistry* **42**, 1820-1830.
- Rivoal, J.,** Ricard, B. & Pradet, A. (1990) Purification and partial characterization of pyruvate decarboxylase from *Oryza sativa* L. *Eur. J. Biochem.* **194**, 791-797.
- Rossmann, M.G. & Blow, D.M.** (1962) The detection of sub-units within the crystallographic asymmetric unit. *Acta Cryst.* **15**, 24-31.
- Schellenberger, A.** (1967) Struktur und Wirkungsweise des aktiven Zentrums der Hefe-Pyruvatdecarboxylase. *Angew. Chem.* **23**, 1050-1061.
- Schellenberger, A.,** Hübner, G. & Neef, H. (1997) Cofactor designing in functional analysis of thiamin diphosphate enzymes. *Methods Enzymol.* **279**, 131-146.
- Schellenberger, A.** (1998) Sixty years of thiamin diphosphate biochemistry. *Biochim. Biophys. Acta* **1385**, 177-186.
- Schenk, G.,** Leeper, F.J., England, R., Nixon, P.F. & Duggleby, R.G. (1997) The role of His113 and His114 in pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis*. *Eur. J. Biochem.* **248**, 63-71.
- Schneider, G. & Lindqvist, Y.** (1993) Enzymatic thiamin catalysis: Mechanistic implications from the three-dimensional structure of transketolase. *Bioorg. Chem.* **21**, 109-117.
- Schneider, G. & Lindqvist, Y.** (1998) Crystallography and mutagenesis of transketolase: mechanistic implications for enzymatic thiamin catalysis. *Biochim. Biophys. Acta* **1385**, 387-398.
- Schowen, R.L.** (1998) Thiamin-dependent enzymes. *Comprehensive biological catalysis*. (Sinnot, M., Ed.) Academic Press, London **Vol. 2**, 217-266.
- Schörken, U. & Sprenger, G.A.** (1998) Thiamin-dependent enzymes as catalysts in chemoenzymatic syntheses. *Biochim. Biophys. Acta* **1385**, 229-243.
- Schütz, A.** (2000) Diplomarbeit, Charakterisierung von Indolpyruvatdecarboxylase aus dem rekombinanten Wildtyp von *Enterobacter cloacae*., Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Schütz, A.,** Golbik, R., Tittmann, K., Svergun, D.I., Koch, M.H.J., Hübner, G. & König, S. (2003<sub>a</sub>) Studies on structure-function relationships of indolepyruvate decarboxylase from *Enterobacter cloacae*, a key enzyme of the indole acetic acid pathway. *Eur. J. Biochem.*, **270**, 2322-2331.
- Schütz, A.,** Sandalova, T., Ricagno, S., Hübner, G., König, S. & Schneider, G. (2003<sub>b</sub>) Crystal structure of thiamindiphosphate-dependent indolepyruvate decarboxylase from *Enterobacter cloacae*, an enzyme involved in the biosynthesis of the plant hormone indole-3-acetic acid. *Eur. J. Biochem.*, **270**, 2312-2321.
- Schütz, A.,** Golbik, R., König, S., Hübner, G. & Tittmann, K. (2004) Intermediates and transitions in thiamin-diphosphate-dependent enzymes. A kinetic and NMR study on indolepyruvate decarboxylase using indolepyruvate, benzoylformate and pyruvate as substrates. *Biochemistry*, eingereicht.
- Sciacovelli, O.,** Dell'itti, A., DeGiglio, A. & Cassidei, L. (1976) Studies on phenylpyruvic acid. I. Keto-enol tautomerism. *Z. Naturforsch.* **C31**, 5-11.
- Sedewitz, B.,** Schleifer, K.-H. & Götz, F. (1984) Physiological role of pyruvate oxidase in the aerobic mechanism of *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.* **160**, 462-465.

- Sekimoto, H.**, Seo, M., Dohmae, N., Takio, K., Kamiya, Y. & Koshiba, T. (1997) Cloning and molecular characterization of plant aldehyde oxidase. *J. Biol.Chem.* **24**, 15280-15285.
- Sekimoto, H.**, Seo, M., Kawakami, N., Komano, T., Desloire, S., Liotenberg, S., Marion-Poll, A., Caboche, M., Kamiya, Y. & Koshiba, T. (1998) Molecular cloning and characterization of aldehyde oxidases in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **39**, 433-442.
- Sergienko, E.A.**, Wang, J., Polovnikova, L., Hasson, M.S., McLeish, M.J., Kenyon, G.L. & Jordan, F. (2000) Spectroscopic detection of transient thiamin diphosphate-bound intermediates on benzoylformate decarboxylase. *Biochemistry* **39**, 13862-13869.
- Sergienko, E.A. & Jordan, F.** (2001<sub>a</sub>) Catalytic acid-base groups in yeast pyruvate decarboxylase. 2. Insights into the specific roles of D28 and E477 from the rates and stereospecificity of formation of carbolligase side products. *Biochemistry* **40**, 7369-7381.
- Sergienko, E.A. & Jordan, F.** (2001<sub>b</sub>) Catalytic acid-base groups in yeast pyruvate decarboxylase. 3. A steady state kinetic model consistent with the behavior of both wild-type and variant enzymes at all relevant pH values. *Biochemistry* **40**, 7382-7403.
- Sergienko, E.A. & Jordan, F.** (2002) A new model for activation of yeast pyruvate decarboxylase by substrate consistent with the alternating-sites mechanism: Demonstration of the existence of two active forms of the enzyme. *Biochemistry* **41**, 3952-3967.
- Sheldrake, A.R.** (1973) Production of hormones in higher plants. *Biol. Rev. Chamb. Philos. Soc.* **48**, 509-559.
- Shin, W.**, Pletcher, J., Blank, G. & Sax, M. (1977) Ring stacking interactions between thiamin and planar molecules as seen in the crystal structure of a thiamin picrolonate dihydrate complex. *J. Am. Chem. Soc.* **99**, 3491-3499.
- Shin, W. & Kim, Y.C.** (1986) The crystal structure of thiamin thiazolone: A possible transitionstate analogue with an intramolecular N-H-O hydrogen bond in the V-form. *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 7078-7082.
- Shin, W.**, Oh, D.G., Chae, C.H. & Yoon, T.S. (1993) Conformational analyses of thiamin-related compounds. A stereochemical model for thiamin catalysis. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 12238-12250.
- Siderova, N.N.**, Usmanov, R.A. & Kochetov, G.A. (1995) Enzymatic synthesis of dihydroxyethylthiamine pyrophosphate, its optical characteristics, and quantitative determination. *Biokhimiia.* **60**, 1095-1099.
- Siegert, P.**, Pohl, M., Kneen, M.M., Pogozeva, I.D., Kenyon, G.L. & McLeish, M.J. (2004) Exploring the substrate specificity of benzoylformate decarboxylase, pyruvate decarboxylase, and benzaldehyde lyase. *Thiamine: Catalytic mechanism in normal and disease states.* (ed. Jordan, F. & Patel, M.S.) Marcel Dekker Inc., 275-290.
- Sprenger, G.A. & Pohl, M.** (1999) Synthetic potential of thiamin diphosphate-dependent enzymes. *J. Mol. Catal. B-Enzymatic* **6**, 145-159.
- Stowe, B.B.** (1955) The production of indoleacetic acid by bacteria. *Biochem. J.* **61**, 9-10.
- Sultanov, A.S.** in: Becker, H. & Berger, W. (Eds.) (1986) *Organikum*, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin, 354-355.
- Sun, S.**, Duggleby, R.G. & Schowen, R.L. (1995) Linkage of catalysis and regulation in enzyme action. Carbon isotope effects, solvent isotope effects, and proton inventories for the unregulated pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis*. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 7317-7322.
- Svergun, D.I.**, Barberato, C. & Koch, M.H.J. (1995) Crysol – a program to evaluate X-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates. *J. Appl. Crystallogr.* **28**, 768-773.
- Svergun, D.I.** (1999) Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing. *Biophys. J.* **76**, 2879-2886.



- Svergun, D.I.**, Petoukhov, M.V., Koch, M.H.J. & König, S. (2000) Crystal versus solution structures of thiamine diphosphate-dependent enzymes. *J. Biol. Chem.* **275**, 297-302.
- Tam, Y.Y. & Normanly, J.** (1998) Determination of indole-3-pyruvic acid levels in *Arabidopsis thaliana* by gas chromatography selected ion monitoring mass spectrometry. *J. Chromatography* **800**, 101-108.
- Tittmann, K.**, Golbik, R., Uhlemann, K., Khailova, L., Schneider, G., Patel, M., Jordan, F., Chipman, D.M., Duggleby, R.G. & Hübner, G. (2003) NMR analysis of covalent intermediates in thiamin diphosphate enzymes. *Biochemistry* **42**, 7885-7891.
- Tittmann, K.**, Schöder, K., Golbik, R., McCourt, J., Kaplun, A., Duggleby, R.G., Barak, Z., Chipman, D.M. & Hübner, G. (2004) Electron transfer in acetoxyacid synthase as a side reaction of catalysis. Implications for the reactivity and partitioning of the carbanion/enamine form of  $\alpha$ -hydroxyethyl-thiamin diphosphate in a "nonredox" flavoenzyme. *Biochemistry*, in Druck.
- Tung, W.L. & Chow, K.C.** (1995) A modified medium for efficient electrotransformation of *E. coli*. *Trends Genet.* **11**, 128-129.
- Usmanov, R.A.**, Siderova, N.N. & Kochetov, G.A. (1996) Interaction of dihydroxyethylthiamine pyrophosphate with transketolase. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **38**, 307-314.
- Ward, O.P. & Baev, M.** (2000) Decarboxylases in stereoselective catalysis. *Stereoselective Biocatalysis*. Edited by Patel, R.N. New York: Marcel Dekker Inc., 267-287.
- Washabaugh, M.W. & Jencks, W.P.** (1988) Thiazolium C(2)-proton exchange: Structure-reactivity correlations and the  $pK_a$  of thiamin C(2)-H revisited. *Biochemistry* **27**, 5044-5053.
- Washabaugh, M.W. & Jencks, W.P.** (1989<sub>a</sub>) Thiazolium C(2)-proton exchange: General-base catalysis, direct proton transfer, and acid inhibition. *J. Am Chem. Soc.* **111**, 674-683.
- Washabaugh, M.W. & Jencks, W.P.** (1989<sub>b</sub>) Thiazolium C(2)-proton exchange: Isotope effects, internal return, and a small intrinsic barrier. *J. Am Chem. Soc.* **111**, 683-692.
- Washabaugh, M.W.**, Stivers, J.T. & Hickey, K.A. (1994) C( $\alpha$ )-proton transfer from 2-(1-hydroxybenzyl)oxythiamin: The unit Brønsted slope overestimates the amount of bond formation to the base catalyst in the transition state. *J. Am Chem. Soc.* **116**, 7094-7097.
- Weiss, P.M.**, Garcia, G.A., Kenyon, G.L. & Cleland, W.W. (1988) Kinetics and mechanism of benzoylformate decarboxylase using  $^{13}C$  and solvent deuterium isotope effects on benzoylformate and benzoylformate analogues. *Biochemistry* **27**, 2197-2205.
- Wikner, C.**, Meshalkina, L., Nilsson, U., Nikkola, M., Lindqvist, Y., Sundström, M. & Schneider, G. (1994) Analysis of an invariant cofactor-protein interaction in thiamin diphosphate-dependent enzymes by site-directed mutagenesis. Glutamic acid 418 in transketolase is essential for catalysis. *J. Biol. Chem.* **269**, 32144-32150.
- Wikner, C.**, Meshalkina, L., Nilsson, U., Bachstrom, S., Lindqvist, Y. & Schneider, G. (1995) His 103 in yeast transketolase is required for substrate recognition and catalysis. *Eur. J. Biochem.* **233**, 750-755.
- Wikner, C.**, Nilsson, U., Meshalkina, L., Udekwu, C., Lindqvist, Y. & Schneider, G. (1997) Identification of catalytically important residues in yeast transketolase. *Biochemistry* **36**, 15643-15649.
- Williams, F.R. & Hager, L.P.** (1966) Crystalline flavin pyruvate oxidase from *Escherichia coli*. I. Isolation and properties of the flavoprotein. *Arch. Biochem. Biophys.* **116**, 168-176.
- Wu, Y.G.**, Chang, A.K., Nixon, P.F., Ki, W. & Duggleby, R.G. (2000) Mutagenesis at asp27 of pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis*. Effect on its ability to form acetoin and acetolactate. *Eur. J. Biochem.* **267**, 6493-6500.
- Yamada, T.** (1993) The role of auxin in plant disease development. *Annu. Rev. Phytopathol.* **31**, 253-273.

- Yagi, K.**, Chujo, T., Nojiri, H., Omori, T., Nishiyama, M. & Yamane, H. (2001) Evidence for the presence of DNA-binding proteins involved in regulation of the gene expression of indole-3-pyruvic acid decarboxylase, a key enzyme in indole-3-acetic acid biosynthesis in *Azospirillum lipoferum* FS. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65**, 1265-1269.
- Zimmer, W.**, Hundeshagen, B. & Niederau, E. (1994) Demonstration of the indolepyruvate decarboxylase gene in different auxin-producing species of the *Enterobacteriaceae*. *Can. J. Microbiol.* **40**, 1072-1076.

## Anhang

**Tab. 13:** *Konstruktion der Primer zur Generierung der EcIPDC-Mutanten. Ausgetauschte Nukleotide sind unterstrichen. Das Nukleotidtriplett, welches für die mutierte Aminosäure codiert, ist hervorgehoben. Die Oligonukleotide, synthetisiert durch Invitrogen GmbH (Karlsruhe, Deutschland), wurden so konzipiert, dass zusätzliche Restriktionsschnittstellen (Rs+) eingeführt wurden.*

Bedeutung	Bezeichnung	Rs <sup>+</sup>	Nukleotidsequenz (5'-3')
<b>Mutationsprimer</b>			
Asp <sup>29</sup> Glu	<i>EcIPDC/Asp<sup>29</sup>Glu fwd</i>	SmaI	CAT CTG TTT GGC GTG <u>CCC</u> <u>GGG</u> <b>GAG</b> TAT AAC CTG CAG
	<i>EcIPDC/Asp<sup>29</sup>Glu rwd</i>		CTG CAG GTT ATA CTC CCC GGG CAC GCC AAA CAG ATG
Glu <sup>52</sup> Asp	<i>EcIPDC/Glu<sup>52</sup>Asp fwd</i>	BsmI	GTG GGC TGT GCC AAT <b>GAC</b> CTG <u>AAT</u> GCA TCC TAT GCC
	<i>EcIPDC/Glu<sup>52</sup>Asp rwd</i>		GGC ATA GGA TGC ATT CAG GTC ATT GGC ACA GCC CAC
His <sup>115</sup> Lys	<i>EcIPDC/His<sup>115</sup>Lys fwd</i>	SacI	AGG GGA GAG <u>CTC</u> CTG <b>AAG</b> CAT ACG TTG GGG GAT GGG GAG
	<i>EcIPDC/His<sup>115</sup>Lys rwd</i>		CTC CCC ATC CCC CAA CGT ATG CTT CAG GAG CTC TCC CCT
Gln <sup>383</sup> Thr	<i>EcIPDC/Gln<sup>383</sup>Thr fwd</i>	KpnI	GAC ATT ATC CTT GCC GAC <b>ACG</b> <u>GGT</u> <u>ACC</u> TCG GCC TTC GGC
	<i>EcIPDC/Gln<sup>383</sup>Thr rwd</i>		GCC GAA GGC CGA GGT ACC CGT GTC GGC AAG GAT AAT GTC
Glu <sup>468</sup> Asp	<i>EcIPDC/Glu<sup>468</sup>Asp fwd</i>	SalI	GGT TAC ACG <u>GTC</u> <b>GAC</b> <u>AGA</u> GCT ATC CAC GGG GCG
	<i>EcIPDC/Glu<sup>468</sup>Asp rwd</i>		CGC CCC GTG GAT AGC TCT GTC GAC CGT GTA ACC
<b>Sequenzierprimer</b>			
1	Sequ1_381to360_rwd	-	CGT ATG ATG CAG CAA CTC TCC C
2	Sequ2_263to284_fwd	-	GGG AGT TAA GTG CCA TGA ACG G
3	Sequ3_630to650_fwd	-	TGC TGC TGA GAA CAA ACT GGC
4	Sequ4_910to929_fwd	-	GGG TTC ACG CAC CAG CTT AC
5	Sequ5_1252to1272_fwd	-	GGC TCG ATT GGT TAC ACG CTG
6	Sequ6_1511to1532_fwd	-	GCC TCG ATC CTC AGT CTG AGT G

**Tab. 14:** *Sekundärstrukturelemente im EcIPDC-Monomer.  
Die mit \* gekennzeichneten  $\beta$ -Faltblätter sind antiparallel.*

Domäne	Helix	AS-Sequenz	$\beta$ -Faltblatt	AS-Sequenz
PYR	$\alpha$ 1	6 CVADYLLDRLTDC 18	$\beta$ 1	22 HLFQ 25
	$\alpha$ 2	28 GDY 30	$\beta$ 2	45 CWVG 48
	$\alpha$ 3	31 NLQFLDHVIDS 41	$\beta$ 3	69 AALLTT 74
	$\alpha$ 4	51 NELNASYAADGYARCKG 67	$\beta$ 4	96 VLHIVGA 102
	$\alpha$ 5	76 GVGELSA 82	$\beta$ 5	136 AQAV 139
	$\alpha$ 6	82 AMNGIAGSYAE 92	$\beta$ 6	163 GYLMLP 168
	$\alpha$ 7	104 GTAAQQRG 111		
	$\alpha$ 8	124 RHFYHMS 130		
	$\alpha$ 9	131 EPIT 134		
	$\alpha$ 10	144 NACYEIDRVLTMLRER 160		
	$\alpha$ 11	169 ADVAKK 174		
R	$\alpha$ 12	191 DSACLKAFRDAAENKLAM 208		
	$\alpha$ 13	217 DFLVLRH 223		
	$\alpha$ 14	225 LKHALQKWVKEV 236	$\beta$ 7	212 TALLA 216
	$\alpha$ 15	244 LMGK 247	$\beta$ 8	239 AHAT 242
	$\alpha$ 16	262 SGSAS 266	$\beta$ 9	279 TVLCV 283
	$\alpha$ 17	267 TGAVKEAIEG 276	$\beta$ 10	304 TIEV 307
	$\alpha$ 18	323 PMNQAIETLVELCKQ 337	$\beta$ 11*	311 AARV 314
			$\beta$ 12*	317 VWFT 320
PP	$\alpha$ 19	361 TQENFWRTLQTFI 373		
	$\alpha$ 20	384 GTSAFGAI 391		
	$\alpha$ 21	411 GYTLAAAFGAQTAC 424	$\beta$ 13	378 IILA 381
	$\alpha$ 22	435 DGAAQLTI 442	$\beta$ 14	400 NFI 402
	$\alpha$ 23	443 QELGSMLRD 451	$\beta$ 15	429 VIVLTG 434
	$\alpha$ 24	465 YTVERAIH 472	$\beta$ 16	456 IILVLN 461
	$\alpha$ 25	476 QRYND 480	$\beta$ 17	499 SECWRV 504
	$\alpha$ 26	485 NWTHI 489	$\beta$ 18	523 LSLIEVM 529
	$\alpha$ 27	506 EAEQLADVLEKVA 518		
	$\alpha$ 28	536 PLLGALTKALEACNN 551		

**Tab. 15:** *Potentielle Wasserstoffbrücken- und Salzbrückenbindungen im Monomer-Monomer-Interaktionsbereich der EcIPDC.*  
*Es sind die Wechselwirkungen zwischen den Untereinheiten A und B dargestellt. Die hervorgehobenen Aminosäuren sind konserviert und am Dimeraufbau der PDC (Zm,Sc) beteiligt.*

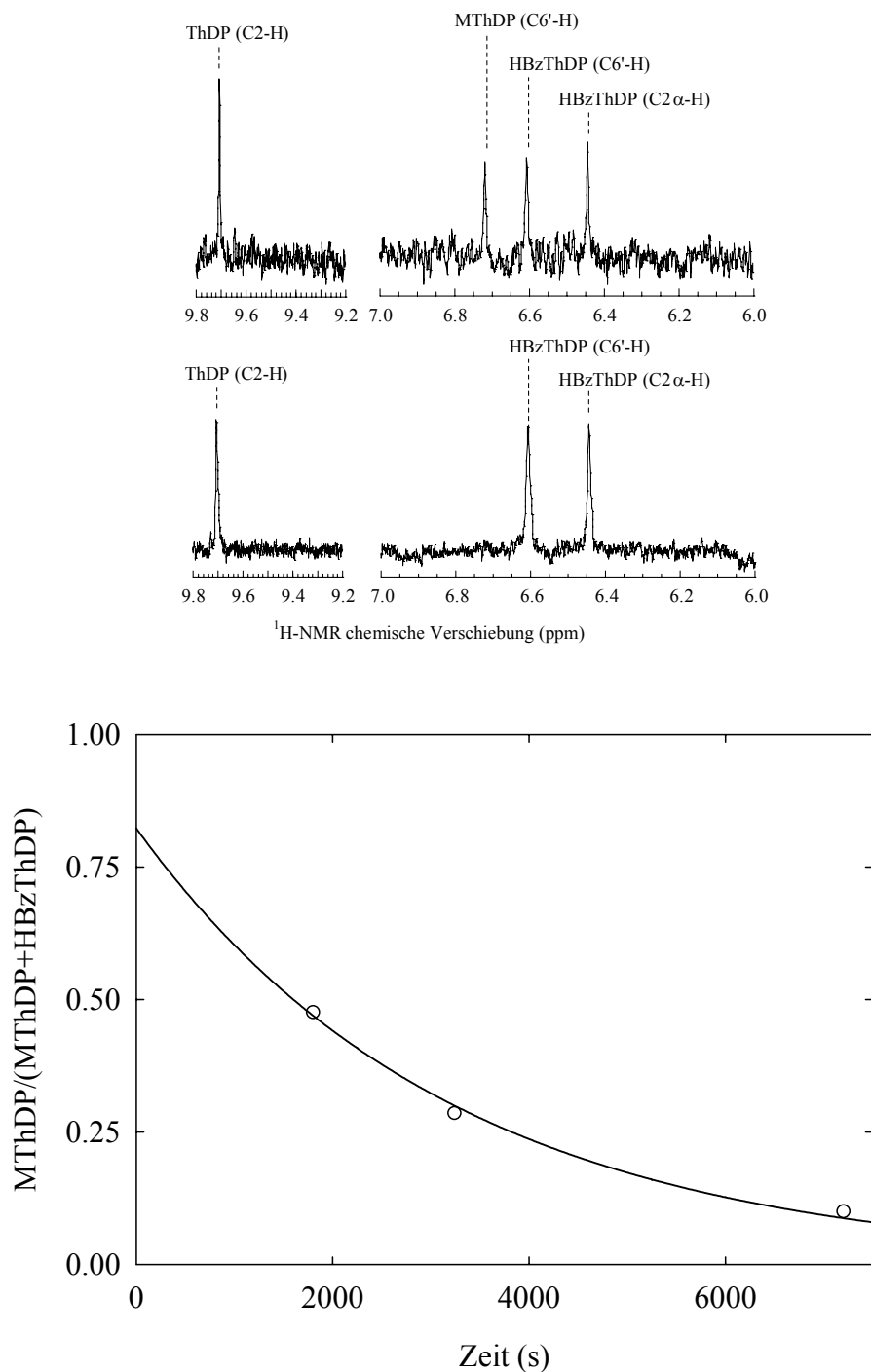
<u>Donor</u>		<u>Akzeptor</u>		Abstand (Å)
Aminosäure	Atom	Aminosäure	Atom	
<b>Asp36</b>	OD1	Gln476	NE2	2.98
	OD1	Tyr478	OH	2.88
Trp46	O	Arg477	NH1	3.17
			NH2	3.19
<b>Asn51</b>	ND2	Leu440	O	3.35
<b>Glu52</b>	OE1	ThDP	N1'	3.15
Leu113	O	Asp289	N	3.08
<b>His116</b>	N	Leu406	O	2.86
	ND1	Trp407	O	2.61
Lys173	NZ	Asn550	O	2.80
		Asn551	OD1	2.69
		Leu113	O	3.06
Asp289	N	His116	N	2.91
Leu406	O	His116	ND1	2.71
<b>Trp407</b>	O	His116	ND1	2.71
<b>Gln439</b>	O	Gln443	NE2	3.12
<b>Gln443</b>	NE2	Gln439	O	3.07
		Gln443	OE1	2.88
		Gln443	NE2	2.87
Gln476	OE1	Gln443	NE2	2.87
	NE2	Asp36	OD1	2.90
Arg477	NH1	Trp46	O	3.16
	NH2	Trp46	O	3.21
<b>Tyr478</b>	OH	Asp36	OD1	2.99
Asn485	N	Ala492	O	3.01
Ala492	O	Asn485	N	2.97
Asn550	O	Lys173	NZ	2.81
	ND2	Asp29	OD1	3.44
Asn551	OD1	Lys173	NZ	2.76
ThDP	N1'	Glu52	OE1	2.67

**Tab. 16:** *Potentielle Wasserstoffbrückenbindungen im Dimer-Dimer-Interaktionsbereich der EcIPDC.*  
*Es sind die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Untereinheiten A und C aufgeführt.*

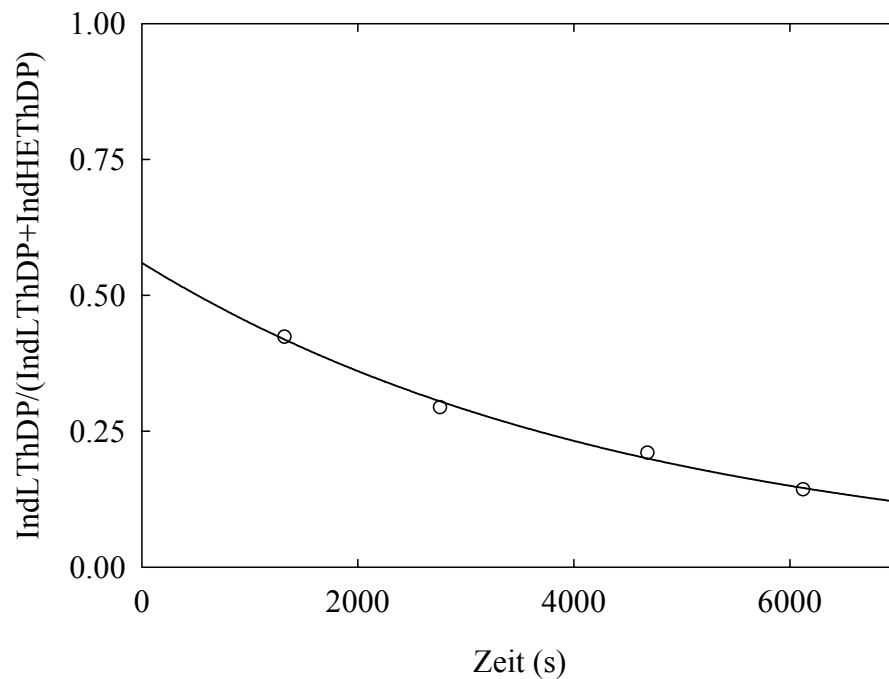
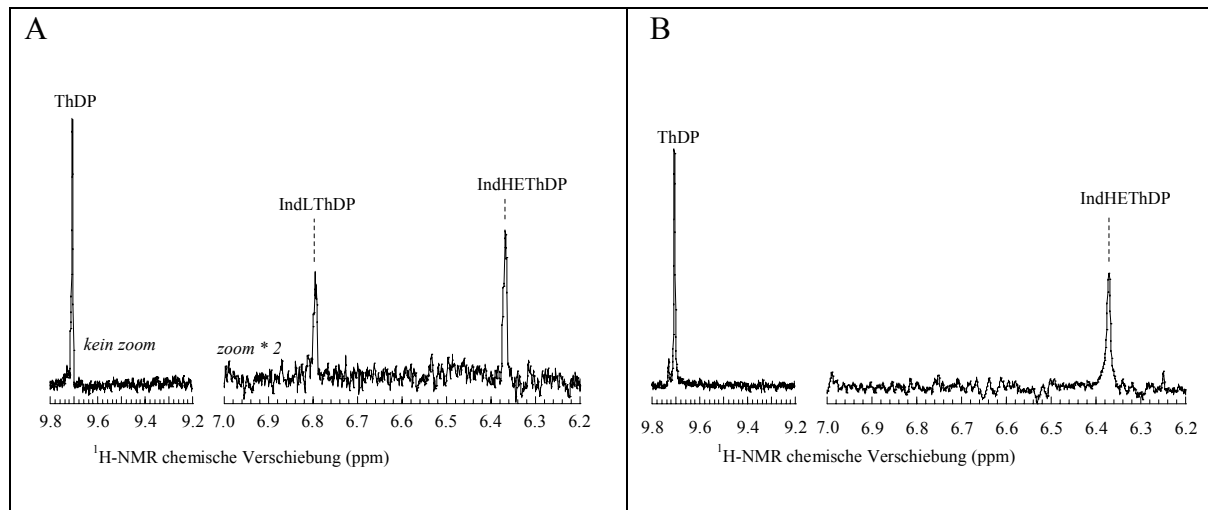
<u>Donor</u>		<u>Akzeptor</u>		Abstand (Å)
Aminosäure	Atom	Aminosäure	Atom	
Cys146	N	Thr320	OG1	3.09
	CB	Thr320	OG1	2.78
	SG	Thr320	OG1	2.85
Val180	N	Asp191	OD1	2.59
Asp191	OD1	Val180	N	2.86
Thr320	OG1	Cys146	N	3.21
		Cys146	CB	2.93
		Cys146	SG	3.04

**Tab. 17:** *Unmittelbare und über Wassermoleküle vermittelte Kontakte der Cofaktoren ThDP und Mg<sup>2+</sup> im aktiven Zentrum der EcIPDC (am Bsp. der Untereinheit A). Die markierten Reste sind in den ThDP-abhängigen Strukturen hoch konserviert. Die mit (\*) markierten Reste stammen von der anderen Untereinheit im funktionellen Dimer.*

Molekül	Atom	Abstand (Å)	Rest	Atom	
ThDP	N3	3.85	OE2	Glu468	
	N3'	3.28	N	Ile410	
	N1'	2.67	OE1	<b>Glu50*</b>	
	N4'	2.63	O	Gly408	
	O1A	2.60		Wasser (19)	
		2.81	N	Ala437	
	O2A	3.03	N	Gly436	
		2.38		Mg <sup>2+</sup>	
	O1B	2.93	O	Gly464	
		2.74		Wasser (203)	
	Mg <sup>2+</sup>	2.56		Wasser (157)	
		2.70	OG1	Thr385	
		3.64	N	Thr385	
		3.38	ND2	Asn462	
		O2B	3.25	N	Val467
			3.16	N	Thr385
		O3B	2.45		Mg <sup>2+</sup>
			2.65	N	Thr466
		3.28	ND2	Asn462	
		2.84	O	Gly464	
Wasser (19)	2.27	OD1	<b>Asp435</b>		
	2.24	OD1	<b>Asn 462</b>		
	2.34	O	Gly464		
	2.38	O2A	ThDP		
	2.45	O3B	ThDP		
	2.23		Wasser (157)		
	2.60	O1A	ThDP		
Wasser (157)	2.69		Wasser(203)		
	2.47	O	Gln383		
	3.07	N	Gly434		
	2.23		Mg <sup>2+</sup>		
Wasser (203)	2.56	O1B	ThDP		
	2.38	O	Leu460		
	3.15	N	Asp435		
	2.74	O1B	ThDP		
Wasser (19)	2.69		Wasser (19)		
	2.66	OG	Ser386		
	3.15	N	Gly434		
	3.14	N	Ser386		



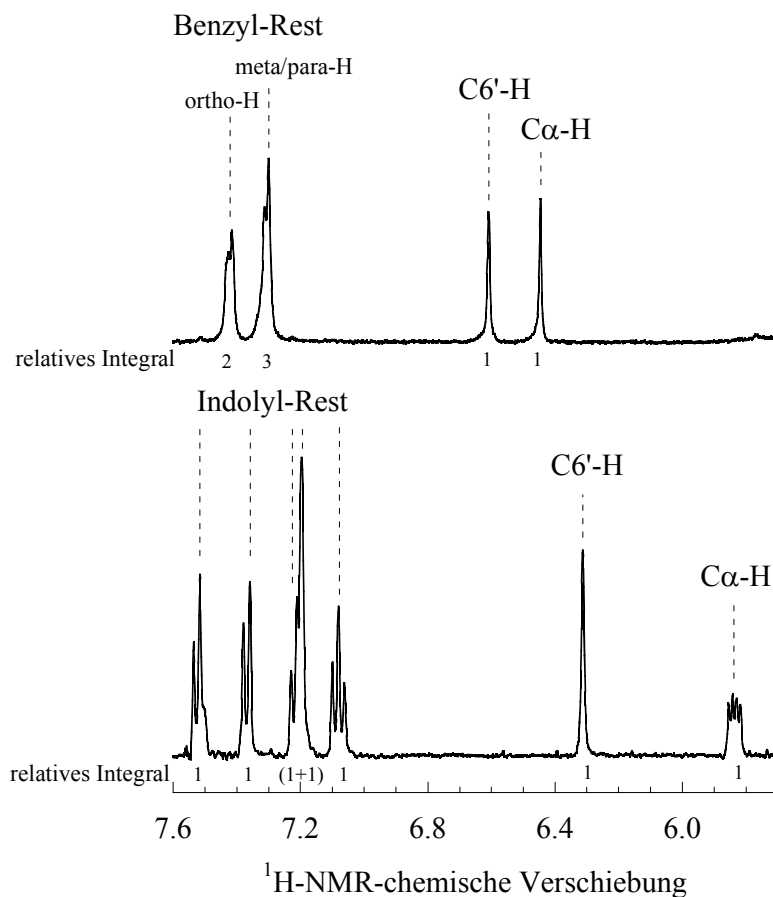
**Abb. 37:** *Stabilität von 2-Mandelyl-ThDP (MThDP).*  
 Es wurde die chemische Stabilität des intermediär in der *EcIPDC/Asp<sup>29</sup>Glu* katalysierten Umsetzung von *Bf* gebildeten MThDP bei 27 °C und pH 0.75 überprüft. Die <sup>1</sup>H-NMR chemische Verschiebungen gegenüber C6'-H entsprechen 6.72 ppm für MThDP und 6.61 ppm für HBzThDP. Die Anpassung der Daten erfolgte an die Gleichung  $y = a \cdot e^{-kt}$  (einfach exponentieller Abfall) mit  $a = 0.82 \pm 7.5 \cdot 10^{-2}$  und  $k = 3.12 \cdot 10^{-4} \pm 3.6 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ . Das entspricht einer Halbwertszeit von 37 min.



**Abb. 38:** *Stabilität von 2-(2-Indolyl-lactyl)-ThDP (IndLThDP).*

*Es wurde die chemische Stabilität des intermediär in der durch die EciPDC/Glu<sup>468</sup> Asp katalysierten Umsetzung von IPyr gebildeten IndLThDP bei 27 °C und pH 0.75 überprüft. Die <sup>1</sup>H-NMR chemische Verschiebungen gegenüber C6'-H entsprechen 6.80 ppm für IndLThDP und 6.37 ppm für IndHETHP. Die Anpassung der Daten erfolgte an die Gleichung  $y = a \cdot e^{-kt}$  (einfach exponentieller Abfall) mit  $a = 0.56 \pm 2.2 \cdot 10^{-2}$  und  $k = 2.20 \cdot 10^{-4} \pm 1.4 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ . Das entspricht einer Halbwertszeit von 53 min.*

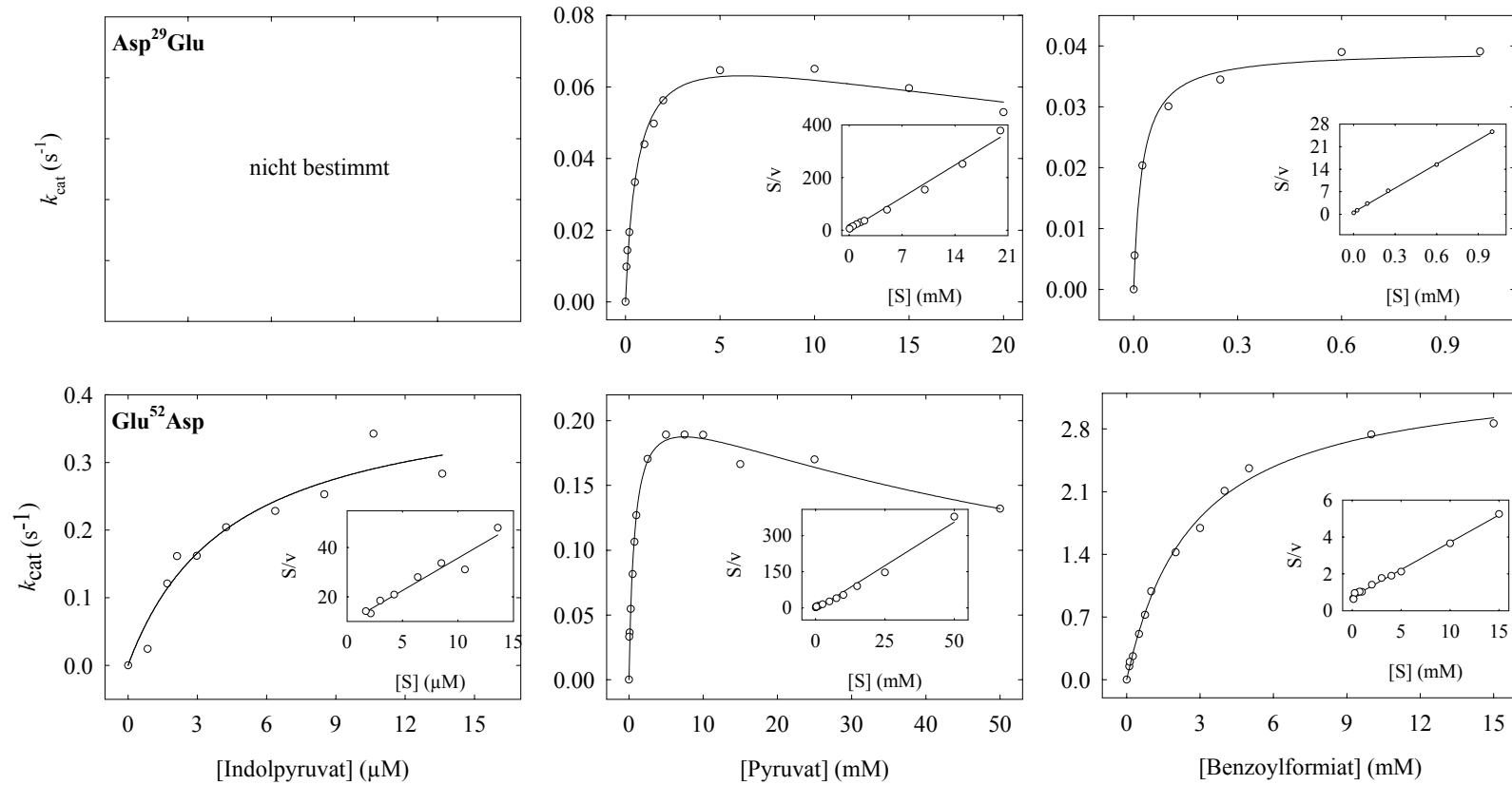


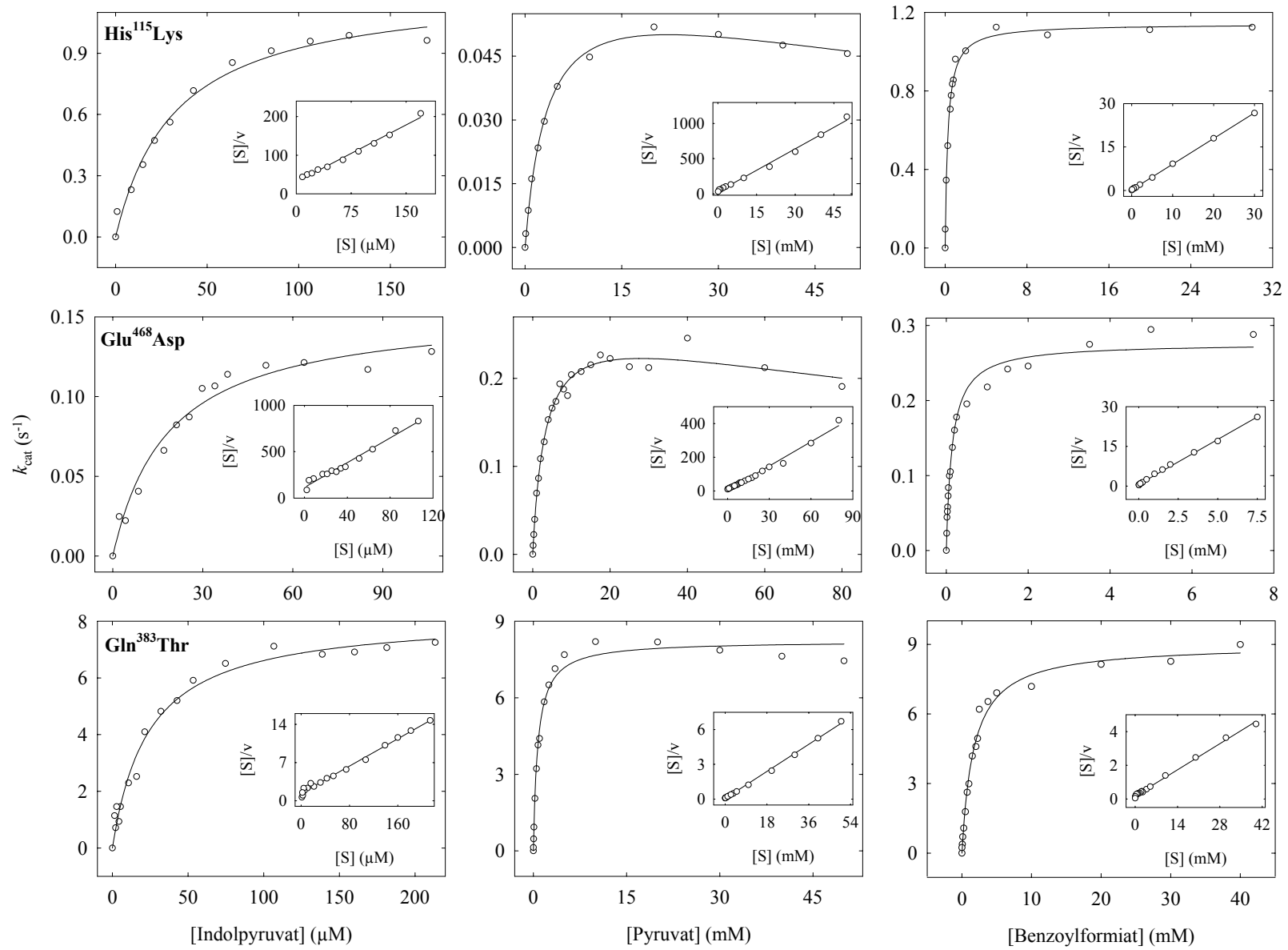


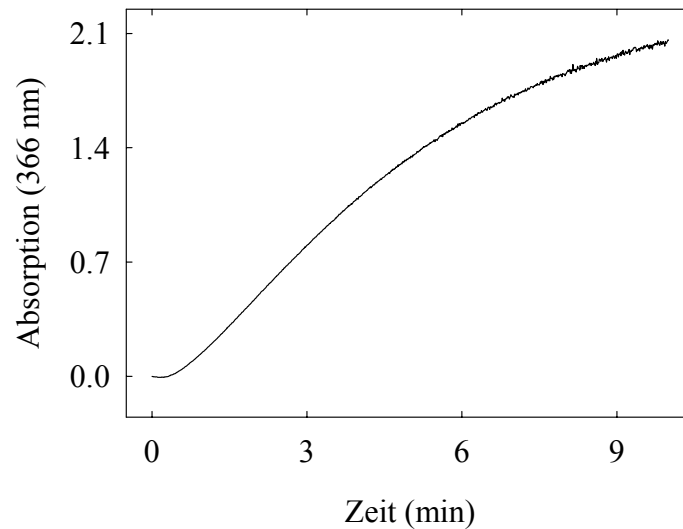
**Abb. 39:**  $^1\text{H-NMR-chemische Verschiebungen der kovalenten ThDP-Addukte HBzThDP und IndHEThDP}$ .

Das C $\alpha$ -H des IndHEThDP entspricht aufgrund der Kopplung mit der prochiralen Methylengruppe einem Quartett. Zwar interferieren die Protonensignale der aromatischen Substrate (Bf, IPyr) und Produkte (Benzaldehyd, Indolacetaldehyd) mit den aromatischen Protonen der Intermediate HBzTHDP (oben) und IndHEThDP (unten), aber die C6'-H Signale bleiben davon unbeeinflusst und können somit zur quantitativen Auswertung herangezogen werden (HBzThDP: 6.61 ppm, IndHEThDP: 6.37 ppm).

**Abb. 40:** *Abhängigkeit der katalytischen Aktivität der EcIPDC-Varianten von der Substratkonzentration.*  
 Zur Bestimmung der kinetischen Konstanten wurden die Messdaten (Kreise) an die Michaelis-Menten-Gleichung (IPyr, Bf) oder an die durch den Term der Substratüberschusshemmung erweiterte Form (Pyr) angepaßt. Die Inserts entsprechen der linearisierten Auftragung nach HANES (1932).



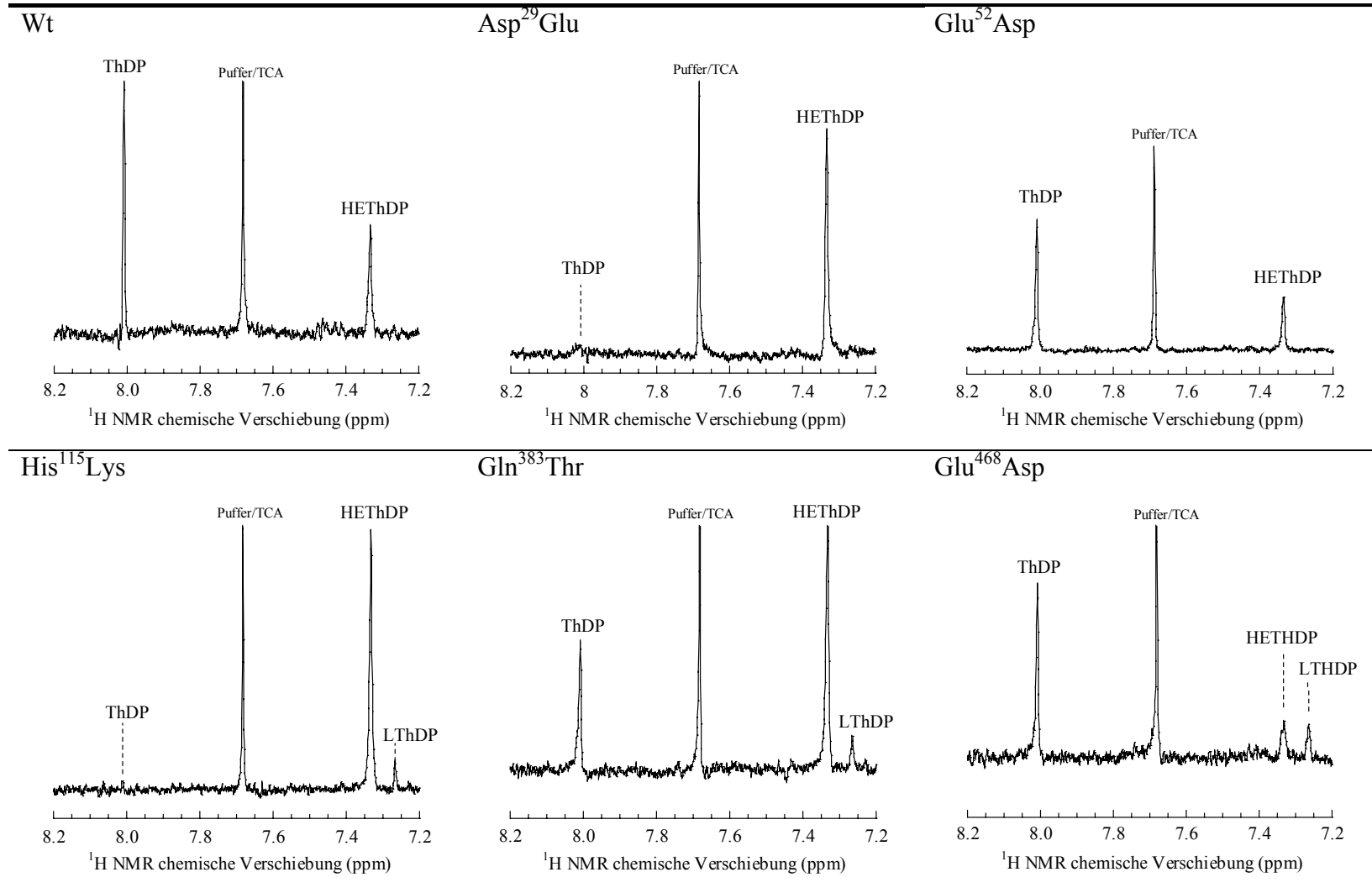




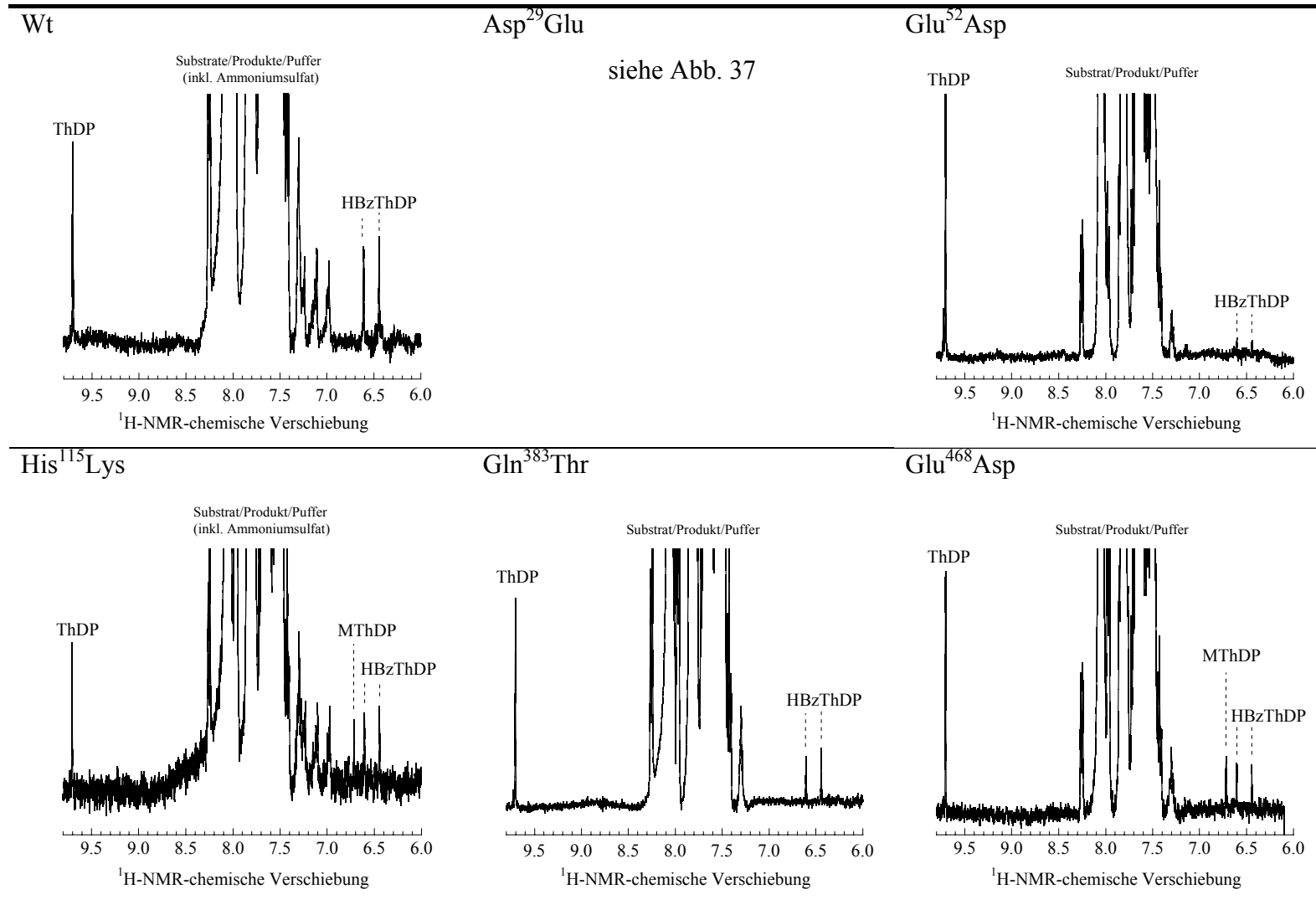
**Abb. 41:** *Progresskurve der Umsetzung von Indolpyruvat durch die EcIPDC-Variante Asp<sup>29</sup>Glu.*

*Es wurde ein gekoppelt optischer Test mit Pferdeleber-ADH angewendet. Der Messansatz enthielt 0.1 M Mes/NaOH pH 6.5, 0.28 mM NADH, 1 U/mL Pferdeleber-ADH, 3.6 mM IPyr (unter Berücksichtigung des Tautomerengleichgewichtes) und 5.1 mg/mL EcIPDC Asp<sup>29</sup>Glu (präinkubiert mit 15 mM Cofaktoren). Die Absorptionsänderung wurde bei 366 nm verfolgt. Anstelle einer Absorptionsabnahme (NADH-Verbrauch im Sinne des gekoppelt optischen Tests) wurde diese dargestellte Progresskurve beobachtet. Während dieser Messungen (30 °C) wurde eine deutliche Denaturierung des Enzyms festgestellt. Beim Wildtypenzym ist dagegen unter vergleichbaren Bedingungen keine Denaturierung zu beobachten.*

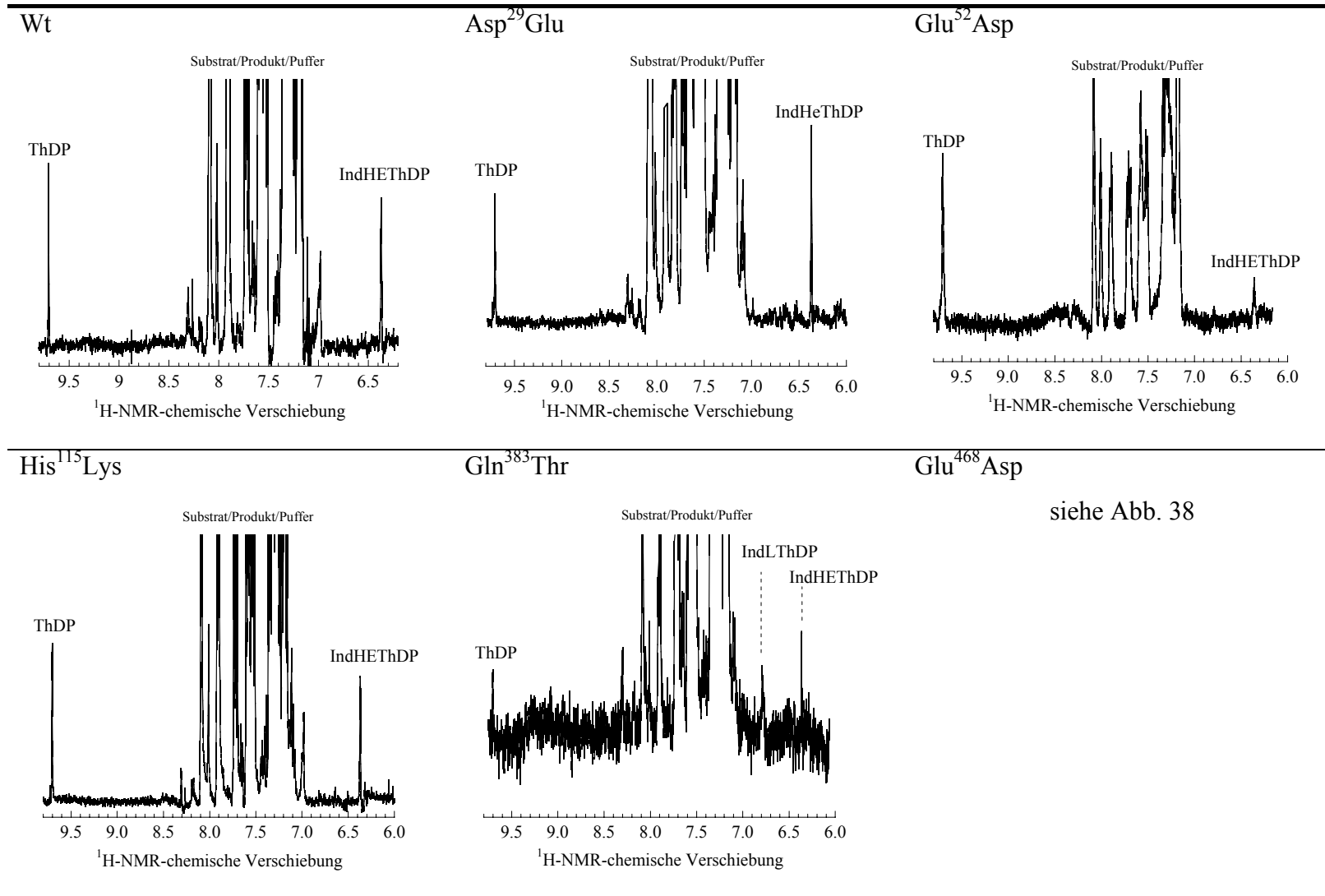
**Abb. 42:**  $^1\text{H}$ -NMR Spektren zur Bestimmung der Intermediatverteilung in der Umsetzung von Pyruvat. Zur Unterscheidung der kovalent am C2-Atom des ThDP-Moleküls gebundenen Intermediate dient eine  $^1\text{H}$ -NMR chemische Verschiebung des C6'-H Singulets der Aminopyrimidinumgebung (8.01 ppm für ThDP, 7.27 ppm für LThDP und 7.33 ppm für HETHDP).



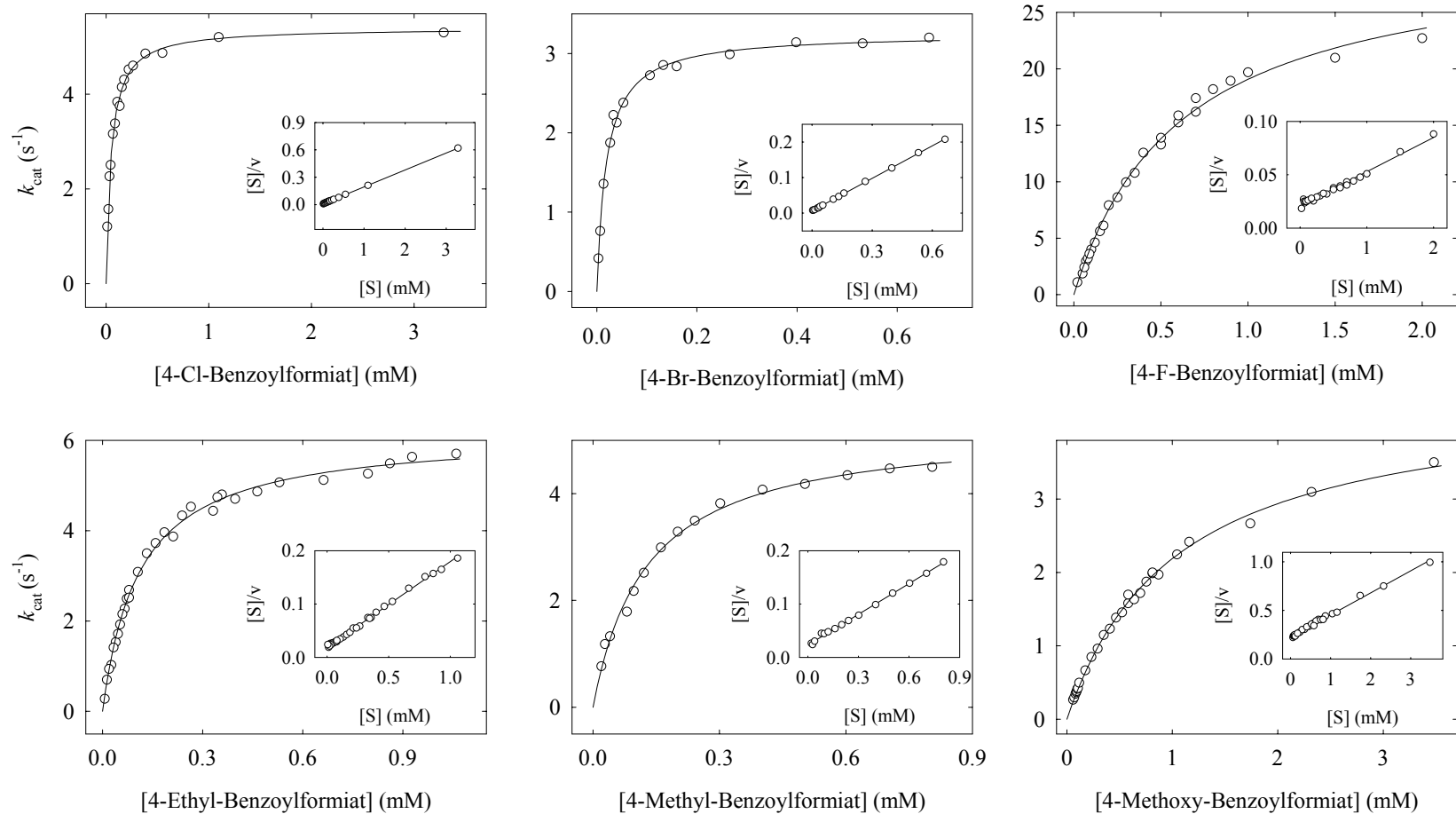
**Abb. 43:**  $^1\text{H-NMR}$  Spektren zur Bestimmung der Intermediatverteilung in der Umsetzung von Benzoylformiat.  
Die  $^1\text{H-NMR}$  chemische Verschiebungen gegenüber  $\text{C6}'\text{-H}$  entsprechen 6.72 ppm für MThDP und 6.61 ppm für HBzThDP.



**Abb. 44:**  $^1\text{H-NMR}$  Spektren zur Bestimmung der Intermediatverteilung in der Umsetzung von Indolpyruvat.  
Die  $^1\text{H-NMR}$  chemische Verschiebungen gegenüber  $\text{C6}'\text{-H}$  entsprechen 6.80 ppm für IndLThDP und 6.37 ppm für IndHEThDP.



**Abb. 45:** *Untersuchung der Umsetzung 4-substituierter Benzoylformiate durch EcIPDC-Wt. Dargestellt ist die Abhängigkeit der katalytischen Aktivität der EcIPDC-Wt von der Konzentration 4-substituierter Benzoylformiate. Zur Bestimmung der kinetischen Konstanten wurden die Messdaten (Kreise) an die Michaelis-Menten-Gleichung angepasst. Die Inserts entsprechen der linearisierten Auftragung nach HANES (1932).*







## **Dankesworte**

*An dieser Stelle möchte ich gern allen danken, die zum Gelingen dieser Dissertationsarbeit beigetragen haben.*

*Prof. Dr. G. Hübner danke ich für die Möglichkeit, in der AG Enzymologie des Fachbereiches Biochemie/Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg diese Arbeit anfertigen zu können. Ich danke für die fachliche Unterstützung und für die stete Förderung dieser Arbeit.*

*Ein herzlicher Dank gilt Dr. S. König für das Anvertrauen der interessanten Thematik und die ständige Diskussionsbereitschaft zu Problemen praktischer und theoretischer Art. Insbesondere danke ich für die Hilfe bei der Durchführung und Auswertung der SAXS-Messungen. Stephan, Danke für die entspannte und effektive Zusammenarbeit! Die unzähligen Stunden am Messplatz X33 und die HEC-Konferenzen werden mir besonders in Erinnerung bleiben.*

*Ein großer Dank gilt Junior-Prof. Dr. K. Tittmann für die Hilfe bei der Aufnahme und Interpretation der <sup>1</sup>H-NMR-Spektren. Ich danke für die zahlreichen Diskussionen und die wertvollen Hinweise, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Kai, Danke für das kooperative Arbeiten!*

*Ganz besonders möchte ich Prof. Dr. G. Schneider und Prof. Dr. Y. Lindqvist danken, die mir den insgesamt sechsmonatigen Aufenthalt in der Arbeitsgruppe „Molekulare Strukturbiologie“ am Karolinska-Institut in Stockholm/Schweden ermöglichten. Ich bedanke mich für die Einführung auf dem Gebiet der Röntgenkristallstrukturanalyse. Insbesondere danke ich für die Ermöglichung der Reisen an die Synchrotrons und die spannende Erfahrung, die eigenen Kristalle persönlich vermessen zu können. Hinsichtlich der Strukturaufklärung der Indolpyruvatdecarboxylase möchte ich Dr. T. Sandalova für die Zusammenarbeit danken. Doreen danke ich für die vielen praktischen Tipps und die zahlreichen privaten Unternehmungen. Eva Lindberg möchte ich für die manchmal aussichtslos erscheinende Hilfe bei der Suche nach einer Unterkunft in Stockholm danken. Hiermit ein Dank an alle Mitglieder der Arbeitsgruppe „Molekulare Strukturbiologie“, die mich so herzlich aufgenommen haben, dass ich mich von Anfang an wohl fühlte. Die Zeit in Stockholm wird mir unvergessen bleiben!*

*Dr. R. Golbik möchte ich für die Bereitstellung der chemisch synthetisierten intermediären ThDP-Addukte und der 4-substituierten Benzoylformiate danken. Ein weiterer Dank gilt der Assistenz bei den stopped-flow Messungen.*

*Der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. E. Wahle danke ich für die Möglichkeit der Nutzung verschiedener Apparaturen und die Hilfe bei der Sequenzierung der Nukleotidsequenzen der EcIPDC-Mutanten.*

*Dr. J. Koga möchte ich für die Überlassung des Plasmids pip362 danken.*

*Dr. M.H.J. Koch danke ich für die Unterstützung und Betreuung während der SAXS-Messungen.*

*Dem EMBL in Hamburg, dem ESRF in Grenoble/Frankreich und den MAX II Laboratorien in Lund/Schweden danke ich für den Zugang zu Synchrotronstrahlung.*

*Ganz herzlich möchte ich allen Mitarbeitern, Doktoranden und Diplomanden der Arbeitsgruppe „Enzymologie“ für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die vielseitige Unterstützung und die anregenden Diskussionen danken. An unsere Weihnachtsfeiern und Arbeitsgruppenausflüge werde ich mich gern zurückerinnern.*

*Ein ganz spezielles Dankeschön gilt Georg Wille, welcher mir die letzten Jahre ein wahrer Freund gewesen ist und es hoffentlich auch noch lange bleiben wird.*

*Diese Arbeit wurde insbesondere durch die Stipendien der Graduiertenförderung des Landes Sachsen/Anhalt und des Deutschen Akademischen Austauschdienstes (DAAD) gefördert.*

*Ein besonderer Dank gilt all meinen Freunden, die immer für mich da waren und es verstanden haben, mich in arbeitsintensiven Zeiten auf andere Gedanken zu bringen.*

*Zum Schluss möchte ich meiner Familie meinen aufrichtigsten Dank aussprechen, insbesondere meinen Eltern, die mich tatkräftig unterstützt und beständig an mich geglaubt haben.*

## **Erklärung**

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

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

Halle/Saale, den

Roter Feldweg 15  
06217 Merseburg  
Deutschland

Tel: +49-(0)-179.7021862  
+49-(0)-3461-214751  
anja.schuetz@biochemtech.uni-halle.de

## Anja Schütz

---

### persönliche Angaben

Alter	27
Geburtstag	11.04.1977
Geburtsort	Wurzen
Nationalität	deutsch
Familienstand	ledig
Kinder	keine



### Bildungsweg

seit 09/2002	wissenschaftliche Mitarbeiterin in der AG Enzymologie am Fachbereich Biochemie/Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Abschluss Dr. rer. nat. angestrebt
seit 10/2000	Promotion zum Thema „Untersuchungen zur Struktur und zum Katalysemechanismus der Indolpyruvatdecarboxylase aus <i>Enterobacter cloacae</i> “ in der AG Enzymologie (Prof. Dr. Hübner) am Fachbereich Biochemie/Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
1995-2000	Studium der Biochemie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Abschluss: Diplom der Biochemie, Prädikat „sehr gut“
1991-1995	Domgymnasium, Merseburg, Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (Durchschnittsnote 1.7)
1983-1991	Schule im Rosental, Merseburg

### weitere Tätigkeiten

1998	zweimonatiges Praktikum in der Forschung Biochemie, Hoechst-Schering AgrEvo GmbH, Frankfurt am Main
08/1995-07/1998	Nachhilfelehrerin (Englisch, Mathematik, Chemie), Studienkreis Halle

### Stipendien

2003	Sachmittelzuwendungen im Rahmen der Frauenförderung der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
03-05/2002 10/2003	zwei Stipendien des Deutschen Akademischen Austauschdienstes (DAAD) für Forschungsaufenthalte in der AG Molekulare Strukturbiologie (Prof. Dr. Schneider), Abteilung Medizinische Biochemie und Biophysik am Karolinska-Institut in Stockholm/Schweden
10/2000-08/2002	Stipendium der Graduiertenförderung des Landes Sachsen-Anhalt

### weitere Fähigkeiten

Fremdsprachen	Englisch, Russisch, Latinum
---------------	-----------------------------