Studien zur Struktur, Funktion und Aktivierung der membran-assoziierten Pyruvatoxidase aus *Escherichia coli*

Dissertation

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

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



von Annett Weidner geboren am 21. Januar 1979 in Halle

Gutachter:

- 1. Prof. Dr. Kai Tittmann, Göttingen
- 2. Prof. Dr. Milton T. Stubbs, Halle
- 3. Prof. Dr. Yves Muller, Erlangen

Halle/Saale, 29.10.2010

Man merkt nie, was schon getan wurde, man sieht immer nur, was noch zu tun bleibt.

Marie Curie

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis				9
Al	bbildı	ungsver	rzeichnis	11
Al	bkürz	ungen ı	und Symbole	15
1	Einl	eitung		19
	1.1	Der Or	Prganismus Escherichia coli (E. coli)	19
		1.1.1	Aerober Energiestoffwechsel in <i>Escherichia coli</i>	22
	1.2	Regula	ation - periphere Membranproteine	26
	1.3	Pyruva	vatoxidase aus <i>Escherichia coli</i>	27
		1.3.1	Aktivierung	31
	1.4	Zielste	ellung der Arbeit	33
2	Mat	erial un	nd Methoden	35
	2.1	Materi	ial	35
		2.1.1	Geräte	35
		2.1.2	Chemikalien, Proteine, Materialien	36
		2.1.3	Stämme, Plasmide, Oligonukleotide	38
	2.2	Molek	kularbiologische Arbeiten	40
		2.2.1	Generierung der <i>Ec</i> POX-Varianten	40
		2.2.2	Generierung des SUMO-alpha Fusionproteins	40
	2.3	Präpai	ration der Pyruvatoxidase und deren Varianten	42
		2.3.1	Zellanzucht	42
		2.3.2	Proteinreinigung	42
	2.4	Präpai	ration des α -Peptides	43
		2.4.1	Präparation des SUMO-alpha Fusionsproteins	44
			2.4.1.1 Zellanzucht	44
			2.4.1.2 Proteinreinigung	44
		2.4.2	Präparation der SUMO-Protease	45
			2.4.2.1 Zellanzucht	45

		2.4.2.2 Proteinreinigung	45		
	2.4.3	Isolierung des α -Peptides	46		
2.5	Chemische Synthese des α -Peptides				
2.6	2.6 Bestimmung des Extinktionskoeffizienten der <i>Ec</i> POX				
2.7	Konzei	ntrationsbestimmungen	48		
	2.7.1	Konzentration der <i>Ec</i> POX	48		
	2.7.2	Konzentration des α -Peptides	48		
	2.7.3	Bestimmung der DNA-Konzentration	48		
2.8	Aktivi	tätstest	48		
2.9	Proteo	lytische Aktivierung	49		
2.10	Bestim	nmung der Redoxpotentiale	50		
	2.10.1	Redoxtitration mit Farbstoffen	50		
	2.10.2	Zyklische Voltammetrie	51		
2.11	UV/Vi	is-Spektroskopie	53		
	2.11.1	Bildung des Phosphonolaktyl-ThDP	53		
	2.11.2	stopped-flow-Absorptionspektroskopie	53		
2.12	CD-Sp	pektroskopie	54		
	2.12.1	Bestimmung der K_D -Werte substratanaloger Verbindungen	54		
	2.12.2	Bestimmung der Sekundärstruktur des α -Peptides	55		
2.13	Infraro	otspektroskopie	56		
	2.13.1	Redoxinduzierte Infrarotspektroskopie	56		
	2.13.2	Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie (IRRAS)	57		
		2.13.2.1 Messungen an der Luft/Wasser-Grenzfläche	59		
		2.13.2.2 Messungen an der Lipid/Wasser-Grenzfläche	59		
2.14	NMR-9	Spektroskopie	60		
	2.14.1	H/D-Austauschexperimente und Intermediatverteilung	60		
	2.14.2	Struktur des α -Peptides	61		
2.15	Röntge	enkleinwinkelstreuung	62		
2.16	Kristal	llographische Arbeiten	63		
	2.16.1	Kristallisation und Datensammlung	63		
	2.16.2	Modellierung und kristallographische Verfeinerung	64		
	2.16.3	Kristallstrukturen mit Intermediaten	65		
Erge	bnisse	und Diskussion	67		
3.1	Kinetis	sche und thermodynamische Untersuchung der <i>Ec</i> POX	67		
	3.1.1	Abhängigkeit der <i>steady-state-</i> Geschwindigkeit von der Substratkon-	67		
	317	Finfluss der Aktivierung auf die Deprotonierung des ThDP	70		
	312	Einfluss der Aktivierung auf die Substrathindung	71		
	5.1.5	Emmuss der Akuvierung auf die Substratbilluung	11		

3

	3.1.4 Einfluss der Aktivierung auf die Bindung von MAP			76
		3.1.5	Einfluss der Aktivierung auf die reduktive Halbreaktion	78
			3.1.5.1 Nicht-aktivierte <i>Ec</i> POX	78
			3.1.5.2 Proteolytisch aktivierte <i>Ec</i> POX	83
		3.1.6	Verteilung der Reaktionsintermediate während der Katalyse	86
		3.1.7	Untersuchungen zum Elektronentransfer	90
		3.1.8	Bestimmung des Mittelpunktpotentials	91
			3.1.8.1 Titration mit Redoxfarbstoffen	92
			3.1.8.2 Zyklische Voltammetrie	93
		3.1.9	Zusammenfassung	95
	3.2	Konfor	mationsänderungen während der Aktivierung der <i>Ec</i> POX	97
		3.2.1	Exponierung der Lipidbindedomäne	97
		3.2.2	Änderung des Gyrationsradius	100
		3.2.3	Strukturelle Änderungen während der Reduktion	102
		3.2.4	Zusammenfassung	106
	3.3	Struktı	urelle Charakterisierung der Pyruvatoxidase aus <i>E. coli</i>	107
		3.3.1	Kristallstuktur der nicht-aktivierten <i>Ec</i> POX	107
		3.3.2	Kristallstruktur der $\Delta 23$ -Variante der <i>Ec</i> POX	115
		3.3.3	Vergleich der nicht-aktivierten <i>Ec</i> POX und der Δ 23-Variante der <i>Ec</i> POX	115
		3.3.4	Kristallstruktur in Gegenwart von Liganden	118
		3.3.5	Zusammenfassung	128
	3.4	Einflus	s des Phenylalanin 465 auf die Katalyse und Aktivierung	130
		3.4.1	Einfluss auf die <i>steady-state-</i> Geschwindigkeit	130
		3.4.2	Einfluss auf die reduktive Halbreaktion	132
		3.4.3	Zusammenfassung	135
	3.5	Unters	uchungen an der Lipidbindedomäne (α -Peptid) \ldots \ldots	136
		3.5.1	Strukturelle Charakterisierung des α -Peptides	137
			3.5.1.1 Sekundärstrukturbestimmung mittels CD-Spektroskopie	137
			3.5.1.2 Untersuchungen zur Membranbindung	138
			3.5.1.3 Strukturbestimmung mittels NMR	144
		3.5.2	Zusammenfassung	146
4	Zusa	ammenf	assung	149
Lit	eratu	rverzeic	hnis	151
A	Anh	ang		167

Tabellenverzeichnis

2.1	Verwendete Stämme	38
2.2	Verwendete Plasmide	39
2.3	Oligonukleotide für die ortsgerichtete Mutagenese	39
2.4	Oligonukleotide zur Amplifizierung des α -Peptides	39
2.5	Chemische Verschiebungen des C(6')-H der ThDP-Reaktionsintermediate	61
3.1	Katalytische Konstanten der nicht-aktivierten und der aktivierten <i>Ec</i> POX	68
3.2	Parameter der Katalyse von nicht-aktivierter und aktivierter <i>Ec</i> POX	95
3.3	Vergleich der Frequenzen der Schwingungen einzelner Gruppen	103
3.4	Intermediatbesetzung der aktiven Zentren der aktivierten EcPOX nach Inku-	
	bation mit Pyruvat	121
3.5	Katalytische Konstanten der <i>Ec</i> POX-Varianten	131
3.6	Übersicht über den Gehalt an Sekundärstrukturelementen des α -Peptides	138
3.7	Übersicht über die Schwingungen der verschiedenen Sekundärstrukturelemente	
	in Proteinen	140
A.1	Verwendetes PCR-Programm zur Amplifizierung des α -Peptides	167
A.2	Apparente Geschwindigkeitskonstanten der reduktiven Halbreaktion von ak-	
	tivierter <i>Ec</i> POX	181
A.3	Übersicht über die berechneten Gyrationsradien von nicht-aktivierter und ak-	
	tivierter <i>Ec</i> POX	183
A.4	Statistik für Datensammlung und Modellierung der Kristallstrukturen	185
A.5	Zuordnung der chemischen Verschiebungen zu den Aminosäuren des α -Peptides	193

Abbildungsverzeichnis

1.1	Rasterelektronenmikroskopaufnahme von <i>E. coli</i>	19
1.2	Schematische Darstellung der Zellmembran	20
1.3	Chemische Struktur der Phospholipide	21
1.4	Einteilung der Enzyme der Atmungskette	22
1.5	Chemische Struktur von Ubichinon und Menachinon	23
1.6	Schematische Darstellung der Atmungskette	24
1.7	Chemische Struktur der Kofaktoren	28
1.8	Katalysemechanismus der <i>Ec</i> POX	28
1.9	Glukosestoffwechsel von <i>E. coli</i>	30
1.10	Aktivierungsmodell der EcPOX	32
2.1	Schematischer Aufbau einer IRRAS-Messanordnung	58
3.1	v/S-Charakteristiken von nicht-aktivierter und aktivierter <i>Ec</i> POX	68
3.2	Hill-Auftragung der nicht-aktivierten <i>Ec</i> POX mit Pyruvat	69
3.3	H/D-Austauschexperimente von nicht-aktivierter <i>Ec</i> POX	71
3.4	Chemische Strukturen der Substratanaloga	71
3.5	Substratbindungsschritt	72
3.6	Übersicht über die auftretenden ThDP-Spezies	72
3.7	Vergleich der CD-Spektren der Pyruvatoxidasen	73
3.8	Bildung des Phosphonolaktyl-ThDP	74
3.9	CD-Titration mit Acetylphosphinat	75
3.10	Kinetik der MAP-Bindung an nicht-aktivierte <i>Ec</i> POX	76
3.11	Kinetik der MAP-Bindung an aktivierte <i>Ec</i> POX	77
3.12	Reduktive Halbreaktion der nicht-aktivierten <i>Ec</i> POX	78
3.13	UV/Vis-Spektren der <i>Ec</i> POX	79
3.14	Zeitverlauf der reduktiven Halbreaktion von nicht-aktivierter <i>Ec</i> POX	80
3.15	Minimalmodell der reduktiven Halbreaktion von nicht-aktivierter <i>Ec</i> POX	81
3.16	Erweitertes Minimalmodell der reduktiven Halbreaktion von nicht-aktivierter	
	ЕсРОХ	83
3.17	Reduktive Halbreaktion der aktivierten <i>Ec</i> POX	83
3.18	Zeitverlauf der reduktiven Halbreaktion von aktivierter <i>Ec</i> POX	84

3.19	Minimalmodell der reduktiven Halbreaktion von aktivierter <i>EcPOX</i>	85
3.20	Vergleich der Progresskurven der reduktiven Halbreaktion von nicht-aktivierter	
	und aktivierter <i>Ec</i> POX	85
3.21	Temperaturabhängigkeit der reduktiven Halbreaktion der aktivierten $EcPOX$.	86
3.22	Intermediatanalyse von nicht-aktivierter <i>Ec</i> POX	87
3.23	Intermediatanalyse von aktivierter <i>Ec</i> POX	89
3.24	Darstellung der verschiedenen FAD-Spezies	90
3.25	Redoxtitration mit Dithionit - Nernst-Plot	92
3.26	Darstellung von Vis-Spektren während der Reduktion	94
3.27	Übersicht der SDS-Gele der limitierten Proteolyse	98
3.28	Chemische Strukturen einiger Thiaminderivate	99
3.29	Experimente mit Röntgenkleinwinkelstreuung	101
3.30	Übersicht über die erhaltenen Parameter der SAXS-Messungen	102
3.31	Chemische Struktur des redoxaktiven Isoalloxazinringes von FAD	103
3.32	Vergleich der IR-Differenz-Spektren der <i>Ec</i> POX mit dem freien Kofaktor FAD .	104
3.33	Vergleich der IR-Differenzspektren der POX aus <i>E. coli</i> und <i>L. plantarum</i>	105
3.34	Quartärstruktur der nicht-aktivierten <i>Ec</i> POX	107
3.35	Domänenstruktur der <i>Ec</i> POX	108
3.36	Aktives Zentrum der nicht-aktivierten <i>Ec</i> POX	109
3.37	Struktur des C-Terminus der nicht-aktivierten <i>Ec</i> POX	110
3.38	Membranbindung der <i>Ec</i> POX	111
3.39	Protonenkanal der EcPOX	112
3.40	Hohlraum in der Struktur der nicht-aktivierten <i>Ec</i> POX	114
3.41	Vergleich der Struktur des aktiven Zentrums der nicht-aktivierten und der ak-	
	tivierten <i>Ec</i> POX	116
3.42	Vergleich des C-Terminus der nicht-aktivierten und der aktivierten <i>Ec</i> POX	117
3.43	Kristallstruktur des PLThDP in der aktivierten <i>Ec</i> POX	119
3.44	Kristallstruktur des LThDP in der aktivierten <i>Ec</i> POX	120
3.45	Kristallstruktur der ThDP-Intermediate der aktivierten EcPOX nach Inkuba-	
	tion mit Pyruvat	121
3.46	Stabilisierung des Pyruvats in der <i>docking</i> -Position (D ₂) der aktivierten <i>Ec</i> POX	123
3.47	Fixierung des Pyruvats in der <i>docking</i> -Position (D ₂) der aktivierten <i>Ec</i> POX	123
3.48	Erweitertes kinetisches Modell der reduktiven Halbreaktion	125
3.49	Proteasebindestelle im nicht-aktivierten Enzym	127
3.50	Konformationsänderung nach MAP- oder Substratzugabe in der nicht-akti-	
	vierten <i>Ec</i> POX	128
3.51	Vergleich der Struktur der aktiven Zentren von $EcPOX$, $LpPOX$ und $ScAHAS$.	130

3.52	Vergleich der v/S-Charakteristiken der nicht-aktivierten EcPOX mit den Ec-	
	POX-Varianten Phe465Ala und Phe465Ile	131
3.53	Vergleich der k_a -Werte der reduktiven Halbreaktion von nicht-aktivierter Ec-	
	POX Wildtyp und Phe465Ile	133
3.54	Übersicht über die Proteasebindestellen in der nicht-aktivierten EcPOX-Wildtyp	133
3.55	Reduktive Halbreaktion von nicht-aktivierter EcPOX Wildtyp und deren Vari-	
	anten Phe465Ile und Phe465Ala	134
3.56	Darstellung der Lipidbindedomäne	136
3.57	Fern-UV-CD-Spektren des chemisch synthetisierten α -Peptides	137
3.58	IRRAS-Experiment an der Luft/Wasser-Grenzfläche	139
3.59	Phasenübergänge einer Lipid-Monoschicht	141
3.60	Reflexions-Absorptions-Spektren von Lipid und Peptid	142
3.61	IRRAS-Experiment an der Lipid/Wasser-Grenzfläche	143
3.62	NMR-Struktur des α -Peptides - energieärmste Modelle	145
3.63	NMR-Struktur des α -Peptides	145
A.1	Reinigung des rekombinant exprimierten α-Peptides	169
A.2	Schema zur Ligandenbindung	170
A.3	Verallgemeinertes Schema zur Ligandenbindung	170
A.4	Minimalmodell der reduktiven Halbreaktion von nicht-aktivierter <i>Ec</i> POX	175
A.5	Amplituden a_1 der reduktiven Halbreaktion von nicht-aktivierter <i>EcPOX</i>	181
A.6	Reoxidation des enzymgebundenen FAD	182
A.7	Kinetik der Proteolyse-Experimente	184
A.8	Kinetik der Proteolyse-Experimente mit <i>Ec</i> POX-Varianten	184
A.9	Elektronendichte des C-Terminus der nicht-aktivierten <i>Ec</i> POX	186
A.10	Darstellung der Hydrophobizität der Oberfläche von <i>Ec</i> POX	187
A.11	Übersicht über die an der Kofaktorbindung beteiligten Reste	187
A.12	Übersicht über die Temperaturfaktoren der nicht-aktivierten <i>Ec</i> POX	188
A.13	Übersicht über die Temperaturfaktoren der aktivierten <i>Ec</i> POX	188
A.14	Übersicht über die nichtplanaren Konformationen des FAD in verschiedenen	
	Kristallstrukturen	189
A.15	Hydrophobizitätsplot des α -Peptides	190
A.16	2D- ¹ H-NMR-TOCSY-Spektrum des α -Peptides	191
A.17	2D- ¹ H-NMR-NOESY-Spektrum des α -Peptides	192

Abkürzungen und Symbole

$\Delta 23 EcPOX$	proteolytisch aktivierte Pyruvatoxidase aus Escherichia coli
AcThDP	2-Acetyl-ThDP
AHAS	Acetohydroxysäuresynthase
Amp	Ampicillin
AP	4'-Aminopyrimidin Form des ThDP
asu	asymmetrische Einheit (asymmetric unit)
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
Cam	Chloramphenicol
CD	Circulardichroismus
Da	Dalton
DESY	Deutsches Elektronensynchrotron
DFT	Dichtefunktionaltheorie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTE	1,4-Dithioerythritol
D_2O	Deuteriumoxid
EcPOX	Pyruvatoxidase aus Escherichia coli
EG	Ethylenglykol
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid (oxidiert)
FADH ₂	Flavin-Adenin-Dinukleotid (reduziert)
Fe-S	Eisen-Schwefel-Cluster
FMN	Flavinmononukleotid
FPLC	<u>F</u> ast <u>P</u> rotein <u>L</u> iquid <u>C</u> hromatography
GCL	Glyoxylatcarboligase
GOX	Glucoseoxidase aus Aspergillus niger
HEThDP	2-(1-Hydroxyethyl)-ThDP
IP	1',4'-iminotautomere Form des ThDP
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
IR	Infrarot

IRRAS	<u>I</u> nfra <u>r</u> ot <u>R</u> esonanz <u>A</u> bsorptions <u>S</u> pektroskopie
Kan	Kanamycin
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KPP	Kaliumphosphatpuffer
LB	Luria-Bertani-Medium
LB-Amp	LB-Medium mit Ampicillin als Selektionsmarker
LB-Kan	LB-Medium mit Kanamycin als Selektionsmarker
LThDP	2-Lactyl-ThDP
LpPOX	Pyruvatoxidase aus Lactobacillus plantarum
MAP	Methylacetylphosphonat
MALDI	<u>Matrix A</u> ssisted Laser <u>D</u> esorption and <u>I</u> onisation
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
MPD	2-Methyl-2,4-pentandiol
n _H	Hill-Koeffizient
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure (<i>nickel-<u>n</u>itrilo<u>t</u>riacetic <u>a</u>cid</i>)
NMR	Kernresonanz (<u>n</u> uclear <u>m</u> agnetic <u>r</u> esonance)
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PATS	Pyridin-3-aldehyd-thiosemicarbazone
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDB	Proteinstruktur-Datenbank (protein data bank)
PE	Phosphatidylethanolamin
PEG	Polyethylenglykol
PG	Phosphatidylglycerin
Phe	Phenylalanin
PLThDP	Phosphonolaktyl-ThDP
POX	Pyruvatoxidase
Q	Ubichinon (oxidiert)
QH ₂	Ubichinon (reduziert)
R _G	Gyrationsradius
rmsd	mittlere quadratische Abweichung (<u>root mean square deviation</u>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<u>revolutions per minute</u>)
RT	Raumtemperatur
SAXS	Röntgenkleinwinkelstreuung (small angle X-ray scattering)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SUMO	<u>s</u> mall <u>u</u> biquitine like <u>mo</u> difier
TCA	Trichloressigsäure

TEMED	$N,\!N,\!N',\!N'\text{-}Tetramethylethylendiamin$
TFA	Trifluoressigsäure
ThDP	Thiamindiphosphat
ThthPP	Thiaminthiazolondiphosphat
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UE	Untereinheit
UV/Vis	ultraviolett/sichtbarer Bereich
ÜN	über Nacht
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Masse/Volumen

Die in der folgenden Arbeit verwendeten Anglismen sind, sofern sie ein fester Bestandteil der biochemischen Terminologie sind, nicht übersetzt. Sie sind zur Verdeutlichung kursiv dargestellt.

1 Einleitung

1.1 Der Organismus Escherichia coli (E. coli)

Escherichia coli (Abb. 1.1) ist aufgrund seiner leichten Verfügbarkeit und Kultivierung zu einem Modellorganismus für viele biochemische Prozesse (zum Beispiel Atmung, Transkription, Translation) geworden und gehört somit zu den am besten untersuchten Organismen der Welt. Der Einzeller gehört zur Familie der *Enterobacteriaceae* und wurde im Jahre 1919 nach seinem Entdecker Theodor Escherich benannt. Es ist ein gram-negatives, stäbchenförmiges, peritrich begeißeltes Bakterium, das im menschlichen und tierischen Darm vorkommt. *E. coli* kann



Abb. 1.1: Rasterelektronenmikroskopaufnahme von *E. coli* [1]

sowohl unter aeroben als auch anaeroben Bedingungen wachsen, was eine präzise Regulation der Stoffwechselwege voraussetzt.

In der Regel verhält sich *E. coli* im menschlichen Darm als Symbiont. Zum Beispiel wird die aufgenommene Nahrung durch die Einzeller zersetzt, so dass deren einzelne Bestandteile leichter resorbiert werden. Ein weiterer Vorteil besteht in der Bereitstellung von Kofaktoren, die der Mensch nicht selbst synthetisieren kann, wie Vitamin B₁, B₂, B₁₂ und Vitamin K. Diese werden von Prokaryonten synthetisiert und anschließend sezerniert. Mit Hilfe spezieller Transporter werden sie über die Darmwand in die Zellen aufgenommen [2][3]. Eine gesunde Darmflora verhindert zudem, dass sich pathogene Mikroorganismen, zum Beispiel Salmonellen, ausbreiten.

Die Zellmembran gram-negativer Bakterien ist von einer äußeren Hülle umgeben (Abb. 1.2). Diese besteht aus einer dünnen Peptidoglykan-Schicht (Dicke 2 nm [4]), welche von einer äußeren Membran umschlossen ist. Die Peptidoglykan-Schicht, auch Murein-Sacculus genannt, besteht aus parallelen Strängen, die alternierend aus β -1 \rightarrow 4-glykosidisch verknüpften N-Acetylglucosamin- und N-Acetylmuraminsäureeinheiten aufgebaut ist. Die einzelnen Ketten werden durch Oligopeptide miteinander

verknüpft. Über Lipoproteine ist die Murein-Schicht an die äußere Membran gebunden. Diese ist asymmetrisch aufgebaut. Die Seite, die zum periplasmatischen Raum weist, ist aus Phospholipiden aufgebaut, während die nach außen gerichtete Seite aus Lipopolysacchariden besteht. Lipopolysaccharide sind Zucker, die mit Fettsäuren verestert sind. In *E. coli* ist Lipid A am häufigsten anzutreffen. Lipid A ist ein Disaccharid, welches aus β -1 \rightarrow 6-verknüpften Glukosaminen aufgebaut ist. Mehrere (6 bis 7) Hydroxyl-Gruppen von Lipid A sind mit gesättigten Fettsäuren verestert, die dann den hydrophoben Teil der Membran ausbilden. Die äußere Membran stellt keine Diffusionsbarriere im eigentlichen Sinn dar, da porenbildenende Proteine (Porine) einen relativ unspezifischen Transport über die Membran für Moleküle bis zu einer Größe von 600 Da ermöglichen. Dabei ist die Kompaktheit, die Hydrophobizität und die Ladung des zu transportierenden Stoffes entscheidend [4][5].

Durch die Zellwand entsteht ein zusätzliches Kompartiment, der periplasmatische Raum. Er grenzt direkt an die Zellmembran und enthält unter anderem Proteine, die für den Import wichtiger Nährstoffe in die Zelle sowie für die Chemotaxis verantwortlich sind. Desweiteren findet die Biogenese von Proteinen für die Peptidoglykan-Schicht oder der äußeren Membran im periplasmatischen Raum statt [4]. Im Gegensatz zu den Verhältnissen im Cyto-



Abb. 1.2: Zellmembran gram-negativer Bakterien

plasma herrschen im Periplasma oxidierende Bedingungen. Deshalb ist es möglich, dass Disulfid-Brücken von Proteinen im Periplasma ausgebildet werden. Für die alkalische Phosphatase konnte gezeigt werden, dass unter reduzierenden Bedingungen das Enzym in einer inaktiven Form vorliegt und erst nach dem Transport ins Periplasma und anschließender korrekter Faltung mit Ausbildung einer Disulfidbrücke in die aktive Konformation überführt wird [6].

Regulierter Stoff- und Informationstransport in die Zelle findet nur an der Zellmembran statt. Sie ist hauptsächlich aus Phospholipiden (Abb. 1.3) aufgebaut. Phospholipide sind vom Glycerol abgeleitet, wobei zwei Hydroxylgruppen mit einer geradzahligen Fettsäure (meist C16 oder C18) verestert sind. Die Fettsäure an Position *sn*-2 kann ungesättigt vorliegen, wobei die Doppelbindung bevorzugt eine *cis*-Konformation einnimmt. Die dritte Hydroxylgruppe des Glycerols trägt die hy-



drophile Kopfgruppe, im Fall von *E. coli*, Ethanolamin oder Glycerin. In *E. coli* findet man ca. 70 % Phosphatidylethanolamin (PE), 20 % Phosphatidyglycerol (PG) und 10 % Cardiolipin (CL). Cardiolipin ist ein Diphosphatidylglycerol, indem zwei Phosphatidylglycerol-Moleküle über ein drittes Glycerol miteinander verbunden sind. Im CL sind insgesamt vier Fettsäuren gebunden und die Kopfgruppe weist eine negative Ladung auf [7]. CL findet man in Membranen, über denen ein elektrochemisches Potential aufgebaut wird, wie zum Beispiel die Zellmembran von Prokaryonten oder die Mitochondrienmembran in Eukaryonten [7].

Die Ladung einer Membran wird von den Kopfgruppen der in ihr enthaltenen Phospholipide bestimmt. In *E. coli* sind zwei Hauptbestandteile, PG und CL, negativ geladen, so dass auch die Zellmembran negativ geladen ist. In Eukaryonten dagegen ist die Zelle von einer ungeladenen Membran umgeben. Diese wird zum größten Teil aus Phosphatidylcholin aufgebaut und weist somit keine Nettoladung auf [8]. Die Ladung einer Membran hat entscheidenden Einfluss auf ihre Funktion, da zum Beispiel periphere Proteine über elektrostatische Wechselwirkungen an die Membran gebunden werden [9].

Die Zusammensetzung der Zellmembran hängt nicht nur vom Organismus, sondern auch von äußeren Faktoren, wie etwa der Temperatur, ab. Der Anteil gesättigter Fettsäuren in der Zellmembran von *E. coli* nimmt mit steigender Temperatur zu, was eine vergleichbare Fluidität bei verschiedenen Temperaturen garantiert [10]. Singer und Nicolson beschrieben biologische Membranen im Rahmen eines Flüssig-Mosaik-Modells, bei dem alle Membranbestandteile (Phospholipide und Proteine) in einer zwei-dimensionalen Schicht statistisch verteilt und lateral beweglich sind [11]. Neuere Studien zeigen, dass die Membranbestandteile nicht völlig frei diffundieren können, da dies der Bildung von Superkomplexen, wie sie zum Beispiel für die oxidative Phosphorylierung benötigt werden, entgegensteht [12]. Es konnte in kristallographischen Studien gezeigt werden, dass es Bindestellen für CL an verschiedenen Protonenpumpen (Bakteriochlorophyll) in der Membran gibt [13][14].

1.1.1 Aerober Energiestoffwechsel in Escherichia coli

Der Energiestoffwechsel in *E. coli* ist fakultativ anaerob, wobei die Energie entweder durch Sauerstoffatmung oder, im Falle anaeroben Wachstums, durch gemischte Säuregärung beziehungsweise Nitrat-, Nitrit-, Sulfat- oder Fumaratatmung gewonnen wird [4].

Wächst *E. coli* unter aeroben Bedingungen, dann können die während der Atmung (Glykolyse, Citratzyklus) entstandenen Reduktionsäquivalente auf die Elektronentransportkette der inneren Zellmembran übertragen werden. Bei der Übertragung der Elektronen werden gleichzeitig Protonen in den periplasmatischen Raum transportiert. Terminale Oxidasen übertragen die Elektronen auf Sauerstoff und bilden somit Wasser. Eine ATPase kann mit Hilfe des entstandenen Protonengradienten aus ADP und anorganischem Phosphat (P_i) ATP generieren.

Peter Mitchell schlug als Erster die chemiosmotische Theorie der ATP-Synthese vor [16]. Demnach ist die Zellmembran für Protonen und andere Ionen undurchlässig, so dass der transversale Transport von Protonen über Proteine der Elektronentransportkette vollzogen wird. Die membranständige ATP-Synthase generiert dann aus dem elektrochemischen Gradienten ATP.

Mittlerweile sind viele Details über diesen Prozess der oxidativen Phosphorylierung bekannt. Die Elektronentransportkette ist modular aufgebaut, was eine effiziente Anpassung an verschiedene Umweltbedingungen ermöglicht. Die einzelnen Komponenten können in drei verschiedene Gruppen eingeteilt werden (Abb. 1.4). Die er-



Abb. 1.4: Einteilung der Enzyme der Atmungskette. Auf der linken Seite sind die Dehydrogenasen abgebildet. Sie geben die Elektronen über den Chinon-Pool (MQ Menachinon; Q Ubichinon) an die Oxidoreduktasen ab. Abbildung modifiziert aus [15].



Abb. 1.5: Chemische Struktur von Ubichinon und Menachinon

ste Gruppe umfasst die substratspezifischen Dehydrogenasen, die die Substrate oxidieren und die Elektronen in den Chinon-Pool transferieren. Er wird bei *E. coli* abhängig von den Wachstumsbedingungen aus Ubichinon oder Menachinon aufgebaut (Abb. 1.5). Beide Chinone sind lipidlöslich und besitzen eine Isoprenoid-Kette, die aus 8 Einheiten besteht. Ubichinon-8 (Q8) kann zwei Elektronen aufnehmen und an die terminalen Oxidoreduktasen übertragen. Diese werden in einer dritten Gruppe zusammengefasst. Sie reduzieren den terminalen Elektronenakzeptor [4].

Unter aeroben Wachstumsbedingungen dient Sauerstoff als terminaler Elektronenakzeptor. Die weitere Beschreibung beschränkt sich auf den Aufbau der Atmungskette unter aeroben Bedingungen. Eine schematische Darstellung der Atmungskette ist in Abbildung 1.6 gezeigt. Komplex I ist die NADH-Dehydrogenase. E. coli besitzt zwei Isoenzyme, die abhängig von der Sauerstoffkonzentration, dem Redoxstatus des Ubichinon-Pools und der NADH-Konzentration arbeiten. NAD-Dehydrogenase I (NDH I) ist aus 14 verschiedenen Untereinheiten aufgebaut und weist einen membranständigen und einen peripher an die Membran gebundenen Teil auf. Die sieben peripheren Untereinheiten enthalten die Redoxgruppen, neun Eisen-Schwefel-Cluster (Fe-S) und ein Flavinmononukleotid (FMN). Die anderen sieben Untereinheiten bilden vermutlich 61 α -Helices, welche die Membran durchdringen [17]. Durch diesen Teil werden Protonen über die Membran in den periplasmatischen Raum transportiert [18]. Wie dieser Pumpmechanismus funktioniert ist nicht genau geklärt. Es wird angenommen, dass abhängig vom Redoxstatus der NDH I, eine Konformationsänderung stattfindet, die dann einen Protonentransport über die Membran ermöglicht [19]. Sequenzvergleiche zeigen, dass die NDH I dem eukaryontischen Komplex I homolog ist [20]. Im Gegensatz dazu ist NDH II ein peripheres Enzym, welches nur aus einer Untereinheit (47 kDa) besteht [21]. Es katalysiert die Oxidation von NADH und überträgt die Elektronen vom enzymgebundenen FAD auf Ubichinon-8 [22]. Succinat-Dehydrogenase ist der zweite Komplex in der Atmungskette von E. coli und dem eukaryontischen Komplex II der Mitochondrienmembran homolog. Er besteht



Abb. 1.6: Schematische Darstellung der prokaryontischen Atmungskette unter aeroben Bedingungen. NDH: NADH-Dehydrogenase, SDH: Succinatdehydrogenase, POX: Pyruvatoxidase, PutA: Prolinoxidase, P5C: Pyrrolin-5-carboxylat, Q: Ubichinon-Pool, QH₂: Ubichinol, Cyt bd: Cytochrom *bd*, Cyt bo: Cytochrom *bo*. Nähere Erklärungen im Text.

aus 4 verschiedenen Untereinheiten mit 5 unterschiedlichen prosthetischen Gruppen (FAD, 3 Fe-S-Cluster und eine Häm-Gruppe) und katalysiert die Oxidation von Succinat zu Fumarat, wobei Q8 reduziert wird [4][23].

Aus *E. coli* sind viele weitere Dehydrogenasen bekannt, die ihre Elektronen, abhängig von den Metabolitkonzentrationen in der Zelle, in die Atmungskette einschleusen. Als Beispiele seien Fumarat-Dehydrogenase, Laktat-Dehydrogenase und Glycerol-3phosphat-Dehydrogenase genannt, auf die hier nicht weiter eingegangen wird. Andere Vertreter der Gruppe der Dehydrogenasen sind Prolinoxidase (PutA) und Pyruvatoxidase (POX). Beides sind Enzyme, die in Abhängigkeit von der zellulären Substratkonzentration peripher an die Membran binden können. Die Elektronen werden über nicht-kovalent gebundenes FAD an den Ubichinon-Pool übertragen. PutA ist ein bifunktionelles Enzym. Es kann zum einen als Transkriptionsrepressor und zum anderen als Enzym fungieren. In seiner Funktion als Enzym oxidiert es bei hohen zellulären Prolinkonzentrationen Prolin zu 1-Pyrrolin-5-carboxylat (P5C). In Abwesenheit von Prolin wird die Rückreaktion katalysiert und Prolin wird in einer NADabhängigen Reaktion synthetisiert [24]. Die Eigenschaften der POX werden in Abschnitt 1.3 näher betrachtet.

Reduziertes Ubichinon aus dem Ubichinon-Pool wird von Elektronenakzeptoren reoxidiert. Bei aerobem Wachstum sind dies vorrangig häm-haltige Cytochromoxidasen, die die Elektronen auf Sauerstoff als terminalen Elektronenakzeptor übertragen. In *E. coli* sind zwei verschiedene Cytochrome bekannt, Cytochrom *bd* und Cytochrom *bo*, die abhängig von der Sauerstoffkonzentration exprimiert werden. Beide enthalten Häm *b*. Zusätzlich enthält Cytochrom *bd* Häm *d* und Cytochrom *bo* Häm *o*. Cytochrom *bd* (Cyt *bd*) ist ein Heterodimer mit mehreren integralen Helices und 3 prosthetischen Häm-Gruppen: b_{558} , b_{595} und *d* [25]. Nur Häm *d* ist in der Lage molekularen Sauerstoff zu binden. Dabei ist der K_M -Wert sehr klein (20 nM [26]), so dass selbst bei niedrigen O_2 -Konzentrationen eine Bindung von Sauerstoff möglich ist. Im Gegensatz dazu benötigt Cytochrom *bo* eine höhere Konzentration an Sauerstoff (K_M 200 nM [26]). Cytochrom *bo* besteht aus mehreren Untereinheiten, die als Cyo A bis Cyo D bezeichnet werden. In der Untereinheit Cyo B sind die Häm-Gruppen (b_{562} , o_3) und ein Kupfer-Ion gebunden. Häm o_3 fungiert gemeinsam mit dem Kupfer als Bindestelle für den Sauerstoff. Gleichzeitig werden Protonen ins Periplasma gepumpt. Die beiden Metallzentren (Fe, Cu) sind in einem Abstand von 5 Å voneinander gebunden und miteinander gekoppelt [27].

Durch den elektrochemischen Gradienten, der von den genannten Komplexen der Atmungskette generiert wurde, kann die F₁F₀-ATP-Synthase ADP phosphorylieren und ATP gewinnen. Dieses Enzym hat ein molare Masse von 530 kDa und besteht aus 8 Untereinheiten [28][29]. Der cytosolische F₁-Teil ist aus den Untereinheiten $\alpha_3\beta_3\gamma\epsilon$ zusammengesetzt, wobei die α - und β -Untereinheiten alternierend einen Ring bilden, der mit dem $\gamma\epsilon$ -Komplex verbunden ist [30][31]. Die drei aktiven Zentren befinden sich jeweils an den Kontaktflächen zwischen den α - und β -Untereinheiten und zeigen unterschiedliche Konformationen bezüglich der Bindestellen für Nukleotide [30][32]. Die γ -Untereinheit besteht aus zwei Helices in einer coiled-coiled Konformation, die mit dem Membranteil (Untereinheiten *a*, *b* und *c*, F₀-Teil [33][34]) verbunden sind. Zusätzlich wurde gefunden, dass ein *"statorstalk"*, welcher aus den Untereinheiten $b_2\delta$ aufgebaut ist, den katalytisch aktiven Teil mit dem Membranteil verbindet. Dabei bindet δ an die α -Untereinheit [35] und b_2 wird mit einer Transmembranhelix in der Membran verankert [36].

Die Knüpfung der energiereichen Triphosphatbindung des ATP erfolgt am cytosolischen F₁-Teil. Kristallographisch sind drei verschiedene Konformationen der α - und β -Untereinheiten dokumentiert [30]. Eine Untereinheit (β E) liegt in einer offenen Konformation vor, so dass ADP und P_i gebunden werden können. Ahmad *et al.* identifizierten Bindestellen für Phosphat [37]. ADP wird über einen Rossmann-*fold* gebunden [38]. Die Energie, die für die Bildung des ATP benötigt wird, stammt aus der Rotation der $\gamma \epsilon c$ -Untereinheiten [29]. Durch die Rotation, speziell der γ -Untereinheit, werden in der Kontaktregion der α - und β -Untereinheiten Konformationswechsel induziert, die die Affinität bezüglich der Reaktionsprodukte (ADP, P_i und ATP) regulieren [29]. Nach einer Drehung der γ -Untereinheit um 120° wird das aktive Zentrum als β TP bezeichnet. Infolge dieser Drehung sind ADP und P_i in räumlicher Nähe zueinander koordiniert. Nach erfolgter Bindungsbildung wird das ATP aus der β DP-Bindestelle entlassen.

1.2 Regulation - periphere Membranproteine

Zellen benötigen ein funktionierendes Signalübertragungssystem, um sich an veränderliche Umweltbedingungen anpassen zu können. Im Vergleich zu Eukaryonten verläuft die Ubertragung von Signalen in Prokaryonten relativ einfach. Während die Signalübertragung in eukaryontischen Zellen häufig über Mehr-Komponenten-Systeme (zum Beispiel G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, MAP-Kinase) verläuft, sind in prokaryontischen Organismen häufig nur Ein- oder Zwei-Komponenten-Systeme zur Signalübertragung vorhanden [39][40]. Beide sind modular aufgebaut, wobei in Ein-Komponenten-Systemen der Signalempfänger direkt an den Signalgeber fusioniert ist. In Zwei-Komponenten-Systemen wird der Empfänger, eine Histidinkinase, nach dem Signaleingang unter ATP-Verbrauch phosphoryliert. Die Phosphatgruppe wird auf einen konservierten Aspartat-Rest der regulatorischen Untereinheit des responseregulator-Proteins übertragen, wodurch die Signalantwort initiiert wird [41]. Prokaryontische Enzyme verfügen daher oft zugleich über katalytische und regulatorische Funktionen, die evolutionär aufeinander abgestimmt sind. So verwundert es nicht, dass es, wie im vorigen Abschnitt beschrieben, in der Elektronentransportkette Proteine gibt, die abhängig von äußeren Faktoren peripher an die Membran binden können, um ihre Aufgaben in der Zelle zu erfüllen. Diese Proteine können somit in einem cytosolischen und einem membranassoziierten Zustand vorliegen. Diese Eigenschaft wird als amphitrop bezeichnet [42]. Die Assoziation an die Membran ist reversibel und unterliegt meist einer Regulation. Mit der Bindung an die Membran sind zumeist regulatorische oder katalytische Aufgaben verbunden.

Periphere Membranbindung kann durch verschiedene Mechanismen vermittelt sein. Johnson & Cornell diskutieren drei Möglichkeiten [42]. 1. Das Protein besitzt eine Bindetasche für eine spezielle Kopfgruppe der Phospholipid-Membran. 2. Das Protein weist eine kovalente Modifikation (zum Beispiel ein Fettsäure-Rest oder ein Farnesyl-Rest) an seiner Oberfläche auf, die als Lipidbindemotif fungiert. Außerdem wird die Orientierung der Proteinkomponente gegenüber der Membran durch elektrostatische Wechselwirkungen unterstützt. 3. Das Protein bildet eine amphipatische Helix aus. Diese liegt parallel zur Membranoberfläche und besitzt eine hydrophobe und eine hydrophile Seite, wobei die hydrophobe Seite zur Membranoberfläche gerichtet ist. Viele amphitrope Proteine binden an Membranen nach einem Zweischrittmechanismus. Zuerst wird das Protein mittels elektrostatischer Wechselwirkungen an der Membran orientiert. Im nächsten Schritt erfolgt die hydrophobe Assoziation der amphipatischen Helix an der Membran.

Bei Prokaryonten ist die Anzahl der zu den ersten beiden Gruppen gehörigen Vertreter begrenzt, so dass die Membranbindung und die damit verbundene Regulation vorrangig über amphipatische Helices erfolgt. Als Beispiel sei zum einen die CTP:Phosphocholin-Cytidylyltransferase genannt. Im nicht-aktivierten Zustand wirkt die Domäne M autoinhibitorisch. Die Gegenwart von Lipiden hebt diese Inhibierung auf, da die Domäne M amphipatisch an die Membran bindet und somit das Enzym an den richtigen "Arbeitsplatz" bringt [43][44]. Ein weiteres Beispiel ist die Prolindehydrogenase (putA). Dieses Enzym agiert abhängig vom Redoxstatus des enzymgebundenen FAD entweder als Enzym oder als Transkriptionsrepressor. In Gegenwart von Substrat (Prolin) katalysiert das Enzym die Umsetzung von Prolin zu Pyrrolin-5-carboxylat (P5C). Im Zuge der Reaktion wird enzymgebundenes FAD reduziert. Im reduzierten Zustand bindet das Enzym an die Membran, wo die Elektronen direkt vom FAD in die Atmungskette transferiert werden können. Bei Substratabwesenheit ist putA im Cytoplasma lokalisiert. Es bindet an das putA-Operon und fungiert somit als Transkriptionsrepressor von putA [45]. Ein weiterer Vertreter dieser Kategorie ist die Pyruvatoxidase aus E. coli. Dieses Enzym, welches als Modellenzym für die Protein-Lipid-Interaktion verwendet wurde, soll in der vorliegenden Arbeit näher untersucht werden.

1.3 Pyruvatoxidase aus Escherichia coli

Pyruvatoxidase aus *Escherichia coli* (*Ec*POX, EC 1.2.2.2) ist ein homotetrameres Enzym, wobei formal pro Untereinheit ein Molekül Thiamindiphosphat (ThDP) und ein Molekül Flavinadenindinukleotid (FAD) nicht-kovalent gebunden sind [46][47] (Abb. 1.7). Die Bindung des Kofaktors ThDP erfolgt in der Kontaktfläche zweier Untereinheiten, die gemeinsam ein funktionelles Dimer bilden und je zwei Kofaktorbindungsorte enthalten. ThDP, die biologisch aktive Form des Vitamins B₁, besteht aus einem Thiazoliumring und einem Aminopyrimidinring, die über eine Methylenbrücke miteinander verbunden sind. Der Kofaktor wird über einen Diphosphat-Anker mit Hilfe eines zweiwertigen Metall-Ions an die Proteinkomponente koordiniert [48]. Wie in allen ThDP-abhängigen Enzymen ist der Kofaktor in der typischen V-Konformation gebunden. FAD, die biologisch aktive Form des Vitamins B₂, enthält einen redoxak-



Abb. 1.7: Chemische Struktur der Kofaktoren

tiven Heterozyklus, den Isoalloxazinring, der über einen Ribosylrest an ein Adenosin gebunden ist. Dieser Kofaktor ist häufig an Elektronentransferreaktionen in Enzymen beteiligt, wobei Ein- und Zwei-Elektronenübergänge möglich sind. FAD wird über einen Rossmann-*fold* an die Proteinkomponente gebunden [49].

*Ec*POX katalysiert die oxidative Decarboxylierung von Pyruvat zu Kohlendioxid und Acetat (Gl. 1.1, [50]).

$$FhDP-EcPOX-FAD+Pyruvat \longrightarrow ThDP-EcPOX-FADH_2+Acetat+CO_2 (1.1)$$

ThDP-*Ec*POX-FADH₂+
$$Q_8 \longrightarrow$$
 ThDP-*Ec*POX-FAD + Q_8H_2 (1.2)

Der Katalysezyklus ist in Abbildung 1.8 dargestellt. Er entspricht den Vorstellungen von Breslow [51] und Schellenberger [52]. Initial kommt es zur Deprotonierung des C(2)-Atoms des Thiazoliumringes (Kofaktoraktivierung, Schritt ①). Die Interak-



Abb. 1.8: Katalysemechanismus der EcPOX. Erklärungen siehe Text.

tion eines konservierten Glutamats (Glu50) mit dem N(1')-Atom des Pyrimidinringes führt zur Bildung der iminotautomeren Form des ThDP [53]. Die Protonenabstraktion vom C(2)-Atom wird durch die Nähe des 4'-Iminostickstoffs des Pyrimidinringes zum Thiazoliumring begünstigt, was das Vorliegen der V-Konformation zur Voraussetzung hat. Das resultierende Carbanion (Ylid) ist in der Lage, die Carbonylgruppe des Substrates Pyruvat nucleophil anzugreifen (Schritt (2)). Das hierdurch gebildete tetrahedrale Intermediat, Laktyl-Thiamindiphosphat (LThDP), geht unter Kohlendioxidabspaltung in Hydroxyethyl-ThDP (HEThDP) über (Schritt (3)). Die Mesomerie zwischen der Carbanion- und der Enaminstruktur bedingt die Resonanzstabilisierung des Intermediates. HEThDP überträgt Elektronen auf FAD, wodurch Acetyl-ThDP gebildet und der Kofaktor FAD reduziert wird (Schritt (4)). Durch Hydrolyse des Acetyl-ThDP wird Acetat gebildet und der freie Kofaktor regeneriert (Schritt (5)). Der Katalysezyklus kann somit als Ping-Pong-Mechanismus beschrieben werden, wobei Pyruvat als das erste und Wasser als das zweite Substrat fungieren, während CO₂ und Acetat das erste beziehungsweise zweite Produkt darstellen.

Die Elektronen des reduzierten FAD (FADH₂) werden auf Ubichinon-8 (Q8), einen mobilen Elektronenakzeptor der Zellmembran, übertragen [54][55] (Gl. 1.2). Q8 ist ein Bestandteil der Atmungskette, wie bereits in Kapitel 1.1.1 beschrieben wurde. Reduziertes Ubichinon-8 wird im Ubichinon-Pool reoxidiert und kann durch die übertragenen Elektronen einen Protonengradienten generieren, der dann zur ATP-Synthese genutzt werden kann.

Die Übertragung der Elektronen auf die Elektronentransportkette erfordert eine Bindung des Enzyms an die Membran, weshalb *Ec*POX auch als peripheres Membranenzym bezeichnet wird. Eine nähere Betrachtung dieser Membranbindung wird in Abschnitt 1.3.1 vorgenommen.

Die physiologische Bedeutung der *Ec*POX ist nicht unmittelbar ersichtlich. Unter oxidativen Bedingungen kann sie, ausgehend vom reduzierten FAD, je zwei ATP-Moleküle über die Atmungskette bereitstellen. Im Gegensatz dazu kann die Pyruvatdehydrogenase (PDH), welche den Acetyl-Rest nach der Decarboxylierung von Pyruvat auf Coenzym A überträgt und somit seine Einschleusung in den Citratzyklus ermöglicht, aus einem Pyruvatmolekül bis zu 11 Moleküle ATP ($3 \times \text{NADH+H^+}$, $1 \times \text{FADH}_2$) und ein Molekül GTP generieren. *Ec*POX wurde deshalb als eine Art Sicherheitssystem für den Ausfall der PDH beschrieben [56]. Es wurde jedoch beobachtet, dass es bei der Kultivierung von *E. coli*-Zellen in Bioreaktoren zu einer vermehrten Produktion von Acetat kommt, die das Wachstum der Zellen stört. Diese Acetatproduktion wurde auf die Katalyse durch die POX zurückgeführt [57]. An PDH- Deletionstämmen konnte gezeigt werden, dass POX deren Aufgabe, die Einschleusung von Acteyl-CoA-Einheiten in den Citratzyklus, übernehmen kann [56]. Eine Deletion von POX wiederum führt zu einer veränderten Verteilung der Stoffwechselprodukte. Während die eingeschleusten Acetyl-CoA-Einheiten der PDH hauptsächlich für die Energiegewinnung eingesetzt werden, werden die Acetyl-CoA-Einheiten der POX für anaplerotische Reaktionen benötigt. Der zugrundeliegende Mechanismus dieser Differenzierung ist jedoch unbekannt [56].

Acetat ist ein Stoffwechselendprodukt, das heißt es kann nur unter Energieverbrauch wieder nutzbar gemacht werden. In *E. coli* sind dafür 2 Systeme bekannt [58] (Abb. 1.9). 1. Acetyl-CoA-Synthase-System (Acs). Die Acs überträgt Acetylgruppen von Acetat auf Coenzym A, wobei ATP zu AMP umgesetzt wird. Die Affinität des Enzyms für Acetat ist hoch, die Aktivität jedoch gering [59]. 2. Acetatkinase-Phosphotransacety-lase-System. In diesem System wird Acetat zunächst durch die Acetatkinase unter ATP-Verbrauch zu Acetylphosphat umgesetzt. Mit Hilfe der Phosphotransacetylase wird der Acetyl-Rest dann auf Coenzym A übertragen. Obwohl die Aktivität des Enzyms recht hoch ist, ist die Affinität für Acetat sehr gering (K_M 300 mM). Mittels dieser Systeme ist es *E. coli* möglich, aus Acetat Acetyl-CoA zu gewinnen. Letzteres kann sowohl in den Citratzyklus eingeschleust, als auch für Synthesezwecke herangezogen werden. Da Intermediate des Citratzyklus zugleich Vorstufen für die Synthese





von Aminosäuren und Pyrimidinbasen sind, muss dieser kontinuierlich mit Intermediaten aufgefüllt werden. Dies erfolgt über den Glyoxylatweg [60]. In Mikroorganismen und Pflanzen kann somit durch Isocitratlyase und Malat-Synthase Oxalacetat generiert werden. Dieses fungiert als Präkursor von Aspartat, Asparagin, Arginin und Lysin [61]. Oxalacetat wird darüberhinaus im Zuge der Gluconeogenese durch Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase zu Phosphoenolpyruvat decarboxyliert. Dieses dient als Ausgangssubstanz für die Synthese von Kohlenhydraten. Somit wird durch die Pyruvatoxidase das Wachstum auf Acetat-haltigem Medium gewährleistet.

Auch aus anderen Organismen sind Pyruvatoxidasen bekannt. Die erste Kristallstruktur dieser Enzymklasse wurde für die Pyruvatoxidase aus *Lactobacillus plantarum* (*Lp*-POX) aufgeklärt [62]. Laktobazillen sind nicht in der Lage Porphyrine zu synthetisieren und besitzen deshalb auch keine Atmungskette. Das Produkt der durch *Lp*POX katalysierten Reaktion ist Acetylphosphat [63][64]. Dieses stellt für *Lactobacillus plantarum* eine Energiequelle unter aeroben Bedingungen dar, da es mittels Acetatkinase zu Acetat und ATP konvertiert werden kann. Die Struktur einer weiteren POX ist 2007 aufgeklärt worden. Sie stammt aus dem gram-positivem Bakterium *Aerococcus viridans* und ähnelt der Struktur der *Lp*POX [65]. Beide Pyruvatoxidasen zeigen Ähnlichkeiten zu anderen ThDP-abhängigen Enzymen [66].

1.3.1 Aktivierung

Cunningham & Hager stellten 1971 fest, dass *Ec*POX durch Phospholipide und eine Vielzahl von Detergenzien aktiviert werden kann [67][68]. In Abbildung 1.10 sind die verschiedenen Aktivierungsmöglichkeiten der *Ec*POX zusammengefasst. Nicht-aktiviertes Enzym ist nicht in der Lage an die Membran zu binden. Nach Substratzugabe und somit Reduktion des FAD findet eine Konformationsänderung statt, bei der ein Lipidbindeanker exponiert wird [69][70]. Detergenzien oder Phospholipide können an das reduzierte Enzym binden und es aktivieren [67][68]. Alternativ dazu kann eine Protease (α -Chymotrypsin) die exponierten C-terminalen Lipidbindedomänen abspalten (23 Aminosäuren, α -Peptid), wodurch das Enzym aktiviert wird [71]. Dieser Prozess wird als proteolytische Aktivierung bezeichnet. Das proteolytisch verkürzte Enzym (Δ 23-Variante) kann nicht mehr an eine Membran binden oder durch Detergenzien aktiviert werden [72]. Beide Aktivierungsmethoden generieren Enzymspezies mit ähnlichen strukturellen wie funktionellen Eigenschaften [73]. *In vivo* wird *Ec*POX durch die Bindung an die Zellmembran aktiviert [74][75].



Abb. 1.10: Aktivierungsmodell der *Ec*POX. Nicht-aktiviertes Enzym kann nicht an die Membran binden. Nach Reduktion des Flavins mittels Pyruvat, wird die Lipidbindedomäne exponiert. Eine Bindung an die Membran aktiviert die *Ec*POX. Alternativ kann eine Protease die Lipidbindedomäne abspalten und proteolytisch aktiviertes Protein generieren (Δ 23-Variante). Diese Spezies kann nicht mehr durch Lipide aktiviert werden.

Die Membranbindung wird über die exponierten C-terminalen Domänen vermittelt [76]. In Oligomerisierungsstudien mit einer Mischung aus Untereinheiten von EcPOX-Wildtyp und einer EcPOX-Variante, die nicht in der Lage war an die Membran zu binden, konnte zudem gezeigt werden, dass zwei C-Termini gemeinsam die Bindung an die Membran vermitteln [77][78]. Eine Sekundärstrukturvorhersage nach dem von Eisenberg entwickelten Verfahren [79] ergab, dass die 23 C-terminalen Aminosäurereste (α -Peptid) eine amphipatische Helix ausbilden können [80]. Es wurde postuliert, dass diese amphipatische Helix die Assoziation des Proteins an die Membran ermöglicht. Nach dem von den Autoren vorgeschlagenen Modell lagern sich je zwei C-terminale Domänen zusammen (pairing) [77][78]. Dieses aus zwei amphipatischen Helices gebildete Strukturelement dockt in einem ersten Schritt an die Membranoberfläche an. In einem zweiten Schritt verdrängen die C-terminalen Domänen die Phospholipid-Kopfgruppen, was eine Wechselwirkung mit den Acylketten im Inneren der Membran erlaubt. Der amphipatische Charakter der Helices soll hierbei deren Dimerisierung über die jeweils hydrophilen Oberflächen gewährleisten. Die Autoren konnten weiterhin zeigen, dass eine EcPOX-Variante, bei der drei Aminosäurereste am C-Terminus deletiert waren, eine reduzierte Aktivierbarkeit durch Detergenzien oder Phospholipide aufweist [77]. Es wurde deshalb ein Einfluss des C-terminalen Arginins auf die Membranassoziation vermutet. Aufgrund seiner positiven Ladung könnte es für die initiale Ausrichtung der *Ec*POX gegenüber den negativ geladenen Kopfgruppen verantwortlich sein.

1.4 Zielstellung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Funktion und die Struktur der *Ec*POX näher zu charakterisieren. Ein besonderer Schwerpunkt lag dabei auf dem Aktivierungsmechanismus des Enzyms. Aufgrund der physiologischen Rolle der substratgetriebenen Konformationsänderung und der durch sie induzierten Membranbindung ist die *Ec*POX ein Modell-System für Protein-Lipid-Wechselwirkungen.

Funktionelle Charakterisierungen sollten mittels kinetischer Studien erfolgen. Eine Bestimmung des geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes in der nicht-aktivierten und in der proteolytisch aktivierten *Ec*POX könnte wertvolle Hinweise auf den durch die Aktivierung beeinflussten Katalyseschritt geben.

Strukturelle Untersuchungen sollten diese Ergebnisse untermauern. Dabei sollte zum einen die Konformationsänderung, die für die Exponierung der Lipidbindedomäne verantwortlich ist, detailliert untersucht werden. Zum anderen stellten sich folgende Fragen: Welche Unterschiede bestehen zwischen den aktiven Zentren des nicht-aktivierten und aktivierten Zustandes? Welche strukturellen Hintergründe bedingen die unterschiedliche Proteolysesensitivität des nicht-aktivierten und aktivierten Zustandes? Wie wird die Lipidbindedomäne im nicht-aktivierten Zustand stabilisiert? Eine weitere Fragestellung betraf die Membranbindung der *Ec*POX, die durch eine postulierte amphipatische Helix am C-Terminus vermittelt wird. Strukturelle Untersuchungen an der isolierten Lipidbindedomäne (α -Peptid) sollten das vorgeschlagene Modell verifizieren und die relative Orientierung dieser Domäne an der Membran aufklären.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Thermocycler	T-Gradient	Biometra GmbH
Autoklav	3870M	Tuttnauer Europe B.V.
Hochdruck-Dispersion	Constant Systems B	IUL Instruments GmbH
Ultrazentrifuge	L8-60M	Beckman Coulter GmbH
Zentrifugen	J2-HC	Beckman Coulter GmbH
	RC 5B	Thermo Fisher Scientific GmbH
	EBA 12	Hettich GmbH & Co.KG
FPLC-System	Pump P-500	Pharmacia LKB
	Programmer GP-250 Plus	Pharmacia LKB
FPLC-Säulen	HiLoad 26/10, Q-Sepharose	GE Healthcare GmbH
	HiLoad 26/60, Superdex 200	GE Healthcare GmbH
	HiLoad 16/60, Superdex 75	GE Healthcare GmbH
	Ni-NTA super flow	Qiagen GmbH
HPLC-System	Äkta purifier	GE Healthcare GmbH
HPLC-Säulen	analytisch	
	Jupiter 300-5 C18	Phenomenex GmbH
	(250x4,6 mm)	
	präparativ	
	Nucleosil 500-5 C18	Macherey-Nagel GmbH
	(250x10 mm)	
UV-Vis-Spektrometer	Uvikon 940	Kontron Instruments
	Jasco V-560	Jasco GmbH
Rapid Quenched-Flow	RQF-3	Kintek
Stopped-Flow- Spektrometer	SX-18MV	Applied Photophysics
CD-Spektrometer	Jasco J-810	Jasco GmbH
FTIR-Spektrometer	modifiziertes IFS 25	Bruker Optics
Spektrometer für IRRAS	Equinox 55 FT-IR	Bruker Optics

NMR-Spektrometer

Avance ARX 400 Avance II 600 Bruker Biospin Bruker Biospin

2.1.2 Chemikalien, Proteine, Materialien

Chemikalien Acrylamid (30%) 37,5:1 AppliChem GmbH, Darmstadt Agar-Agar AppliChem GmbH, Darmstadt Agarose AppliChem GmbH, Darmstadt Ammoniumpersulfat Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg Ampicillin AppliChem GmbH, Darmstadt Aprotinin AppliChem GmbH, Darmstadt Benzylviologen Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München Bromphenolblau VWR International GmbH, Darmstadt Coomassie-Brillantblau G250 AppliChem GmbH, Darmstadt DTE AppliChem GmbH, Darmstadt Deuteriumoxid (99,9%) Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München *E. coli* polar lipid extract Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA EDTA VWR International GmbH, Darmstadt Essigsäure VWR International GmbH, Darmstadt Ethanol (96%) VWR International GmbH, Darmstadt Ethylenglykol VEB Laborchemie, Apolda Indigodisulfonat Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München Kaliumhexacyanoferrat(III) VEB Laborchemie, Apolda FAD AppliChem GmbH, Darmstadt β -D-Glukose Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München Glutaryl-L-phenylalanin-4-nitroanilid VWR International GmbH, Darmstadt Glycerol (87%) VWR International GmbH, Darmstadt Glycin Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe Hefeextrakt AppliChem GmbH, Darmstadt IPTG AppliChem GmbH, Darmstadt Kaliumhydroxid VWR International GmbH, Darmstadt Kanamycin AppliChem GmbH, Darmstadt Magnesiumsulfat (Heptahydrat) VWR International GmbH, Darmstadt MES AppliChem GmbH, Darmstadt Natriumchlorid VWR International GmbH, Darmstadt Natriumhydroxid VWR International GmbH, Darmstadt VWR International GmbH, Darmstadt Natriumpyruvat
PATS	Lancaster Synthesis, Morecambe, England
PEG 2000	VWR International GmbH, Darmstadt
Phenosafranin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Phosphorsäure (85%)	VWR International GmbH, Darmstadt
Protaminsulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Salzsäure (37%)	VWR International GmbH, Darmstadt
Schwefelsäure (97%)	VWR International GmbH, Darmstadt
SDS	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
D ₁₂ SDS	Euriso-Top GmbH, Saarbrücken
Streptomycinsulfat	AppliChem GmbH, Darmstadt
TCA	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
TEMED	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
ThDP-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Tris	AppliChem GmbH, Darmstadt
Trypton	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ubichinon-0	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

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

Proteine

Alkalische Phosphatase (10.000 U/mL)	NEB, Frankfurt
BamHI (20.000 U/mL)	NEB, Frankfurt
BsaI (10.000 U/mL)	NEB, Frankfurt
Rinderserumalbumin, Fraktion V	AppliChem GmbH, Darmstadt
α-Chymotrypsin	AppliChem GmbH, Darmstadt
DNaseI	AppliChem GmbH, Darmstadt
Pfu DNA-Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot
DpnI	Fermentas, St. Leon-Rot
GOX	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
T4 DNA-Ligase	NEB, Frankfurt
dNTP	Fermentas, St. Leon-Rot

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

Verwendete Kits	
Miniprep Kit	Qiagen, USA
Gel Extraktions Kit	Qiagen, USA
PCR Reinigungs Kit	Qiagen, USA

2.1.3 Stämme, Plasmide, Oligonukleotide

In Tabelle 2.1. sind die verwendeten Stämme mit deren genetischen Veränderungen aufgeführt. Plasmide, welche in diese Organismen transformiert wurden, um das gewünschte Genprodukt zu erhalten, sind in Tabelle 2.2 dargestellt.

Bezeichnung	Genotyp	Bezugsquelle	
E. coli ZK126	F [−] W3110 tna2 ∆lacU169	Prof. Dr. R. Kolter, Harvard Medical School, Boston, USA [81]	
E. coli XL1-Blue	F' recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [proAB lacI q Z Δ M15 Tn10 (Tet ^R)]	Stratagene, USA	
E. coli BL21(DE3)	F ⁻ ompT gal dcm lon hsdSB(rB ⁻ mB ⁻) λ (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])	Novagen, USA	
<i>E. coli</i> Rosetta(DE3) pLysS	F ⁻ ompT gal dcm hsdSB(rB ⁻ mB ⁻) λ (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) pLysSRARE(Cam ^R)	Novagen, USA	

Tab. 2.1: Verwendete Bakterienstämme mit deren Genotyp sowie die Bezugsquelle.

Oligonukleotide, welche zur Generierung von Punktmutationen der Pyruvatoxidase aus *Escherichia coli* verwendet wurden, sowie die Oligonukleotide, welche zur anschließenden Sequenzierung dieser Mutanten verwendet wurden, sind in Tabelle 2.3 zusammengefasst. Für die rekombinante Generierung des α -Peptides musste die Sequenz aus dem Wildtyp-Plasmid amplifiziert werden. Die Oligonukleotide, welche dafür benötigt wurden, sind in Tabelle 2.4 angegeben.

Bezeichnung	Eigenschaften	Resistenz	Bezugsquelle	
pYYC102	<i>poxB</i> -Gen unter Kon- trolle des <i>tac</i> -Promotors	Amp ^{<i>R</i>}	Prof. Dr. John E. Cronan	
pET-SUMO	Expression von SUMO	Kan ^R	Invitrogen BT	
pET-SUMO-alpha	Expression des SUMO- alpha Konstruktes	Kan ^R	Ergebnis dieser Arbeit	
pULP1	Expression der SUMO- Protease	Cam ^{<i>R</i>}	Invitrogen BT	

Tab. 2.2: Verwendete Plasmide mit der Antibiotikaresistenz und der Bezugso	quelle.
--	---------

Tab. 2.3: Oligonukleotide für die ortsgerichtete Mutagenese. In der Spalte **Sequenz** ist dasjenige Nukleotid markiert, welches von der Wildtyp-Sequenz abweicht. Die Nukleotide, welche für die Sequenzierung nötig waren, sind im unteren Teil der Tabelle dargestellt.

Name	Sequenz 5'→ 3'
D27A-f	GGAGTCACAGGCG C CTCTCTGAACGGTC
D27A-b	GACCGTTCAGAGAG G CGCCTGTGACTCC
D27N-f	GGAGTCACAGGC A ACTCTCTGAACGG
D27N-b	CCGTTCAGAGAGT T GCCTGTGACTCC
F465A-f	CAACAGCGTGCTGGGCG CT GTGGCGATGGAGATG
F465A-b	CATCTCCATCGCCACA GC GCCCAGCACGCTGTTG
F465I-f	CAACAGCGTGCTGGGC A TTGTGGCGATGGAGATG
F465I-b	CATCTCCATCGCCACAA T GCCCAGCACGCTGTTG
Seq27-b	TGAGCGGCAATCGCCAGTA
Seq465-f	TGCCGCCGATGACGCTAT

Tab. 2.4: Oligonukleotide zur Amplifizierung der Sequenz für das α -Peptid vom Original-Plasmid pYYC102.

Name	Sequenz 5'→ 3'
alpha-f	ATGGTCTCATGGTATGCTGCGCGCAATCAT
alpha-b	CGCGGATCCCTATTACCTTAGCCAGTTTGTTTT

2.2 Molekularbiologische Arbeiten

2.2.1 Generierung der EcPOX-Varianten

Punktmutationen der EcPOX (Asp27Ala, Asp27Asn, Phe465Ala, Phe465Ile) wurden mit Hilfe der Anleitung aus dem QuikChange[®]-Kit (Stratagene, USA) eingeführt. Mit dem Programm PrimerX (http://www.bioinformatics.org/primerx/index.htm) wurden die Primersequenzen erstellt (siehe Tab. 2.3) und bei Eurofins MWG Operon synthetisiert. Das Wildtyp-Plasmid (pYYC102) wurde aus einer Übernacht-Kultur (5 mL LB-Amp (1 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefe, 0,5 % NaCl (w/v), 100 µg/mL Ampicillin), 30 °C, 200 rpm) mit Hilfe des Miniprep-Kits (Tab. 2.1.2) präpariert. Die DNA-Konzentration wurde spektrometrisch bestimmt (siehe 2.7.3). Zur Einführung der Mutationen wurde eine Polymerasekettenreaktion (PCR) mit 25 ng Plasmid-DNA (pYYC102) im Ansatz durchgeführt. Das PCR-Programm wurde nach der QuikChange[®]-Anleitung mit 16 Zyklen für eine Punktmutation bei den entsprechenden Temperaturen durchgeführt. Methyliertes Plasmid ohne Mutation (ursprüngliches Plasmid) wurde mittels DpnI für 4 Stunden bei 37 °C verdaut. Unmethyliertes Plasmid (2 μ L des PCR-Ansatzes) wurde in elektrokompetente E. coli XL1-blue Zellen (Tab. 2.1.3) transformiert (Parameter: 2500 V, 25 mF, 200 Ω). Nach 30 minütiger Inkubation bei 37 °C in SOC-Medium (2 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefe, 20 mM Glukose, 10 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 2,5 mM KCl) wurden die Zellen auf selektivem LB-Medium (LB-Amp) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Plasmid aus den vorhandenen Einzelkolonien mittels Miniprep-Kit isoliert und die DNA-Konzentration bestimmt. Der Erfolg der Mutagenese wurde mittels Sequenzierung kontrolliert (Eurofins MWG Operon, Sequenzierprimer siehe Tab. 2.3). Plasmide, welche die korrekte Mutation enthielten, wurden in den Expressionsstamm ZK126 (Tab. 2.1.3) transformiert und als Glycerolkultur (70 % (v/v) LB-Kultur (OD 0,6) + 30 % (v/v) Glycerol) bei -70 °C gelagert.

2.2.2 Generierung des SUMO-alpha Fusionproteins

Zur Expression des α -Peptides wurde auf Grund der geringen Größe des Peptides (23 Aminosäuren) ein Fusionsprotein mit dem SUMO-Protein generiert. Das Wildtyp-Plasmid (pYYC102) wurde zunächst mit Hilfe des Miniprep-Kits (Tab. 2.1.2) präpariert und die DNA-Konzentration bestimmt (Abschnitt 2.7.3). Die Nukleotidsequenz des α -Peptides wurde mittels PCR aus dem pYYC102-Plasmid amplifiziert. Dazu wur-

den die angegebenen Primer (alpha (Tab. 2.4), 0,5 pmol/ μ L) mit den dNTPs (200 μ M), der Pfu DNA-Polymerase und der Plasmid-DNA (380 ng) versetzt und einem mehrschrittigen Amplifikationszyklus unterworfen (PCR-Programm siehe Anhang A.1). Das erhaltene PCR-Produkt wurde gereinigt (PCR-Reinigungskit, Tab. 2.1.2) und aufkonzentriert. Zunächst wurde das Konstrukt mit dem Restriktionsenzym Bsal für 3 Stunden bei 50 °C verdaut (BamHI Puffer, BSA (1:10)). Anschließend wurde mit BamHI für 3 Stunden bei 37 °C geschnitten. Beide Restriktionsenzyme wurden für 20 Minuten bei 65 °C denaturiert. Der gesamte Ansatz wurde auf ein präparatives Agarosegel (1,7 % (w/v)) geladen und aufgetrennt (400 mA, 100 V, 15 Minuten). Die entsprechende Bande wurde ausgeschnitten und mittels Gelextraktionskit (Tab. 2.1.2) gereinigt. Der Zielvektor (pET-SUMO, Tab. 2.2) wurde in XL1-blue Zellen (Tab. 2.1.3) transformiert und vermehrt. Das Plasmid wurde mittels Miniprep-Kit extrahiert und die DNA-Konzentration bestimmt. Damit das amplifizierte Konstrukt mit den generierten Enden in den Vektor ligieren kann, musste dieser mit denselben Restriktionsenzymen (BsaI und BamHI) verdaut werden. Anschließend wurde der Vektor am 5'-Ende mit Hilfe von alkalischer Phosphatase für eine Stunde bei 37 °C dephosphoryliert. Auch dieser Ansatz wurde auf ein präparatives Agarosegel (1 % (w/v)) aufgetragen und aufgetrennt (400 mA, 100 V, 30 Minuten). Die entsprechende Bande (ungefähr 5 kb) wurde ausgeschnitten und mittels Gelextraktionskit gereinigt. Der gereinigte und geschnittene Vektor und das DNA-Konstrukt wurden mit Hilfe der T4 DNA-Ligase ligiert. Es wurde einmal mit 5-fachem und einmal mit 10-fachem Uberschuss an Fragment im Vergleich zum Vektor gearbeitet. Für die Berechnung des Ligationsansatzes wurde folgende Formel (Gl. 2.1, [82]) verwendet.

Masse Fragment [ng] =
$$\frac{5 (10) \cdot 100 \text{ ng Vektor} \cdot \text{Länge Fragment [bp]}}{\text{Länge Vektor [bp]}}$$
 (2.1)

Mit 97 bp DNA-Fragment und 5643 bp Vektor ergaben sich 2 verschiedene Proben und eine Negativkontrolle ohne DNA-Fragment. Die Ansätze mit Vektor, DNA-Fragment und Ligase wurden bei 16 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte eine Transformation von 1,5 μ L des Ligationsansatzes in einen Klonierungsstamm (XL1blue) mit Kanamycin als Selektionsmarker. Der Erfolg der Ligation wurde mittels Kolonie-PCR überprüft. Dafür wurde eine kleine Menge einer Einzelkolonie von der Kulturplatte entnommen und in 40 μ L destilliertem Wasser ausgerieben. Diese Zellsuspension wurde 10 Minuten auf 110 °C erhitzt und anschließend als Template in die PCR eingesetzt. Es wurden die gleichen Konzentrationen (Primer, dNTP's, Polymerase) und Einstellungen des PCR-Programms wie für die Amplifizierung (Tab. A.1) verwendet. Fand eine Ligation von Template und Vektor statt, dann konnten in einem Agarosegel (1,7 % (w/v)) eine Bande, die der Größe des DNA-Konstruktes (69 bp) entsprach, beobachtet werden. Von einer solchen positiven Kolonie wurde das Plasmid präpariert, die DNA-Konzentration bestimmt und eine Sequenzierung durchgeführt (Eurofins MWG Operon). Für die Sequenzierung wurden Primer verwendet, welche an den T7-Promotor des pET-Vektors binden können. Nach Bestätigung der korrekten Sequenz wurde das Plasmid in den Expressionsstamm BL21(DE3) (Tab. 2.1.3) transformiert. Ein Expressionstest (SDS-PAGE, 15 %ig, [83]) vor und nach Induktion mit 1 mM IPTG bestätigte die Expression des gewünschten Konstruktes. Das Plasmid wurde als pET-SUMO-alpha bezeichnet (Tab. 2.2). Zur Lagerung wurde das Plasmid in BL21(DE3)-Zellen transformiert und diese als Glycerolkultur (siehe Abschnitt 2.2.1) bei -70 °C aufbewahrt.

2.3 Präparation der Pyruvatoxidase und deren Varianten

2.3.1 Zellanzucht

Die Pyruvatoxidase aus *Escherichia coli* wurde rekombinant in *E. coli* hergestellt. Das Wildtyp-Plasmid (pYYC102) wurde freundlicherweise von Herrn John E. Cronan, Jr. (Universität Illinois, USA) und die Zellen (ZK126) von Herrn Roberto Kolter (Harvard Medical School, Boston, USA) zur Verfügung gestellt [81][78] (Tab. 2.1.3 und 2.3). Die Plasmide mit den Punktmutationen wurden wie in Abschnitt 2.2.1 generiert. Alle Stämme wurden als Glycerolkultur gelagert.

Die Zellen wurden in 6x 1 Liter LB-Medium (Abschnitt 2.2.1) mit 100 μ g/mL Ampicillin im Schüttelkolben bei 37 °C unter konstantem Schütteln kultiviert. Die ZK126-Zellen exprimieren zu Beginn der stationären Wachstumsphase einen *rpoS* codierten σ^S -Faktor [81][78][84]. Dieser dient als Induktor für das Plasmid. Die Zellen exprimieren somit das Genprodukt sobald sie sich in der stationären Phase des Wachstums befinden. Nach 19 Stunden Inkubation wurden die Zellen mittels Zentrifugation (4.000 g, 10 min, 8 °C) geerntet und bei -20 °C eingefroren. Die Lagerung bis zur weiteren Aufarbeitung erfolgte bei -20 °C.

2.3.2 Proteinreinigung

Die folgenden Arbeiten wurden auf Eis bzw. im Kühlraum ($\approx 8 \ ^{\circ}C$) durchgeführt. Die eingefrorenen Zellen (ca. 20 g) wurden mit dem doppelten Volumen 20 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6.5 (KPP) mit 0,1 mM FAD resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension mittels Hochdruck-Dispersion bei 2.200 bar aufgeschlossen und unlösliche Zellbestandteile mittels Ultrazentrifugation (70.000 g, 30 min, 4 °C) abgetrennt. Im Überstand befindliche Desoxyribonukleinsäure (DNA) wurde mittels 0,5 % (w/v) Streptomycinsulfat für 30 Minuten gefällt. Mit dem Überstand nach einer weiteren Zentrifugation (70.000 g, 30 min, 4 °C) wurde eine Hitzefällung durchgeführt. Dazu wurde das Proteingemisch unter Rühren in einem Becherglas in einem 80 °C warmem Wasserbad für 3 Minuten auf 65 °C erhitzt. Ausgefallendes hitzelabiles Protein wurde mittels Zentrifugation (70.000 g, 30 min, 4 °C) sofort abgetrennt. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand mit 1 mL/min auf einem mit Niedrigsalzpuffer (20 mM KPP pH 6.5) äquilibrierten Anionenaustauscher (HiLoad 26/10 Q Sepharose, 50 mL) aufgetragen. Protein, welches nicht an die Säule gebunden hatte, wurde mit 3 Säulenvolumina 10 % Hochsalzpuffer (300 mM KPP pH 6.5) eluiert. Ein sich anschließender linearer Gradient über 6 Säulenvolumina von 10 % auf 100 % Hochsalzpuffer eluierte das Protein bei ungefähr 160 mM KPP pH 6.5. Das Eluat wurde fraktioniert gesammelt und anschließend mit Hilfe der SDS-PAGE [83] auf Reinheit untersucht. Fraktionen, die eine Reinheit von mindestens 90 % aufwiesen, wurden vereinigt und mittels Ultrafiltration (30 kDa MWCO) aufkonzentriert, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Fraktionen mit geringerer Reinheit wurden aufkonzentriert und auf eine mit Hochsalzpuffer (300 mM KPP pH 6.5) äquilibrierte Gelfiltrationssäule (Superdex 200 26/60, 320 mL) aufgetragen und mit 0,9 mL/min aufgetrennt. Fraktionen, welche eine Reinheit von mehr als 90 % aufwiesen, wurden vereinigt, aufkonzentriert, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die Ausbeuten lagen bei allen Varianten bei 17-22 mg Protein/Liter Medium.

2.4 Präparation des *α*-Peptides

Zur Expression des α -Peptides wurde auf Grund der Kürze des Peptides (23 Aminosäuren) ein Fusionsprotein mit dem SUMO-Protein (ca. 100 Aminosäuren, 11 kDa) generiert. SUMO steht für *small ubiquitin like modifier* und bezeichnet ein kleines Protein, welches ubiquitär in Eukaryonten vorkommt und zelluläre Prozesse reguliert [85]. Die Vorteile einer Fusion mit dem SUMO-Protein bestehen in der einfachen Detektion und Reinigung und in der Tatsache, dass das SUMO-Protein schnell in die native Form faltet und somit als Chaperon für das Fusionsprotein agiert. Durch diese Funktion wird zudem das Fusionsprotein vor dem Abbau geschützt [86]. Ein weiterer Vorteil besteht in der sehr effizienten Abspaltung des N-terminalen SUMO-*tags*. Die SUMO-Protease, eine Cysteinprotease, erkennt die dreidimensionale Struktur des SUMO-*tags* und schneidet spezifisch vor der ersten Aminosäure des Zielproteins. SUMO-*tag* und SUMO-Protease besitzen einen N-terminalen His-*tag*, der eine einfache Reinigung und Abtrennung der SUMO-Produkte ermöglicht [87].

2.4.1 Präparation des SUMO-alpha Fusionsproteins

2.4.1.1 Zellanzucht

Die Zellen mit dem generierten Plasmid (pET-SUMO-alpha (siehe Abschnitt 2.2.2)) wurden in einer Glycerinkultur bei -80 °C aufbewahrt. Aus dieser Lösung wurde zunächst auf Kanamycin-haltiger (50 μ g/mL) LB-Agar-Platte ein Verdünnungsausstrich hergestellt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden Zellen einer Einzelkolonie in einer Vorkultur (100 mL LB-Kan) unter konstanter Belüftung (200 rpm) über Nacht bei 30 °C inkubiert. Die Zellen wurden geerntet (2.600 g, 15 min, 8 °C) und mit frischem LB-Kan-Medium resuspendiert und in 6x 1 L Schüttelkultur bei 37 °C kultiviert. Nachdem eine optische Dichte von 0,6 erreicht war, wurde die Expression des gewünschten Gens mit 1 mM IPTG induziert. Nach 19-stündiger Inkubation bei 37 °C und konstanter Belüftung (200 rpm) wurden die Zellen geerntet (4.000 g, 10 min, 8 °C). Das Zellpellet wurde bei -20 °C gelagert.

2.4.1.2 Proteinreinigung

Ungefähr 25 g Zellen (His-SUMO-alpha) wurden mit ca. 50 mL Puffer (50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7.2, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol) resuspendiert und mittels Hochdruck-Dispersion bei 2.200 bar aufgeschlossen. Die unlöslichen Zellbestandteile wurden abzentrifugiert (70.000 g, 30 min, 4 °C) und die DNA im Überstand mit 0,5 % (w/v) Streptomycinsulfat für 30 Minuten gefällt. Zusätzlich wurde ein DNase I-Verdau (5 μ g/mL) für weitere 30 Minuten durchgeführt. Zur Erhöhung der DNase-Aktivität wurde die Magnesiumkonzentration im Überstand auf 10 mM MgSO₄ eingestellt. Anschließend wurde noch zweimal zentrifugiert (70.000 g, 30 min, 4 °C). Der Überstand (ungefähr 100 mL) wurde über einen Superloop auf die mit Niedrigimidazolpuffer (50 mM KPP pH 7.2, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol) äquilibrierte Ni-NTA-Affinitätssäule (ca. 15 mL Säulenvolumen) mit 1 mL/min aufgetragen. Nach Auftragung der gesamten Probe, wurde mit 2 mL/min bei 10 % Hochimidazolpuffer (50 mM KPP pH 7.2, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol), Protein, welches nicht an das Säulenmaterial gebunden hatte, eluiert, bis die Basislinie bei einer Wellenlänge von 280 nm wieder erreicht wurde. Anschließend wurde ein Gradient von 10 % bis 100 % Hochimidazolpuffer über 5 Säulenvolumina angelegt. Das Eluat wurde fraktioniert gesammelt und die Reinheit der Proteinproben mittels SDS-PAGE (15 % [83]) überprüft. Fraktionen, welche SUMO-alpha Protein enthielten, wurden vereinigt und mittels Ultrafiltration (10 kDa MWCO) auf ungefähr 3 mL aufkonzentriert. Diese Lösung wurde dann auf eine äquilibrierte (50 mM KPP pH 7.2, 300 mM NaCl) Gelfiltrationssäule (Superdex 75 16/60, 120 mL) aufgetragen und mit 1 mL/min eluiert. Die erhaltenen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE (15 % [83]) auf ihre Reinheit überprüft. Fraktionen mit über 90 % Reinheit wurden vereinigt, aufkonzentriert, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20 °C gelagert.

2.4.2 Präparation der SUMO-Protease

2.4.2.1 Zellanzucht

Zellen des *E. coli*-Stammes (Rosetta(DE3) pLysS, Tab. 2.1.3) wurden mit dem Plasmid für die SUMO-Protease (pULP1, Tab. 2.2) transformiert (Abschnitt 2.2.1) und auf Medium mit Selektionsmarker ($35 \mu g/mL$ Kanamycin und $30 \mu g/mL$ Chloramphenicol) über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Zellen und das Plasmid wurden freundlicherweise von der AG Biotechnologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg zur Verfügung gestellt. Eine Einzelkolonie wurde in einer Vorkultur (50 mL LB-Kan-Cam) über Nacht bei 37 °C angezogen. Die Zellen wurden mittels Zentrifugation (2.600 g, 15 min, 8 °C) geerntet und in frischem Medium resuspendiert und in 1 Liter Hauptkultur (LB-Kan-Cam) inokuliert. Diese wurde bei 37 °C im Schüttelkolben (200 rpm) inkubiert. Bei einer optischen Dichte von ca. 1 wurde die Expression der SUMO-Protease mit 0,75 mM IPTG für 4 Stunden bei 30 °C induziert. Die Zellen wurden geerntet (4.000 g, 10 min, 8 °C) und bei -20 °C eingefroren.

2.4.2.2 Proteinreinigung

Das Zellpellet (ca. 2 g Zellen) wurde in ca. 40 mL Aufschlusspuffer (20 mM Tris/HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 10 mM MgSO₄, 1 mM β -Mercaptoethanol) resupendiert. Anschließend wurden die Zellen mittels Hochdruck-Dispersion bei 2.200

bar aufgeschlossen. Die unlöslichen Bestandteile wurden pelletiert (70.000 g, 30 min, 4 °C). Die DNA im Überstand wurde mit 5 μ g/mL DNase I verdaut. Nach erneuter Zentrifugation (70.000 g, 30 min, 4 °C) wurde der Überstand mit 1 mL/min auf die äquilibrierte (20 mM Tris/HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 1 mM β -Mercaptoethanol) Ni-NTA-Affinitätssäule (ca. 15 mL Säulenvolumen) aufgetragen. Anschließend wurde das nicht an die Säule gebundene Protein mit einem Puffer, der eine geringe Imidazol-Konzentration (20 mM Tris/HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 1 mM β -Mercaptoethanol) enthielt, eluiert, bis die Basislinie bei einer Wellenlänge von 280 nm erreicht war. Ein Gradient von 0 % bis 100 % Imidazol (20 mM Tris/HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 250 mM Imidazol, 1 mM β -Mercaptoethanol) wurde über 10 Säulenvolumina angelegt. Das eluierte Protein wurde fraktioniert gesammelt und die Reinheit mittels SDS-PAGE (15 % [83]) kontrolliert. Überschüssiges Imidazol wurde aus den vereinigten Fraktionen mittels Dialyse (14 kDa MWCO) über Nacht gegen 150 mM Tris/HCl pH 8.0, 2 mM EDTA, 1 mM DTE entfernt. Nach mehrmaligem Pufferwechsel wurde Glycerin zugeben, so dass die SUMO-Protease in 75 mM Tris/HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 0,5 mM DTE und 50 % Glycerin bei -80 °C eingefroren werden konnte.

2.4.3 Isolierung des *α*-Peptides

Zur Gewinnung des α-Peptides musste das SUMO-alpha Fusionsprotein mit der SU-MO-Protease gespalten werden. Dazu wurden die Protease und das SUMO-alpha Fusionsprotein in 50 mM KPP pH 7.2 in einem Verhältnis von 1:2000 (molare Konzentration) vereinigt und für 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Konzentration des Fusionsproteines im Proteolyseansatz sollte möglichst hoch sein, da eine Aufkonzentrierung des α -Peptides nicht ohne Weiteres möglich ist. Zur Abtrennung der SUMO-Protease und des abgeschnittenen SUMO-Teils des Fusionsproteins wurde eine erneute Affinitätschromatographie (Ni-NTA, ca. 15 mL) mit 50 mM KPP pH 7.2 als mobiler Phase durchgeführt. Das im Durchfluss enthaltene α -Peptid musste anschließend mittels Umkehrphasen-HPLC (RP-HPLC) gereinigt werden. Zur Bestimmung der optimalen Reinigungsbedingungen wurde zunächst ein analytischer Lauf mit einer C18-HPLC-Säule (Phenomenex Jupiter 300) gestartet. Nach erfolgter Optimierung wurde das α -Peptid mit einer präparativen RP-HPLC-Säule (Nucleosil 500) gereinigt. Dazu wurde die Säule mit Puffer A (Wasser mit 0,1 % TFA) bei einer Flussgeschwindigkeit von 1 mL/min äquilibriert und anschließend die Probe injiziert (ca. 1 mg). Nach erfolgter Injektion wurde ein linearer Gradient mit Puffer B (66 % Acetonitril, 33 % Isopropanol, 0,1 % TFA, [80]) über 180 mL angelegt. Das Elutionsprofil ist in Abbildung A.1 A gezeigt. Die erhaltenen Peaks wurden fraktioniert gesammelt und mittels MALDI-Massenspektrometrie (Abb. A.1 B) analysiert. Fraktion 2 enthält das gereinigte α -Peptid mit einer molaren Masse von 2641 Da.

2.5 Chemische Synthese des *α*-Peptides

Die Synthese des aus 23 Aminsäuren bestehenden α -Peptides (*Ec*POX_{550–572}, H-Met-Leu-Arg-Ala-IIe-IIe-Ser-Gly-Arg-Gly-Asp-Glu-Val-IIe-Glu-Leu-Ala-Lys-Thr-Asn -Trp-Leu-Arg-OH) erfolgte in Kooperation mit der AG Naturstoffbiochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg nach dem Prinzip der Festphasen-Synthese an einem Peptidsynthesizer (ABI 443A). Die Synthesevorschrift ist im Anhang A.2 auf Seite 168 beschrieben. Das Rohprodukt wurde über Umkehrphasen-HPLC (C18-Säule, 5-35 % Wasser/Acetonitril Gradient (mit 0,1 % TFA)) gereingt. Die korrekte Synthese wurde mit Hilfe der Massenspektrometrie bestätigt (Spektren nicht gezeigt).

2.6 Bestimmung des Extinktionskoeffizienten der EcPOX

FAD ist fest, aber nicht-kovalent an die Pyruvatoxidase gebunden. Wenn sichergestellt ist, dass kein freies FAD in der Lösung vorliegt, kann anhand der FAD-Absorption der Extinktionskoeffizient des Proteins bestimmt werden. Das Spektrum von *Ec*POX (1 mg/mL) wurde im Wellenlängenintervall von 300-650 nm aufgenommen und die Extinktion des Absorptionsmaximums (438 nm) bestimmt. Anschließend wurde das Protein bei 95 °C für 5 Minuten im Wasserbad denaturiert. Ausgefallenes Protein wurde abzentrifugiert (10.000 g, 5 min, 4 °C) und ein Spektrum des Überstandes im gleichen Wellenlängenbereich aufgenommen. Der Überstand enthielt ausschließlich das vormals proteingebundene FAD. Anhand des bekannten Extinktionskoeffizienten des freien oxidierten FAD ($\varepsilon_{FAD,448nm} = 10.961 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [88]) konnte der Extinktionskoeffizient der *Ec*POX bestimmt werden. Er beträgt $\varepsilon_{EcPOX,438nm} = 13.721 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.7 Konzentrationsbestimmungen

2.7.1 Konzentration der EcPOX

Die Proteinkonzentration der Pyruvatoxidase aus *E. coli* wurde entweder über die Proteinextinktion bei 438 nm und den ermittelten Extinktionskoeffizienten (siehe Abschnitt 2.6) oder durch das Verfahren nach Bradford [89] bestimmt. Für die Methode nach Bradford wurde eine Eichgerade mit Albumin Fraktion V erstellt, anhand derer die Konzentration der unbekannten Proteinlösung bestimmt werden konnte.

2.7.2 Konzentration des *α*-Peptides

In der Sequenz des α -Peptides befindet sich nur ein Tryptophan. Über dieses wurde die Konzentration des α -Peptides spektroskopisch bei einer Wellenlänge von 280 nm ermittelt (ε_{α -Peptid} = 5.500 M⁻¹ cm⁻¹).

2.7.3 Bestimmung der DNA-Konzentration

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurden UV/Vis-Spektren (240-340 nm) vom Puffer und von der Probe aufgenommen. Das Pufferspektrum wurde von dem Probenspektrum abgezogen und die Absorption bei 260 nm bestimmt. Mit Gleichung 2.2 [82] wurde die DNA-Konzentration in μ g/mL bestimmt.

$$c = OD_{260nm} \cdot V \cdot F \tag{2.2}$$

Dabei ist OD_{260nm} die optische Dichte bei 260 nm, V der Verdünnungsfaktor und F der Faktor für dsDNA (hier F=50).

2.8 Aktivitätstest

Die Messung der enzymatischen Aktivität erfolgte mittels eines Reduktaseansatzes mit Kaliumhexacyanoferrat (K_3 [Fe(CN)₆]) als artifiziellem Elektronenakzeptor. Dieser Aktivitätstest wurde von Mather & Gennis [70] beschrieben und leicht verändert angewandt. Bei diesem Test wird das Enzym (80 µM) in 100 mM KPP pH 6.0 mit 10 mM MgSO₄ und 1 mM ThDP mit 200 mM Pyruvat für 5 Minuten inkubiert. Nach Zugabe

von 10 mM Kaliumhexacyanoferrat wird die Absorptionsabnahme bei 450 nm verfolgt. Der Extinktionskoeffizient von Kaliumhexacyanoferrat wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt ($\varepsilon_{K_3[Fe(CN)_6]} = 218,8 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [90]). Die Messtemperatur betrug 30 °C. Mit Gleichung 2.3 wurde die spezifische Aktivität berechnet.

$$A_{S} = \frac{dE/dt \cdot V}{z \cdot d \cdot v \cdot \varepsilon_{K_{3}[Fe(CN)_{6}]} \cdot [E]}$$
(2.3)

Darin bedeuten: A_S spezifische Aktivität (U/mg), dE/dt Extinktionsänderung pro Zeit (min⁻¹), V Volumen des Messansatzes (μ L), z Anzahl der übertragenen Elektronen (z=2), d Schichtdicke der Messküvette (d=1 cm), v Volumen an Enzymlösung (μ L), $\varepsilon_{K_3[Fe(CN)_6]}$ Extinktionskoeffizient von Kaliumhexacyanoferrat bei 450 nm (218,8 M⁻¹ cm⁻¹) und [E] Enzymkonzentration (mg/mL).

2.9 Proteolytische Aktivierung

Zur Aktivierung der *Ec*POX vor kinetischen oder spektroskopischen Messungen sowie der Kristallisation wurde routinemäßig die Methode der limitierten Proteolyse angewandt, bei der 23 Aminosäuren C-terminal von jeder Untereinheit abgespalten werden. Recny und Hager haben ein Protokoll dafür angegeben [69], welches in modifizierter Form verwendet wurde [91].

In einem Ansatz werden 3 mg/mL Enzym in 100 mM KPP pH 6.0 mit 20 mM MgSO₄ und 10 mM ThDP mit 200 mM Pyruvat reduziert. Nach 10 Minuten wird 20 μ g/mL α -Chymotrypsin (1 mg/mL Stammlösung in 1 mM HCl) zugefügt und die Proteolyse nach 40 Minuten durch Zugabe eines 10-fachen Überschusses an Aprotinin, einem Proteaseinhibitor, abgestoppt. Die Protease, der Inhibitor und überschüssiges Pyruvat wurden mittels Ultrafiltration (30 kDa MWCO) abgetrennt. Anschließend wurde die proteolytisch aktivierte *Ec*POX in den Messpuffer umgepuffert.

Für die zeitabhängigen Proteolyseexperimente wurden die gleichen Konzentrationen an Enzym und Kofaktoren im Ansatz verwendet. Die Reaktion wurde jedoch mit SDS-Probenpuffer unter Erwärmung für 5 Minuten auf 95 °C abgestoppt. Anschließend wurde das Proteolysemuster der Proben mit Hilfe eines SDS-Gels (10 % [83]) analysiert. Zur Untersuchung des Einflusses von verschiedenen Substraten und Substratanaloga auf Teilreaktionen wurden folgende Konzentrationen angewandt. **Gesamtreaktion.** Zur simultanen Charakterisierung von Substratbindung und Reduktion des Flavins wurde das Enzym mit 200 mM Pyruvat reduziert und anschließend mit der Protease verdaut.

Substratbindung. Zur Generierung des prä-Decarboxylierungsintermediates wurde die *Ec*POX mit 20 mM Methylacetylphosphonat (MAP) inkubiert. Das Substratanalogon bindet an das C(2)-Atom des ThDP und bildet ein Phosphonolaktyl-ThDP (PL-ThDP) aus, welches nicht weiter reagieren kann.

Post-Decarboxylierungsintermediat. Konformationsänderungen nach Decarboxylierung wurden untersucht, indem das Enzym mit 100 μ M Thiaminthiazolondiphosphat (freundlicherweise von Frau Franziska Seifert zur Verfügung gestellt) rekombiniert wurde. Thiaminthiazolondiphosphat ähnelt der chemischen Struktur des HEThDP, überträgt jedoch keine Elektronen auf FAD.

Reduktion des FAD. Zur separaten Reduktion des Flavins wurde das Enzym in einer Anaerobenkammer mit 290 μ M Natriumdithionit reduziert. Anaerobe Bedingungen wurden durch mehrmaliges Evakuieren mit Stickstoff erzielt. Alle Lösungen (Volumen unter 1 mL) wurden anaerobisiert, indem sie mindestens 30 Minuten in der Anaerobenkammer standen und den gelösten Sauerstoff an die Umgebung abgaben.

2.10 Bestimmung der Redoxpotentiale

2.10.1 Redoxtitration mit Farbstoffen

Die Bestimmung der Mittelpunktpotentiale der *Ec*POX wurde von Herrn Prof. Dr. Kai Tittmann im Labor von Prof. Dr. Sandro Ghisla von der Universität Konstanz durchgeführt.

Die Experimente wurden bei 15 °C unter anaeroben Bedingungen, in An- und Abwesenheit von Redoxfarbstoffen, mit Natriumdithionit durchgeführt. Für die nichtaktivierte *Ec*POX wurde Phenosafranin (E_m =-208 mV bei pH 6.0) und für die Δ 23-Variante wurde Indigodisulfonat (E_m =-65 mV bei pH 6.0) verwendet. Die Potentiale der Farbstoffe dürfen nur \pm 30 mV von dem des enzymgebundenen Flavins abweichen. Anaerobe Bedingungen wurden in einer Anaerobenkammer durch mehrmaliges Evakuieren und Spülen mit Stickstoff erreicht. Die Natriumdithionit-Lösung wurde vor jedem Experiment frisch hergestellt und die Konzentration anhand der reduktiven Titration von freiem FAD berechnet. Ein typischer Ansatz enthielt 16,13 μ M *Ec*POX in 100 mM KPP pH 6.0 mit 10 mM MgSO₄/ThDP, der mit 1 μ M Benzylviologen versetzt wurde. Dieses 4,4'-Bipyridin-Derivat sorgt für eine schnellere Einstellung des Redoxgleichgewichtes. Nach schrittweiser Zugabe von 0,2-0,5 μ L Natriumdithionit-Lösung wurde jeweils ein UV/Vis-Spektrum von 300-700 nm aufgenommen.

Diese Messungen wurden zuerst ohne Redoxfarbstoff durchgeführt. Wird während der Reduktion des Flavins ein Semichinon stabilisiert (chemische Struktur Abb. 3.24), kann dies im Spektrum detektiert werden. Diese thermodynamische Stabilisierung kann anhand der Auftragung der maximalen Absorptionsänderung des Semichinons, für das neutrale Semichinon zum Beispiel bei 550 nm, gegen die der oxidierten Form (438 nm) bestimmt werden.

Das Mittelpunktpotential der nicht-aktivierten und der aktivierten *Ec*POX wurde mit demselben Messansatz, jedoch unter Addition von 10-20 μ M Redoxfarbstoff, siehe oben, erhalten. Anhand der spektralen Änderung des bekannten Redoxfarbstoffes kann das Potential in der Messzelle mit Hilfe der Nernst'schen Gleichung berechnet werden (2.4). Eine Auftragung der Konzentration an oxidierter Spezies bei 438 nm gegen das errechnete Potential ermöglicht eine Berechnung der Mittelpunktpotentiale der Enzymspezies mit Hilfe der Nernst'schen Gleichung [92].

$$E = E_m + \frac{2, 3 \cdot R \cdot T}{z \cdot F} \cdot lg \frac{[\text{Ox}]}{[\text{Red}]}$$
(2.4)

E steht für das gemessenes Potential, E_m für das Mittelpunktpotential, *R* Gaskonstante (8,3144 J/(mol·K)), *F* Faradaykonstante (96,5 kJ/(V·mol)), *T* absolute Temperatur in Kelvin und *z* ist die Anzahl der übertragenen Elektronen. Im vorliegenden Fall gilt *z*=2.

2.10.2 Zyklische Voltammetrie

Untersuchungen zum Redoxverhalten der Pyruvatoxidase aus *Escherichia coli* mittels FT-IR wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Georg Wille am Institut für Biophysik an der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt/Main durchgeführt.

FAD kann während Redoxreaktionen Elektronen aufnehmen oder abgeben. Zur Bestimmung des Mittelpunktpotentials des enzymgebundenen FAD in der *Ec*POX wurde mit einer Redoxzelle gearbeitet, in der über eingebaute Elektroden das Elektrodenpotential und damit der Redoxzustand des Proteins variiert werden kann. Der Aufbau dieser Elektrode und der Messaufbau wurde von Bernad & Mäntele [93] beschrieben. Es ist zu beachten, dass die Schichtdicke der Messzelle sehr klein ist (maximal 5 μ m). Damit ist sichergestellt, dass die Elektronen schnell in der Lösung äquilibrieren (innerhalb des Nernst-Abstandes).

Die Messungen erfolgten an einem IFS 25 FT-IR-Spektrometer, was die simultane Aufnahme von IR-Spektren zwischen 1000 cm⁻¹ und 4000 cm⁻¹ und von Vis-Spektren in einem Bereich von 400 nm bis 1000 nm ermöglichte. Die Messzelle wurde mit einer sehr konzentrierten Proteinlösung (ca. 2,4 mM EcPOX-Lösung (ca. 150 mg/mL) in 50 mM KPP pH 6.0 und 100 mM KCl) befüllt (Volumen etwa 3 μ L) und auf höchstens 5 μ m Schichtdicke eingestellt. Mit Hilfe eines Potentiostaten war es möglich, die Spannung in der Zelle von +300 bis -500 mV gegen eine Ag/AgCl-Referenz-Elektrode zu verändern. Damit das Protein an der hydrophoben Goldoberfläche der Elektrode nicht denaturiert, wurde diese mit einer 1 mM Pyridin-3-aldehyd-thiosemicarbazon-Lösung (PATS) hydrophilisiert. Überschüssiges Reagens wurde abgespült. Desweiteren wurde mit Mediatoren gearbeitet, die die Elektronen effizient von der Elektrode zum Protein transferieren. Die Auswahl dieser Mediatoren erfolgte in Anlehnung an Hellwig et al. [94]. Sie haben keinen Einfluss auf die aufgenommenen Spektren oder das Redoxverhalten des Enzyms, sondern beschleunigen lediglich die Gleichgewichtseinstellung. Die Messungen wurden bei Raumtemperatur (22 °C) durchgeführt.

Zur Kontrolle, dass sich die *Ec*POX in der Zelle reduzieren lässt, wurden Vis-Spektren (400-800 nm) des Enzyms aufgenommen, während die angelegte Spannung im Bereich von +300 bis -500 mV gegen eine Ag/AgCl-Elektrode variiert wurde.

Das Mittelpunktpotential wurde bestimmt, indem zyklische Voltammogramme aufgenommen wurden. Bei dieser Methode wird die Stromstärke gemessen, welche beim Anlegen einer Spannung an der Probe entsteht. Die Spannung wurde automatisch mit einer Geschwindigkeit von $10 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ im Bereich von +300 bis -500 mV zyklisch variiert. Gleichzeitig wurde die Stromstärke gemessen. Die Auftragung der Stromstärke gegen die angelegte Spannung liefert ein typisches Muster, anhand dessen das Mittelpunktpotential, bei dem die Konzentration an oxidierter und reduzierter Form gleich ist, bestimmt werden kann.

Desweiteren ist zu beachten, dass bei den Messungen mit einer Ag/AgCl/3M KCl-Elektrode als Gegenelektrode gearbeitet wurde. Um das Standard-Redoxpotential zu erhalten, müssen zu den ermittelten Werten 208 mV (für die Normal-Wasserstoffelektrode) addiert werden.

2.11 UV/Vis-Spektroskopie

Messungen im UV/Vis-Bereich wurden bei 25 beziehungsweise 30 °C an einem Absorptionsspektrometer (Jasco V-560) oder gegebenenfalls an einem *stopped-flow-Spek*trometer (SX18 MV) durchgeführt. Proteinspektren wurden immer pufferkorrigiert.

2.11.1 Bildung des Phosphonolaktyl-ThDP

Die kovalente Bindung von Methylacetylphosphonat (MAP) an ThDP wurde direkt anhand der Bildung der Iminoform des Phosphonolaktyl-ThDP bei 305 nm verfolgt. Nicht-aktivierte *Ec*POX konnte am Spektrometer gemessen werden, während aktiviertes Enzym mit Hilfe des *stopped-flow*-Spektrometers analysiert wurde. Die Messtemperatur betrug 25 °C. Ein Messansatz setzte sich wie folgt zusammen. Nichtaktiviertes Enzym (2 mg/mL) in 50 mM KPP pH 6.0 wurde mit der entsprechenden Konzentration an MAP versetzt und anschließend die Absorptionsänderung bei 305 nm spektroskopisch verfolgt. Die Zeit, die nach MAP-Zugabe bis zum Start der Messung verging (Totzeit), wurde notiert. Bei der Auswertung wurde die Zeitskala mittels dieser Werte additiv korrigiert. Aktivierte *Ec*POX (2 mg/mL) in 20 mM KPP pH 6.0 wurde in die eine Spritze und MAP entsprechender Konzentration in 20 mM KPP pH 6.0 in die andere Spritze gefüllt. Zum Reaktionsstart wurden beide Lösungen im Volumenverhältnis 1+1 zusammengeschossen und die Reaktion in einer Messzelle (d= 1 cm) analysiert.

2.11.2 stopped-flow-Absorptionspektroskopie

Zur Analyse schneller Reaktionen wurde ein SX18 MV *stopped-flow*-Spektrometer verwendet. Eine Spritze des Gerätes wurde mit Pyruvatoxidase-Lösung (Wildtyp oder Varianten) bekannter Konzentration gefüllt, die andere Spritze mit Substratlösung (jeweils gleicher Puffer). Zum Reaktionsstart wurden beide Lösungen im Volumenverhältnis 1+1 zusammengeschossen, so dass eine optimale Durchmischung gewährleistet war. Die Schichtdicke der Messzelle betrug 1 cm. Die Detektion erfolgte mit einem Photomultiplier.

Messungen unter aeroben Bedingungen wurden in luftgesättigten Lösungen durchgeführt ($[O_2]_{25^\circ C} \approx 250 \ \mu M$ [95]). Für anaerobe Messungen wurde der Sauerstoff mittels eines Hilfsenzymsystems, bestehend aus Glukoseoxidase (GOX) und β -D-Glukose, aus der Lösung entfernt. Die entsprechenden Reaktionen lauten:

$$\beta$$
-D-Glukose + GOX-FAD $\longrightarrow \gamma$ -D-Glukonolakton + GOX-FADH₂
GOX-FADH₂+ O₂ \longrightarrow GOX-FAD + H₂O₂

Ein anaerober Ansatz setzte sich wie folgt zusammen: 1 mL Enzymlösung sowie 1 mL der Substratlösung wurden mit 22 mM Glukose und 82,5 μ M GOX versetzt. Die Lösungen wurden frei von Luftblasen in die Messspritzen gefüllt und 5 Minuten bei der Messtemperatur inkubiert. Der Aufbau des *stopped-flow*-Spektrometers ermöglichte einen weitgehenden Sauerstoffausschluss.

Für die Messungen der reduktiven Halbreaktion wurde unter anaeroben Bedingungen bei einer Messtemperatur von 20 °C die Absorption bei 438 nm verfolgt. Die finalen Konzentrationen betrugen: 1 mg/mL Enzym (16,13 μ M) in 100 mM KPP pH 6.0 mit 10 mM MgSO₄ und 1 mM ThDP. Die Pyruvatkonzentrationen wurden für die nicht-aktivierte *Ec*POX in einem Bereich von 5 bis 700 mM und für die aktivierte *Ec*POX in einem Bereich von 1 bis 100 mM variiert. Für die Untersuchung der Temperaturabhängigkeit der reduktiven Halbreaktion wurde mit aktivierter *Ec*POX und 100 mM Pyruvat bei verschiedenen Temperaturen (5, 10, 15, 20, 25, 30 °C) unter anaeroben Bedingungen gemessen.

Zur Untersuchung, ob während der reduktiven Halbreaktion von nicht-aktivierter und aktivierter *Ec*POX transiente radikalische Semichinone gebildet werden, wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 550 nm verfolgt.

2.12 CD-Spektroskopie

Bei der Circulardichroismus-Spektroskopie wird die Wechselwirkung von zirkular polarisiertem Licht mit optisch aktiven Substanzen ausgenutzt. Beim Durchtritt der Strahlung durch die Probe werden links- und rechtsgerichtetes zirkular polarisiertes Licht unterschiedlich stark beeinflusst. Die dichroischen Eigenschaften des austretenden Lichtes werden gemessen.

2.12.1 Bestimmung der K_D-Werte substratanaloger Verbindungen

Zur Bestimmung der apparenten *K*_D-Werte der Substratbindung wurden Titrationen mit den kompetitiven Inhibitoren Acetylphosphinat (AcPh) und Methylacetylphos-

phonat (MAP) durchgeführt [96]. Die Messungen mit AcPh wurden von Herrn Danilo Meyer im Labor von Prof. Dr. Frank Jordan, Rutgers Univerität, Newark, USA durchgeführt.

AcPh und MAP sind Substratanaloga, die an das C(2)-Atom des ThDP binden, dann jedoch auf Grund der entstandenen C-P-Bindung nicht mehr weiterreagieren können. Das achirale ThDP wird in Gegenwart der Proteinkomponente und bei Ausbildung des asymmetrischen Additionsadduktes am ThDP (prä-Decarboxylierungsintermediat) chiral und zeigt ein CD-Signal bei etwa 300 nm [97].

Für die Messungen mit AcPh wurde das Enzym (2 mg/mL) in 20 mM MES und 20 mM KPP pH 6.1 mit 1 mM MgSO₄ und 200 μ M ThDP vorgelegt und mit steigenden Konzentrationen an AcPh versetzt. Nach jedem Titrationsschritt wurde für 2 Minuten inkubiert und ein Spektrum im Wellenlängenbereich von 280-600 nm aufgenommen. Für die Messungen mit MAP wurde das Enzym (1 mg/mL) in 20 mM KPP pH 6.0 mit 5 mM MgSO₄ und 1 mM ThDP vorgelegt und mit steigenden Konzentrationen an MAP versetzt. Nach 7 Minuten wurde ein Spektrum aufgenommen (*scan speed*: 500 nm/min, *response*: 0,5 sec, *data pitch*: 0,2 nm, 7 Spektren wurden akkumuliert). Alle Messungen wurden bei 20 °C in einer Quarzküvette (d=1 cm) durchgeführt. Von den erhaltenen Spektren wurde die Absorption des Puffers subtrahiert und um den Verdünnungsfaktor korrigiert.

Die Amplituden am jeweiligen Maximum des CD-Signales (305–310 nm) wurden gegen die Inhibitorkonzentrationen aufgetragen. Die erhaltenen Werte wurden mit Hilfe der Hill-Gleichung (Gl. 2.5) angepasst, da Abweichungen von der Hyperbolität zu verzeichnen waren.

$$CD = \frac{CD_{\max} \cdot [S]^n}{K_D^n + [S]^n}$$
(2.5)

2.12.2 Bestimmung der Sekundärstruktur des α-Peptides

Die Anteile unterschiedlicher Sekundärstrukturen in einem Peptid spiegeln sich im Charakter seines CD-Spektrums wider. Mit Hilfe von Referenzspektren von Peptiden, die vollständig helikal oder vollständig als β -Faltblatt vorliegen, können die prozentualen Anteile der unterschiedlichen Sekundärstrukturen berechnet werden [98].

Zur Bestimmung des Sekundärstrukturgehaltes des chemisch synthetisierten α -Peptides wurden CD-Spektren von 50 μ M α -Peptid in 20 mM KPP pH 6.0 in Abwesenheit und in Gegenwart von SDS (100 mM) aufgenommen. SDS bildet bei diesen Konzentrationen Mizellen aus (cmc 7-10 mM [99]). Als Positivkontrolle wurden auch Spektren mit verschiedenen Konzentrationen an Trifluorethanol (TFE, 5–50 % (v/v)) aufgenommen. Die Messungen wurden in einer 1 mm-Küvette bei 20 °C mit folgenden Einstellungen aufgenommen: 190–250 nm, *scan speed*: 50 nm/min, *response*: 0,5 sec, *data pitch*: 0,1 nm. Je 20 Spektren wurden akkumuliert. Die Dekonvolution der Spektren erfolgte mit Hilfe des Jasco-implementierten Programms.

2.13 Infrarotspektroskopie

Die Schwingungen von Atomen in Molekülen können mit Hilfe der Infrarotspektroskopie untersucht werden. Da für ein Molekül pro Atom entsprechend der Rotationsund Translationsbewegung mehrere Schwingungsfreiheitsgrade (3*Anzahl der Atome-6) existieren, sind in einem Infrarot-Proteinspektrum die einzelnen Absorptionsbanden überlagert, wodurch die Zuordnung zu individuellen Bindungen erschwert wird. Es können aber Aussagen über Gruppenschwingungen getroffen werden. Die Schwingungsmoden der Peptidbindung, zum Beispiel die Carbonyl-Streckschwingung (Amid-I-Bande bei 1650 cm⁻¹, Tab. 3.7), werden für die Analyse der Sekundärstruktur von Proteinen verwendet [100]. Es wurden anhand von Modellpeptiden beziehungsweise -proteinen mit bekannter Sekundärstuktur Tabellen erstellt, so dass auf die Struktur geschlossen werden kann [101].

Eine andere Möglichkeit, die überlagerten Spektren für die Analyse von einzelnen Bindungen zu verwenden, stellt die Methode der IR-Differenzspektroskopie dar. Bei dieser Methode werden FT-IR-Spektren von Proteinlösungen vor und nach einer Reaktion aufgenommen und die Differenz aus beiden Spektren berechnet. Die erhaltenen Differenz-IR-Spektren beinhalten nur noch die Banden, welche sich infolge der Reaktion verändert haben. Eine Zuordnung der einzelnen Banden zu Schwingungsmoden ist somit unter Umständen möglich.

2.13.1 Redoxinduzierte Infrarotspektroskopie

Infrarotspektroskopische Untersuchungen zum Redoxverhalten der Pyruvatoxidase aus *Escherichia coli* wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Georg Wille am Institut für Biophysik an der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt/Main durchgeführt.

Flavoproteine sind in der Lage, an Redoxprozessen teilzunehmen. Eine interessante Fragestellung in diesem Zusammenhang ist, ob während der Redoxreaktion struk-

turelle Änderungen auf Seite des Kofaktors oder an der Proteinkomponente stattfinden. Die redoxinduzierte IR-Differenzspektroskopie gewährt einen direkten Zugang zu den strukturellen Änderungen, die während der Reduktion stattfinden. Für diese Anwendung wurde mit einer Infrarotmesszelle gearbeitet, bei der über eingebaute Elektroden die Spannung verändert werden konnte. Der Aufbau dieser Elektrode und der Messaufbau wird in Kapitel 2.10.2 auf Seite 51 beschrieben [93]. Die Schichtdicke der Messzelle ist sehr klein (maximal 5 μ m), damit die Elektronen schnell in der Lösung äquilibrieren (innerhalb des Nernst-Abstandes). Ein weiterer Grund für die kleinen Schichtdicken ist das Messprinzip. Es wurde mit einer Reflexionszelle gearbeitet, so dass die Weglänge des IR-Strahls ungefähr doppelt so lang war, wie die Schichtdicke der Messzelle (2 · d_{Zelle}). Da die Enzyme in wässrigen Pufferlösungen vorlagen und die Absorption des Wassers die Proteinspektren dominiert, musste mit Hilfe einer kurzen Weglänge das Signal des Wassers möglichst minimiert werden. Die Messzelle wurde mit einer sehr konzentrierten Proteinlösung (ca. 2,4 mM EcPOX-Lösung (ca. 150 mg/mL) in 50 mM KPP pH 6.0 und 100 mM KCl) befüllt (Volumen etwa 3 μ L). Ihre Schichtdicke wurde auf höchstens 5 μ m eingestellt. Die Goldoberfläche der Elektrode wurde mit einer 1 mM Pyridin-3-aldehyd-thiosemicarbazon-Lösung (PATS) hydrophilisiert und anschließend abgespült. Zur Beschleunigung der Gleichgewichtseinstellung wurde mit Redoxmediatoren gearbeitet [94]. Die verwendete Mischung hat keinen Einfluss auf den betrachteten Bereich der IR-Spektren. Mit Hilfe eines Potentiostaten war es möglich, die Spannung in einem Bereich von -390 bis +390 mV in der Zelle zu variieren. Während oder nach der Reduktion konnten Vis-

oder IR-Spektren aufgenommen werden. Bei der Aufnahme von IR-Spektren (6000-1000 cm⁻¹) wurden immer 128 Interferogramme mit einer Auflösung von 4 cm⁻¹ aufgezeichnet, gemittelt und dann einer Fouriertransformation unterzogen. Die Messungen wurden bei Raumtemperatur (22 °C) durchgeführt.

2.13.2 Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie (IRRAS)

Die Struktur des α-Peptides in An- und Abwesenheit von Lipiden wurde mittels Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie (IRRAS) untersucht. Alle Messungen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Andreas Kerth und Tina Weber am Institut für Physikalische Chemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg durchgeführt.

Abbildung 2.1 zeigt den schematischen Aufbau eines Infrarot-Reflexions-Absorptions-Setups. Es wurde mit einem verschiebbaren Trog-System gearbeitet. Ein Trog enthält die Referenzpufferlösung, der andere die zu untersuchende Probe in der entsprechen-



Abb. 2.1: Schematischer Aufbau einer IRRAS-Messanordnung Der IR-Strahl wird auf die Wasser/Pufferoberfläche fokussiert (Vergrößerung). An den Seiten sind verstellbare Barrieren angebracht, wodurch der Oberflächendruck reguliert werden kann. Abbildungen entnommen aus [102].

den Pufferlösung. Mit Hilfe eines computergesteuerten Pumpsystems wurde gewährleistet, dass die Füllstandshöhen in beiden Trögen gleich waren. Diese Tröge wurden abwechselnd in den Fokus eines IR-Strahls gefahren, welcher auf die Wasseroberfläche fokussiert ist. Nach einer kurzen Wartezeit (30 s) zur Beruhigung der Wasseroberfläche nach dem Bewegen der Tröge und zum Einstellen der Füllstandshöhe wurden IR-Spektren aufgenommen. IR-Spektren (2000 scans/Spektrum, Auflösung von 8 cm⁻¹) wurden mit einem Equinox 55 FT-IR-Spektrometer und einem MCT-Detektor aufgenommen. Ein Polarisator generierte parallel (p) oder senkrecht (s) zur Strahlungsrichtung polarisiertes Licht. Mit einem System aus Spiegeln konnte der IR-Strahl in verschiedenen Winkeln auf die Pufferoberfläche fokussiert werden. Die Adsorptionsmessungen wurden bei einem Einfallswinkel von 40° mit p-polarisiertem Licht durchgeführt. Zusätzlich konnte in dem Probentrog der Oberflächendruck der Monoschicht bestimmt werden. Die Messung des Oberflächendrucks erfolgte nach der indirekten Methode nach Wilhelmy, wobei ein kleines Filterpapier als Wilhelmy-Plättchen dient. Das Filterpapier taucht in die Subphase ein und wird benetzt. Abhängig vom Benetzungsgrad findet eine Gewichtsveränderung des Plättchens statt, welche mit Hilfe einer Elektrowaage aufgezeichnet wird [103]. Der Oberflächendruck π wird als Differenz der Oberflächenspannung des Puffers σ_0 ($\sigma_{0,Wasser}$ 72,75 mN/m bei 20 °C, [104]) und der des Peptides $\sigma_{\rm P}$ angegeben ($\pi = \sigma_0 - \sigma_{\rm P}$). Für tiefere Einblicke in die Theorie der IRRAS-Messungen sei auf die Übersichtsartikel [105] und [106] verwiesen.

Bedingt durch den Reflexionsaufbau muss der IR-Strahl ca. 30 cm mit Wasserdampf angereicherte Luft durchdringen. Das Rotations-Schwingungs-Spektrum des Wasserdampfs überlagert das IRRA-Spektrum des Oberflächenfilms, weshalb das Reflektivitätsspektrum der Referenz zeitnah zum Reflektivitätspektrum des Probenfilms aufgenommen wird. Daraus wird dann das Reflexions-Absorptions-Spektrum berechnet (-log R/R₀) [107].

2.13.2.1 Messungen an der Luft/Wasser-Grenzfläche

IRRAS-Messungen des α -Peptides an der Luft/Wasser-Grenzfläche wurden im kleinen Trog (60x60x3 mm³, ca. 11 mL) durchgeführt. Der große Trog enthielt den Puffer als Referenz. Die Messtemperatur betrug 20 °C. Zur Kalibrierung des Systems wurde der Messpuffer (20 mM KPP pH 6.0) eingefüllt und der Drucksensor angebracht. Das Peptid wurde anschließend mit Hilfe einer feinen Spritze in die Subphase eingebracht, so dass eine Konzentration von 100 nM α -Peptid im Trog erreicht wurde. Direkt im Anschluss daran wurden Infrarot-Spektren in einem Frequenzbereich von 4000 bis 400 cm⁻¹ aufgenommen.

2.13.2.2 Messungen an der Lipid/Wasser-Grenzfläche

Zur Untersuchung, ob das α -Peptid an die Membran bindet, wurden die IRRAS-Messungen an einem Lipidfilm wiederholt. Der Probentrog (300x60x3 mm³, ca. 54 mL) wurde zunächst mit Messpuffer (20 mM KPP pH 6.0) gefüllt und der Drucksensor angebracht und kalibriert. Auf den Puffer im Probentrog wurde eine Lipid-Monoschicht (Langmuir-Film) aus dem polaren Lipidextrakt von *E. coli* (67,0 % (w/v) Phosphatidylethanolamin, 23,2 % (w/v) Phosphatidylglycerol, 9,8 % (w/v) Cardiolipin) gespreitet. Die Lipidkonzentration betrug 284,5 μ M. Der Film wurde mit Hilfe der Filmwaage auf 20 mN/m $^{-1}$ komprimiert und während der Messung konstant bei diesem Druck gehalten. Gleichzeitig wurde die Aufnahme der Infrarot-Spektren von 4000 bis 400 cm⁻¹ gestartet. Sobald keine Änderungen in den Lipid-IR-Spektren mehr auftraten (Reflexions-Absorptions-Spektrum des Lipids, RALipid) und somit gewährleistet war, dass sich die Wasserdampfatmosphäre in der Messkammer stabilisiert hatte, konnte mit der Injektion des Peptides in die Subphase begonnen werden. Zuerst wurden die Barrieren der Filmwaage gestoppt (ein Oberflächendruck von 20 mN/m blieb erhalten) und die Änderung der Anzahl der Moleküle pro Fläche in Abhängigkeit von der Zeit aufgenommen. Das Peptid (200 nM α -Peptid in 20 mM KPP pH 6.0) wurde nach einer Stunde in die Subphase des Probentroges mit Hilfe einer dünnen Spritze injiziert. Die Durchmischung erfolgte mittels Diffusion. Direkt nach der Injektion wurde die Aufnahme der IR-Spektren fortgesetzt. Nach einer Messzeit von 5 Stunden wurden nochmals 300 nM α -Peptid in die Subphase injiziert, so dass die finale Peptid-Konzentration 500 nM betrug. Die Messtemperatur wurde konstant bei 20 °C gehalten. Von den Lipid/Peptid-Spektren (Reflexions-Absorptions-Spektrum des Peptides in der Lipidschicht, RA_{Lipid/Peptid}) wurde das Lipid-Spektrum abgezogen, so dass ein Reflexions-Absorptions-Spektrum des Peptides in der Membranumgebung erhalten wurde ($RA_{Peptid} = RA_{Lipid/Peptid} - RA_{Lipid}$).

2.14 NMR-Spektroskopie

2.14.1 H/D-Austauschexperimente und Intermediatverteilung

Die Geschwindigkeit der Deprotonierung am C(2)-Atom des ThDP wurde mit Hilfe der ¹H-NMR-Spektroskopie untersucht. Wird das Enzym in D₂O inkubiert, tauscht das Proton am C(2)-Atom des Kofaktors gegen ein Deuteron aus der Lösung aus. Als Beobachtungsgröße wird das Verhältnis der Flächenintegrale des austauschbaren C(2)-H mit dem nicht-austauschbaren C(6')-H verwendet [53].

Für die Reaktion wurden 10 mg/mL nicht-aktivierte Apo-FAD-*Ec*POX (161,3 μ M aktive Zentren) in 100 mM KPP pH 6.0 mit äqimolaren Konzentrationen ThDP und 5 mM MgSO₄ versetzt. Nach verschiedenen Zeiten (10 ms, 50 ms, 2s) wurde die Reaktion durch Zugabe desselben Volumens Quenchlösung (12,5 % TCA (w/v), 1 M DCl in D₂O) abgestoppt. Für Reaktionszeiten unter 2 Sekunden, wurde eine *chemical-quenched-flow*-Apparatur (RQF-3, Kintek Corp., TX, USA) verwendet. Das denaturierte Protein wurde nach 10 Minuten Inkubationszeit abzentrifugiert (10.000 g, 10 min, 4 °C). Der Überstand wurde filtriert (Nylon, 0,45 μ m) und im NMR-Gerät (Avance ARX 400, Bruker) gemessen.

Der H/D-Austausch für aktiviertes Enzym wurde mit 7 mg/mL Apo-FAD-*Ec*POX (117,9 μ M aktive Zentren) in 100 mM KPP pH 6 und mit äqimolaren Konzentrationen ThDP und 5 mM MgSO₄ gemessen. Für die aktivierte *Ec*POX wurden als Zeitpunkte 5 ms, 10 ms, 20 ms gewählt. Die Messtemperatur betrug 25 °C.

Zur qualitativen und quantitativen Analyse der Intermediate, die während der Reaktion am ThDP entstehen, wurde die ¹H-NMR-gestützte Intermediatanalyse eingesetzt [108]. Als Beobachtungsgröße dient das Signal des C(6')-H-Atoms. Dieses Proton zeigt unterschiedliche chemische Verschiebungen in Abhängigkeit vom gebundenen Reaktionsintermediat am C(2)-Atom des ThDP. Mit Hilfe von chemisch synthetisierten ThDP-Intermediaten als Referenzsubstanzen [109][110][111] konnten Zuordnungstabellen der Intermediate erstellt werden (Tab. 2.5, [108]).

Nicht-aktivierte *Ec*POX wurde unter *single-turnover*-Bedingungen gemessen. Dafür wurde unter anaeroben Bedingungen gearbeitet, wobei das gleiche Hilfsenzymsystem wie für die *stopped-flow*-Messungen verwendet wurde (Kapitel 2.11.2). In einer *chemical-quenched-flow*-Apparatur wurde eine Spritze mit Proteinlösung (10 mg/mL

Intermediat	Chem. Verschiebung (C(6')-H)		
	ppm		
ThDP	8.01		
LThDP	7.27		
HEThDP	7.33		
AcThDP	7.36, 7.37, 8.6		

Tab. 2.5: Chemische Verschiebungen des C(6')-H der ThDP-Reaktionsintermediate im ¹H-NMR-Spektrum [108]. Bei Acetyl-ThDP liegt ein Gleichgewicht zwischen der hydratisierten Form und einer internen Carbinolamin-Form vor [109].

Enzym in 100 mM KPP pH 6.0 mit äquimolarer Konzentration an ThDP und 5 mM MgSO₄, 22 mM Glukose, 82,5 μ M GOX) gefüllt. Die andere Spritze enthielt Pyruvatlösung (500 mM in 100 mM KPP pH 6.0, 22 mM Glukose, 82,5 μ M GOX) und die dritte Spritze wurde mit der Quenchlösung (12,5 % TCA (w/v), 1 M DCl in D₂O) befüllt. Jeweils gleiche Volumina an Enzym- und Pyruvatlösung wurden zusammengeschossen und nach definierten Zeiten mit demselben Volumen an Quenchlösung abgestoppt. Folgende Zeitpunkte wurden bei einer Messtemperatur von 25 °C analysiert: 10 ms, 50 ms, 100 ms, 200 ms, 500 ms.

Aktivierte *Ec*POX wurde unter *steady-state*-Bedingungen gemessen. Ein Ansatz bestand aus: 15 mg/mL Enzym in 100 mM KPP pH 6.0 mit 5 mM MgSO₄ und äquimolarer Konzentration an ThDP (252,6 μ M). Dieser Ansatz wurde mit 200 mM Pyruvat für 30 Millisekunden reduziert und mit Hilfe von 20 mM K₃[Fe(CN)₆] in *steady-state*-Bedingungen gebracht und gehalten. Die Messtemperatur betrug 25 °C.

2.14.2 Struktur des α-Peptides

In Zusammenarbeit mit Ulrich Weininger von der AG Biophysik an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg wurden zweidimensionale NMR-Spektren (2D-NMR) des α -Peptides aufgenommen.

Von dem chemisch synthetisierten unmarkierten α -Peptid (1 mM α -Peptid in 20 mM KPP pH 6.0 (10 % D₂O)) wurde in Anwesenheit von SDS-Mizellen (150 mM deuteriertes SDS (d₂₅-SDS)) an einem 600 MHz NMR-Spektrometer (Avance 600, Bruker) ein 2D-¹H-TOCSY- und ein 2D-¹H-NOESY-Spektrum aufgenommen. Das störende Wassersignal wurde unter Verwendung der "Watergate"-Pulsfolge unterdrückt [112]. Die NMR-Spektren wurden mit dem Programm NMRPIPE [113] prozessiert und mit dem Programm NMRVIEW [114] analysiert. Für die Strukturbestimmung des α -Peptides wurden die aus den NOEs ermittelten Abstände aus dem 2D-¹H-NOESY-Spektrum als Eingabeparameter für das ARIA-Programm [115][116] verwendet. Strukturberechnungen wurden mit und ohne Berücksichtigung der Phi/Psi-Winkel aus der

TALOS-Datenbank [117] durchgeführt. Die berechneten Strukturen wiesen nur minimale Strukturunterschiede voneinander auf, deshalb wurden die Winkel-Beschränkungen bis zum finalen *refinement* verwendet. Mit PROCHECK wurde die Geometrie der berechneten Struktur des α -Peptides analysiert [118].

2.15 Röntgenkleinwinkelstreuung

Mit Röntgenkleinwinkelstreuexperimenten (SAXS) können unter anderem die molekulare Masse suspendierter Partikel und deren Gyrationsradius (R_G) bestimmt werden. Der Gyrationsradius ist die Wurzel aus dem mittleren Abstandsquadrat für alle Streuzentren (Elektronen) in einem Partikel. Bei globulären Proteinen kann man ihn mit der Partikelgröße vergleichen. Eine umfangreiche Beschreibung der theoretischen Grundlagen der SAXS-Messungen ist in Koch *et al.* [119] zu finden.

Die Experimente wurden am Messplatz X33 der EMBL-Außenstelle im Hasylab am Deutschen Elektronen-Synchrotron (DESY) in Hamburg in Zusammenarbeit mit PD Dr. Stephan König vom Institut für Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg durchgeführt [120]. Aufgrund des verbesserten Aufbaus der optischen Elemente (Monochromator, Spiegel), durch den Einsatz einer neuen Vakuummesszelle (Größe 6x3x1 mm³) zur Reduktion des Hintergrundrauschens und durch die Verwendung einer image plate (Mar345) als Detektor, konnten die Streukurven sehr schnell aufgenommen werden (2 Minuten pro Streukurve), was die zeitaufgelöste Verfolgung struktureller Änderungen ermöglichte. Die Messtemperatur wurde auf 20 °C eingestellt, die Kameralänge betrug 2,7 m. Die Streuvektorachse wurde mit reinem Tripalmitin kalibriert. Zur Bestimmung der Molmasse wurden die auf den Streuvektor s=0 extrapolierten Streuintensitäten (I(0)) der Proben mit denen von BSA (5 mg/mL in 50 mM Hepes pH 7.5) verglichen [121]. Eine Messung bestand aus der zeitnahen Aufnahme zweier Streukurven des entsprechenden Puffers und dazwischen der Streukurve der Probe. Die Streukurven des Puffers (I(s) vs S) wurden von der Streukurve der Probe abgezogen. Zusätzlich zu dem neuen Aufbau des Messplatzes wurde auch die Software verbessert. Die Reduktion der Daten erfolgte automatisch direkt nach der Messung am Messplatz. Das Softwarepaket ATSAS 2.1 [122] vereint die verschiedenen Programme zur Auswertung. Die Pufferkorrektur erfolgte mit PRIMUS [123], zur Abschätzung der Abstandsverteilungsfunktion wurde GNOM [124] verwendet. Bei ausgewählten Streukurven wurde anschließend eine ab initio Strukturbestimmung durchgeführt. Bei dieser Methode wurden mit dem Programm DAMMIN [125]

Modellstrukturen generiert, deren berechnete Streukurven den empirischen Streukurven nahekommen. Es können somit auch dreidimensionale Formabschätzungen des Proteins vorgenommen werden.

Folgende Messungen wurden durchgeführt: Zum einen wurde anhand einer Konzentrationsreihe der Gyrationsradius und somit die Oligomerstruktur des Enzyms untersucht. Nicht-aktivierte EcPOX in 100 mM KPP pH 6.0 mit 10 mM MgSO₄ und 1 mM ThDP wurde bei verschiedenen Proteinkonzentrationen (5-60 mg/mL) gemessen. Von aktiviertem Enzym (gleiche Pufferbedingungen) wurde ebenfalls der Gyrationsradius bestimmt. Desweiteren wurde der Einfluss verschiedener Substrate beziehungsweise Substratanaloga (Pyruvat, MAP) auf die Oligomerstruktur untersucht. Darüberhinaus wurde auch eine Kinetik der Proteolyse aufgenommen. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass nach Zugabe von 5 μ g/mL α -Chymotrypsin die limitierte Proteolyse langsamer abläuft, so dass ein Zeitfenster für die SAXS-Messungen von etwa 16 Minuten bestand. Für die Kinetik wurde EcPOX (3 mg/mL) in 100 mM KPP pH 6.0 mit 10 mM MgSO₄ und 1 mM ThDP mit 200 mM Pyruvat reduziert und mit der Protease (5 μ g/mL) versetzt. Die Probe wurde in die Messzelle überführt und sofort gemessen. Es wurden Streukurven nach 4, 8, 12 und 16 Minuten aufgenommen. Um Strahlungsschäden (Oxidation) der untersuchten Proteine während der Messung zu vermeiden, wurde allen Ansätzen 5 mM DTE zugesetzt [126].

2.16 Kristallographische Arbeiten

Die Datensammlung und Auswertung der Datensätze erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Piotr Neumann an der AG Physikalische Biotechnologie von der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

2.16.1 Kristallisation und Datensammlung

Kristalle der nicht-aktivierten *Ec*POX sowie ihrer Δ 23-Variante wurden mit der Methode der Gasphasendiffusion (hängender Tropfen) [127] erhalten. Sie wuchsen im Kühlraum unter Lichtausschluss. Ausgehend von den Kristallisationsbedingungen nach Williams & Hager [46][128], unter denen das Protein spontan kristallisierte (50-100 mM KPP pH 5.7, Inkubation bei -3 °C), wurde nach neuen Kristallisationsbedingungen gesucht. Kristalle der nicht-aktivierten *Ec*POX (10 mg/mL *Ec*POX in 20 mM KPP pH 6.0, 10 mM ThDP/MgSO₄) wurden in einer 1+1-Mischung mit 80 mM KPP pH 6.0 mit 0–1 % (w/v) PEG 2000 und 0,05 – 0.10 % (w/v) Protaminsulfat bei einer Temperatur von 8 °C nach 2 Wochen erhalten [91]. Kristallisationsbedingungen für die proteolytisch aktivierte *Ec*POX wurden nach einem *screening* mit verschiedenen Bedingungen (Hampton Crystal Screen 1&2, Screeninglösungen der AG Physikalische Biotechnologie) mit Hilfe eines Pipettierroboters in einer 96-Loch-Platte und anschließender Optimierung der Bedingungen im 24-Loch-Format erhalten. In einer 1+1-Mischung von Reservoirlösung (100 mM MES–NaOH pH 6.2, 20 – 35 % 2-Methyl-2,4-pentandiol (MPD)) und Proteinlösung (10 mg/ml Δ 23 *Ec*POX in 20 mM KPP pH 6.0 mit 10 mM ThDP/MgSO₄) waren nach 2 Wochen bei 13 °C gelbe Kristalle zu beobachten.

Bei der Strukturbestimmung wurde zur Verminderung von Strahlenschäden nach der Methode der Kryokristallographie bei -173 °C (100 K) gearbeitet [129][130]. Kristalle der nicht-aktivierten *Ec*POX mussten vor der Datenaufnahme noch in Kryolösungen inkubiert werden. Dazu wurden drei Lösungen hergestellt, die der Zusammensetzung der Reservoirlösung des Tropfens entsprachen und zusätzlich entweder 5 %, 15 % oder 30 % (v/v) Ethylenglykol enthielten. Die Kristalle wurden bei 8 °C nacheinander kurz in den jeweiligen Lösungen mit steigender Konzentration an Ethylenglykol inkubiert und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Proteolytisch aktivierte *Ec*POX-Kristalle wurden nicht in Kryolösungen inkubiert, da sie aufgrund des Wachsens in einem organischen Lösungsmittel (MPD) nicht zur Bildung von Eiskristallen neigten.

Einzelne Kristalle wurden mit Hilfe eines *loops* aus ihrer Mutterlauge entnommen und auf dem Goniometerkopf einer Drehanode (RA Micro 007, Rigaku/MSC, Japan) in den Stickstoffstrom bei einer Temperatur von 100 K (XSTREAM2000, Rigaku/MSC, Japan) positioniert und bei einer Wellenlänge von 1.5418 Å (Cu K α) gemessen. Einige vielversprechende Kristalle wurden in einen Dewar (CX100, Taylor-Wharton) transferiert und bei -196 °C gelagert. Diese Kristalle wurden später mit Hilfe von Synchrotronstrahlung am Berliner Elektronenspeicherring (BESSY) gemessen. Die verwendeten Wellenlängen sind in Tab. A.4 zusammengefasst.

2.16.2 Modellierung und kristallographische Verfeinerung

Die redundanten Datensätze eines Einzelkristalls wurden mit XDS [131] integriert und skaliert. Die initialen Phasen für die Struktur der nicht-aktivierten *Ec*POX wurden mittels molekularem Ersatz (*molecular replacement*) mit der bekannten Struktur

der Pyruvatoxidase aus Lactobacillus plantarum (PDB Code: 1POW [62]) mit dem Programm PHASER [132] errechnet. Die asymmetrische Einheit besteht aus 2 Monomeren, welche zugleich das funktionale Dimer bilden. Teile der Struktur wurden mit den Programmen O [133] und COOT [134] manuell konstruiert, wobei die berechnete Differenzelektronendichte ohne Beeinflussung durch das Modell (*omit-map*) als Vorgabe benutzt wurde, um das Rückgrat der Polypetidkette in die Elektronendichte einzufügen. Die Anpassung des Modells an die gemessene Elektronendichte (refinement) wurde mit CNS [135] durchgeführt. Während der ersten Zyklen des refinements wurde, um die Zahl der Parameter zu reduzieren, das System mittels nicht-kristallographischer Symmetrie (NCS) gezwungen, eine Symmetrie zwischen gleichen Seitenketten der beiden Monomere einzuhalten. Später wurde diese Restriktion für Regionen mit unterschiedlicher Konformation zwischen den beiden Monomeren gelockert. Mit PHENIX [136] wurden 6 TLS Gruppen (3 pro Monomer, entsprechend den Domänen) eingeführt, so dass die Translation und Rotation der Domänen zueinander modelliert werden konnten. Das Modell der nicht-aktivierten EcPOX wurde bis zu einem R-Wert von 0.1832 und einen R_{free} -Wert von 0.2160 verfeinert [137].

Für die Struktur der proteolytisch aktivierten *Ec*POX wurde das Modell der nichtaktivierten *Ec*POX als Suchmodell für das *molecular replacement* verwendet. Die asymmetrische Einheit besteht aus 12 Monomeren, welche 3 katalytisch aktive Tetramere repräsentieren. Die Struktur wurde nach derselben Methode wie die Struktur der nicht-aktivierten *Ec*POX (NCS Beschränkung und TLS Einteilung für jede Domäne) und mit den gleichen Programmen bis zu einem *R*-Wert von 0.1834 und einen R_{free} -Wert von 0.1977 verfeinert.

2.16.3 Kristallstrukturen mit Intermediaten

Zur Untersuchung der Struktur des aktiven Zentrums und der Konformationsänderung während der Aktivierung wurden *soaking*-Experimente durchgeführt, bei denen Proteinkristalle (nicht-aktiviert oder aktiviert) vor dem Einfrieren in Stickstoff in verschiedenen Lösungen inkubiert wurden.

Für die *soaking*-Experimente mit nicht-aktivierter *Ec*POX wurden Pyruvat als Substrat und MAP als Substratanalogon verwendet. Alle Kryolösungen (5, 15, 30 % EG) wurden mit jeweils 100 mM Pyruvat bzw. 50 mM MAP versetzt. Ein Kristall wurde bei einer Temperatur von 8 °C in der ersten Pyruvat-Kryolösung (5 % EG) nur kurzzeitig (10 s) inkubiert, in der zweiten Kryolösung (15 % EG) erfolgte die Inkubation für 3 Minuten und in der Dritten für weitere 30 Sekunden. Der Erfolg der Reduktion wurde anhand der Entfärbung des Kristalls bewertet. Es musste während der Inkubation darauf geachtet werden, dass die Integrität des Kristalls erhalten blieb, da die erwartete Konformationsänderung während der Reduktion die Streueigenschaften des Kristalls beeinträchtigen könnte. Die Inkubation in der MAP-Kryolösung erfolgte entsprechend länger (10 s, 60 s, 14 min). Ein Kristall konnte insgesamt 15-20 Minuten über der Reservoirlösung in den Kryolösungen inkubiert werden.

Kristalle der aktivierten *Ec*POX wurden in einer *soaking*-Lösung inkubiert, die der Zusammensetzung der Reservoirlösung entsprach und zusätzlich entweder 100 mM MAP oder 500 mM Pyruvat enthielt. Die Inkubationszeit mit dem Substratanalogon betrug 2 Minuten und mit Pyruvat 15-20 Sekunden. Die *soaking*-Experimente mit den Kristallen der aktivierten *Ec*POX wurden bei einer Temperatur von 13 °C durchgeführt.

3 Ergebnisse und Diskussion

In diesem Kapitel werden zunächst die kinetischen und thermodynamischen Eigenschaften der Pyruvatoxidase aus *Escherichia coli* in der nicht-aktivierten und in der proteolytisch aktivierten Form beschrieben. Im Anschluss daran wird die Konformationsänderung, welche zur Exponierung der Lipidbindedomäne führt, untersucht. Die Kristallstrukturen der nicht-aktivierten und der proteolytisch aktivierten *Ec*POX sowie die Strukturen der Intermediatkomplexe geben einen Einblick bis ins atomare Detail. Im letzten Abschnitt werden die Eigenschaften der isolierten C-terminalen Domäne (α -Peptid) der *Ec*POX dargestellt.

3.1 Kinetische und thermodynamische Untersuchung der EcPOX

Die kinetischen und thermodynamischen Eigenschaften von nicht-aktivierter und aktivierter *Ec*POX werden im Folgenden gegenübergestellt. Dabei ist, wenn von aktiviertem Protein gesprochen wird, immer proteolytisch aktiviertes Protein gemeint.

3.1.1 Abhängigkeit der *steady-state-*Geschwindigkeit von der Substratkonzentration

Zur Untersuchung des Einflusses der Aktivierung auf die *steady-state-*Geschwindigkeiten von nicht-aktivierter und aktivierter *Ec*POX wurden Untersuchungen zur Abhängigkeit der enzymatischen Umsetzung von der Pyruvatkonzentration durchgeführt (Abb. 3.1). Die erhaltenen Daten konnten zunächst hyperbol nach Michaelis-Menten angepasst werden. Die ermittelten kinetischen Parameter sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst. Es ist klar zu erkennen, dass die Aktivierung sowohl den $K_{\rm M}$ -Wert, als auch die Maximalgeschwindigkeit ($V_{\rm max}$) beeinflusst. So sinkt der $K_{\rm M}$ -Wert nach Aktivierung durch SDS 3-fach (*Ec*POX_{Δ23}: 4-fach) und $V_{\rm max}$ steigt auf das 6-fache (*Ec*POX_{Δ23}: 2,2-fach). Die resultierende Katalysekonstante $k_{\rm cat}$ der Reaktion erhöht sich somit ebenfalls um Faktor 6 bzw. 2, so dass auch die katalytische Effizienz der aktivierten *Ec*POX stark erhöht wird (Steigerung um den Faktor 9 für die proteolytisch aktivierte bzw. 18 für die SDS-aktivierte *Ec*POX).



Abb. 3.1: Abhängigkeit der Geschwindigkeit von der Substratkonzentration von nicht-aktivierter und aktivierter *EcPOX*. Die spezifischen Aktivitäten wurden mit dem Standard-Reduktaseansatz (100 mM KPP pH 6.0, 30°C) bei konstanter Ionenstärke (0,5 M) bestimmt. Es wurde eine Anpassung der Daten nach Michaelis-Menten vorgenommen. • Nicht-aktivierte *EcPOX* • Proteolytisch aktivierte *EcPOX* • *EcPOX* mit 20 μ M SDS (aktiviert)

Der K_M -Wert für Pyruvat ist mit 99 mM für die nicht-aktivierte *Ec*POX sehr hoch. Im Vergleich dazu liegt der K_M -Wert für Pyruvat in der *Lp*POX bei 0,5 mM [138]. Diese geringe Fähigkeit zur Substratbindung in der nicht-aktivierten *Ec*POX spiegelt die physiologische Bedeutung des Enzyms im Metabolismus von *E. coli* wieder. Während die POX in *Lactobacillus plantarum* essentiell für die Synthese von ATP ist, kommt der *Ec*POX wahrscheinlich nur eine *backup*-Funktion zu. Unter aeroben Bedingungen wird Pyruvat vom Pyruvatdehydrogenasekomplex (*Ec*PDH, K_M 0,3 mM [139]) zu Acetyl-CoA umgesetzt. Durch die Einschleusung von Acetyl-CoA in den Citratzyklus werden aus einem Pyruvatmolekül insgesamt vier Reduktionsäquivalente (3 NADH, 1 FADH₂) generiert, aus denen in der Atmungskette ATP gewonnen werden kann. Die Ausbeute an Reduktionsäquivalenten aus einem Pyruvatmolekül ist bei der *Ec*POX deutlich geringer (1 FADH₂).

In PDH-Deletionsmutanten konnte gezeigt werden, dass die Pyruvatoxidase zusammen mit der Acetatkinase und der Acetyl-CoA-Synthase das aerobe Wachstum unter diesen Umständen gewährleistet [140]. Durch den hohen $K_{\rm M}$ -Wert der *Ec*POX ist somit sichergestellt, dass unter Bedingungen, unter denen die PDH aktiv ist, die *Ec*POX inaktiv vorliegt. Die intrazelluläre Pyruvatkonzentration kann lokal stark variieren. Es

Tab. 3.1: Katalytische Konstanten der nicht-aktivierten und der aktivierten EcPOX. Die Kon-
stanten beziehen sich auf eine hyperbole Auswertung nach Michaelis-Menten. Darüberhinaus
wurden die Daten auch nach der Hill-Gleichung angepasst, wobei nur der Hill-Koeffizient n _H
angegeben wurde.

Enzym	<i>К</i> _М (Руг) mM	V _{max} U/mg	$egin{array}{c} {m k}_{ m cat} \ { m s}^{-1} \end{array}$	$rac{k_{ m cat}/K_{ m M}}{{ m M}^{-1}\cdot{ m s}^{-1}}$	n H
EcPOX	98,8 ± 10,3	$14,3 \pm 0,6$	$14,7 \pm 0,6$	149	1,22
$EcPOX_{\Delta 23}$	$24,8\pm5,2$	32,2 ± 1,3	31,9 ± 1,3	1286	1,24
EcPOX SDS akt	33,8 ± 3,1	$86,4 \pm 2,5$	89,3 ± 2,6	2642	1

ist somit nicht auszuschließen, dass ein Teil der *Ec*POX-Population reduziert wird und somit partiell aktiviert vorliegt.

Ein Hill-Koeffizient (n_H) von 1,2 deutet auf eine positive Kooperativität des Enzyms hin. Mit Hilfe der Hill-Gleichung kann eine Kurve angepasst werden, bei der die Spezies sich kooperativ zueinander verhalten [141]. Der Hill-Plot, bei dem $\lg \frac{y}{1-y}$ gegen die logarithmierte Substratkonzentration aufgetragen wird, liefert Aussagen über die Kooperativität von Enzymen bei verschiedenen Substratkonzentrationen [142]. Der Anstieg der Funktion im Hill-Plot (d($\lg \frac{y}{1-y}$)/d(\lg [S])) im zentralen Substratbereich entspricht dem Hill-Koeffizienten (n_H). Nur die Michaelis-Menten-Funktion würde im Hill-Plot eine Gerade mit dem Anstieg 1 liefern.

Abbildung 3.2 A zeigt die Abhängigkeit der *steady-state-*Geschwindigkeit der nichtaktivierten *Ec*POX von der Substratkonzentration. Die Daten zeigen eine leichte Sigmoidität, was durch den Hill-Koeffizienten (n_H 1,22) bestätigt wird. Im Hill-Plot (Abb. 3.2 B) sind 3 unterschiedliche Anstiege zu erkennen. Zur besseren Visualisierung wurde eine lineare Anpassung der Daten vorgenommen. Der Anstieg, der dem Hill-Koeffizienten (n_H) entspricht, beträgt für den flacheren Abschnitt 0,55, für den steilen Abschnitt 1,87 und für die übrigen Punkte 0,98.

Nicht-aktivierte *Ec*POX zeigt bei einer Pyruvatkonzentration im Bereich von 20 bis 50 mM ein positiv kooperatives Verhalten. Eine Interpretationsmöglichkeit für die vorgefundene positive Kooperativität besteht darin, dass die Substratbindung in einem aktiven Zentrum die Bindung an einem weiteren aktiven Zentrum begünstigt.



Abb. 3.2: Auftragung der spezifischen Aktivitäten der nicht-aktivierten *Ec***POX mit Pyruvat nach Hill. A** Anpassung durch die Hill-Gleichung. **B** Hill-Plot der Daten aus Abb. A. Zur besseren Darstellung des Trends wurden in den Plot Geraden gelegt. Der Anstieg dieser beschreibt den Hill-Koeffizient (n_H). Er beträgt für den flacheren Anstieg 0,55, für den steilen Anstieg 1,87 und für die übrigen Punkte 0,98.

Dies setzt eine Kommunikation zwischen den beteiligten aktiven Zentren voraus. Frank *et al.* haben anhand der Proteinstrukturen der E1-Komponente der PDH gefunden, dass ein Protonenkanal zwischen je zwei Untereinheiten vorliegt [143]. Dieser ermöglicht einen Austausch von Information, in diesem Fall vermittelt durch die Übertragung eines Protons. Auch in der *Ec*POX könnte ein Protonenkanal existieren, denn so könnte erreicht werden, dass nur die aktiven Zentren, die sich auf einer Seite des Proteins befinden, reduziert werden und nach der Exponierung der Lipidbindedomäne die Membranbindung ermöglichen. Eine genauere Betrachtung dieser Frage wird in Abschnitt 3.2.1 auf Seite 97 gegeben.

Eine weitere mögliche Deutung der positiven Kooperativität resultiert aus der Tatsache, dass die Substratbindung in *Ec*POX auch an Enzymspezies erfolgen kann, die bereits kovalente ThDP-Intermediate enthalten (Abschnitt 3.3.4 aus Seite 118). Vom kinetischen Standpunkt aus enthalten so gebildete Enzymspezies effektiv zwei Substratmoleküle. Begünstigt das zweite Substratmolekül die Produktabspaltung, so resultiert hieraus positive Kooperativität.

Die Fragestellung, die sich aus den sehr unterschiedlichen Katalysekonstanten von nicht-aktivierter und aktivierter *Ec*POX ergab, war, welche Schritte der Katalyse durch die Aktivierung spezifisch beeinflusst werden. Zur Beantwortung dieser Frage wurden verschiedene spektroskopische Methoden angewandt, die die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten einzelner Schritte ermöglichten.

3.1.2 Einfluss der Aktivierung auf die Deprotonierung des ThDP

Zunächst wurde untersucht, ob die Deprotonierungsgeschwindigkeit am C(2)-Atom des ThDP nach der Aktivierung verändert wurde. Wie bereits in Kapitel 1.3 beschrieben, muss der Kofaktor vor der Katalyse aktiviert werden. Die Deprotonierung des C(2)-Atoms im Thiazoliumring des ThDP kann mit H/D-Austauschexperimenten und der Detektion mittels ¹H-NMR-Spektroskopie verfolgt werden. Aus dem zeitlichen Verlauf kann die Geschwindigkeit der Deprotonierung ermittelt werden. Sie beträgt im nicht-aktivierten Enzym 150,8 \pm 7,7 s⁻¹ (Abb. 3.3). Der Vergleich mit dem k_{cat} -Wert (14,7 s⁻¹) zeigt, dass die Deprotonierung im nicht-aktivierten Enzym nicht geschwindigkeitsbestimmend für die Katalyse ist.

Die aktivierte *Ec*POX weist eine dramatisch erhöhte Geschwindigkeitskonstante des H/D-Austausches auf. Es war jedoch nicht möglich eine definierte Geschwindigkeitskonstante zu bestimmen, da die Zeitauflösung der verwendeten *quenched-flow*-Apparatur hierfür nicht ausreichend war. Die aus der Totzeit der Apparatur abgeschätzte



Abb. 3.3: H/D-Austauschexperimente von nicht-aktivierter EcPOX.

Ansatz: 1 mg/mL Enzym in 100 mM KPP pH 6.0, 10 mM MgSO₄, 1 mM ThDP, Inkubation mit D₂O, Stopp der Reaktion mit TCA-Quenchlösung. **A** Gegenüberstellung der ¹H-NMR-Spektren zu verschiedenen Zeitpunkten. **B** Darstellung des zeitlichen Verlaufs des Verhältnisses der integralen Flächen der Signale von C(6')-H und C(2)-H [90].

untere Grenze von $k_{H/D aktiviert}$ beträgt 600 s⁻¹. Die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten sind in Tabelle 3.2 auf Seite 95 zusammengefasst. Auch für die aktivierte Spezies (k_{cat} 31,9 s⁻¹) ist die Deprotonierung im Hinblick auf die Katalyse nicht geschwindigkeitsbestimmend.

3.1.3 Einfluss der Aktivierung auf die Substratbindung

Im katalytischen Zyklus der *Ec*POX folgt der Deprotonierung am C(2)-Atom des Thiazoliumringes die Carboligation mit dem Substrat. Um den potentiellen Einfluss der Aktivierung auf die Substratbindung abzuschätzen, kann mit substratanalogen Verbindungen gearbeitet werden, die nach der Ausbildung der C-C-Bindung keinen weiteren Umsätzen unterliegen. In diesem Fall wurden Acetylphosphinat (AcPh) und Methylacetylphosphonat (MAP) verwendet (Abb. 3.4). Beide Analoga binden am C(2)-Atom und bilden entsprechende Addukte aus. Die C–P-Bindung kann jedoch im Ge-



Abb. 3.4: Chemische Strukturen der verwendeten Substratanaloga



Abb. 3.5: Einzelne Schritte der Substratbindung

gensatz zur C-C-Bindung am Enzym nicht gespalten werden. Die Ligandenbindung am Enzym kann somit unabhängig von der Decarboxylierung analysiert werden. Es bleibt anzumerken, dass die Ligandenbindung in diesem Fall aus zwei Prozessen zusammengesetzt ist (Abb. 3.5): 1. Die Bildung des Michaelis-Komplexes, in dem sich das Substrat in einer *docking*-Position in räumlicher Nähe zum ThDP befindet. 2. Die kovalente Bindungsbildung erfolgt zwischen dem $C(\alpha)$ -Atom des Substrates beziehungsweise des Liganden und dem C(2)-Atom des ThDP.

An anderen ThDP-abhängigen Enzymen konnte bereits gezeigt werden, dass durch die Bildung des Additionsproduktes aus Substratanalogon und ThDP charakteristische Banden im Nah-UV-CD-Spektrum auftreten (TK: [145][146], *h*PDH-E1, POX: [97], PDC: [147][148]). ThDP, eine prochirale Verbindung, nimmt durch den definierten Einbau in die chirale Proteinumgebung selbst chiralen Charakter an. Jordan und Mitarbeiter haben versucht, diese Banden im Nah-UV-CD-Spektrum im Bereich von 300-330 nm unterschiedlichen Protonierungsgleichgewichten des ThDP (Abb. 3.6) zuzuordnen [97][149][150][151][152]. Demnach entspricht ein positives Maximum bei etwa 300 nm der 1',4'-iminotautomeren Form (IP) des Kofaktors, während ein negatives Maximum bei 320 nm durch die 4'-Aminoform (AP) des ThDP induziert wird. Asztalos konnte mit Hilfe verschiedener ThDP-Analoga zeigen, dass dieses Extremum tatsächlich von der 4'-Aminogruppe induziert wird [153]. Die AP- und die IP-Form



Abb. 3.6: Übersicht über die während der Aktivierung auftretenden ThDP-Spezies. Abbildung modifiziert nach [144].
des Kofaktors stehen über ein positiv geladenes 4'-Aminopyrimidinium (APH⁺) in Zusammenhang. Diese Interpretation der Banden im CD-Spektrum wird durch die Beobachtung unterstützt, dass ihre Intensitäten pH-abhängig sind [144].

In Abbildung 3.7 A sind die CD-Spektren von nicht-aktivierter und aktivierter *Ec*POX dargestellt. Die Zuordnung der Banden erfolgte in Analogie zu anderen ThDP-abhängigen Enzymen beziehungsweise durch Vergleich mit UV/Vis-Absorptionsspektren des Enzyms. Die Banden bei 415 und 366 nm im nicht-aktivierten Enzym stammen vom enzymgebundenen FAD, da dieser Kofaktor bei diesen Wellenlängen absorbiert (Abb. 3.13). Im Bereich von 290–330 nm tritt lediglich ein positives Extremum bei 295 nm auf. Dieses entspricht nach Jordan *et al.* der IP-Form des ThDP [97]. Interessanterweise ist keine Bande bei 330 nm nachweisbar. Somit existiert in der nicht-aktivierten *Ec*POX im Gegensatz zur *Lp*POX keine AP-Form des ThDP [97].

Der Vergleich der CD-Spektren zwischen nicht-aktivierter und aktivierter *Ec*POX lässt deutliche Änderungen der Bandenlage zu erkennen. Das positive Maximum bei 366 nm verschiebt sich nach proteolytischer Aktivierung bathochrom um 10 nm. Die positive Bande bei 415 nm verschwindet und die sehr schwach negative Bande bei 472 nm wird in der aktivierten *Ec*POX intensiviert. Dieser Befund spricht für strukturelle Veränderungen in der Umgebung des FAD, die durch die Aktivierung hervorgerufen werden. Dies bestätigt Experimente von Recny und Hager, die anhand von UV/Vis-Spektren während der limitierten Proteolyse auf eine hydrophilere FAD-Umgebung nach der Aktivierung geschlossen haben [69]. In der ThDP-Region (290-330 nm) ist





A Vergleich von nicht-aktivierter (–) und aktivierter (–) *Ec*POX. **B** Vergleich von nichtaktivierter POX aus *E. coli* (–) und *Lactobacillus plantarum* (–). Die Enzymkonzentrationen betrugen jeweils 2 mg/mL, die Enzyme lagen vollständig rekonstituiert bei pH 6.0 vor.

im aktivierten Zustand gegenüber dem nicht-aktivierten Zustand ein um 4 nm rotverschobenes positives Maximum zu finden.

Die CD-Spektren nicht-aktivierter *Ec*POX und *Lp*POX im Nah-UV-Bereich unterscheiden sich deutlich voneinander (Abb. 3.7 B). Die FAD-Region der *Lp*POX zeigt 2 prominente Banden, eine negative bei 454 nm und eine positive bei 389 nm. Da auch in der aktivierten *Ec*POX eine Verschiebung der Banden auftritt, ist die Struktur der FAD-Region der aktivierten *Ec*POX der der *Lp*POX ähnlicher. In der *Lp*POX ist eine zusätzliche negative Bande bei 321 nm vorhanden. Laut Jordan entspricht diese Bande der 4'-Aminopyrimidinform (AP) des Kofaktors [97]. Die Banden der IP-Spezies sind in beiden Pyruvatoxidasen zu finden, wobei die POX aus *E. coli* das ausgeprägtere Maximum besitzt.

Anhand der CD-Spektren können begrenzt strukturelle Aussagen zur *Ec*POX getroffen werden. Die FAD-Bindetasche verändert sich nach der Aktivierung und entspricht mehr der der *Lp*POX. Im aktiven Zentrum der *Ec*POX wird die IP-Form und nicht die AP-Form des ThDP stabilisiert. Studien mit Hilfe der Dichtefunktionaltheorie (DFT) haben gezeigt, dass in einem apolaren aktiven Zentrum die AP-Form und in einem polareren aktiven Zentrum die IP-Form stabilisiert wird [154]. Daraus lässt sich auf eine hydrophobe apolare Struktur des aktiven Zentrums für die nicht-aktivierte *Ec*POX schließen. Nach der Aktivierung ist das aktive Zentrum polarer, was eine erhöhte Lösungsmittelzugänglichkeit nahelegt.

Es konnte gezeigt werden, dass nach Zugabe von substratanalogen Verbindungen und der folgenden Bildung von Additionskomplexen am ThDP (Abb. 3.8) die Intensität des positiven Maximum bei 300 nm ansteigt [97][155]. Da die Zunahme an Signalamplitude bei 300 nm idealerweise der C–C-Bindungsbildung entspricht, kann man aus der Auftragung gegen die Inhibitorkonzentration den *K*_D-Wert für die Sub-



Abb. 3.8: Bildung des Phosphonolaktyl-ThDP. Abbildung modifiziert aus Seifert et al. [155].



Abb. 3.9: Differenzspektren der CD-Titration mit Acetylphosphinat. Ansatz: 2 mg/mL Enzym in 20 mM KPP und 20 mM Mes pH 6.1, 1 mM MgSO₄, 200 μ M ThDP. Die einzelnen Spektren wurden nach Zugabe von steigenden Konzentrationen an AcPh nach 2 Minuten Inkubation aufgenommen. A nicht-aktivierte *EcPOX*, **B** aktivierte *EcPOX*, Inset: Abhängigkeit der CD-Signale im angegebenen Bereich von der AcPh-Konzentration. Fit nach Hill-Gleichung.

stratbindung (die die Bildung des Michaelis-Komplexes und die Carboligation umfasst) bestimmen.

In Abbildung 3.9 sind exemplarisch die CD-Titrationen der nicht-aktivierten und der aktivierten *Ec*POX mit AcPh dargestellt. Die Titrationen mit MAP ergaben ein ähnliches Bild. Die Anpassung der Daten erfolgte mit Hilfe der Hill-Gleichung. Der K_D -Wert der nicht-aktivierten *Ec*POX mit dem Substratanalogon AcPh beträgt 1526,4 ± 63,7 μ M (MAP: 1579,2 ± 64,1 μ M). Beide Inhibitoren unterscheiden sich vom nativen Substrat Pyruvat durch ihre Größe. AcPh ist dem Pyruvat im Volumen ähnlicher als MAP, welches durch die Methoxygruppierung erheblich mehr Raum beansprucht. Da aber die K_D -Werte beider Inhibitoren vergleichbar sind, kann geschlossen werden, dass die Methoxygruppe keinen Einfluss auf die Bindung hat.

Das aktivierte Enzym weist apparente Bindungskonstanten von 173,1 \pm 24,5 μ M für AcPh und 221,4 \pm 88,4 μ M für MAP auf. Diese K_D -Werte sind einander größenordnungsmäßig gleich und im Vergleich zum nicht-aktivierten Enzym um einen Faktor 10 verringert. Die substratanalogen Verbindungen binden im proteolytisch aktivierten Enzym um den Faktor 10 stärker an das enzymgebundene ThDP. Auch dieser Befund kann mit einem offeneren aktiven Zentrum nach der Aktivierung gedeutet werden.

3.1.4 Einfluss der Aktivierung auf die Bindung von MAP

Die beschriebenen CD-spektroskopischen Experimente legten eine kovalente Bindung des Substratanalogons MAP an den Kofaktor nahe. Eine Untersuchung zur Kinetik der Inhibitorbindung sollte weitere Unterschiede zwischen nicht-aktiviertem und aktiviertem Enzym offen legen. In Abbildung 3.10 A ist exemplarisch eine Progresskurve der Bindung von MAP an das aktive Zentrum der nicht-aktivierten *Ec*POX dargestellt. Durch die Bildung der iminotautomeren Form des Phosphonolaktyl-ThDP (Abb. 3.8) wird eine Zunahme des Signals bei 305 nm hervorgerufen. Abbildung 3.10 B zeigt die Abhängigkeit der aus den Progresskurven erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten der Ligandenbindung von der MAP-Konzentration. Die Anpassung der Daten erfolgte nach einer hyperbolen Gleichung (3.1).

$$k_{\rm obs} = \frac{k_2 \cdot [{\rm MAP}]}{K_1 + [{\rm MAP}]} + k_{-2}$$
(3.1)

Der K_1 -Wert der nicht-aktivierten *Ec*POX für MAP konnte mit 1591,8 ± 561,6 mM und der k_2 mit 0,11 ± 0,03 s⁻¹ bestimmt werden. Der k_{-2} -Wert konnte mit dieser Methode nicht ermittelt werden, da der Fehler bei der Bestimmung von solch numerisch kleinen Werten unangemesen hoch wäre. In jedem Falle gilt jedoch $k_2 \gg k_{-2}$ was zeigt, dass das Gleichgewicht der C–C-Bindungsbildung weit auf der Seite des kovalenten Adduktes liegt. Doch auch die Fehler der Anpassung der anderen Parameter sind





A Kinetik nicht-aktivierter *Ec*POX mit 30 mM MAP. Die Daten wurden einfach exponentiell $(y = a(1 - e^{-k_{obs} \cdot t}) + n)$ angepasst (–). **B** Auftragung der ermittelten k_{obs} -Werte gegen die Ligandenkonzentration. Die Daten wurden hyperbol (–) angepasst (Gl. 3.1). Zum Vergleich ist eine lineare Anpassung (- - -) der Daten dargestellt. Ansatz: 2 mg/mL Enzym in 50 mM KPP pH 6.0 mit 10 mM MgSO₄ und 1 mM ThDP mit steigenden Konzentrationen an MAP (0,5-200 mM).

relativ groß. Zum Vergleich wurde eine lineare Regression im Bereich kleiner MAP-Konzentrationen (bis 40 mM) durchgeführt. Diese weicht jedoch deutlich von den gemessenen Werten (- - -) ab, was die Notwendigkeit einer hyperbolen Anpassung verdeutlicht.

Der Vergleich mit aktivierter *Ec*POX zeigt, dass MAP deutlich schwächer an das aktive Zentrum des nicht-aktivierten Enzyms bindet. Eine hyperbole Anpassung der Geschwindigkeitskonstanten von aktivierter *Ec*POX gegen die Ligandenkonzentration (Abb. 3.11 B) ergibt einen K_1 -Wert von 14,4 ± 4,2 mM und k_2 von 0,47 ± 0,10 s⁻¹. Die primäre Bindung von MAP an die aktivierte Enzymspezies ist etwa um den Faktor 100 fester als an der nicht-aktivierten *Ec*POX. Diese Beobachtung bestätigt die Ergebnisse der thermodynamischen K_D -Wert-Bestimmung. In den CD-Titrationsexperimenten wurde eine bessere Bindung von Methylacetylphosphonat beziehungsweise Acetylphosphinat an das aktive Zentrum der aktivierten *Ec*POX gefunden.

Der thermodynamisch bestimmte K_{app} -Wert ist eine zusammengesetzte Größe ($\frac{K_1 \cdot K_2}{1+K_2}$, Herleitung A.4). Durch die Bestimmung des K_1 -Wertes für MAP lässt sich eine Abschätzung für den kinetisch nicht zugänglichen K_2 -Wert vornehmen.

$$K_2 = \frac{K_{\rm app}}{K_1 - K_{\rm app}} \tag{3.2}$$

Die Abschätzung des K_2 -Wertes nach Gleichung 3.2 liefert für die nicht-aktiverte POX einen Wert von 9,93·10⁻⁴ und für die aktivierte *Ec*POX einen Wert von 1,56·10⁻².





A Kinetik aktivierter *Ec*POX mit 5 mM MAP. Die Daten wurden doppelt exponentiell ($y = a(1 - e^{-k_1 \cdot t}) + b(1 - e^{-k_2 \cdot t}) + n$) angepasst (–). **B** Auftragung der ermittelten k_1 -Werte gegen die Ligandenkonzentration. Die Daten wurden hyperbol (–) angepasst (Gl. 3.1). Ansatz: 2 mg/mL Enzym in 50 mM KPP pH 6.0 mit 10 mM MgSO₄ und 1 mM ThDP mit steigenden Konzentrationen an MAP (0,05-5 mM).

Dies zeigt erneut, dass die kovalente Ligandenbindung eine stark vorwärts gerichtete Reaktion darstellt und die Rückreaktion k_{-2} kaum eine Rolle spielt. Es ist anzunehmen, dass diese Feststellung auf die Substratbindung übertragbar ist. Unter den vorliegenden Bedingungen gilt $K_{app} \approx K_D$.

Bemerkenswert ist die im Vergleich zur Bindung des Substrates Pyruvat (Abschnitt 3.1.5) sehr langsame Bindung des Substratanalogon MAP an das Enzym. Hierfür könnten sterische Wechselwirkungen, bedingt durch das zusätzliche Sauerstoffatom im Substratanalogon, verantwortlich sein.

3.1.5 Einfluss der Aktivierung auf die reduktive Halbreaktion

3.1.5.1 Nicht-aktivierte EcPOX

Unter anaeroben Bedingungen kann die reduktive Halbreaktion der *Ec*POX mit Hilfe schneller kinetischer Methoden untersucht werden. Bei der reduktiven Halbreaktion findet nur ein Teil der nativen Reaktion statt (Abb. 3.12). Enzym und Substrat assoziieren zu einem Michaelis-Komplex, worauf sich die kovalente Bindungsknüpfung (k_{C-C}) zur Bildung des Laktyl-ThDP anschließt. Nach Decarboxylierung (k_{decarb}) wird das resonanzstabilisierte HEThDP gebildet. Die Elektronen werden auf das enzymge-



Abb. 3.12: Reduktive Halbreaktion der nicht-aktivierten *Ec***POX.** Orange hinterlegte Enzymsymbole repräsentieren Spezies, die oxidiertes FAD enthalten. Nach der Reduktion des FAD schließt sich eine Konformationsänderung an, die zur Exponierung der C-terminalen Domänen führt. Es wird eine partiell aktivierte Enzymspezies (E_a) gebildet (violett). Weitere Erklärungen siehe Text.

bundene FAD übertragen (k_{red}), wodurch dieses reduziert wird. Aus Studien zur Konformationsänderung von EcPOX in Substratgegenwart war bekannt, dass nach der Reduktion die C-terminalen Domänen jeder Untereinheit exponiert werden (k_{Konf}) [156]. Diese Enzymspezies ist partiell aktiviert, das heißt durch die Konformationsänderung wird die Zugänglichkeit des aktiven Zentrums für das Substrat erleichtert. Nach der Konformationsänderung wird Acetat mittels Hydrolyse von Acetyl-ThDP abgespalten ($k_{hvdrolvse}$), was durch eine Produktanalyse bestätigt werden konnte [90]. Das regenerierte ThDP kann ein weiteres Pyruvatmolekül angreifen, Laktyl-ThDP bilden und Kohlendioxid abspalten. Vom so gebildeten HEThDP können keine Elektronen auf das enzymgebundene FAD übertragen werden, da dieses bereits reduziert vorliegt und aufgrund der Abwesenheit von Elektronenakzeptoren auch nicht reoxidiert werden kann. Im Zuge der reduktiven Halbreaktion werden somit pro Enzymuntereinheit 2 Moleküle Substrat umgesetzt, eines wird in Acetat überführt, das andere führt zur quantitativen Bildung von Ea-HEThDP-FAD_{red}. Aufgrund der in die reduktive Halbreaktion involvierten Decarboxylierungsschritte ist der Gesamtprozess in guter Näherung irreversibel. Bezüglich des FAD liegen während der reduktiven Halbreaktion single-turnover-Bedingungen vor.

Mit Hilfe eines *stopped-flow*-Absorptionsspektrometers kann die Reduktion des FAD direkt verfolgt werden. Wie in Abbildung 3.13 dargestellt, ist die Absorptionsände-



Abb. 3.13: UV/Vis-Spektren der EcPOX im Bereich der FAD-Absorption.

A Absorption im Bereich des FAD der nicht-aktivierten *Ec*POX im oxidierten (—) und reduzierten (—) Zustand. Ansatz: 1 mg/mL Enzym in 20 mM KPP pH 6.0 mit 10 mM MgSO₄ und 1 mM ThDP, mit und ohne 100 mM Pyruvat. In Anwesenheit von Pyruvat liegt *Ec*POX reduziert vor. Die größten Absorptionsunterschiede sind bei 438 nm zu beobachten (dünne Linie). **B** Unterschiede der Absorptionseigenschaften von nicht-aktivierter (—) und aktivierter (—) *Ec*POX.

rung durch Reduktion des enzymgebundenen FAD bei einer Wellenlänge von 438 nm am größten, weshalb dieses Signal für die Messungen herangezogen wurde.

Die Progresskurven der FAD-Reduktion sind in Abb. 3.14 A dargestellt. Für die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten wurden die Kurven doppelt-exponentiell nach Gleichung 3.3 angepasst.

$$y = a_1 * e^{-k_a * t} + a_2 * e^{-k_b * t} + n$$
(3.3)

Etwa 80 % der Gesamtamplitude sind mit der schnellsten Phase (k_a) assoziiert. Die berechneten Geschwindigkeitskonstanten dieser Phase (k_a) hängen hyperbol von der Substratkonzentration ab (Abb. 3.14 B), während die ihr zugeordneten Amplituden (a_1) nicht substratabhängig sind (Abb. A.5). Auch die Amplituden (a_2) und die Geschwindigkeitskonstanten der zweiten Phase (k_b) zeigten keine Substratabhängigkeit (Daten nicht gezeigt). Zur Klärung welcher katalytische Prozess dieser Absorptionsabnahme bei 438 nm zugrunde liegt, werden die Reaktionen der reduktiven Halbreaktion auf die beobachteten Schritte reduziert. NMR-spektroskopische Untersuchungen am nicht-aktivierten Enzym zeigten, dass die Interkonversion der reduzierten Enzymspezies wesentlich schneller erfolgt als die Substratbindungs- und Decarboxylierungsschritte am oxidierten Enzym, welche zum reduzierten Enzym führen (Abschnitt 3.1.6). Die beobachtete reduktive Halbreaktion ist aus 6 Reaktionsschritten



Abb. 3.14: Zeitverlauf der reduktiven Halbreaktion von nicht-aktivierter *Ec*POX. A Darstellung des Zeitverlaufes der Reduktion des enzymgebundenen FAD bei unterschiedlichen Pyruvatkonzentrationen (5-700 mM). Die Richtung des Pfeils zeigt die Zunahme der Pyruvatkonzentration. **B** Auftragung der ermittelten k_{obs} -Werte der ersten Phase gegen die Pyruvatkonzentration. Durchgezogene Linie: Anpassung nach Gl. 3.4. Ansatz: 1 mg/mL Enzym in 100 mM KPP pH 6.0 mit 10 mM MgSO₄ und 1 mM ThDP mit steigenden Konzentrationen an Pyruvat (5-700 mM) unter anaeroben Bedingungen.



Abb. 3.15: Minimalmodell der reduktiven Halbreaktion von nicht-aktivierter EcPOX.

zusammengesetzt (Abb. 3.15), die Bildung des Michaelis-Komplexes (k_1), die Substratbindung (k_2), die Decarboxylierung (k_3) und die Übertragung der Elektronen (k_4). Dem Elektronentransfer schließt sich eine Konformationsänderung (k_5) an, die zu partiell aktiviertem Enzym (E_a) führt [156]. Von diesem wird in einem irreversiblen Schritt Acetat hydrolytisch abgespalten (k_6).

Der signalgebende Prozess bei einer Wellenlänge von 438 nm ist die Reduktion von oxidiertem enzymgebundenen FAD (k_4). Wenn dieser Schritt geschwindigkeitsbestimmend wäre, dann müssten lag-Phasen zu beobachten sein und die Zeitkonstante des Prozesses müsste, aufgrund der irreversiblen Decarboxylierung (k_3) , unabhängig von der Substratkonzentration sein. Wegen der gefundenen Substratabhängigkeit von k_a kommen somit nur die Substratbindung und die Decarboxylierung als geschwindigkeitsbestimmende Schritte in Betracht. Die Decarboxylierung ist vermutlich schneller als die Substratbindung (was durch die Intermediatanalyse bestätigt werden konnte, Abschnitt 3.1.6), so dass die Substratbindung (k_1, k_2) als geschwindigkeitsbestimmender Prozess während der ersten Phase (k_a) der reduktiven Halbreaktion angenommen werden muss. Im Falle der Geschwindigkeitslimitierung durch die nicht-kovalente Assoziation des Substrates (k_1) wäre eine lineare Abhängigkeit der k_a -Werte von der Substratkonzentration zu erwarten. Da eine hyperbole Abhängigkeit der k_a -Werte von der Pyruvatkonzentration gefunden wurde, kann der Prozess auf die kovalente Substratbindung (k_2) eingeschränkt werden. Die Auftragung der ermittelten Geschwindigkeitskonstanten der ersten Phase (k_a) gegen die Substratkonzentration konnte mit Gleichung 3.4 angepasst werden (Abb. 3.14 B). Eine detaillierte Ableitung ist im Anhang auf Seite 175 zu finden. Dort wird auch eine ausführliche Diskussion der möglichen geschwindigkeitsbestimmenden Schritte vorgenommen.

$$k_{\rm obs} = \frac{k_2 \cdot [\rm Pyr]}{K_1 + [\rm Pyr]} \tag{3.4}$$

 K_1 für Pyruvat beträgt 665,9 ± 43,5 mM und k_2 konnte mit 16,2 ± 0,7 s⁻¹ bestimmt werden. Der berechnete K_1 -Wert für Pyruvat ist damit ungewöhnlich hoch. Dies wird vor allem im Vergleich zum K_M -Wert der nicht-aktivierten *Ec*POX für Pyruvat deutlich, der bei 98,8 mM liegt. Die unterschiedlichen Werte stellen jedoch keinen Widerspruch dar. Das Signal der reduktiven Halbreaktion liefert oxidiertes enzymgebundenes FAD. Nach der Reduktion erfolgt der Konformationswandel, wodurch das Enzym partiell aktiviert wird. Die Substratbindung an diese Spezies wird jedoch während der reduktiven Halbreaktion nicht beobachtet, da sie bereits reduziertes FAD enthält (Abb. 3.15). Zur Bestimmung des K_M-Wertes wurde der Standard-Reduktaseansatz verwendet. Bei diesem wird das Enzym mit Pyruvat für 5 Minuten vorinkubiert, worauf es aufgrund der eintretenden Konformationsänderung partiell aktiviert vorliegt. Die langsame Aktivierung des Enzyms nach Zugabe von Pyruvat spiegelt sich in lag-Phasen der Progresskurven bei Verwendung des Reduktaseansatzes wider [157]. Die in der vorliegenden Arbeit genutzten Präinkubationszeiten sind lang genug, um die substratgetriebene Aktivierung zum Abschluss gelangen zu lassen. Der Elektronenakzeptor Hexacyanoferrat übernimmt aufgrund seiner Größe und Mobilität und des Redoxpotentials (E_{0 [$Fe(CN)_6$]³⁻/[$Fe(CN)_6$]⁴⁻ +0,46 V [158]) die Elektronen direkt vom} HEThDP. Die Reduktion von FAD ist somit nicht Bestandteil des katalytischen Zyklus im K₃Fe(CN)₆-Test. Während der Messungen mit Hexacyanoferrat liegt das Enzym demnach als partiell aktivierte Spezies vor und weist eine 7-fach verbesserte Bindung zum Substrat auf.

Die zweite Phase in der Progresskurve der reduktiven Halbreaktion konnte mit einer Geschwindigkeitskonstante k_b von etwa 0,5 s⁻¹ bestimmt werden. Als Erklärung für diese langsame Phase kann eine Reoxidation des enzymgebundenen FAD durch Rest-Sauerstoff ausgeschlossen werden, da dieser Prozess im Vergleich zu den berechneten Geschwindigkeitskonstanten zu langsam ist (k_{reox} 0,08 s⁻¹, Abb. A.6). Auch die Isomerisierung (k_5) , die zur partiell aktivierten Enzymspezies führt, kommt als Erklärung nicht in Frage, da sich sonst im Zuge der reduktiven Halbreaktion transient E-AcThDP anhäufen würde, was jedoch durch NMR-Studien an nicht-aktivierter Ec-POX ausgeschlossen werden konnte (Abschnitt 3.1.6). Die zweite Phase ist vermutlich auf eine weitere Enzymspezies im Ansatz zurückzuführen. Zusätzlich zur Hauptspezies existiert eine weitere Spezies E₀, die nicht zur effektiven Substratbindung befähigt ist und in einem langsamen Prozess in die Hauptspezies umgewandelt wird (Abb. 3.16). Daraus erklärt sich die durch Gleichung 3.3 gegebene Funktionalität mit positiven Amplituden a_1 und a_2 . Die Amplitude a_1 korreliert mit dem Anteil der Spezies E und die Amplitude a2 mit E0 im Ausgangszustand, wobei 80 % der Gesamtamplitude auf a_1 entfallen.

Die nicht-aktivierte *Ec*POX wird somit über die kovalente Substratbindung reguliert. Substrat bindet an die *docking*-Position in räumlicher Nähe zum aktiven Zentrum und



Abb. 3.16: Erweitertes Minimalmodell der reduktiven Halbreaktion von nicht-aktivierter *Ec*POX.

wird in einem relativ langsamen Prozess ($k_2 = 16,2 \text{ s}^{-1}$) kovalent an das C(2)-Atom des ThDP gebunden. Eine quantitative Aussage zur Geschwindigkeit des Elektronentransfers kann nicht getroffen werden, da dieser Prozess nicht geschwindigkeitsbestimmend ist und somit nicht zeitaufgelöst beobachtet wurde.

3.1.5.2 Proteolytisch aktivierte *Ec*POX

Das Reaktionsschema der reduktiven Halbreaktion (Abb. 3.17) der proteolytisch aktivierten *Ec*POX vereinfacht sich, da die Konformationsänderung des Enzyms bereits während der proteolytischen Aktivierung stattgefunden hat. Die Progresskurven der FAD-Reduktion in Abhängigkeit von der Pyruvatkonzentration sind exemplarisch in Abbildung 3.18 A dargestellt. Interessanterweise sind die Progresskurven durch drei voneinander zeitlich gut getrennte Phasen gekennzeichnet. Die Geschwindigkeits-



Abb. 3.17: Reduktive Halbreaktion der aktivierten *EcPOX.* Orange hinterlegte Enzymsymbole repräsentieren Spezies, die oxidiertes FAD enthalten. Erklärungen siehe Text.

konstanten wurden nach Gleichung (3.5) bestimmt. Die Vorfaktoren a_1 , a_2 und a_3 sind stets positiv und stellen die Amplituden der einzelnen Phasen dar.

$$y = a_1 * e^{-k_a * t} + a_2 * e^{-k_b * t} + a_3 * e^{-k_c * t} + n$$
(3.5)

Die erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten und die dazugehörigen Amplituden sind in Tabelle A.6 zusammengefasst. Der Hauptteil der Reaktion wird durch den ersten Term beschrieben, der ungefähr 80 % der Gesamtamplitude ($a = a_1 + a_2 + a_3$) repräsentiert und zugleich den schnellsten Prozess widerspiegelt. Die Amplituden der ersten Phase zeigen keine Substratabhängigkeit, während die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten analog zu den k_{obs} -Werten der nicht-aktivierten *Ec*POX eine hyperbole Abhängigkeit zeigen (Abb. 3.18 B).

Die Daten wurden mit Hilfe der Gleichung 3.4 angepasst. Der K_1 -Wert für Pyruvat beträgt 39,9 ± 8,8 mM und k_2 konnte mit 784,2 ± 61,4 s⁻¹ bestimmt werden. Der erhaltene K_1 -Wert für Pyruvat ist für die aktivierte *Ec*POX deutlich geringer (Faktor 17) als für die nicht-aktivierte Enzymspezies und bestätigt damit auch die thermodynamische K_D -Wert-Bestimmung mit substratanalogen Verbindungen. Bei der aktivierten *Ec*POX stimmen der K_D -Wert (39,9 mM) und der K_M -Wert (24,8 mM) für Pyruvat weitgehend überein. Dies kann als Bestätigung für das Modell der redoxinduzierten Konformationsänderung gewertet werden. Während in der reduktiven Halbreaktion der





A Progresskurven der Reduktion des enzymgebundenen FAD bei unterschiedlichen Pyruvatkonzentrationen (5-100 mM). Die Richtung des Pfeils zeigt die Zunahme der Pyruvatkonzentration. **B** Auftragung des ermittelten k_{obs} der ersten Phase gegen die Pyruvatkonzentration. Durchgezogene Linie: Anpassung nach Gl. 3.4 Ansatz: 1 mg/mL Enzym in 100 mM KPP pH 6.0 mit 10 mM MgSO₄ und 1 mM ThDP mit steigenden Konzentrationen an Pyruvat (5-100 mM) unter anaeroben Bedingungen.



Abb. 3.19: Minimalmodell der reduktiven Halbreaktion von aktivierter EcPOX.

aktivierten *Ec*POX keine Konformationsänderung mehr auftritt, ist dieser Schritt in der reduktiven Halbreaktion der nicht-aktivierten Spezies ein fester Bestandteil (Abb. 3.12) und begründet die Diskrepanz von K_{D} - und K_{M} -Wert.

Zunächst soll nur die erste Phase, die Hauptphase, der Progresskurve der reduktiven Halbreaktion betrachtet werden. Die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten (k_a) sind abhängig von der Substratkonzentration, während die Amplituden substratunabhängig sind. In Abbildung 3.19 ist die beobachtete Reaktionsfolge nochmals dargestellt. Bei der aktivierten *Ec*POX gilt genauso wie beim nicht-aktivierten Enzym, dass die Absorptionsabnahme bei 438 nm verfolgt wird, der Prozess der Reduktion jedoch aufgrund der Substratabhängigkeit der beobachteten Amplituden nicht der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Katalyse sein kann. Die Decarboxylierung ist auch nicht limitierend (vgl. Abschnitt 3.1.6), so dass auch bei der aktivierten *Ec*POX die kovalente Substratbindung als geschwindigkeitsbestimmender Schritt der Katalyse postuliert werden muss.

Als Ursache für die Existenz der beiden anderen Phasen, die in den Progresskurven gefunden wurden, kommen verschiedene Subspezies des Enzyms in Frage. Die zweite Phase (k_b 123,1 s⁻¹) wird durch nicht vollständig aktiviertes Enzym verursacht. Diese Gruppe ist vermutlich strukturell sehr heterogen. Nicht-aktiviertes Enzym, das während der Präparation von proteolytisch aktivierter *Ec*POX nicht vollständig verdaut wurde, ist vermutlich an der Ausprägung der dritten Phase (k_c 12,3 s⁻¹) beteiligt.



Abb. 3.20: Vergleich der Progresskurven der reduktiven Halbreaktion von nichtaktivierter und aktivierter *EcPOX*. Ansatz: 1 mg/mL Enzym in 100 mM KPP pH 6.0 mit 10 mM MgSO₄ und 1 mM ThDP unter anaeroben Bedingungen mit 100 mM Pyruvat. Inset: Zeitachse in logarithmischer Darstellung. — Nicht-aktivierte EcPOX — Aktivierte *EcPOX*



Abb. 3.21: Temperaturabhängigkeit der reduktiven Halbreaktion der aktivierten *Ec*POX. Zeitverlauf der Reduktion unter anaeroben Bedingungen mit 1 mg/mL *Ec*POX in 100 mM KPP pH 6.0 mit 10 mM MgSO₄, 1 mM ThDP und 100 mM Pyruvat. Die Absorptionsänderung des enzymgebundenen FAD wurde bei 438 nm und bei verschiedenen Temperaturen verfolgt. -25° C -20° C -10° C -5° C. Inset: Zugehöriger Arrhenius-Plot.

Beim Vergleich der Progresskurven der reduktiven Halbreaktion von nicht-aktivierter und aktivierter EcPOX unter sonst identischen Bedingungen werden die Unterschiede unmittelbar deutlich (Abb. 3.20). Beim aktivierten Enzym ist ein Großteil der Reaktion während der Mischzeit des stopped-flow-Geräts bereits abgelaufen. Zur besseren Auflösung dieser ersten Phase sollte untersucht werden, ob eine Absenkung der Temperatur die Geschwindigkeitskonstanten beeinflusst. Es wurden Experimente bei 5 verschiedenen Temperaturen (5, 10, 15, 20 und 25 °C) durchgeführt und die Geschwindigkeitskonstanten der ersten Phase in Analogie zu den bereits beschriebenen Experimenten bestimmt (Abb. 3.21). Eine Auftragung der erhaltenen logarithmierten $k_{\rm obs}$ -Werte gegen den Kehrwert der absoluten Temperatur ergibt eine Gerade (Abb. 3.21 Inset). Nach Arrhenius, der 1889 ein empirisches Modell beschrieb, wonach die Ausgangsmoleküle einen aktivierten Zustand durchlaufen müssen, um in das Produkt überzugehen, kann anhand des Anstiegs dieser Gerade (m = $-E_a/R$) die Aktivierungsenergie Ea bestimmt werden. Diese zusätzliche Energie wird vom System benötigt, um von den Ausgangsmolekülen in den aktivierten Zustand zu gelangen. Sie beträgt im vorliegenden Fall für die aktivierte *EcPOX* 43,4 kJ/mol⁻¹.

3.1.6 Verteilung der Reaktionsintermediate während der Katalyse

Aufgrund der unterschiedlichen chemischen Verschiebungen der ThDP-Intermediate im ¹H-NMR-Spektrum können die im Verlauf der Katalyse gebildeten Reaktionsintermediate qualitativ und quantitativ bestimmt werden [108]. Unter *steady-state*-Bedingungen können bei Zugrundelegung einfacher Modellmechanismen mikroskopische Geschwindigkeitskonstanten berechnet werden. Im Unterschied zur Analyse UV/Vis-spektroskopischer Transientkinetiken besteht dabei kein Zuordnungsproblem. Im folgenden wird mit Hilfe der Intermediatanalyse dargestellt, welche Schritte infolge der Aktivierung der *Ec*POX beeinflusst werden.

Wird nicht-aktivierte *Ec*POX mit Pyruvat inkubiert, kommt es zur Bildung von Enzymspezies mit reduziertem FAD. Dieser Prozess kann mittels UV/Vis-spektroskopischer Methoden direkt und zeitaufgelöst verfolgt werden (Kapitel 3.1.5). Darüberhinaus ist bekannt, dass in Gegenwart von Pyruvat eine Konformationsänderung erfolgt, deren Resultat ein partiell aktiviertes Enzym ist. Es ist daher naheliegend, dass die pyruvatgetriebene Aktivierung eine Folge der Reduktion des nicht-aktivierten Enzyms ist. Es stellt sich somit die Frage, welche Intermediate auf der Zeitskala der Aktivierung angehäuft werden. Dazu wurden Intermediatverteilungen nach unterschiedlichen Inkubationszeiten mit Pyruvat mittels ¹H-NMR bestimmt. Es sei jedoch angemerkt, dass dies in Abwesenheit eines Elektronenakzeptors und folglich nicht unter *steady-state*-Bedingungen vorgenommen wurde und somit den Reaktionsbedingungen der reduktiven Halbreaktion entspricht. Abbildung 3.22 A zeigt, dass hierbei ausschließlich nicht-reagiertes ThDP und HEThDP auftraten. LThDP und Acetyl-ThDP wurden dagegen nicht beobachtet. Die zeitabhängige Zunahme von HEThDP ist bei der verwendeten Pyruvatkonzentration von 250 mM durch einen k_{obs} -Wert



¹H NMR chemische Verschiebung

Abb. 3.22: Intermediatanalyse von nicht-aktivierter EcPOX.

Ansatz: 80,7 μ M nicht-aktivierte *Ec*POX in 100 mM KPP, 5 mM MgSO₄, 80,7 μ M ThDP und 250 mM Pyruvat. Inkubation bei 25 °C. **A** Gegenüberstellung der ¹H-NMR-Spektren zu verschiedenen Zeitpunkten. **B** Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Bildung des Hydroxyethyl-ThDP normiert auf die Gesamtkonzentration an ThDP.

von 4,1 s⁻¹ gekennzeichnet. Dieser ist mit dem k_{obs} -Wert der reduktiven Halbreaktion bei gleicher Pyruvatkonzentration in guter Übereinstimmung. Damit verläuft die Bildung der reduzierten Enzymspezies mit der gleichen Kinetik wie die Bildung von HEThDP. Aus der Analyse der Transientkinetiken der reduktiven Halbreaktion ist bereits bekannt, dass die Bildung der C-C-Bindung geschwindigkeitsbestimmend ist. Da diese Interpretation zur Vorrausetzung hat, dass die Elektronenübertragung vom HEThDP auf das enzymgebundene FAD deutlich schneller als die C-C-Bindung erfolgt, kann sich nicht viel E-HEThDP akkumulieren (Terminologie entsprechend Abb. 3.12). Schneller Verbrauch von E-HEThDP würde wiederum zur transienten Akkumulation von Acetyl-ThDP führen, wenn dieses nicht wesentlich schneller hydrolysiert und in Ea-HEThDP überführt würde, als es gebildet wird. Folglich muss das NMR-spektroskopisch beobachtete HEThDP vorrangig Ea-HEThDP sein, also eine partiell aktivierte Enzymspezies, die das Endprodukt der reduktiven Halbreaktion der EcPOX darstellt. Dem NMR-spektroskopisch beobachteten Prozess liegt somit derselbe geschwindigkeitsbestimmende Schritt zugrunde wie der reduktiven Halbreaktion. Nach der substratinduzierten Konformationsänderung (k_{konf}) liegt eine Enzymspezies vor, die erheblich schneller Substrat zu binden vermag, als das nichtaktivierte Enzym (E). Diese Enzymspezies ist partiell aktiviert (Ea). Partiell aktiviertes Enzym kann durch Proteolyse bzw. durch die Gegenwart von Lipiden eine weitere Aktivitätssteigerung erfahren.

Damit bestätigt der NMR-spektroskopische Befund, dass nach erfolgter pyruvatgetriebener Aktivierung des nicht-aktivierten Enzyms die Schritte der initialen Substratbindung und der C-C-Bindungsbildung sehr viel schneller erfolgen als am nichtaktivierten Enzym. Es ist jedoch nicht möglich aus den vorliegenden Daten hierzu eine quantitative Aussage zu gewinnen. Diese Interpretation korreliert gut mit den Resultaten der *steady-state*-Messungen. Nicht-aktivierte *Ec*POX zeigt einen K_M -Wert für Pyruvat von 98,8 mM. Dies steht im scheinbaren Widerspruch zum K_1 -Wert von 665,9 mM für Pyruvat, der für die k_{obs} -Werte der reduktiven Halbreaktion am nichtaktivierten Enzym bestimmt wurde. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass sich der K_M -Wert tatsächlich auf ein bereits durch vorherige Präinkubation mit Pyruvat partiell aktiviertes Enzym (E_a) bezieht, welches deutlich affiner gegenüber Pyruvat ist.

Die Intermediatanalyse des proteolytisch aktivierten Enzyms wurde in Gegenwart von Fe[K₃(CN)₆] und unter *steady-state*-Bedingungen durchgeführt. Dabei werden nicht-reagiertes ThDP und Acetyl-ThDP beobachtet (Abb. 3.23). Das Fehlen des HE-ThDP-Signals bei gleichzeitiger Beobachtung eines, wenn auch schwachen, Acetyl-ThDP-Signals spricht dafür, dass die Geschwindigkeitskonstante des Elektronentrans-





fers deutlich größer als die der Hydrolyse ist ($k_{red} \gg k_{hydrolyse}$). Zugleich lag ein hoher Anteil an nicht-reagiertem ThDP vor, welches unter den vorliegenden Bedingungen vorrangig die E·S-Spezies (Substrat in *docking*-Position) repräsentiert. Dies deutet darauf hin, dass die C-C-Bindungsbildung und die Hydrolyse des Acetyl-ThDP geschwindigkeitsbestimmend für die Katalyse der aktivierten *Ec*POX sind. Eine quantitative Bestimmung der mikroskopischen Geschwindigkeitskonstanten kann jedoch nicht vorgenommen werden, da nicht alle Intermediate beobachtet werden und dies für eine solche Bestimmung notwendig wäre [108].

Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den Resultaten von Bertagnolli & Hager [159]. Die Autoren bestimmten die Geschwindigkeitskonstante der Decarboxylierung mit 62 s⁻¹. Sie verwendeten dabei einen indirekten Ansatz, bei dem, mit Hilfe von Bromkresolgrün, die Änderung des pH-Wertes detektiert wurde. Es wurde vorausgesetzt, dass die beobachtete pH-Wert-Änderung Folge der CO₂-Bildung ist. Um zu vermeiden, dass die Hydrogencarbonatbildung geschwindigkeitsbestimmend für die Signalgabe im Bromkresolgrün-Test ist, wurde dem Messansatz Carboanhydrase zugesetzt. Dieses Enzym katalysiert die Hydratisierung von Kohlendioxid zu Hydrogencarbonat und arbeitet in der Nähe der Diffusionskontrolle. Die Reaktionsgleichung lautet:

$$CO_2 + H_2O \longrightarrow HCO_3^- + H^+$$

In der Negativkontrolle wurde auch ohne Zugabe von Carboanhydrase die gleiche Geschwindigkeitskonstante erhalten. Die Vermutung liegt also nahe, dass die von Bertagnolli & Hager beobachteten pH-Verschiebungen nicht durch das gebildete CO₂

bedingt sind, sondern vorrangig die Relaxation von Protonierungsgleichgewichten an der Proteinoberfläche widerspiegeln, die durch die Verdünnung des Proteins in ein ungepuffertes Medium ausgelöst wurden.

Nicht-aktivierte und aktivierte *Ec*POX unterscheiden sich somit in ihrer Fähigkeit das Substrat, aus einer *docking*-Position heraus kovalent zu binden. Dies steht im Übereinklang mit den unterschiedlichen Werten für k_2 im nicht-aktivierten (16,2 s⁻¹) und aktivierten (784 s⁻¹) Enzym, welche die C-C-Bindungsbildung reflektieren.

3.1.7 Untersuchungen zum Elektronentransfer

Die Reduktion der Flavinkomponente kann nach verschiedenen Mechanismen erfolgen (Abb. 3.24 A). Zum einen gibt es den direkten Hydridtransfer an die N(5)-Position des FAD. Eine andere Möglichkeit besteht in der Generierung einer carbanionischen Struktur des Substrates durch eine Base im aktiven Zentrum und die anschließende Übertragung der Elektronen auf das FAD. Desweiteren kann die FAD-Reduktion auch über einen radikalischen Mechanismus verlaufen. Bei diesem würde die C-H-Bindung des Substrates so gespalten, dass ein transientes Radikal entsteht. Das FAD würde dann in der radikalischen Semichinon-Form vorliegen (Abb. 3.24 B). Es gibt zwei verschiedene Semichinonspezies, ein neutrales blaues Semichinon und





A Darstellung verschiedener Mechanismen der Reduktion des FAD. *1* Hydridtransfer, *2,3* Reduktion über die Bildung eines Carbanions, *4,5* Radikalmechanismus. Abbildung entnommen aus [160]. **B** Die radikalischen Semichinone können spektroskopisch voneinander unterschieden werden. Das neutrale blaue Semichinon hat Absorptionsbanden bei 550-600 nm und das anionische rote Semichinon bei ca. 350 nm. (Spektrum in [161].)

ein anionisches rotes Semichinon. Diese Spezies unterscheiden sich in ihren Absorptionseigenschaften im UV/Vis-Bereich.

Für die verwandte *Lp*POX konnte gezeigt werden, dass die enzymatische Reaktion über ein stabilisiertes radikalisches Semichinon verläuft [92]. Bei diesem Enzym wird nicht Acetat, sondern das energiereiche Acetylphosphat mittels Phosphorolyse gebildet. Um die konkurrierende Hydrolysereaktion auszuschließen, ist die Phosphorolyse mit dem Elektronentransfer (ET) gekoppelt. Das Phosphat attackiert demnach das kinetisch stabilisierte HEThDP-Radikal. Nach homolytischer Spaltung des radikalischen anionischen Phosphat-ThDP-Adduktes wird Acetylphosphat gebildet. Es stellte sich daher die Frage, ob auch in *Ec*POX die Elektronen nach einem Einelektronentransfermechanismus unter Bildung von Radikalintermediaten übertragen werden.

Zur Untersuchung dieses Problems wurde unter anaeroben Bedingungen die Absorption bei 550 nm herangezogen. Eine Zunahme der Absorption auf der Millisekunden-Zeitskala würde für die Bildung des neutralen blauen Semichinons sprechen. Für keine der untersuchten *Ec*POX-Varianten (nicht-aktivierter und aktivierter Wildtyp, nicht-aktivierte Variante Phe465Ala, nicht-aktivierte Variante Phe465Ile, aktivierte Variante Phe465Ile) konnte im *stopped-flow*-Experiment eine Zunahme des optischen Signals bei 550 nm detektiert werden. Eine Stabilisierung des neutralen Semichinons kann somit ausgeschlossen werden. Die Detektion des anionischen roten Semichinon ist durch die Absorption des FAD und des Substrates im relevanten Wellenlängenbereich (340-420 nm) erschwert. Aussagen über die Stabilisierung dieses Radikals können nicht getroffen werden. Eine zweifelsfreie Detektion ist mittels UV/Vis-Absorptionsspektroskopie nicht möglich. Als geeignete Methode käme die Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (ESR) in Betracht.

3.1.8 Bestimmung des Mittelpunktpotentials

FAD ist ein redoxaktiver Kofaktor, der im Zuge der Reduktion entweder ein oder zwei Elektronen aufnehmen und übertragen kann. Ein Maß der Affinität einer Substanz für Elektronen ist das Redoxpotential. Dieses wird in Bezug auf die Normal-Wasserstoff-Elektrode unter Standardbedingungen (T=25 °C, p=1 atm) angegeben und dann als Standardpotential bezeichnet. Das Redoxpotential enzymgebundener FAD-Moleküle kann - in Abhängigkeit ihrer lokaler Einbettung in der Proteinumgebung - in weiten Bereichen variieren. Im Falle der *Ec*POX stellte sich insbesondere die Frage, ob sich die Redoxpotentiale der nicht-aktivierten und der aktivierten Form voneinander unterscheiden.

3.1.8.1 Titration mit Redoxfarbstoffen

Zur Bestimmung des Redoxpotentials können Flavoproteine unter anaeroben Bedingungen mit Farbstoffen, deren Redoxpotential bekannt ist, umgesetzt werden. Anhand von gemessenen UV/Vis-Spektren während der Titration mit Reduktionsmitteln kann mit Hilfe der Nernst'schen Gleichung anhand der Absorptionsänderung des bekannten Farbstoffs das Mittelpunktpotential des enzymgebundenen FAD bestimmt werden.

In Abbildung 3.25 sind die resultierenden Spektrenscharen der nicht-aktivierten *Ec*-POX (A) und der Δ 23-Variante (B) unter Verwendung von Natriumdithionit als Reduktionsmittel dargestellt. Das Spektrum der aktivierten *Ec*POX zeigte im Zuge der Reduktion eine Zunahme des Signals bei 550 nm. Dies deutet auf eine Stabilisierung eines neutralen blauen Semichinons unter Gleichgewichtsbedingungen hin. In der



Abb. 3.25: Darstellung der UV/Vis-Spektren für die Redoxtitration mit Dithionit und der dazugehörigen Nernst-Plots.

Links Ansatz: 1 mg/mL Enzym in 100 mM KPP pH 6.0 unter anaeroben Bedingungen und steigenden Konzentrationen Natriumdithionit. **Rechts** Nernst-Plot zur Bestimmung des Mittelpunktpotentials (–). **A** Nicht-aktivierte *Ec*POX **B** Aktivierte *Ec*POX

nicht-aktivierten Spezies schien keine Stabilisierung dieser radikalischen Spezies aufzutreten.

Unter zusätzlicher Verwendung von Redoxfarbstoffen konnte anhand des bekannten Mittelpunktpotentials des Farbstoffes das Potential in der Messzelle nach Gleichung 3.6 berechnet werden [92],

$$E = E_m + \frac{2, 3 \cdot R \cdot T}{z \cdot F} \cdot lg \frac{[\text{Farbstoff}_{Ox}]}{[\text{Farbstoff}_{Red}]}$$
(3.6)

wobei E_m für das Mittelpunktpotential des Farbstoffes, *R* für die Gaskonstante, *T* für die absolute Temperatur, *F* für die Faraday-Konstante (96,5 kJ V⁻¹ mol⁻¹) und *z* für die Anzahl der zu übertragenen Elektronen (hier *z*=2) stehen.

Aus der Auftragung der Absorption bei 438 nm, was der Absorption von oxidierten enzymgebundenen FAD entspricht, gegen das errechnete Potential, welches mit Hilfe von Natriumdithionit eingestellt wurde, kann das Mittelpunktpotential über die Nernst'sche Gleichung bestimmt werden. Für das nicht-aktivierte Enzym wurde ein Mittelpunktpotential von -170 mV erhalten. Die proteolytisch aktivierte *Ec*POX wies ein um 100 mV verändertes Mittelpunktpotential von -73 mV auf. Im aktivierten Enzym können somit leichter Elektronen vom ThDP auf das FAD übertragen werden.

Im Vergleich zur verwandten *Lp*POX ($E_m = -62 \text{ mV}$) wird deutlich, dass die Mittelpunktpotentiale der aktivierten *Ec*POX und der *Lp*POX ähnlich sind [92]. Das Potential eines Kofaktors Elektronen aufzunehmen oder abzugeben wird durch die Proteinkomponente wesentlich beeinflusst. Die vorliegenden Befunde implizieren strukturelle Unterschiede zwischen nicht-aktivierter und aktivierter *Ec*POX in der Umgebung des gebundenen FAD. Die Energie, die dem veränderten Mittelpunktpotential entspricht, ist vergleichsweise niedrig (2,9 kJ/mol⁻¹). Anhand der Kristallstrukturen von *Lp*POX konnte gezeigt werden, dass FAD in der N(5)-N(10)-Achse einen Knick (bis zu 25°, *Lp*POX Phe479Trp [162]) aufweist. Auch in anderen Enzymen konnten, teilweise abhängig vom Redoxstatus, distorsierte Isoalloxazinringe des FAD beobachtet werden.

3.1.8.2 Zyklische Voltammetrie

Eine weitere unabhängige Methode zur Untersuchung des Redoxpotentials des FAD im Enzym stellt die redoxinduzierte Infrarotspektroskopie dar. In einer Messzelle wird durch Elektroden die Spannung so eingestellt, dass das enzymgebundene FAD reduziert wird. Zur Kontrolle der vollständigen Reduktion des enzymgebundenen FAD bei der angelegten Spannung, wurde ein Absorptionsspektrum des FAD aufgenommen. Nach der Spannungsveränderung wurden kontinuierlich Vis-Spektren im Wellenlängenbereich von 400-800 nm aufgenommen. In den Differenzspektren der Abbildung 3.26 A ist die FAD-Absorption im Bereich von 400-500 nm repräsentiert. Mit fortschreitender Zeit änderte sich die Absorption nicht weiter, die Reduktion war somit vollständig. Weiterhin war zu beobachten, dass in den Spektren bei einer Wellenlänge >500 nm keine Änderungen während der Reduktion stattfanden.

Zur Bestimmung des Redoxpotentials vom FAD im enzymgebundenen Zustand wurden zyklische Voltammogramme aufgenommen. Dabei wird nach erfolgter kontinuierlicher Spannungsänderung die Stromstärke gemessen, die das System aufweist. Das Enzym wird zuerst reduziert und anschließend wieder oxidiert. Der Vorgang ist beliebig oft wiederholbar, wobei sich die Spektren nicht voneinander unterscheiden. In der Auftragung der gemessenen Stromstärke gegen die eingestellte Spannung wurde ein typisches Muster erhalten (Abb. 3.26 B). Aus der Spannung des Maximums der oxidierten (-311 mV) und der reduzierten Spezies (-392 mV) ergibt sich das Mittelpunktpotential als deren Durchschnitt. Für die nicht-aktivierte *Ec*POX ergab sich ein Mittelpunktpotential von -351,5 mV. Bezogen auf die Standard-Wasserstoffelektrode konnte das Redoxpotential für die nicht-aktivierte *Ec*POX mit -143,5 mV angegeben werden.

Im Vergleich zur Bestimmung mittels Redoxfarbstoff liegt das Mittelpunktpotential um 30 mV höher. Diese Differenz kann mit den unterschiedlichen Messbedingun-



Abb. 3.26: Experimente zur Bestimmung des Redoxpotentials in nicht-aktivierter *EcPOX*. A Verlauf der Reduktion nach Anlegen einer Spannung. Übersicht über die Vis-Spektren während die Spannung variiert und enzymgebundenes FAD reduziert wird. **B** Abhängigkeit der Stromstärke von der angelegten Spannung. Das System wird dabei zyklisch oxidiert und reduziert (zyklisches Voltammogramm).

gen erklärt werden. So wurde bei der Redoxtitration mit Farbstoffen bei einer Temperatur von 15 °C gearbeitet, während die voltammetrischen Messungen bei 22 °C durchgeführt wurden. Außerdem waren die Reaktionsansätze nicht identisch. Bei den voltammometrischen Messungen musste mit der 150-fachen Menge an Protein in der Messzelle gearbeitet werden und es war nötig den Puffer mit zusätzlichen 100 mM Salz (KCl) zu versetzen. Das Redoxpotential ist unter anderem abhängig von der Temperatur und der Konzentration der gelösten Stoffe im Ansatz [163].

Während der Reduktion des FAD in nicht-aktiviertem Enzym wurden auch IR-Spektren aufgenommen. Die strukturellen Aussagen, die man anhand dieser Spektren treffen kann, sind in Kapitel 3.2.3 auf Seite 102 dargestellt.

Leider war es nicht möglich, die proteolytisch aktivierte *Ec*POX zu messen, da in der Messzelle sehr hohe Proteinkonzentrationen verwendet werden müssen und das aktivierte Enzym bei diesen Konzentrationen ausfällt. *Ec*POX, die durch Detergenzien aktiviert wurde, konnte noch nicht gemessen werden.

3.1.9 Zusammenfassung

In diesem Kapitel werden die kinetischen und thermodynamischen Eigenschaften der Pyruvatoxidase aus *Escherichia coli* beschrieben. Tabelle 3.2 fasst die in den vorgestellten Studien erhaltenen Parameter zusammen. Es konnte gezeigt werden, dass nichtaktivierte und aktivierte *Ec*POX sehr unterschiedlich auf steigende Substratkonzentrationen reagieren.

	EcPOX	$EcPOX_{\Delta 23}$
$k_{\rm cat} ({\rm s}^{-1})$	$14,7\pm0,6$	31,9 ± 1,3
$k_{\rm H/D} ({\rm s}^{-1})$	150,8 ± 7,7	≫ 600
k_{decarb} (s ⁻¹)	$\gg 600$	$\gg 600$
$k_{\rm obs\ redHR}\ ({ m s}^{-1})$	$16,2\pm0,7$	$\textbf{784,2} \pm \textbf{61,4}$
$k_{\rm ET}~({ m s}^{-1})$	\geq 5 \cdot 16,2	\geq 5 \cdot 784,2
$k_{\rm hydrolyse} ({\rm s}^{-1})$	$\gg 600$	$\gg 600$
E_m (mV)	-170	-73
<i>K</i> ₁ (mM)	$665,9\pm43,5$	39,9 ± 8,8
$K_{\text{C-C-binding}}$ AcPh (μ M)	$1526,4\pm63,7$	$173,\!1\pm24,\!5$
$K_{\text{C-C-binding}}$ MAP (μ M)	$1579,2 \pm 64,1$	$22\overline{1,\!4\pm88,\!4}$
$k_{\text{C-C-binding}} \text{MAP}(\text{s}^{-1})$	0,11 ± 0,03	$0,\!47\pm0,\!10$

Tab. 3.2: Parameter der Katalyse von nicht-aktivierter und aktivierter *Ec*POX. So ist der $K_{\rm M}$ -Wert für das proteolytisch aktivierte Enzym um einen Faktor 4 verringert. Ebenso steigt der $V_{\rm max}$ -Wert, so dass es zu einer Steigerung der katalytischen Effizienz um den Faktor 9 kommt. Es stellte sich somit die Frage, welche Teilschritte des Katalysezyklus durch die Aktivierung vorrangig beeinflusst werden. Zu diesem Zweck wurde die katalytische Reaktion der *Ec*POX in Einzelschritte zerlegt. Durch die Untersuchung des Substratbindungsschrittes mit Hilfe substratanaloger Verbindungen konnte gezeigt werden, dass in der proteolytisch aktivierten *Ec*POX dieser Schritt ungefähr 5mal so schnell ablaufen kann.

In der reduktiven Halbreaktion mit Pyruvat als Substrat konnte gezeigt werden, dass die initialen Schritte der Katalyse (Bildung des Michaelis-Komplexes und C-C-Bindungsbildung) nach der Aktivierung beeinflusst sind. So ist der k_{obs} -Wert der reduktiven Halbreaktion für die aktivierte *Ec*POX ca. 50mal höher als im nicht-aktivierten Enzym. Die hier vorgeschlagene Interpretation weist diese Steigerung der Beschleunigung der C-C-Bindungsbildung zu.

Die nachfolgenden Katalyseschritte wurden mittels ¹H-NMR-Intermediatanalyse untersucht. Insgesamt zeigte sich, dass sowohl im nicht-aktivierten als auch im aktivierten Enzym die kovalente Bindung des Substrates an das C(2)-Atom des ThDP der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Katalyse ist.

Während der Reaktion werden Elektronen vom HEThDP auf FAD übertragen, wobei es wahrscheinlich nicht zur transienten Bildung von Semichinonen kommt.

In elektrochemischen Experimenten wurde gezeigt, dass das Redoxpotential der proteolytisch aktivierten *Ec*POX um 100 mV höher liegt als im nicht-aktivierten Enzym. Die Übertragung der Elektronen auf das enzymgebundene FAD ist somit in der aktivierten *Ec*POX im Gegensatz zur nicht-aktivierten Spezies erleichtert.

Die kinetischen und thermodynamischen Eigenschaften der permanent aktiven *Lp*-POX sind denen der aktivierten *Ec*POX ähnlicher als denen der nicht-aktivierten Spezies.

Nicht-aktivierte *Ec*POX zeigt in ihrer v/S-Charakteristik eine schwache positive Kooperativität im Bereich zwischen 20 bis 50 mM Pyruvat. Diese Eigenschaft könnte mit der simultanen Exponierung zweier auf einer Seite des Tetramers gelegener Lipidbindedomänen in Zusammenhang stehen, welche die Membranbindung garantieren.

3.2 Konformationsänderungen während der Aktivierung der EcPOX

Wie in der Einleitung (Abschnitt 1.3.1 auf Seite 31) beschrieben, liegt die Pyruvatoxidase aus *Escherichia coli* in Abhängigkeit vom Redoxstatus des FAD in verschiedenen Konformationszuständen vor. Die Konformation des reduzierten Enzyms ist durch die Exponierung der C-terminalen Domäne zum Lösungsmittel hin charakterisiert. Die exponierte Domäne vermittelt die Membranbindungskompetenz des Enzyms. Im membran-assoziierten Zustand erfolgt die Übertragung der Elektronen vom reduzierten FAD zum Ubichinon-8. Auf diese Weise gelangen die Elektronen direkt in die Atmungskette.

3.2.1 Exponierung der Lipidbindedomäne

In den letzten 30 Jahren wurden zahlreiche Untersuchungen zum Verständnis der zugrundeliegenden Konformationsänderung durchgeführt [71][156]. Dabei kamen im Wesentlichen Experimente mit limitierter Proteolyse zum Einsatz. Die exponierte Cterminale Domäne wurde durch eine Protease abgespalten und gelelektrophoretisch analysiert. Es stellte sich hierbei heraus, dass die Zugabe von Pyruvat zum Enzym eine Konformationsänderung auslöst, in deren Folge die Lipidbindedomäne exponiert wird. Die Frage, ob die Substratbindung am ThDP oder die Reduktion des FAD entscheidend für diese Konformationsänderung sind, wurde nicht beantwortet. Im Jahr 1977 konnte gezeigt werden, dass eine Reduktion des FAD durch ein artifizielles Reduktionsmittel, Natriumdithionit, das gleiche Proteolysemuster erzeugt wie Pyruvatzugabe [69][70][71]. Der Redoxstatus des FAD übt somit einen entscheidenden Einfluss auf die Funktion des Enzyms aus. Die Frage, ob bereits eine kovalente Modifikation des ThDP zur Exponierung der C-terminalen Domäne ausreicht, konnte jedoch nicht geklärt werden.

In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss des Substrates beziehungsweise substratanaloger Verbindungen auf die limitierte Proteolyse der *Ec*POX untersucht werden. Zunächst wurde in einem Vorversuch überprüft, ob die Proteasereaktion durch Pyruvat oder MAP beeinflusst wird. Mit Hilfe eines spektroskopischen Ansatzes, der die Freisetzung von p-Nitroanilin (λ =405 nm) aus N-Glutaryl-L-phenylalanin-4-nitroanilid detektiert, konnte eine Beeinflussung der Proteaseaktivität ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt).

Die Produktbildung beim Verdau der *Ec*POX durch α -Chymotrypsin wurde zeitaufgelöst mittels SDS-PAGE verfolgt (Abb. A.7). Zur einfacheren Visualisierung wurden





Ansatz: 3 mg/mL *Ec*POX in 100 mM KPP pH 6.0, 20 mM MgSO₄, 5 mM ThDP, Substrat oder substratanaloge Verbindung, 20 μ g/mL α -Chymotrypsin, Abbruch der Reaktion mit SDS-Probenpuffer. Erläuterungen im Text. ThthPP Thiaminthiazolondiphosphat

die Endwerte der jeweiligen Kinetiken nebeneinander aufgetragen (Abb. 3.27). In der ersten Spur ist EcPOX ohne Zusätze gezeigt. Bei 62 kDa tritt eine deutliche Bande auf. Spur 2 zeigt das Proteolysemuster nach Zugabe von α -Chymotrypsin zum oxidierten Enzym. Im Gegensatz zu Spur 1 werden zwei Banden beobachtet, wovon eine bei 62 kDa, eine weitere bei 50 kDa erscheint. Mittels SDS-PAGE wurde von Recny & Hager gezeigt, dass in Abwesenheit von Substrat das Enzym C-terminal verkürzt wird [69]. Somit war das erhaltene Spaltungsmuster zu erwarten. Die abgespaltene Peptidsequenz (101 Aminosäuren) wird als β -Peptid bezeichnet. Das verkürzte Enzym (50 kDa) ist katalytisch inaktiv [69][76]. Wird das gleiche Experiment nach vorheriger Substratzugabe (Spuren 3-4, nach verschiedenen Inkubationszeiten) durchgeführt, resultiert ein anderes Proteolysemuster. Die Bande für das um das β -Peptid verkürzte Protein tritt nicht mehr auf. Stattdessen wird eine zusätzliche Bande erhalten, die einem um 23 Aminosäurereste verkürzten Monomer der EcPOX entspricht. Das abgespaltene Peptid wird als α -Peptid bezeichnet. Sequenzierungsstudien zeigten, dass auch dieses Peptid C-terminal abgespalten wurde [80]. Das um die 23 Aminosäurereste verkürzte Proteinmonomer (60 kDa) ist die proteolytisch aktivierte EcPOX.

In Abwesenheit von Substrat ist die Proteasebindestelle für die Abspaltung des β -Peptides exponiert, während die Bindestelle für die Abspaltung des α -Peptides unzugänglich ist. In Substratgegenwart sind die Zugänglichkeiten zu den Schnittstellen verändert. Die Proteasebindestelle für die Abspaltung des α -Peptides ist exponiert, während die Bindestelle für den Abbau des β -Peptides unzugänglich ist.



Abb. 3.28: Chemische Strukturen einiger Thiaminderivate

ThDP, **PL-ThDP** Phosphonolaktyl-ThDP, welches nach Bindung von MAP im Enzym gebildet wird und als Analogon des prä-Decarboxylierungsintermediates fungiert, **ThthPP** Thiaminthiazolondiphosphat, welches anstelle von ThDP gebunden wird und dem post-Decarboxylierungsintermediat, HEThDP, ähnelt.

Zur Beantwortung der Frage, ob eine Modifikation des ThDP für die Exponierung der Lipidbindedomäne ausreichend ist, wurden Experimente mit limitierter Proteolyse in Gegenwart der substratanalogen Verbindung MAP durchgeführt. Abbildung 3.28 zeigt die chemischen Strukturen einiger Thiaminderivate. MAP, ein kompetitiver Inhibitor der EcPOX [96], bindet an das C(2)-Atom des Thiazoliumringes im Kofaktor, wobei die entstandene C-P-Bindung im Gegensatz zur äquivalenten C-C-Bindung des Laktyl-ThDP nicht gespalten werden kann. Die Reaktion bleibt auf der Stufe des Phosphonolaktyl-ThDP (PL-ThDP, prä-Decarboxylierungsintermediat) stehen. In Spur 5 im SDS-Gel (Abb. 3.27) ist das Proteolysemuster in Gegenwart von 20 mM MAP dargestellt. Es ist lediglich eine Bande bei 62 kDa zu erkennen. Daraus kann geschlossen werden, dass weder α -Peptid noch β -Peptid abgespalten wurden. Es muss demnach eine Konformationsänderung eingetreten sein, die die Proteasebindestelle für den β -Peptid-Abbau maskiert. Die Spaltstelle zur Abspaltung des α -Peptides wurde jedoch nicht simultan exponiert. Ein vergleichbares Proteolysemuster findet man nach Rekonstitution von Apo-FAD-EcPOX mit Thiaminthiazolondiphosphat (ThthPP, Spur 6). Die Keto-Gruppe am Thiazoliumring des ThthPP ähnelt der Enamin-Form des Hydroxyethyl-ThDP (HEThDP), dem post-Decarboxylierungsintermediat [164]. ThthPP bindet 30fach stärker an die EcPOX als ThDP [165]. Beide Analoga, welche die Bindung des Substrates am Kofaktor simulieren, aber keine Reduktion des FAD induzieren, rufen eine Konformationsänderung hervor, die den Abbau des β -Peptides verhindert. Die Exponierung der Lipidbindedomäne wird dagegen nicht induziert.

Wurde das enzymgebundene FAD in einer Anaerobenkammer mit Natriumdithionit reduziert (Spuren 7-8), resultierte ein vergleichbares Proteolysemuster wie bei Reduk-

tion des Enzyms durch Pyruvat (Spuren 3-4). Es fand ein Abbau des α -Peptides vom Enzym, aber kein β -Peptid-Abbau statt. Auch die Kinetiken des Abbaus waren nach Inkubation mit Natriumdithionit bzw. Pyruvat vergleichbar (Abb. A.7 B und E). Die Reduktion des FAD ist somit entscheidend für die Konformationsänderung, die die Lipidbindedomäne (α -Peptid) exponiert. Die Proteasebindestelle für die Abspaltung des β -Peptides ist unzugänglich.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass im Zuge der Aktivierung mindestens zwei Konformationsänderungen in der *Ec*POX erfolgen. Eine schützt vor dem Abbau des β -Peptides, während die andere zur Exponierung der Lipidbindedomäne führt. Letztere vermittelt die Membranbindung und ermöglicht so die Übertragung der Elektronen vom reduzierten FAD auf Ubichinon-8 in der Elektronentransportkette.

3.2.2 Änderung des Gyrationsradius

Experimente mit Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS) liefern Informationen über die Oligomerstruktur von Proteinen. Anhand der aufgenommen Streukurven können Gyrationsradien und die molekulare Masse von Proteinen bestimmt werden. Es konnte in einer systematischen Untersuchung gezeigt werden, dass die relativen Fehler der ermittelten Parameter unter 10 % liegen [121]. Eine neue Messanordnung für SAXS-Messungen am DESY in Hamburg [120] erlaubte es zudem, Messungen in kurzen Zeitabständen durchzuführen, so dass die Strukturdaten auch zeitlich aufgelöst werden konnten.

In Substratabwesenheit lag die nicht-aktivierte *Ec*POX im untersuchten Konzentrationsbereich (2 bis 60 mg/mL) als Tetramer (248 kDa) mit einem Gyrationsradius R_G von 3,95 nm vor (Tab. A.3). In Abbildung 3.29 A ist exemplarisch die Streukurve für eine Proteinkonzentration von 10 mg/mL dargestellt. Die Streukurven konnten gut angepasst werden. Aufgrund des neuen Aufbaus des Messplatzes verbesserte sich das Signal-Rausch-Verhältnis, so dass auch die Daten bei größeren Streuwinkeln in die Kalkulation einbezogen werden konnten. Die errechneten Parameter sind mit anderen tetrameren ThDP-abhängigen Enzymen vergleichbar (*Lp*POX: MW 264 kDa, R_G 4,06 nm [166]).

Die Zugabe von Pyruvat oder MAP führte bei nicht-aktivierter *Ec*POX nicht zur Änderung des Oligomerzustandes (Abb. 3.30). *Ec*POX lag unter den gewählten Bedingungen immer als Tetramer vor. Allerdings gab es Unterschiede im Verlauf der Streukurven je nachdem welches Additiv zugefügt wurde. Nach Zugabe von MAP blieben



Abb. 3.29: Darstellung der Streukurven und Abhängigkeit der Gyrationsradien bzw. molekularen Masse von der Inkubationszeit mit der Protease.

A Ausgewählte Streukurve der nicht-aktivierten *Ec*POX (10 mg/mL in 100 mM KPP pH 6.0). Inset: Zugehörige Abstandsverteilungsfunktion **B** Zeitabhängigkeit des Gyrationsradius und der molekularen Masse während der Proteolyse durch α -Chymotrypsin. Ansatz: 3 mg/mL *Ec*POX in 100 mM KPP pH 6.0 mit 20 mM MgSO₄, 1 mM ThDP, 200 mM Pyruvat, 5 μ g/mL α -Chymotrypsin. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden SAXS-Messungen gestartet.

Gyrationsradius und molekulare Masse weitgehend unverändert. Wurde Pyruvat zugesetzt, erhöhte sich der Gyrationsradius von 3,95 auf 4,53 nm. Dieses Verhalten steht im Gegensatz zu Resultaten mit *LpPOX*, bei der auch nach Pyruvatzugabe keine Änderung des Gyrationsradius oder der Oligomerstruktur auftrat [167]. Es ist naheliegend, dass die Zunahme des Gyrationsradius der *EcPOX* nach Substratzugabe eine Konsequenz der im vorigen Kapitel beschriebenen Konformationsänderung ist. Wie dort gezeigt, wird nach Reduktion des enzymgebundenen FAD die C-terminale Domäne exponiert. Somit erhöht sich die Partikelgröße, deren Maß bei globulären Proteinen der Gyrationsradius ist, während die molare Masse unverändert bleibt.

Dieser Effekt konnte durch Zugabe einer Protease (α -Chymotrypsin) umgekehrt werden (Abb. 3.30). Die exponierten C-terminalen Domänen wurden abgespalten, was sich in einem reduzierten Gyrationsradius (von R_G 3,95 auf R_G 3,76 nm verringert) und in einer geringeren molaren Masse widerspiegelt. In zeitaufgelösten SAXS-Messungen sollte die Proteolyse abhängig von der Inkubationszeit der Protease beobachtet werden. In Vorversuchen wurde die Proteasekonzentration so angepasst, dass das Zeitfenster für die Aufnahme von SAXS-Streukurven groß genug war (Daten nicht gezeigt). In Abbildung 3.29 B ist die Zeitabhängigkeit des Gyrationsradius bzw. der molekularen Masse während der Proteolyse dargestellt. Nach 15 Minuten war die



Abb. 3.30: Übersicht über die erhaltenen Parameter der SAXS-Messungen. *Ec*POX: nicht-aktiviertes Enzym; *Ec*POX+MAP: nicht-aktiviertes Enzym mit 20 mM MAP; *Ec*POX+Pyr: nicht-aktiviertes Enzym mit 150 mM Pyruvat; *Ec*POX Chymo: Endpunkt nach der Proteolyse mit α -Chymotrypsin; *Ec*POX prot: proteolytisch aktiviertes Enzym.

Proteolyse nahezu abgeschlossen. Dies steht in Übereinstimmung mit den Resultaten der SDS-PAGE. Interessanterweise nahm die molare Masse des proteolytisch aktivierten Enzyms im Vergleich zum nicht-aktivierten stärker ab (45,6 %) als der Gyrationsradius, welcher sich nur um 4,8 % verringerte.

3.2.3 Strukturelle Änderungen während der Reduktion

Die Infrarot-Spektroskopie ist eine sensible Methode, um Strukturänderungen von Proteinen zu detektieren [168][169][170][171]. Besonderes Interesse verdienen strukturelle Änderungen während der Katalyse. Für Redoxenzyme besteht die Möglichkeit, IR-Spektren in Abhängigkeit vom Redoxstatus aufzunehmen und miteinander zu vergleichen [168]. Zu diesem Zweck wurde von Bernad und Mäntele eine Messzelle entwickelt, in der das Redoxpotential verändert und simultan FT-IR-Spektren aufgenommen werden können [93]. Da sich in einem Protein-IR-Spektrum alle Schwingungen der einzelnen Gruppen überlagern und die Zuordnung der Banden zu einzelnen Bindungen schwierig ist, wurde mit Differenzspektren gearbeitet. In diesen Spektren treten nur noch Banden auf, die als Resultat der strukturellen Änderungen während der Redoxreaktion eine Veränderung erfahren.

Oxidiertes FAD liegt in freier Lösung in einer planaren Konformation vor, wodurch die Aromatizität des Isoalloxazinringes vollständig ausgeprägt ist. Während der Reduktion wird der Isoalloxazinring an den Positionen N(1) und N(5) hydrogeniert (Abb. 3.31). Reduziertes Flavin bevorzugt eine um die N(5)-N(10)-Achse geknickte



Abb. 3.31: Chemische Struktur des redoxaktiven Isoalloxazinringes von FAD

Konformation. Durch die zusätzliche Bindung eines Wasserstoffatoms am N(1)- und am N(5)-Atom des FAD infolge der Reduktion und durch die daraus resultierende sp³-Hybridisierung der Stickstoffatome wird der aromatische Zustand aufgehoben. Auch in quantenchemischen Berechnungen konnte gezeigt werden, dass die energieärmste Struktur von reduziertem FAD einen Knick um die N(5)-N(10)-Achse aufweist, während die oxidierte Form des Kofaktors planar ist [172][173][174][175].

In verschiedenen Kristallstrukturen konnten unterschiedliche Konformationen des Isoalloxazinringes beobachtet werden. Oxidiertes FAD liegt in der später beschriebenen *Ec*POX (Kapitel 3.3) und in der *Lp*POX sowie deren Varianten in einer geknickten Konformation vor [62][66][137]. In der *Lp*POX-Variante Phe479Trp weist der Isoalloxazinring in der N(5)-N(10)-Ebene eine Distorsion von 25° auf (PDB: 2EZ4 [162]). Planare Konformationen des Isoalloxazinringes wurden in den Kristallstrukturen von Glukoseoxidase aus *Aspergillus niger* (PDB: 1CF3 [176]) und der D-Aminosäureoxidase aus Hefe (PDB: 1C0I [177]) gefunden. Wille *et al.* konnten die geknickte Konformation des reduzierten FAD in der *Lp*POX auch mit Hilfe von FT-IR-Differenzspektren nachweisen [174]. In Tabelle 3.3 sind die Zuordnungen einiger Banden des Differenzspektrums zu einzelnen Schwingungen der FAD-Bindungen zusammengefasst.

In der *Lp*POX ähnelt das FT-IR-Differenzspektrum hinsichtlich der Bandenlage und Bandenintensität dem des freien Kofaktors FAD. Es sind nur relativ kleine Abwei-

	EcPOX	LpPOX	FAD
ν(S-H)	2561, 2543	_	_
ν(C(4)=O)	1718	1716	1716
ν(C(2)=O)	1687,1669	1696,1680	1692,1674
$\nu(C(4a)=C(10a))$	1600	1600	1600
$\nu(C(4a)=N(5))$	1562	1570	1580
$\nu(C(10a)=N(1))$	1529	1534	1548

Tab. 3.3: Vergleich der Frequenzen der Schwingungen einzelner Gruppen. Die Werte für die *Lp*POX und den freien Kofaktor in Lösung wurden aus [174] entnommen. Alle Zahlenwerte sind als Wellenzahlen (cm^{-1}) angegeben. chungen hinsichtlich der Lage und der Intensität der Banden zu beobachten [174]. In einem Kontrollexperiment, bei dem der Binärkomplex aus Apo-Enzym und ThDP (LpPOX) in der Messzelle reduzierenden Bedingungen ausgesetzt wurde, wurde ein Spektrum erhalten, welches dem Pufferspektrum entsprach. Alle Banden im FT-IR-Differenzspektrum stammen somit vom enzymgebundenen Kofaktor FAD. Im Gegensatz zur LpPOX waren in EcPOX gravierendere Abweichungen von der Spektrumform des freien Kofaktors zu beobachten (Abb. 3.32). So wiesen die Banden bei 1718, 1562, 1529 cm⁻¹ besonders starke Abweichungen vom Spektrum des freien FAD auf. In den gezeigten FT-IR-Differenzspektren sind natürlich nicht nur die Änderungen des Kofaktors, sondern auch der Proteinkomponente enthalten. Änderungen der Bandenlage der Amid-I- und Amid-II-Bande geben Hinweise auf eine Konformationsänderung im Protein, die umfassender ist als nur die Änderung der Konformation des Kofaktors. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den im Abschnitt 3.2.1 beschriebenen Konformationsänderungen. Es wurde dort gezeigt, dass die Reduktion des FAD zu einer Konformationsänderung führt, in deren Folge die C-terminale Lipidbindedomäne exponiert wird.

Ein Vergleich der Pyruvatoxidasen aus den verschiedenen Organismen zeigt deutliche Unterschiede der Bandenlage und -intensität auf (Abb. 3.33). In Tabelle 3.3 ist für eine Auswahl an Schwingungsmoden des FAD die Bandenlage in unterschiedlicher Umgebung zusammengestellt. Sehr ausgeprägte Differenzen sind vor allem für die



Abb. 3.32: Vergleich der IR-Differenzspektren der *Ec*POX mit dem freien Kofaktor FAD. A Das Differenzspektrum der *Ec*POX (ca. 1 mM in 50 mM KPP pH 6.0 und 100 mM KCl) ist in schwarz (–) und das des freien FAD (in 100 mM KPP pH 6.0 und 100 mM KCl) ist in rot (–) dargestellt. Die Spektren wurden anhand der Schwingung der C(10a)=N(1)-Bindung (ν (C(10a)=N(1))) normiert. **B** Vergrößerter Ausschnitt aus Abbildung A.

Valenzschwingung der C(10a)=N(1)-Bindung (ν (C(10a)=N(1))) zu finden. Die Lage der Bande verschiebt sich in der *Ec*POX um 19 cm⁻¹ bezüglich des freien FAD in den kleineren Wellenzahlenbereich. Dies, und die Verschiebung der Valenzschwingungsbande bei 1562 cm⁻¹ (ν (C(4a)=N(5))), deuten auf eine geknickte Konformation des enzymgebundenen reduzierten FAD hin [174]. Diese Vermutung wird durch FT-IR-Messungen an anderen FAD-abhängigen Enzymen (Glukoseoxidase GOX und D-Aminosäureoxidase DAAO) bestätigt. In beiden Enzymen ist keine Verschiebung der Banden im FT-IR-Differenzspektrum zu beobachten [174]. Auch die Kristallstrukturen beider Enzyme geben keine Hinweise auf eine gebogene Konformation des FAD (GOX: [176][178], DAAO: [177]). Eine weitere Bestätigung für das Vorliegen der gebogenen Konformation wurde durch Studien an einer LpPOX-Variante erbracht. Bei dieser wurde ein Valin, welches für die geknickte Konformation des oxidierten FAD verantwortlich gemacht wird, gegen ein Alanin ausgetauscht (Val265Ala). Im FT-IR-Differenzspektrum der *Lp*POX-Mutante war die ν (C(10a)=N(1))-Bande nicht so stark verschoben wie in dem LpPOX-Wildtyp [179] und entsprach somit mehr der planaren Konformation des freien Kofaktors.

Eine Besonderheit von *Ec*POX war eine Änderung der Absorption in der Umgebung von SH-Gruppen (ν (S-H)) während der Reduktion. SH-Gruppen absorbieren bei einer



Abb. 3.33: Vergleich der IR-Differenzspektren der POX aus *E. coli* und *L. plantarum*. Das IR-Differenzspektrum der *Ec*POX (ca. 1 mM *Ec*POX in 50 mM KPP pH 6.0, 100 mM KCl) ist rot (–) und das der *Lp*POX (ca. 1 mM in 100 mM KPP pH 6.0) schwarz (–) abgebildet. Die Spektren wurden anhand der Schwingung der C(10a)=N(1)-Bindung (ν (C(10a)=N(1))) normiert. Der gelb unterlegte Bereich verdeutlicht eine Änderung im Bereich der S-H-Valenzschwingung. Die Amid-I-Bande ist grün und die Amid-II-Bande blau hinterlegt.

Wellenzahl von 2500 cm⁻¹. In der Struktur der *Ec*POX sind in einem Tetramer 40 Cysteine enthalten, wobei Cys74, Cys208 und Cys378 auf Grund der räumlichen Nähe zu FAD interessant sind. Cys208 und Cys212 haben einen Abstand von 4 Å zueinander und sind etwa 14 Å vom N(1)-Atom des Isoalloxazinringes entfernt. Das S-Atom des Cys378 befindet sich in einem Abstand von 10,4 Å vom N(1)-Atom des Isoalloxazinringes. Cys74 liegt zwischen ThDP und FAD, wobei der Abstand zum C(2)-Atom des Thiazoliumringes 8,3 Å und zum N(1) des Isoalloxazinringes 13 Å beträgt. Welches dieser drei Cysteine das Signal bei 2550 cm⁻¹ liefert oder ob ein anderes Cystein betroffen ist, konnte nicht geklärt werden. Dafür wären Mutationsstudien erforderlich. Leider können keine Aussagen im Vergleich zu *Lp*POX getroffen werden, da bisher keine FT-IR-Spektren in dem relevanten Wellenzahlenbereich (2500-2600 cm⁻¹) vorliegen.

3.2.4 Zusammenfassung

In diesem Abschnitt wurden die während der Katalyse stattfindenden Konformationsänderungen dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass eine Addition von Substrat oder Substratanalogon an ThDP zu einer Konformationsänderung führt, die die Abspaltung des β -Peptides verhindert. Reduktion des enzymgebundenen FAD führt zur Exponierung der Lipidbindedomäne. Mit dieser strukturellen Änderung wird die physiologisch erforderliche Anlagerung des Enzyms an die Membran ermöglicht. Nur dadurch können die Elektronen vom reduzierten Flavin auf die Atmungskette übertragen werden.

Die Exponierung der Lipidbindedomäne konnte darüberhinaus durch Röntgenkleinwinkelstreuexperimente bestätigt werden. Substratzugabe ruft eine Vergrößerung des Gyrationsradius hervor, was auf eine Oberflächenvergrößerung des Tetramers schließen lässt. Die molare Masse bleibt jedoch konstant.

Schließlich konnten Konformationsänderungen während der Reduktion mittels redoxinduzierter FT-IR nachgewiesen werden. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass der enzymgebundene reduzierte Kofaktor um die N(5)-N(10)-Achse stärker geknickt ist als das enzymgebundene oxidierte FAD. Hierdurch wird das Redoxpotential erhöht, was die Elektronenübertragung auf das FAD thermodynamisch und kinetisch erleichtert.

3.3 Strukturelle Charakterisierung der Pyruvatoxidase aus E. coli

Zur Aufklärung der Struktur im atomaren Detail wurde die Pyruvatoxidase aus *E. coli* kristallisiert und die Kristallstruktur mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse bestimmt. Es konnten die Raumstrukturen des nicht-aktivierten und des proteolytisch aktivierten Enzyms sowie mehrere Strukturen mit gebundenen Intermediaten gelöst werden (siehe Abschnitt 3.3.4).

3.3.1 Kristallstuktur der nicht-aktivierten EcPOX

Nicht-aktivierte *Ec*POX kristallisierte mit 2 Monomeren in der asymmetrischen Einheit in der tetragonalen Raumgruppe P4₃2₁2. Die Auflösung betrug 2,9 Å (Tab. A.4) und es konnten die Positionen aller Aminosäuren (2–572) der Monomere (A und B) bestimmt werden. Bemerkenswert sind die über die gesamte Struktur hohen Temperaturfaktoren (B-Faktoren) (Wilson B-Faktor 73 Å²), das Protein ist also sehr flexibel. Besonders hoch sind die B-Faktoren in einem flexiblen *loop* über dem aktiven Zentrum (466–478). Die C(α)-Atome dieses Bereichs haben einen B-Faktor von über 130 Å² (Abb. A.12). Auch die C-terminalen Reste (566–572) weisen höhere B-Faktoren auf. Dennoch sind die Reste für eine Strukturbestimmung hinreichend gut definiert, wie mit Hilfe einer *omit-map* (Elektronendichtekarte ohne Einfluss des Modells) bestätigt werden konnte (Abb. A.9).

Die Pyruvatoxidase aus *E. coli* ist ein homotetrameres Enzym (Abb. 3.34 A). Die Kofaktoren ThDP und FAD sind an der Kontaktfläche zweier Dimere gebunden (Abb. 3.34 C), so dass die kleinste funktionelle Einheit ein Dimer darstellt. Jeweils zwei



Abb. 3.34: Quartärstruktur der nicht-aktivierten Pyruvatoxidase aus *E. coli.* **A** Aufsicht **B** Tetramer um 90° um die x-Achse gegenüber Abb. A gedreht. **C** Positionierung der Kofaktoren ThDP und FAD im Tetramer.

dieser Dimere, welche um 62 $^\circ$ gegeneinander verdreht sind (Abb. 3.34 B), bilden ein Tetramer.

Obwohl die Sequenzhomologie ThDP-abhängiger Enzyme im allgemeinen sehr gering ist (teils unter 20 %), sind sich die Monomere einander topologisch sehr ähnlich. Ein Monomer besteht in der Regel aus 3 Domänen, wobei jede Domäne 6 β -Faltblätter enthält, die von 5 bis 6 α -Helices umgeben sind. Die im folgenden vorgenommene Einteilung der Domänen der *Ec*POX erfolgt in Anlehnung an Muller *et al.* [66]. Die PYR-Domäne (Reste 2–172) bindet den Pyrimidinring des Thiamindiphosphates, die FAD-Domäne (188–323) bindet den zweiten Kofaktor, das FAD, und die PP-Domäne (358– 530) bindet, unterstützt durch ein Magnesium-Ion, den Diphosphatanker des Thiamindiphosphats (Abb. 3.35). Im Unterschied zu anderen ThDP-abhängigen Enzymen verfügt das Monomer der *Ec*POX über eine weitere Domäne. Diese wird als Membrananker (531–572) bezeichnet. Sie besteht aus einer Helix, die das aktive Zentrum der nicht-aktivierten *Ec*POX bedeckt und einem sich anschließenden antiparallelen β -Faltblatt. Die letzten 8 Seitenketten weisen keine definierte Sekundärstuktur auf. Mit dieser kurzen C-terminalen Domäne kann das Enzym an die Membran binden [55].

An der Bindung je eines FAD-Moleküls sind nur Seitenketten einer Untereinheit beteiligt, während jedes ThDP-Molekül von je 2 verschiedenen Monomeren koordiniert wird. Das ThDP wird von der PYR-Domäne und der PP-Domäne benachbarter Untereinheiten gebunden (Abb. 3.36 und A.11 A). Wie auch in anderen ThDP-abhängigen Enzymen, ist in der *Ec*POX das ThDP in der typischen V-Konformation gebunden [62] [146][180][181]. In dieser Konformation befindet sich die 4'-Aminogruppe in räumlicher Nähe zum reaktiven C(2)-Atom des Thiazoliumringes. Diese Konformation



Abb. 3.35: Struktur eines Monomers der Pyuvatoxidase aus *E. coli*. Folgende Farbcodierung wurde verwendet: α -Helices, β -Faltblätter, *loop*-Strukturen, Membrananker.


Abb. 3.36: Darstellung ausgewählter Aminosäurereste des aktiven Zentrums der Pyruvatoxidase aus *E. coli*. Orange ist die Untereinheit A und blau die Untereinheit B dargestellt. ThDP wird von beiden Untereinheiten gebunden. Das Magnesium-Ion ist pink gekennzeichnet. Relevante Wasserstoffbrückenbindungen sind mit grau gestrichelten Linien gezeigt.

wird durch die hydrophobe Seitenkette eines Methionins (Met408) unterstützt, welche sich als Keil zwischen die beiden Ringe des Kofaktors schiebt. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, ist die V-Konformation des ThDP entscheidend für dessen katalytische Funktion im Enzym (Abschnitt 1.3).

Der Adenosinmonophosphat-Anker des zweiten Kofaktors, FAD, wird über einen Rossmann-*fold* fest, aber nicht kovalent, an das Enzym gebunden [38]. Dieser ist typisch für die Bindung von Molekülen, die einen Nukleotid-Baustein aufweisen, wie etwa NADH, ATP und FAD. Der Rossmann-*fold* wird aus 6 parallelen β -Faltblättern, die von α -Helices unterbrochen werden, gebildet. Er ist aus 2 symmetrischen Hälften, $\beta_1\alpha_1\beta_2\alpha_2\beta_3$ und $\beta_4\alpha_4\beta_5\alpha_5\beta_6$, aufgebaut. Dabei sind β_3 und β_4 im allgemeinen durch eine Helix (α_3) miteinander verbunden. In *Ec*POX besteht der Rossmann-*fold* jedoch nur aus 5 β -Faltblättern. Die beiden Hälften sind direkt miteinander verbunden ($\beta_1\alpha_1\beta_2\alpha_2\beta_3/\beta_4\alpha_3\beta_5$) [49][62]. Die zwei Methylgruppen des leicht gebogenen Isoalloxazinringes (15° Biegung um die N(5)–N(10)-Achse) weisen in die Richtung des ThDP, welches 11 Å (ThDP(C2)-FAD(N5)) entfernt ist (Abb. A.11 B). Die Krümmung des Ringes wird durch Ile254 induziert, welches die Funktion von Val265 in der *Lp*POX übernimmt [179][182]. Oxidiertes Flavin sollte aufgrund der ausgedehnteren Delokalisation der Elektronen in einer planaren Konformation vorliegen [172]. Die gefundene

gebogene Konformation zeigt, dass die Proteinkomponente einen Druck auf den Kofaktor ausübt, wodurch das Redoxpotential beeinflusst werden kann [183]. Auch in der verwandten *Lp*POX ist das oxidierte FAD nicht in der planaren Form gebunden, in der Variante Phe479Trp beträgt die Biegung 28° (PDB: 2EZ4 [162]). In anderen Flavoproteinen, wie zum Beispiel Glukoseoxidase, liegt das FAD (und auch das FADH₂) permanent in einer planaren Konformation vor [178].

Das aktive Zentrum der nicht-aktivierten *Ec*POX wird vorwiegend aus hydrophoben Aminosäuren, die von zwei verschiedenen Untereinheiten stammen, gebildet (Abb. 3.36). Auf der einen Seite kleiden Phe112, Gln113, Val380, Met408 sowie die zwei Methylgruppen des Isoalloxazinringes das aktive Zentrum aus. Auf der gegenüberliegenden Seite sind Asp27 und Thr25 positioniert. In Übereinstimmung mit dem Breslow-Mechanismus [51], der allen ThDP-abhängigen Enzymen zu Grunde liegt, sollte die Katalyse in hydrophoben Umgebungen erleichtert sein. Crosby *et al.* haben gezeigt, dass die Decarboxylierung von Laktylthiazoliumderivaten in unpolaren Lösungsmitteln begünstigt ist [184][185]. Auch in anderen ThDP-abhängigen Enzymen wurden hydrophobe aktive Zentren gefunden (PDC:[186], GCL:[187]).

Die Struktur der C-terminalen Domäne konnte vollständig bestimmt werden (Abb. 3.37). Die 23 C-terminalen Aminosäuren werden als α -Peptid bezeichnet und sind rot dargestellt. Sie vermitteln die Membranbindung [72][188]. Im nicht-aktivierten Enzym weisen die neun C-terminalen Aminosäurereste keine definierte Sekundär-



Abb. 3.37: Darstellung der C-terminalen Domäne der nicht-aktivierten Pyruvatoxidase aus E. coli. In orange, blau und grün sind die verschiedenen Untereinheiten dargestellt. Das von der Protease abspaltbare α -Peptid wurde rot hervorgehoben. Alle relevanten Wasserstoffbrückenbindungen sind grau gestrichelten mit Linien dargestellt.

struktur auf. Zwischen den Resten 552–555 und 560–565 wird ein antiparalleles *β*-Faltblatt aufgebaut. N-terminal zum *α*-Peptid schließen sich eine *α*-Helix (536–544) und ein *β*-Faltblatt (531–534) an. Die Stabilisierung der Domäne wird über ein *half barrel*-Motiv gewährleistet. Vier *β*-Faltblätter (467–469, 531–534, 552–555, 560–564) bilden untereinander Wasserstoffbrückenbindungen aus. Sie werden von weiteren Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Asparagin 537 und Glutamat 564, Serin 556 und Aspartat 560, sowie Aspartat 348 und Arginin 558 fixiert. Dieser Membrananker (Reste 531-572) verschließt das aktive Zentrum der nicht-aktivierten *Ec*POX. Die Zugänglichkeit des aktiven Zentrums für Substrat- und Analogamoleküle ist daher in diesem Zustand vermindert. Hierzu korreliert der für die nicht-aktivierte *Ec*POX gemessene hohe *K*₁-Wert für die primäre Substratbindung (*K*₁ = 665,9 mM). Nach proteolytischer Aktivierung liegt der *K*₁-Wert erheblich niedriger (*K*_{1 Δ23} = 39,9 mM).

Kooperativität ist in der Familie der ThDP-abhängigen Enzyme weit verbreitet. Man kann dabei zwischen positiver und negativer Kooperativität unterscheiden. Von positiver Kooperativität spricht man unter anderem dann, wenn die Bindung eines Moleküls an einem Zentrum die Bindung eines anderen Moleküls an anderer Stelle begünstigt. Bei negativer Kooperativität wird die zweite Bindung behindert oder ganz unterdrückt. Im Extremfall liegt ein aktives Zentrum aktiv vor, während sich das andere in Warteposition befindet. Physiologisch wäre diese Regulation für die *Ec*POX gut vorstellbar, denn nach der Reduktion des Flavins wird die C-terminale Domäne exponiert, wobei jeweils zwei Domänen gemeinsam die Lipdbindung vermitteln [189]. Wird somit auf einer Seite des Enzyms die Exponierung der Membranbindedomäne induziert, dann sollte auf der gegenüberliegenden cytosolischen Seite keine Exponierung stattfinden (Abb. 3.38). Eine derart komplexe Regulation erfordert eine Kom-



Abb. 3.38: Membranbindung der *Ec*POX.

Orange und blau sind die jeweiligen katalytisch aktiven Dimere der nicht-aktivierten *Ec*POX dargestellt. Eine "Kommunikation" der Monomere in einem katalytisch aktiven Dimer könnte zu einer Inhibierung der Exponierung der cytosolisch exponierten Lipidbindestelle führen. munikation zwischen zwei aktiven Zentren eines funktionalen Dimers. Frank *et al.* haben in der PDH-E1-Komponente einen polaren, mit Wasser gefüllten, Kanal zwischen zwei aktiven Zentren gefunden [143]. Es wurde postuliert, dass dieser eine Kommunikation beider aktiver Zentren ermöglicht. Diese findet wahrscheinlich über ein Proton statt, welches für die Aktivierung des ThDP eine entscheidende Rolle spielt (Abschnitt 1.3). Seifert *et al.* haben in kinetischen Studien Halbzentrenaktivität an der E1-Komponente der humanen PDH demonstriert [155]. Andere ThDP-abhängige Enzyme weisen rudimentäre Protonenkanäle auf, jedoch ist deren Funktionsfähigkeit wohl oft nicht gegeben [190].

In *Ec*POX liegt ein vollständiger und damit potentiell funktionaler Protonenkanal vor (Abb. 3.39). Er wird von Glutamat 50 und 51 sowie den Histidinen 49 und 80 zweier Untereinheiten eines funktionalen Dimers gebildet. In diesem Kanal sind zudem mehrere Wassermoleküle lokalisiert. Die beteiligten Reste sind in der Lage untereinander Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden und somit einen Transfer von Protonen zu ermöglichen.

Die Kristalle der nicht-aktivierten *Ec*POX waren sehr empfindlich gegenüber mechanischer Beanspruchung und gegenüber Temperaturschwankungen. Eine mögliche Ursache ist der hohe Wassergehalt (65,3 %) im Kristall. Auch der Matthews-Koeffizient, der das Verhältnis des Volumens der Einheitszelle zur molaren Masse beschreibt, liegt höher als bei anderen Proteinen (2,15 Å³/Da, [191]). Er beträgt für die nicht-aktivierte *Ec*POX 3,55 Å³/Da. Die Temperaturfaktoren, die die Unsicherheiten in der Lagebe-



Abb. 3.39: Protonenkanal zwischen zwei Monomeren eines katalytisch aktiven Dimers der *Ec*POX. Die an der Ausbildung des Protonenkanals beteiligten Aminosäureseitenketten sind entsprechend ihrer Zugehörigkeit zu den Untereinheiten rosa und grün dargestellt. Die gestrichelten Linien kennzeichnen Abstände, die unter 3,5 Å liegen. Wasser wurde als Kugel dargestellt.

stimmung von einzelnen Atomen beschreiben, waren in der nicht-aktivierten EcPOX sehr hoch (Wilson B 72,9 \AA^2). Möglicherweise liegt die hohe Flexibilität in einem ausgedehnten Hohlraum im Inneren des Enzymmoleküls begründet. Die typische Packungsdichte von Proteinen entspricht etwa der eines kristallinen Feststoffs. Andererseits verkraftet die Proteinkomponente die Einführung von Mutationen ohne Änderungen in der globalen Struktur. Es muss somit in einem Protein genügend Platz für die Einführung größerer Reste sein. Dies spricht eher für eine Struktur, die eine Ähnlichkeit zu Flüssigkeiten aufweist [192]. Die Berechnung von Hohlräumen innerhalb eines Proteins oder von Einstülpungen an der Proteinoberfläche kann nach verschiedenen Algorithmen erfolgen. Für die folgenden Untersuchungen wurde das Programm CASTP [193] genutzt, wobei der Probenradius 1,4 Å betrug. Es konnte gezeigt werden, dass in der nicht-aktivierten EcPOX ein sehr großer Hohlraum mit einem Volumen von 29738 Å³ existiert (Abb. 3.40). Im Vergleich mit anderen ThDP-abhängigen Enzymen zeigt sich, dass auch in der verwandten LpPOX ein großer Hohlraum (29400 $Å^3$) existiert. In der E1-Komponente des menschlichen PDH-Komplexes (*h*PDH-E1) und in der PDC aus Zymomonas mobilis (ZmPDC) konnten keine Hohlräume, sondern nur Einstülpungen an der Proteinoberfläche mit bedeutend kleineren Volumina (*h*PDH-E1 3462 Å³) gefunden werden. Der Hohlraum in der *Ec*POX verbindet die aktiven Zentren miteinander, die sich im Tetramer gegenüber liegen. Es handelt sich also nicht um die aktiven Zentren des funktionalen Dimers, sondern um diejenigen aktiven Zentren, die jeweils der Membran zugewandt sind.

Ob diesem Hohlraum eine definierte Funktion zukommt, ist unbekannt. Für die *Ec*-POX könnte mit aller Vorsicht vermutet werden, dass über ihn eine "Kommunikation" stattfindet. An einem aktiven Zentrum bindet ein Pyruvat, FAD wird reduziert und die Lipidbindedomäne wird exponiert. Über den Protonenkanal könnte eine Inhibierung des gegenüberliegenden aktiven Zentrums erfolgen, so dass die Lipidbindedomäne auf der cytosolischen Seite nicht exponiert wird. Durch den Hohlraum könnte dann ein Informationstransfer erfolgen, der das gegenüberliegende aktive Zentrum inhibiert. Durch den Protonenkanal könnte das korrespondierende aktive Zentrum (welches nun der Membran zugewandt ist) aktiviert werden. Durch diese Regulation wäre eine nahezu gleichzeitige Exponierung der Lipidbindedomänen auf der Membran zugewandten Seite gegeben. Kinetisch wäre bei einem solchen Mechanismus ein Wechselspiel von positiver und negativer Kooperativität zu erwarten. Empirisch wird eine leichte positive Kooperativität gefunden, die als Resultat eines komplexen Regulationsmechanismus interpretierbar ist. Chang & Cronan konnten zeigen, dass an der Membranbindung *in vivo* zwei C-terminale Domänen beteiligt sind [189].



Abb. 3.40: Darstellung des lösungsmittelunzugänglichen Hohlraumes in der Struktur der nicht-aktivierten *EcPOX*. A Darstellung des Hohlraumes in der Struktur des nicht-aktivierten Enzyms. Aminosäurereste, die an der Ausbildung des Hohlraumes beteiligt sind, wurden als Kugeln dargestellt. Reste, die für die Ausbildung des Protonenkanals verantwortlich sind, sind grün markiert. In den Abbildungen darunter sind unterschiedliche Orientierungen des Enzyms zur besseren Visualisierung gezeigt. **B** Separate Darstellung des Hohlraumes in derselben Orientierung wie in Abbildung A. **C** Illustration der Lage des Protonenkanals, welcher zwischen zwei Monomeren eines katalytisch aktiven Zentrums liegt. Der Hohlraum wird somit nicht von einem funktionalen Dimer gebildet, sondern von Untereinheiten, die sich gegenüber liegen. Die Hohlräume wurden mit CASTP [193] berechnet und mit Hilfe eines Plugins in PYMOL dargestellt.

3.3.2 Kristallstruktur der **A23-Variante** der *Ec*POX

Die proteolytisch aktivierte Pyruvatoxidase aus *E. coli* (*Ec*POX_{$\Delta 23$}) kristallisierte in der orthorhombischen Raumgruppe P2₁2₁2₁ und konnte mit einer Auflösung von 2.5 Å gelöst werden [91]. Die Phasen wurden mittels *molecular replacement* unter Zugrundelegung des Modells der nicht-aktivierten *Ec*POX als Suchmodell bestimmt. In der asymmetrischen Einheit befinden sich 12 Monomere, die 3 katalytisch aktive Tetramere bilden. In der $\Delta 23$ -Variante konnten nicht alle Aminosäurereste aufgelöst werden. So fehlen ein *loop* über dem aktiven Zentrum (467–477) sowie Reste des C-Terminus. Zusätzlich zu den 23 Resten, die von der Protease abgespalten wurden, fehlen C-terminal in der Struktur 10 Aminosäuren (539-549). Sie sind wahrscheinlich sehr flexibel und deshalb nicht sichtbar.

Die Gesamtstruktur der proteolytisch aktivierten *Ec*POX entspricht im Wesentlichen der Struktur des nicht-aktivierten Enzyms, wobei die B-Faktoren kleiner sind (Abb. A.13). Wie erwartet, repräsentiert die Struktur der *Ec*POX_{$\Delta 23$} einen eingefrorenen Zustand nach einer Konformationsänderung. Das aktive Zentrum ist nach der proteolytischen Aktivierung besser zugänglich. Im Inneren der proteolytisch aktivierten *Ec*POX befindet sich wie im nicht-aktivierten Enzym ein großer Hohlraum. Aufgrund des Fehlens der C-terminalen Reste ist der Hohlraum in der $\Delta 23$ -Variante geringfügig kleiner (20931 Å³).

3.3.3 Vergleich der nicht-aktivierten *Ec*POX und der \triangle 23-Variante der *Ec*POX

Die Kristallstrukturen der proteolytisch aktivierten (*Ec*POX_{$\Delta 23$}) und der nicht-aktivierten *Ec*POX sind sich global sehr ähnlich (r.m.s.d. der C(α)-Atome des Tetramers 0.346 Å). Die $\Delta 23$ -Variante ist kompakter aufgebaut als die nicht-aktivierte *Ec*POX, was die SAXS-Experimente bestätigt (Abschnitt 3.2.2). Die Abstände der Aminosäurereste im aktiven Zentrum werden dadurch nicht beeinflusst. Ein Unterschied zwischen den beiden Strukturen sind natürlich die fehlenden C-terminalen 23 Aminosäuren und der *loop* (467–477) über dem aktiven Zentrum der *Ec*POX_{$\Delta 23$}. Dieser *loop* zeichnet sich auch in der nicht-aktivierten *Ec*POX durch hohe Temperaturfaktoren aus, was dessen Flexibilität unterstreicht.

In der Übereinanderlagerung der aktiven Zentren beider Strukturen wird deutlich, dass sich die Position und Orientierung der meisten Aminosäuren nach der proteolytischen Aktivierung nicht verändert hat (Abb. 3.41). Eine wesentliche Ausnahme hiervon stellt die Position von Phe465 dar, welches sich in der proteolytisch aktivierten



Enzymspezies 6 Å näher am C(2)-Atom des ThDP befindet. Da Phenylalanin als potentieller Überträger von Elektronen in Frage kommt, ist es wahrscheinlich, dass die veränderte Position dieser Seitenkette einen Beitrag zum katalytisch wirksamen Unterschied zwischen aktivierter und nicht-aktivierter Enzym-Form leistet. Es ist wahrscheinlich, dass das "Einschwenken" des Phe465 zwischen die beiden Kofaktoren dazu beiträgt, dass der ET auch in der aktivierten Spezies deutlich schneller als die C-C-Bindungsbildung erfolgt. Dieser Schluss wird durch die *Lp*POX weiter unterstützt. Dieses Enzym zeigt keine Aktivierung, so dass es permanent zu einem effizienten Elektronentransfer in der Lage sein muss. Das konservierte Phe479 in der *Lp*POX befindet sich an derselben Position wie Phe465 im aktivierten Zustand der *Ec*POX (Abb. 3.51 A). Ein Austausch dieses Restes in der *Lp*POX (Phe479Trp, Phe479Tyr) führte zu deutlich verminderten Elektronentransferraten [194]. Für eine ausführlichere Behandlung dieses Themas wird auf Abschnitt 3.4 verwiesen.

Der Isoalloxazinring des Flavins weist in der $EcPOX_{\Delta 23}$ eine stärkere Biegung um die N(5)-N(10)-Achse auf. In der nicht-aktivierten EcPOX betrug der Krümmungswinkel 15°, in der $\Delta 23$ -Variante 19°, wobei bei der Bestimmung des Beugewinkels Unsicherheiten aufgrund der begrenzten Auflösung bestehen (Abb. A.14). In anderen Studien an Flavoproteinen zeigte sich, dass die Krümmung des FAD um die N(5)-N(10)-Achse vermutlich einen Einfluss auf das Redoxpotential hat. Da reduziertes FAD bereits im freien Zustand einen Knick um die N(5)-N(10)-Achse aufweist, führt

die durch Kofaktor-Protein-Wechselwirkungen bedingte geknickte Konformation des oxidierten Zustandes zur relativen Destabilisierung des letzteren und mithin zur Erhöhung des Redoxpotentials [195][196]. Die Bestimmung des Redoxpotentials (Kapitel 3.1.8) bestätigt diesen Zusammenhang. Das Redoxpotential erhöht sich nach proteolytischer Aktivierung um 100 mV (*EcPOX*: -170 mV, *EcPOX*_{$\Delta 23$}: -73 mV).

Auch die Struktur der C-terminalen Domäne (Reste 531-572), die in der nicht-aktivierten Form das aktive Zentrum verschließt, verändert sich durch die proteolytische Aktivierung (Abb. 3.42). Die Struktur der Δ 23-Variante ist bis zum Aminosäurerest 539 definiert. Ab Position 531 zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen nichtaktivierter und aktivierter EcPOX hinsichtlich der Lage der Reste. Das kurze Faltblatt (Rest 531–534) fehlt in der Struktur der ∆23-Variante. Die Reste 531 bis 539 liegen als *loop* vor. Somit ist insbesondere die α -Helix (Reste 536–544), die im nicht-aktivierten Zustand das aktive Zentrum verschließt, in der Δ23-Variante nicht ausgeprägt. Die Cterminalen Reste der proteolytisch aktivierten EcPOX sind nicht mehr in räumlicher Nähe zum aktiven Zentrum lokalisiert. Dies zeigt, dass die Öffnung des aktiven Zentrums zum Lösungsmittel hin das entscheidende Ereignis für die Aktivierung des Enzyms ist. Da die Reste der, das aktive Zentrum ursprünglich blockierenden Helix (Reste 536-544), im aktivierten Zustand größtenteils nicht mehr aufgelöst werden können, ist für dieses Strukturelement mit einem Helix-Coil-Übergang zu rechnen. Dieser Prozess ist wahrscheinlich ein wichtiger Teilschritt der substratgetriebenen Aktivierung. Damit ist es möglich, der in Abschnitt 3.1 diskutierten Konformationsänderung (Schritt k_5 in Abb. 3.15) eine strukturelle Grundlage zuzuweisen. Da Helix-Coil-Übergänge sehr schnell erfolgen können (10⁴-10⁷ s⁻¹, [197][198][199]) kann



Abb. 3.42: Darstellung der C-terminalen Domäne der nicht-aktivierten und der aktivierten *Ec*POX. In gelb sind die Reste der nicht-aktivierten *Ec*POX und in grün die der proteolytisch aktivierten *Ec*POX dargestellt.

dieser Prozess nicht geschwindigkeitsbestimmend für die substratgetriebene Aktivierung sein. Nach Abspaltung des α -Peptides werden zudem verstärkt hydrophobe Bereiche an der Proteinoberfläche exponiert (Abb. A.10), was die Assoziation an die Membran begünstigt.

3.3.4 Kristallstruktur in Gegenwart von Liganden

Mit Hilfe der Kryokristallographie (Datenaufnahme bei Temperaturen von 100 K) war es möglich Kristallstrukturen mit gebundenen Substraten oder substratanalogen Verbindungen und den dazugehörigen Intermediaten aufzulösen. Es wurden die Strukturen der nicht-aktivierten und der $\Delta 23$ -Variante jeweils mit Pyruvat und mit Methylacetylphosphonat (MAP) bestimmt. Eine Zusammenfassung der Statistiken der Datenaufnahme und der Modellierung ist in Tabelle A.4 auf Seite 185 gezeigt. Allgemein gilt, dass die Intermediatsstrukturen beim aktivierten Enzym besser aufgelöst sind, da die C-terminale Domäne keiner Konformationsänderung unterliegt, die die Integrität des Kristalls hätte beeinträchtigen können.

Die Strukturen der Intermediatkomplexe zeigen hinsichtlich der Proteinkomponente gegenüber dem nativen Enzym keine signifikanten Abweichungen. Die Positionen der C(α)-Atome stimmen bis auf 0,58 Å miteinander überein. Die Bindung von Substraten oder Substratanaloga hat somit keinen Einfluss auf die globale Struktur und die Ergebnisse können gut miteinander verglichen werden.

Zunächst werden die höher aufgelösten Intermediatkomplexe im aktivierten Enzym behandelt. Nach Inkubation von Kristallen der aktivierten *Ec*POX mit MAP konnte in allen 12 Monomeren (Untereinheiten A–L) der asymmetrischen Einheit Phosphonolaktyl-ThDP in der S-Konfiguration als Additionsprodukt am ThDP identifiziert werden. Abbildung 3.43 zeigt die Ausrichtung des PL-ThDP durch eine 3-Zentren-Bindung. In Analogie zur *Lp*POX (r.m.s.d. der C(α)-Atome des Dimers=1.9 Å) tragen folgende Gruppen zur Stabilisierung des Intermediates bei [162]: Die Hydroxylgruppe des C(α)-Atoms des PL-ThDP wird mittels Wasserstoffbrückenbindungen direkt von Gln113 (*Lp*POX:Gln122) und der Aminogruppe des Aminopyrimidinringes des ThDP positioniert. Desweiteren findet eine indirekte Stabilisierung der OH-Gruppe über ein Wassermolekül statt, welches seinerseits mit Ser73 interagiert.

Als zweites Zentrum fungiert der unpolare Methylrest des PL-ThDP. Dieser wird, wie in *Lp*POX, in einer hydrophoben Tasche gebunden, die aus den Aminosäureresten Phe112, Val380 und Phe465 sowie dem Dimethylring des Isoalloxazinringes des FAD



Abb. 3.43: Bindung des PLThDP in der aktivierten PLThDP EcPOX. wird im aktivierten Enzym über eine 3-Zentren-Bindung fixiert. Erläuterungen im Text. Zur besseren Visualisierung wurden Phe112 und FAD nicht gezeigt. Wassermoleküle sind als Kugeln dargestellt. Die gestrichelten Linien verdeutlichen Wasserstoffbrückenbindungen. Die Elektronendichte (omit-map) des PLThDP wurde mit 2.5 σ konturiert.

gebildet wird. Mit Hilfe von Mutationsstudien konnte für den Valin-Rest (Val380) eine Beteiligung an der Substratbindung gezeigt werden [200].

Die Phosphonat-Gruppe des Substratanalogons wird unmittelbar über Wasserstoffbrücken zum Proteinrückgrat des Asp27 sowie über Wassermoleküle zum Ser28 und zum Gln113 senkrecht zur Ringebene des Thiazoliumringes orientiert. Eine senkrechte Orientierung der Carboxylatgruppe im nativen Intermediat Laktyl-ThDP würde die Abspaltung des Kohlendioxids begünstigen, da das Elektronenpaar der heterolytisch zu spaltenden Bindung so bereits im Übergangszustand mit dem π -Elektronensystem des Thiazoliumringes in Konjugation treten kann. Somit wird das prä-Decarboxylierungsintermediat vom Enzym in einer reaktionskompetenten Konformation gebunden. Die Decarboxylierung unterliegt einer stereoelektronischen Kontrolle.

Die räumliche Lage der Methoxy-Gruppe des Phosphonat-Restes konnte in der vorliegenden Struktur nicht genau bestimmt werden. Da die Methoxy-Gruppe im nativen Substrat Pyruvat keinerlei Entsprechung hat, sind auf Seiten des Enzyms auch keine Reste vorhanden, die die Ausrichtung dieser Gruppe spezifisch unterstützen könnten. Vermutlich kann sich der Rest um die $C(\alpha)$ -P-Bindung frei drehen, wodurch eine über mehrere Orientierungen gemittelte Elektronendichte resultiert.

Interessanterweise ist im Abstand von 3,2 Å eines Sauerstoff-Atoms der Phosphonat-Gruppe in einigen Untereinheiten (A,G,H,I,K) ein Oxoanion positioniert, welches in Analogie zur Struktur der *Lp*POX als Phosphat-Ion ausgewiesen wurde. Auch die anderen Untereinheiten zeigen an dieser Position zumeist positive Differenzelektronendichte, die jedoch zu diffus ist, um einem Phosphat-Ion zugeordnet zu werden. Durch die Bindung des Phosphat-Ions werden Wasserstoffbrücken zur Phosphonat-Gruppe des PL-ThDP ausgebildet. Die Koordination eines Phosphat-Ions im aktiven Zentrum der *EcPOX* wird a priori nicht erwartet, da hier die Produktabspaltung hydrolytisch erfolgt. In der verwandten *LpPOX* wird durch ein Phosphat-Ion, das an der gleichen Position lokalisiert ist, Acetylphosphat phosphorolytisch vom Acetyl-ThDP abgespalten [92]. Die Stabilisierung des Phosphat-Ions erfolgt in der *LpPOX* durch Glu483. Ein Austausch des Glutamatrestes in wahlweise ein Glutamin oder ein Alanin machte einen Einfluss dieses Restes auf die Substrat- und Phosphatbindung deutlich [201][202]. In *EcPOX* ist Glu483 nicht konserviert. In vergleichbarer räumlicher Nähe ist in *EcPOX* ein Aspartat der anderen Untereinheit (Asp27) positioniert. Durch die distorsierte Orientierung der Seitenkette ist möglicherweise die Ausrichtung des Phosphat-Ions etwas verändert, so dass in *EcPOX* keine Phosphorolyse stattfinden kann.

Nach der Inkubation von Kristallen der aktivierten *Ec*POX mit Pyruvat ergab sich ein anderes Bild. Aufgrund der Größe der Einheitszelle ($201,83 \times 205,81 \times 214,27$ Å³) und der Tatsache, dass die asymmetrische Einheit 12 Monomere enthält, wurde in den aktiven Zentren keine einheitliche Intermediatbesetzung gefunden. Die Lösungsmittelzugänglichkeit der aktiven Zentren ist durch die Packung der Untereinheiten im Kristall beeinträchtigt.



Abb. 3.44: Bindung des LThDP in der aktivierten EcPOX. LThDP wird im aktivierten Enzym (Kette K) über eine 3-Zentren-Bindung fixiert. Erläuterungen dazu im Text. Zur besseren Visualisierung wurden Phe112 und FAD nicht dargestellt. Wassermoleküle sind als Kugeln dargestellt. Die gestrichelten Linien verdeutlichen Wasserstoffbrückenbindungen. Die Elektronendichte $(2F_o-F_c)$ des LThDP wurde mit 1.2 σ konturiert.

	Tetramer 1		Tetramer 2		Tetramer 3	
A	HEThDP + Pyr	E	ThDP + Pyr	Ι	ThDP + Pyr	
B	HEThDP + Pyr	F	ThDP + Pyr	J	ThDP + Pyr	
C	LThDP	G	HEThDP + Pyr	K	LThDP	
D	HEThDP + Pyr	Η	ThDP + Pyr	L	LThDP	

Tab. 3.4: Intermediatbesetzung der aktiven Zentren der aktivierten *Ec*POX nach Inkubation mit Pyruvat

In drei Untereinheiten (Kette C,K,L) wurde Laktyl-ThDP gefunden (Abb. 3.44). Die Ausrichtung des LThDP im aktiven Zentrum erfolgt in Analogie zum PLThDP über eine 3-Zentren-Bindung. Die Hydroxyl-Gruppe, die Methyl-Gruppe und die Carboxylat-Gruppe werden in vergleichbarer Weise direkt oder indirekt über Wassermoleküle im aktiven Zentrum fixiert. Die Ausbildung einer hydrophoben Umgebung ist, neben der senkrechten Ausrichtung der Carboxylat-Gruppe, ein wichtiger Beitrag zur Triebkraft der Decarboxylierung. Das ungeladene Kohlendioxid-Molekül diffundiert im hydrophoben Milieu leichter aus dem Proteininneren heraus und verhindert somit unter anderem eine Rückreaktion.

Die anderen 9 Untereinheiten weisen unterschiedliche Intermediatbesetzungen auf (Tab. 3.4). In 4 Untereinheiten konnte die positive Differenzelektronendichte vor dem C(2)-Atom des ThDP nicht befriedigend durch das Vorliegen des Laktyl-Intermediates



Abb. 3.45: Kristallstruktur der ThDP-Intermediate der aktivierten *Ec*POX nach Inkubation mit Pyruvat. A Die positive Elektronendichte (*omit-map* konturiert mit 2.5 σ) in Untereinheit B. Der modellierte Laktyl-Rest füllt die Elektronendichte nur unvollständig aus. Es verbleibt ein erheblicher Anteil an Restelektronendichte. **B** Stattdessen wurden HEThDP und Pyruvat in *docking*-Position in die Dichte modelliert. Die Elektronendichtekarte (2F₀-F_c) wurde mit 1.2 σ konturiert.

erklärt werden (Abb. 3.45 A). Eine bessere Anpassung ergab sich durch die simultane Einführung eines planaren post-Decarboxylierungsintermediates (HEThDP) und eines nichtkovalent gebundenen Pyruvates in *docking*-Position (D₁) in räumlicher Nähe zum C(2)-Atom des ThDP (Abb. 3.45 B). Die Einführung von HEThDP in die positive Differenzelektronendichte ist jedoch nicht zwingend, da Acetyl-ThDP die Dichte ebenfalls ausfüllt. Die beiden Intermediate unterscheiden sich hinsichtlich der Lage einer Doppelbindung voneinander. Während in der Enamin-Form des HEThDP die OH-Gruppe am C(α)-Atom über eine Einfachbindung gebunden ist, ist im Acetyl-ThDP eine C-O-Doppelbindung ausgebildet. Als Kriterium für die Unterscheidung der beiden Intermediate lassen sich bei einer Auflösung von 2,2 Å jedoch nicht voneinander unterscheiden.

Die Fixierung des Pyruvatmoleküls in D₁ wird durch folgende Reste gewährleistet (Abb. 3.45 B): Die Carboxylat-Gruppe wird über die Seitenketten von Ser28 und Gln113 sowie über den Amid-Stickstoff des Proteinrückgrates von Ser28 gebunden. Ein Wassermolekül im Abstand von 3,1 Å stabilisiert die Carboxylat-Gruppe zusätzlich. Die Keto-Gruppe am C(α)-Atom des Pyruvats wird über Wasserstoffbrückenbindungen von der Carboxylat-Gruppe des Asp27 und der Hydroxyl-Gruppe des HEThDP gebunden. Die Methyl-Gruppe des Pyruvats weist in eine hydrophobe Tasche, die aus den Aminosäuren Phe465 und Val466 gebildet wird. Die Position des Val466 ist jedoch nicht in allen Untereinheiten definiert. In den anderen Untereinheiten gehört diese Aminosäure bereits zu dem flexiblen *loop*, der nicht mehr aufgelöst werden konnte.

Asp27 ist an der Ausbildung von D₁ beteiligt. In den Kristallstrukturen der aktivierten *Ec*POX zeigte sich, dass die Position der Seitenkette von Asp27 variabel ist. In einigen Untereinheiten weist die Seitenkette zum ThDP bzw. dem ThDP-Intermediat hin, in anderen weist sie von Kofaktor weg. Möglicherweise übt diese Aminosäure eine noch nicht exakt definierte "Schalterfunktion" im Katalysezyklus aus.

Desweiteren kann geschlussfolgert werden, dass sich die *docking*-Position (D_1) mit der Position des Oxoanions in der Phosphonolaktyl-Struktur überlappt. Somit schließen sich die Bindung von Pyruvat und Phosphat wechselseitig aus.

In einigen Untereinheiten (E,F,H,I,J), in denen nur ThDP anstatt eines ThDP-Intermediates gefunden wurde, befindet sich ebenfalls ein Pyruvatmolekül in räumlicher Nähe zum C(2)-Atom des ThDP. Diese Position unterscheidet sich jedoch von der eben beschriebenen *docking*-Position D₁ und wird deshalb als D₂ bezeichnet (Abb. 3.46 A). Auch hier wird die Carboxylat-Gruppe von der Seitenkette des Gln113 sowie



Abb. 3.46: Stabilisierung des Pyruvats in der *docking*-Position (D₂) der aktivierten *Ec*POX. A Bindung von Pyruvat in der *docking*-Position (D₂) der Untereinheit F. Die Elektronendichte $(2F_o-F_c)$ wurde mit 1.2 σ konturiert. B Übereinanderlagerung der beiden *docking*-Positionen D₁ (UE B, cyan) und D₂ (UE F, grün).

über den Amid-Stickstoff des Proteinrückgrates von Asp27 gebunden. Ein Wassermolekül stabilisiert die Carboxylat-Gruppe zusätzlich. Die Keto-Gruppe des Pyruvats wird jedoch nicht über Wasserstoffbrückenbindungen zur Seitenkette des Asp27 gebunden. Aufgrund des verkürzten Abstandes zwischen dem C(2)-Atom des ThDP und der Keto-Gruppe des Pyruvates (D₁: C(2)–O 3,81 Å; D₂: C(2)–O 2,45 Å; Abb. 3.46 B) erfolgt die Bindung bereits über die Wechselwirkungen, die auch für LThDP an-



Abb. 3.47: Fixierung des Pyruvats in der *docking*-Position (D₂) der aktivierten *Ec*POX. A Bindung von Pyruvat in der *docking*-Position (D₂) der Untereinheit F. Die Elektronendichte des Pyruvatmoleküls ($2F_o$ - F_c) wurde mit 1.2 σ konturiert. D₂ ist für den nukleophilen Angriff des C(2)-Atoms auf das C(α)-Atom des Pyruvats geeigneter. **B** Zum Vergleich ist die Orientierung der Laktyl-Gruppe des LThDP in Untereinheit K gezeigt.

zutreffen sind. Die Keto-Gruppe wird von der Seitenkette des Gln113 und von der exozyklischen Aminogruppe des ThDP stabilisiert. Die D_2 -Position liegt somit auf der Trajektorie der C-C-Bindungsbildung. Das Pyruvat ist in dieser Position so ausgerichtet, dass es von dem freien Elektronenpaar des Ylids angegriffen werden kann und nur minimale Translations- und Rotationsbewegungen erforderlich sind, um kovalent gebunden zu werden (Abb. 3.47).

Im folgenden Abschnitt sollen mechanistische Schlussfolgerungen, die sich aus den kristallographischen Befunden ergeben, zusammenfassend diskutiert werden. Dies geschieht vorbehaltlich der durch die Auflösung gegebenen Grenzen.

In der vorliegenden Arbeit werden erstmals docking-Positionen für native Substratmoleküle in einem ThDP-abhängigen Enzym dokumentiert. Insbesondere Pyruvat in der Position D₂ liegt in einer günstigen Orientierung für den nukleophilen Angriff des C(2)-Atoms in seiner Ylid-Form auf das C(α)-Atom vor. Der Abstand zwischen den beiden relevanten Kohlenstoffatomen beträgt in dieser Position 3,2 Å. Pyruvat in der *docking*-Position D₁ wird nur in aktiven Zentren gefunden, die zugleich ein post-Decarboxylierungsintermediat enthalten. Es besteht dabei die Möglichkeit, dass das so gebundene Pyruvat die Abspaltung des Produktes Acetat unterstützt. Substratassistierte Produktabspaltung wurde auch für andere Enzyme, wie Phosphoglyceratkinase [203] und Aconitathydratase [204], vorgeschlagen. Im Zuge des Abspaltungsprozesses könnte Pyruvat von der Position D_1 in die Position D_2 übergehen. Eine mögliche Funktion von in D₁-Position gebundenem Pyruvat besteht im Ausschluss des Phosphats als Substrat, welches in Abwesenheit von Pyruvat etwa an dieser Stelle fixiert wird. Pyruvat in D₁-Position wird von Asp27 stabilisiert, welches in der LpPOX fehlt. In vergleichbarer Position liegt in LpPOX ein loop vor. Dies könnte die unterschiedliche Produktbildung von EcPOX und LpPOX erklären.

Die simultane Bindung von Pyruvat und post-Decarboxylierungsintermediat impliziert ein erweitertes kinetisches Schema für die reduktive Halbreaktion (Abb. 3.48). In Abschnitt 3.1.5 wurde die C-C-Bindungsbildung als geschwindigkeitsbestimmender Schritt für den Ablauf der reduktiven Halbreaktion wahrscheinlich gemacht. Da die k_{obs} -Werte der reduktiven Halbreaktion eine deutliche Abhängigkeit von der Pyruvatkonzentration zeigen, die Decarboxylierung des enzymgebundenen LThDP aber irreversibel erfolgt, konnte der Elektronentransfer als geschwindigkeitsbestimmender Schritt gemäß Abb. 3.15 ausgeschlossen werden. Das erweiterte Schema der reduktiven Halbreaktion würde dagegen auch einen substratabhängigen Elektronentransfer implizieren. Unter der Voraussetzung, dass die Elektronenübertragung vom HEThDP



Abb. 3.48: Erweitertes kinetisches Modell der reduktiven Halbreaktion Orange hinterlegte Enzymsymbole repräsentieren Spezies, die oxidiertes FAD enthalten. Erklärungen siehe Text.

auf das FAD geschwindigkeitsbestimmend ist, erhält man folgende Abhängigkeit des k_{obs} -Wertes von der Substratkonzentration:

$$k_{\rm obs} = \frac{k_4 K_S + k'_4(S)}{K_S + (S)} \tag{3.7}$$

Somit bewegt sich k_{obs} in Abhängigkeit von der Substratkonzentration zwischen den Größen k_4 und k'_4 . Die empirisch erhaltene hyperbole Substratabhängigkeit der k_{obs} -Werte, die für (S) \rightarrow 0 praktisch den Wert Null annehmen (vgl. Abb. 3.18), würde bei Anwendung von Gl. 3.7 $k_4 \ll k'_4$ voraussetzen. Damit würde man den in der *docking*-Position gebundenen Pyruvatmolekülen eine dramatische Steigerung des Elektronentransfers zuweisen. Da das Pyruvatmolekül in *docking*-Position nicht zwischen den beiden Kofaktoren lokalisiert ist und die wechselseitige Orientierung von ThDP und FAD durch die Substratbindung nicht beeinflusst wird, ist eine solche Interpretation unwahrscheinlich. Unter der Voraussetzung einer langsamen C-C-Bindungsbildung liefert auch das erweiterte Reaktionsschema den durch Gl. 3.4 gegebenen Zusammenhang zwischen k_{obs} und der Substratkonzentration. Die kristallographischen Befunde sprechen somit für die Richtigkeit des im kinetischen Teil der Arbeit vorgeschlagenen Reaktionsmechanismus.

Die Strukturen des enzymgebundenen Laktyl-ThDP und seines Analogons demonstrieren die senkrechte Ausrichtung der Carboxylat-Gruppe gegenüber dem Thiazoliumring. Die Decarboxylierung des LThDP unterliegt daher erwartungsgemäß der stereoelektronischen Kontrolle. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass kristallines Phosphonolaktyl-Thiamin bereits in Abwesenheit der Enzymkomponente die senkrechte Orientierung der Carboxy-Gruppe zum Thiazoliumring aufweist [205]. Für LThDP in freier Lösung ist die Konformation des Laktylrestes nicht genau bekannt. Es liegt auch keine Kristallstuktur für isoliertes Laktyl-ThDP bzw. Laktyl-Thiamin vor, da diese Verbindungen zu schnell decarboxylieren. Molekülmechanische Berechnungen [206] und die Analogie zum Phosphonolaktyl-Thiamin sprechen jedoch dafür, dass Laktyl-Thiamin in wässriger Lösung ebenfalls bereits über die senkrechte Orientierung der Carboxylat-Gruppe gegenüber dem Thiazoliumring verfügt. Hierzu korrespondiert, dass Laktyl-Thiamin in wässriger Lösung bei pH 7.0 mit $k=10^{-4}$ s⁻¹ decarboxyliert und somit instabil ist. Die relative Leichtigkeit der Decarboxylierung des isolierten Laktyl-Thiamins in Lösung wird - neben der elektronenziehenden Wirkung des Thiazoliumringes - gerade der mutmaßlichen senkrechten Orientierung der Carboxylat-Gruppe zugeschrieben.

Die senkrechte Orientierung der Carboxylat-Gruppe gegenüber dem Thiazoliumring wird zwar im enzymgebundenen Intermediat vorgefunden, ist aber kein Spezifikum der enzymkatalysierten Decarboxylierung. Da die Decarboxylierung in EcPOX größenordnungsmäßig mit einem minimalen k von 10^2 s^{-1} ablaufen muss, um die k_{cat} -Werte zu erklären, steigert die Gegenwart der Proteinkomponente die Decarboxylierungsgeschwindigkeit des LThDP um etwa 6 Größenordnungen. Welche molekulare Ursache kommt für diese dramatische Beschleunigung in Betracht? Studien von Crosby und Lienhard an Thiazoliumverbindungen [185] und von Jordan et al. an LThDP [207] haben den starken Einfluss des Milieus auf die Decarboxylierung herausgestellt. In Medien niedriger Polarität erfolgt die Decarboxylierung von LThDP erheblich schneller als in Wasser. Ursache hierfür ist, dass durch die Decarboxylierung die negative Ladung, die ursprünglich über die Carboxylat-Gruppe delokalisiert vorliegt, dem positiv geladenen Thiazoliumring näherkommt, wodurch das Dipolmoment des Intermediats sinkt. Zugleich wird das elektrostatisch neutrale CO₂ generiert. Insoweit diese Faktoren bereits im Übergangszustand wirksam werden, führt eine apolare, hydrophobe Umgebung zu einer Beschleunigung der Decarboxylierung. Nach Jordan erfolgt die Decarboxylierung von Laktyl-Thiamin in Tetrahydrofuran (ϵ_{rel} =7,4) mit k_{decarb} =54 s⁻¹ [207]. Dies kommt den k_{cat} -Werten typischer ThDP-abhängiger Enzyme bereits recht nahe. Tatsächlich befinden sich in EcPOX in der unmittelbaren Umgebung des LThDP-Intermediates folgende hydrophobe Reste: Phe112, Val380, Phe465 und der Dimethylphenylring des Isoalloxazinringes des FAD (Abb. 3.44).

Kristalle der nicht-aktivierten *Ec*POX zeigten nach der Inkubation in Substrat- bzw. MAP-Lösung aufgrund der Konformationsänderung (Abschnitt 3.2.1) erwartungsgemäß eine verringerte Auflösung (Tab. A.4 auf Seite 185). Daher konnten für diese Strukturen keine definierten Intermediate modelliert werden. Aussagen zu Konformationsänderungen des Proteinrückgrates nach Substratzugabe können dennoch getroffen werden.

Im Abschnitt 3.2.1 wurde anhand von Experimenten mit limitierter Proteolyse gezeigt, dass im nicht-aktivierten Enzym die Proteasebindestelle für die Abspaltung des β -Peptides (Tyr475) zugänglich ist, während die Proteasebindestelle (Tyr549) für die Abspaltung des *α*-Peptides nicht zugänglich ist. Die Kristallstruktur des nicht-aktivierten Enzyms erlaubt eine anschauliche strukturelle Deutung dieses Befundes (Abb. 3.49). Der flexible loop (Reste 466-478) über dem aktiven Zentrum, der auch Tyr475 trägt, ist im nicht-aktivierten Zustand exponiert. Nach der Bindung von Substrat bzw. Substratanalogon erfährt der loop eine Konformationsänderung, in deren Verlauf die Proteasebindestelle Tyr475 maskiert wird. Diese Konformationsänderung wird auch in Kristallen nicht-aktivierter EcPOX beobachtet, die in MAP- bzw. Pyruvatlösungen inkubiert wurden. Nach dem soaking ist der loop, der im nicht-aktivierten Enzym in Abwesenheit von Pyruvat bzw. MAP noch definiert war, nicht mehr auflösbar, so dass von seiner Flexibilisierung ausgegangen werden muss. Als Konsequenz dieser Konformationsänderung geht die Zugänglichkeit von Tyr475 für die Protease verloren (Abb. 3.50). Nach Inkubation der Kristalle mit Pyruvat wurde zusätzlich zu der soeben beschriebenen Konformationsänderung eine weitere beobachtet. In Untereinheit A zeigte sich, dass Phe465 eine andere Position als im nicht-aktivierten Zustand einnimmt (Abb. 3.50 B). Es befindet sich 6 Å näher am C(2)-Atom des ThDP und liegt somit an der Position von Phe465 der aktivierten EcPOX. Die Bindung von Pyruvat hat somit die Konformationsänderung, die mutmaßlich zu einer Beschleunigung des ET führt, im Kristall ausgelöst.

Die mit der Reduktion von FAD gekoppelte Exponierung der C-terminalen Domäne wurde jedoch nicht beobachtet. Möglicherweise wird die Exponierung der C-termina-



Abb. 3.49: Zugänglichkeit der Proteasebindestellen Tyr475 und Tyr549. Darstellung der nicht-aktivierten **EcPOX** im *cartoon*-Modell. Tyr475 (Spaltposition β -Peptid) und Tyr549 (Spaltposition α -Peptid) sind als Stäbchenmodell gezeigt. Während Tyr475 an der Proteinoberfläche exponiert vorliegt, ist Tyr549 im Proteininneren verborgen. Der flexible loop (466-478) wurde blau hervorgehoben.



Abb. 3.50: Konformationsänderung nach MAP- oder Substratzugabe in der nichtaktivierten *EcPOX* Verwendeter Farbcode: weiß: nicht-aktivierte *EcPOX*, grün: nichtaktivierte *EcPOX* nach *soaking* mit MAP , rosa: nicht-aktivierte *EcPOX* nach *soaking* mit Pyruvat, gelb: aktivierte *EcPOX* **A** Nach Inkubation mit MAP ist die Lage des flexiblen *loops* (Reste 466–478) nicht mehr bestimmbar. (Elektronendichtekarte 2Fo-Fc mit 1,2 σ konturiert.) **B** Nach Inkubation mit Pyruvat ist die Lage des flexiblen *loops* (Reste 466–478) nicht mehr bestimmbar. Zusätzlich zeigt Phe465 eine veränderte Position im aktiven Zentrum. (Elektronendichtekarte 2F_o-F_c mit 1,2 σ konturiert.)

len Domäne durch Kristallkontakte unterbunden. Die Exponierung würde zur Flexibilisierung der Domäne führen und somit eine eingeschränkte Detektierbarkeit in der Röntgenkristallographie nach sich ziehen.

3.3.5 Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurde gezeigt, dass *Ec*POX nach der Bindung von Substrat oder MAP an das C(2)-Atom des ThDP eine Konformationsänderung durchläuft, die die Proteasebindestelle für die Abspaltung des β -Peptides (Tyr475) für die Protease unzugänglich macht. Dieses Ergebnis konnte mit den Kristallstrukturen der nicht-aktivierten *Ec*POX sowie den Intermediatstrukturen der nicht-aktivierten *Ec*POX bestätigt werden.

Reduktion des FAD induziert eine weitere Konformationsänderung, in deren Verlauf die C-terminale Lipidbindedomäne exponiert und die Proteasebindestelle für die Abspaltung des α -Peptides (Tyr549) zugänglich wird.

Im Zuge dieser Konformationsänderung erfährt das Protein eine weitreichende Än-

derung der Struktur, die anhand der Verschiebung der SH-Gruppen mit Hilfe von FT-IR-Spektren detektiert werden konnte.

Anhand der Kristallstrukturen von nicht-aktivierter und aktivierter *Ec*POX konnte gezeigt werden, dass infolge der Konformationsänderung Phe465 in die Nähe der beiden Kofaktoren gelangt, wodurch möglicherweise der Elektronentransfer beschleunigt wird.

Die Zugänglichkeit und somit die Hydrophilie des aktiven Zentrums ändert sich im Zuge der Aktivierung. Das proteolytisch aktivierte Enzym ist stärker lösungsmittelexponiert. Dieses Resultat steht im Einklang mit den Ergebnissen des vorigen Kapitels, in dem gezeigt wurde, dass der K_D -Wert der aktivierten *Ec*POX für MAP im Vergleich zum nicht-aktivierten Enzym verringert ist.

Kristallstrukturen mit Reaktionsintermediaten zeigen einen "Schnappschuss" inmitten einer enzymatisch katalysierten Reaktion. Es konnte demonstriert werden, dass das Substratanalogon MAP in der aktivierten *Ec*POX kovalent an das C(2)-Atom des ThDP bindet und durch eine 3-Zentren-Bindung fixiert wird. Aufgrund der unterschiedlichen Zugänglichkeit der aktiven Zentren im Kristall war es zudem möglich, auch die erwarteten kovalenten Intermediate der Reaktion mit Pyruvat aufzulösen. Darüberhinaus konnte nichtkovalent gebundenes Pyruvat in *docking*-Positionen nachgewiesen werden.

Die Kristallstrukturen der nicht-aktivierten *Ec*POX, die mit Substrat bzw. Substratanalogon inkubiert wurden, geben Aufschluss über die Konformationsänderungen, die während der Aktivierung stattfinden.

3.4 Einfluss des Phenylalanin 465 auf die Katalyse und Aktivierung

Die gegenüber dem nicht-aktivierten Enzym veränderte Position von Phe465 in aktivierter *Ec*POX legte es nahe, den Einfluss dieser Seitenkette auf die Katalyse zu untersuchen. Hierzu wurden die Enzymvarianten Phe465Ile und Phe465Ala generiert. In aktivierter *Ec*POX und *Lp*POX nehmen die Seitenketten von Phe465 beziehungsweise Phe479 äquivalente Positionen im Raum ein (Abb. 3.51 A). Für *Lp*POX wurde die essentielle Rolle des Phe479 für den Elektronentransfer bereits beschrieben [194]. Dagegen ist in der Acetohydroxysäuresynthase aus Hefe (*Sc*AHAS), welche dieselbe Kofaktorausstattung wie *Ec*POX oder *Lp*POX besitzt, aber keine Redoxreaktionen katalysiert [208], kein homologer Aminosäurerest zu Phe465 zu finden (Abb. 3.51 B). Es wird vermutet, dass das FAD in der AHAS aufgrund eines gemeinsamen evolutionären Vorläufers gebunden wird und nur noch strukturelle Aufgaben erfüllt [209].

3.4.1 Einfluss auf die steady-state-Geschwindigkeit

Um den Einfluss von Phe465 auf die Katalyse zu untersuchen, wurden Varianten generiert, die eine Punktmutation an dieser Position tragen. Phe465 wurde zum einen gegen Alanin und zum anderen gegen Isoleucin ausgetauscht. Die Seitenkette von Isoleucin beansprucht fast ebenso viel Raum wie Phenylalanin. Im Gegensatz zum Phe stehen aber im Ile keine leeren π^* -Orbitale für einen effizienten Elektronentrans-



Abb. 3.51: Vergleich der Struktur der aktiven Zentren von *EcPOX, LpPOX und ScAHAS*. **A** Vergleich von nicht-aktivierter (–), aktivierter *EcPOX* (–) und *LpPOX* (–, PDB code: 1POW [62]), **B** Vergleich der Struktur der aktivierten *EcPOX* (–) mit *ScAHAS* (–, PDB code: 1JSC [181]).



Abb. 3.52: Vergleich der v/S-Charakteristiken der nicht-aktivierten *Ec*POX mit den *Ec*POX-Varianten Phe465Ala und Phe465Ile. A Vergleich von nicht-aktiviertem Wildtyp (•) mit den Varianten Phe465Ile (•) und Phe465Ala (•) B Vergleich der nicht-aktivierten Varianten (Phe465Ile (•) und Phe465Ala (•)) untereinander.

fer zur Verfügung. Demgegenüber ist der Raumbedarf von Alanin deutlich geringer. Die Expression und Reinigung dieser Varianten erfolgten wie die des Wildtypes. Während der Reinigung wurden keine Änderungen der Proteinstabilität beobachtet. Daher ist es naheliegend, dass die Gesamtstruktur des Proteins durch die jeweilige Punktmutation nicht verändert wurde.

Abbildung 3.52 zeigt die v/S-Charakteristiken der Varianten im Vergleich mit dem Wildtyp. Die katalytischen Parameter der untersuchten Varianten weisen untereinander und im Vergleich zum Wildtyp deutliche Unterschiede auf (Tab. 3.5). Die Werte folgen dabei einem erwarteten Trend. Generell liegen die Aktivierungsbarrieren für einen durch chemische Bindungen vermittelten ET (*through-bond*) wesentlich niedriger als für einen ET durch das Vakuum (*through-space*) [210]. Über Ile werden die Elektronen schlechter übertragen als über Phe, da hier nur σ^* -Orbitale zur Verfügung stehen, dennoch scheint Ile aufgrund seiner Größe den ET noch zu unterstützen. Bei Austausch gegen ein Alanin sinkt die Effizienz des ET weiter, da aufgrund der geringen

Tab. 3.5: Katalytische Konstanten der nicht-aktivierten *Ec*POX-Varianten im Vergleich mit dem Wildtyp.

Enzym	K _M (Pyr)	V _{max}	k _{cat}	k _{cat} /K _M
	mM	U/mg	s ⁻¹	$\mathrm{M}^{-1}\cdot\mathrm{s}^{-1}$
EcPOX-WT	98,8 ± 10,3	$14,\!3\pm0,\!6$	$14,7\pm0,6$	149,0
EcPOX-F465I	$62,2\pm4,0$	4,53 ± 0,11	4,68 ± 0,11	75,2
EcPOX-F465A	$199,0\pm23,6$	$0,37\pm0,02$	$0,38\pm0,02$	1,9

Größe die σ^* -Orbitale der Seitengruppe zu weit von den Kofaktoren entfernt liegen. Der ET in der Phe465Ala-Variante erfolgt über größere Abstände hinweg im Vakuum und ist daher sehr langsam. Interessanterweise ist dieser Trend bereits im nichtaktivierten Zustand der Varianten ausgeprägt.

3.4.2 Einfluss auf die reduktive Halbreaktion

Um die Konsequenzen des Austauschs von Phe465 gegen Ala beziehungsweise Ile näher zu charakterisieren wurden die reduktiven Halbreaktionen der *Ec*POX-Varianten analysiert. Die beobachtete Reaktion ist dieselbe wie für den Wildtyp (Abb. 3.12 auf Seite 78). Unter anaeroben Bedingungen wird Pyruvat an das C(2)-Atom des ThDP gebunden, decarboxyliert und die Elektronen werden auf oxidiertes FAD übertragen, wobei dieses reduziert wird. Die Reduktion des FAD kommt als Absorptionsabnahme bei 438 nm zum Ausdruck. Diese wurde in *stopped-flow*-Experimenten verfolgt. Als Resultat des Elektronentransfers entsteht Acetyl-ThDP. Dessen Hydrolyse reproduziert transient ThDP, so dass ein weiteres Pyruvatmolekül binden und decarboxylieren kann. Auf der Stufe des HEThDP bleibt die Reaktion stehen, da die Elektronen nicht mehr auf das bereits reduziert vorliegende FAD übertragen werden können.

Die erhaltenen Kurven der *Ec*POX-Phe465Ile-Variante enthielten 3 zeitlich distinkte Phasen, die mit Gl. 3.5 angepasst wurden. Eine Auftragung der jeweils höchsten Geschwindigkeitskonstante (k_a) gegen die Substratkonzentration zeigt einen hyperbolen Verlauf (Abb. 3.53). Der beobachtete geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist somit von der Substratkonzentration abhängig.

$$k_{\rm obs} = \frac{k_2 \cdot [\rm Pyr]}{K_1 + [\rm Pyr]}$$
(3.8)

Eine Anpassung der Daten an Gl. 3.8 ergab: K_1 für Pyruvat von 41.4 ± 1.9 mM und k_2 von 3.50 ± 0.05 s⁻¹. Ausgehend von den Betrachtungen, die bereits für den Wildtyp vorgenommen wurden (Kapitel 3.1.5) kann somit die C-C-Bindungsbildung als geschwindigkeitsbestimmender Schritt der reduktiven Halbreaktion dieser Variante postuliert werden. Im Vergleich zum Wildtyp ist der K_1 -Wert der Phe465Ile-Variante für Pyruvat deutlich niedriger (Faktor 16). Nicht-aktivierte Phe465Ile-Variante liegt somit bereits partiell aktiviert vor, das aktive Zentrum ist zugänglicher als beim Wildtyp. Diese Schlussfolgerung konnte durch eine thermodynamische K_D -Wert-Bestimmung mittels CD-Titration mit MAP bestätigt werden ($K_{D-F465I}$ 383,9 ± 30,1 μ M; Daten



Abb. 3.53: Vergleich der k_a -Werte der reduktiven Halbreaktion von nicht-aktivierter *Ec*POX Wildtyp (•) mit *Ec*POX-Phe465Ile-Variante (•). Ansatz: 1 mg/mL Enzym in 300 mM KPP pH 6.0 mit 10 mM MgSO₄, 1 mM ThDP und steigenden Konzentrationen an Pyruvat unter anaeroben Bedingungen.

nicht gezeigt). Eine Erklärung für dieses Verhalten ergibt sich aus der Flexibilität des *loops* (467–477) über dem aktiven Zentrum. In Experimenten zur limitierten Proteolyse konnte gezeigt werden, dass die Zugänglichkeit der Proteasebindestellen durch die Mutation verändert wurde (Abb. A.8). Die SDS-Gele dokumentieren, dass im Falle der Varianten in Substratgegenwart zusätzlich zum α-Peptid auch β-Peptid abgespalten wird. Die Spaltprodukte $EcPOX_{\Delta 23}$ und $EcPOX_{\Delta 101}$ entstehen dabei zu vergleichbaren Anteilen. Es war nicht möglich, die Kristallstrukturen der EcPOX-Varianten zu bestimmen, deshalb soll anhand der Struktur der nicht-aktivierten Wildtyp-EcPOX eine Erklärung für die Flexibilität gefunden werden. Die Bindestelle der Protease für die Abspaltung des β-Peptides (Tyr475) befindet sich in einem *loop* über dem aktiven Zen-



Abb. 3.54: Übersicht über die Proteasebindestellen in der nicht-aktivierten *EcPOX*-Wildtyp. A In rot sind die Reste des abzuspaltenden α -Peptides und in gelb die des β -Peptides dargestellt. Tyr475 und Tyr549 sind die Proteasebindestellen, wobei im nicht-aktivierten Enzym Tyr549 nicht zugänglich ist. Der *loop*, der zwischen den Resten Phe465 und Tyr475 ausgebildet wird, weist hohe Temperaturfaktoren auf und ist somit flexibel. **B** Tyr475 befindet sich auf demselben *loop* wie Phe465. Eine Punktmutation des Phe465 könnte die interne Stabilisierung des *loops* über das Rückgrat stören und somit den *loop* flexibilisieren.

trum, der hohe Temperaturfaktoren aufweist und somit sehr flexibel ist (Abb. 3.54 A). Beim nicht-aktivierten Wildtyp-Enzym ist Tyr475 der Protease zugänglich, was sich in der Abspaltung des β -Peptides zeigt (Abb. 3.27 Spur 2 auf Seite 98). Die substratgetriebene Konformationsänderung führt zur Maskierung dieser Spaltstelle (Spuren 3-8). Diese Konformationsänderung findet in den Varianten nicht statt, so dass trotz Substratgegenwart und genügend langer Inkubationszeit zusätzlich zum α -Peptid auch β -Peptid abgespalten wird. In Abbildung 3.54 B sind die Aminosäurereste, die an der Ausbildung des flexiblen *loops* beteiligt sind, dargestellt. Das Proteinrückgrat wird über hydrophobe Wechselwirkungen stabilisiert, so dass eine hydrophobe Tasche, die aus den Aminosäuren Val385, Trp386, Phe465 und Ile555 besteht, gebildet wird. Ein Austausch des Phe465 führt offenbar zu einer Destabilisierung des *loops*, wodurch die Proteasebindestelle Tyr475 auch nach Substratzugabe zugänglich bleibt.

Das veränderte Proteolysemuster steht möglicherweise mit Problemen bei der proteolytischen Aktivierung der Varianten in Zusammenhang. Es war nicht möglich, eine homogene Lösung proteolytisch aktivierter Enzymspezies zu generieren. Jedoch war eine Aktivierung mittels SDS möglich ($k_{cat-F465I-SDS}$ 17,2 s⁻¹).

Im Falle der nicht-aktivierten *Ec*POX-Phe465Ala-Variante konnten die Progresskurven der reduktiven Halbreaktion meist zweiphasig ausgewertet werden. Zur Auftragung der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten gegen die Substratkonzentration wurden jedoch nur die Konstanten herangezogen, die dem Hauptteil der Reaktion entsprachen (Abb. 3.55 A). Eine hyperbole Abhängigkeit lässt in Analogie zum Wild-



Abb. 3.55: Reduktive Halbreaktion von nicht-aktivierter *Ec*POX Wildtyp und deren Varianten Phe465Ile und Phe465Ala. A Abhängigkeit der k_a -Werte der *Ec*POX-Phe465Ala-Variante von der Substratkonzentration, **B** Vergleich der k_a -Werte von Wildtyp und den Varianten. Ansatz: 1 mg/mL Enzym in 300 mM KPP pH 6.0 mit 10 mM MgSO₄ und 1 mM ThDP und steigenden Konzentrationen an Pyruvat unter anaeroben Bedingungen.

typ die C-C-Bindungsbildung als geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Katalyse in der Phe465Ala-Variante vermuten. Eine Anpassung der Daten an Gl. 3.8 ergab einen K_1 -Wert für Pyruvat von 26,3 ± 5,4 mM und einen k_2 -Wert von 0,12 ± 0,007 s⁻¹. Auch bei dieser Variante zeigt sich ein deutlich verringerter K_1 -Wert für Pyruvat, was, wie in der Phe465Ile-Variante für ein lösungsmittelzugängliches aktives Zentrum spricht. Die Gesamtreaktion ist jedoch mit 0,12 s⁻¹ vergleichsweise langsam. Ein hydrophileres aktives Zentrum könnte zudem auch die Decarboxylierung beeinträchtigen. Die Abspaltung einer hydrophoben Abgangsgruppe wie CO₂ erfolgt erleichtert in hydrophoben Umgebungen.

Wie sind die verringerten katalytischen Aktivitäten der Varianten im Vergleich zum Wildtyp zu erklären? Beim Wildtyp wurde die autoinhibitorische Wirkung der C-terminalen Domäne (535-572) diskutiert, die den Zugang zum aktiven Zentrum blockiert und somit den niedrigen k_{cat} -Wert erklären könnte. Die C-terminale Domäne wurde jedoch durch die Punktmutation nicht verändert. Das aktive Zentrum sollte dementsprechend in vergleichbaren Umfang wie im Wildtyp blockiert werden. Die dem Wildtyp vergleichbar hohen K_M -Werte der Varianten bestätigen diese Vermutung. Obwohl der Elektronentransfer im vorliegenden Fall nicht direkt untersucht werden konnte, kann man anhand der verringerten katalytischen Aktivität der Varianten im Vergleich zum Wildtyp schließen, dass der Transfer der Elektronen vom HEThDP zum FAD beeinflusst sein muss. Besonders deutlich wird dies an der *Ec*POX-Phe465Ala-Variante.

3.4.3 Zusammenfassung

Auch bei den Varianten Phe465Ala und Phe465Ile liegt der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Katalyse in der C-C-Bindungsknüpfung. Die *steady-state*-Kinetiken liefern deutliche Unterschiede der k_{cat} -Werte im Vergleich zum Wildtyp, wobei der Austauch des Phenylalanins zu Alanin erwartungsgemäß gravierendere Auswirkungen hat. Ein Einfluss des Phe465 auf den Elektronentransfer kann deshalb nicht ausgeschlossen werden.

Das aktive Zentrum der Phe465Ile-Variante ist für das Lösungsmittel zugänglicher, wie eine Bestimmung des K_1 -Wertes für Pyruvat gezeigt hat. Die *Ec*POX-Variante liegt somit bereits partiell aktiviert vor.

Ein Austausch des Phe465 führt zu einer Flexibilisierung des *loops* über dem aktiven Zentrum, so dass die Proteasebindestelle Tyr475 der Protease zugänglich ist.

3.5 Untersuchungen an der Lipidbindedomäne (α-Peptid)

Chang & Cronan beschrieben im Jahr 1995, dass zwei C-terminale Domänen an der Bindung des Enzyms an die Membran beteiligt sind [189]. Mit Hilfe der Kristallstruktur können diese Schlussfolgerungen unterstützt werden. In Abbildung 3.56 ist die Struktur der nicht-aktivierten EcPOX dargestellt, wobei das nach Reduktion abspaltbare α -Peptid (Reste 550-572) rot markiert ist und das vor Reduktion abspaltbare β -Peptid (Reste 476-572) blau dargestellt ist. Je zwei C-terminale Domänen liegen auf einer Seite des Tetramers, so dass beide gemeinsam die Bindung an die Membran gewährleisten. Recny et al. haben mit Hilfe von Algorithmen zur Vorhersage der Sekundärstruktur (Eisenberg, [79]) postuliert, dass sich die Lipidbindedomäne zu einer amphipatischen Helix faltet und so die Membranbindung vermittelt wird [80]. In einer amphipatischen Helix sind idealerweise alle ungeladenen und hydrophoben Aminosäureseitenketten auf einer Seite der Helix lokalisiert und alle geladenen Reste auf der anderen Seite, so dass eine Asymmetrie bezüglich der Ladung entsteht. Die Aussagekraft von Vorhersagen zur Sekundärstruktur ist bei einer so geringen Anzahl an Aminosäuren jedoch begrenzt, zumal durch die Exponierung der C-terminalen Domäne Strukturänderungen während der Aktivierung erwartet werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Bindung des α -Peptides, welches die Lipidbindedomäne enthält, untersucht werden.



Abb. 3.56: Struktur der Lipidbindedomäne der nicht-aktivierten *Ec*POX. Rot sind die C-terminalen 23 Aminosäuren dargestellt (α -Peptid). Der Teil des Proteins, der proteolytisch abgespalten wird, wenn zuvor keine Reduktion des Flavins stattgefunden hat, ist blau markiert (β -Peptid). A Tetramer der nicht-aktivierten *Ec*POX, **B** gedreht um 90°.

3.5.1 Strukturelle Charakterisierung des *α*-Peptides

In der Kristallstruktur der nicht-aktivierten *Ec*POX konnten die Seitenketten aller Aminosäuren aufgelöst werden. Es zeigte sich, dass die 8 C-terminalen Reste (564-572) keine definierte Sekundärstruktur ausbilden, während zwischen den Resten 553-555 und 562-564 sogar ein kurzes anti-paralleles β -Faltblatt ausgebildet wird (Abb. 3.37 auf Seite 110). Zur einfacheren Untersuchung der Struktur des α -Peptides sollte es isoliert charakterisiert werden. Zu diesem Zweck wurde es unter Zuhilfenahme des SUMO-Fusions-Expressionssystems rekombinant hergestellt und gereinigt (Kapitel 2.4 auf Seite 43). Für die im folgenden vorgestellten Experimente wurde allerdings das chemisch synthetisierte α -Peptid verwendet.

3.5.1.1 Sekundärstrukturbestimmung mittels CD-Spektroskopie

Die Bestimmung der Sekundärstruktur mit Hilfe der CD-Spektroskopie ist eine einfache und schnelle Methode. Mittels Dekonvolution der erhaltenen Spektren und Vergleich mit Modellpeptiden oder -proteinen kann der prozentuale Anteil der verschiedenen Sekundärstrukturelemente bestimmt werden [98].

In Abbildung 3.57 sind die erhaltenen CD-Spektren dargestellt und in Tabelle 3.6 die daraus ermittelten prozentualen Anteile des Sekundärstrukturgehaltes zusammengefasst. Das isolierte α -Peptid bildet in Abwesenheit spezifischer Zusätze keine helikalen Strukturen aus (Abb. 3.57 A, schwarze Linie). Nach Zugabe steigender Konzentrationen (bis 50 % (v/v)) an Trifluorethanol (TFE) wird eine Konformationsän-



Abb. 3.57: Fern-UV-CD-Spektren des chemisch synthetisierten α -**Peptides.** Ansatz: 50 μ M α -Peptid in 20 mM KPP pH 6.0 **A** Titration mit TFE. Die Pfeile markieren die Veränderungen mit steigender Konzentration an TFE (0–50 % (v/v)). **B** Vergleich der CD-Spektren ohne SDS (–), mit 100 mM SDS (–) und mit 50 % (v/v) TFE (–).

Anteil (%)	α-Peptid	+ SDS	+ TFE
α-Helix	0.0	46.8	32.9
β -Faltblatt	30.2	20.8	27.4
turn	15.3	0.0	0.0
ungeordnet	54.5	32.4	39.7

Tab. 3.6: Übersicht über den Gehalt an Sekundärstrukturelementen des α -Peptides (in Prozent). Ansatz: 50 μ M α -Peptid in 20 mM KPP pH 6.0 zusätzlich 100 mM SDS oder 50 % (v/v) TFE.

derung induziert. Bei einer Konzentration von 50 % (v/v) TFE sind etwa 33 % der Aminosäuren im α -Peptid in α -helikaler Form gefaltet. TFE begünstigt generell die Ausbildung helikaler Strukturen [211]. Es konnte gezeigt werden, dass Proteinstrukturen, die im nativen Zustand nahezu vollständig aus β -Faltblättern aufgebaut sind, wie zum Beispiel β -Lactglobulin, durch TFE in die α -helikale Form überführt wurden [212]. In Gegenwart von 100 mM SDS bildet das α -Peptid ebenfalls α -helikale Strukturen (ca. 47 %) aus. SDS ist ein anionisches Detergenz, welches in einem Konzentrationsbereich von 7-10 mM auf Grund des hydrophoben Effektes Mizellen ausbildet [99]. SDS-Mizellen sind amphipatischer Natur. Sie bestehen aus einem hydrophoben Kern, der aus Alkylketten gebildet wird. Die Oberfläche der Mizelle wird von den hydrophilen Sulfatresten aufgebaut und ist negativ geladen. Sie können in gewissem Umfang als Ersatz für echte Liposomen dienen. Auf Grund des geringen Durchmessers (d \approx 4 nm, [213]) sind sie jedoch erheblich kleiner als Lipidvesikel (d \approx 150 nm) und weisen somit eine ausgeprägtere Kurvatur auf.

Der Sekundärstrukturgehalt des isolierten α -Peptides wird durch die Anwesenheit von SDS-Mizellen signifikant verändert. Das α -Peptid ist somit fähig, in eine α -helikale Struktur zu falten. Jedoch sind die SDS-Mizellen auf Grund ihrer starken Kurvatur nur bedingt mit der physiologischen inneren Zellmembran von *E. coli*, die nahezu planar aufgebaut ist, vergleichbar. Deshalb wurde nach Möglichkeiten gesucht, die Bindung des α -Peptides an die Membran unter möglichst physiologischen Bedingungen zu untersuchen.

3.5.1.2 Untersuchungen zur Membranbindung

Mit Hilfe der Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie (IRRAS) können Peptide oder Proteine an der Luft-Wasser-Grenzfläche untersucht werden. An dieser Grenzfläche kann zuvor auch eine monomolekulare Lipidschicht (Langmuir-Film) gespreitet werden, so dass nach Zugabe von Peptid- oder Proteinmolekülen auftretende Unterschiede im IR-Spektrum auf die Lipidbindung zurückgeführt werden können.

Verhalten des α-Peptides an der Luft/Wasser-Grenzfläche

Die Messung des Oberflächendruckes an der Luft/Wasser-Grenzfläche (Abb. 3.58 A) erlaubt Aussagen zum Adsorptionsverhalten des α -Peptides an dieser Grenzfläche. Es zeigte sich, dass nach Injektion des Peptides in die Lösung der Oberflächendruck zeitabhängig um insgesamt 5,5 mN/m steigt. Das Peptid wandert zur Grenzfläche und erhöht den Oberflächendruck, es ist oberflächenaktiv. Dieser Prozess ist durch eine komplexe Kinetik charakterisiert. Simultan zur Messung des Oberflächendruckes wurden kontinuierlich IR-Spektren aufgenommen, die in Abbildung 3.58 B exemplarisch gezeigt sind. Nach 2 Stunden (–) wird die Ausprägung einer Bande im Amid-I-Bereich bei 1660 cm⁻¹ und im Amid-II-Bereich bei 1545 cm⁻¹ beobachtet. Dies legt die Ausbildung einer α -helikalen Struktur nahe (Tab. 3.7, [100]). Nach 5 Stunden (–) sind die Banden bei 1660 cm⁻¹ und 1545 cm⁻¹ wieder verschwunden. Zugleich werden Banden bei 1625 cm⁻¹ und 1529 cm⁻¹ ausgebildet, was für eine Sekundärstruktur aus β -Faltblättern spricht. Diese Struktur aus Faltblättern ist nach 10 Stunden (–) noch ausgeprägter.

Nach der Injektion diffundiert das α -Peptid an die hydrophobe Luft/Wasser-Grenzfläche und faltet sich zu einer α -helikalen Struktur. Im Laufe der Zeit nimmt die Konzentration des Peptides an der Grenzfläche zu. Die hohen Konzentrationen an der Grenzfläche scheinen die Bildung von Faltblättern zu fördern, die eine hohe Packungsdichte bei gleichzeitiger Ausbildung zahlreicher intermolekularer Wasserstoffbrückenbindungen erlauben.





A Zeitlicher Verlauf des Oberflächendruckes während des Experimentes. Ansatz: 100 nM α-Peptid in 20 mM KPP pH 6.0. **B** Auswahl an IRRA-Spektren zu den in Abbildung A farbig markierten Zeitpunkten (– 2 Stunden, – 5 Stunden, – 10 Stunden)

Verhalten des α-Peptides an der Lipid/Wasser-Grenzfläche

Biologische Membranen wurden von Singer & Nicolson 1972 als flüssige zweidimensionale Doppelschichten von Phospholipiden beschrieben [11]. Proteine können peripher an die Membran gebunden werden oder als integrale Proteine die Membran durchspannen. Die IRRAS-Messungen wurden jedoch an einer Monoschicht durchgeführt. Monomolekulare Schichten, sogenannte Langmuir-Filme, sind zwei-dimensionale Schichtsysteme, welche nur aus einer Moleküllage bestehen [214][215]. Für die Herstellung der Monoschicht wurde mit einem Lipidextrakt aus E. coli gearbeitet. Dieser enthielt Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylglycerol und Cardiolipin in ihren physiologischen Verhältnissen. Die genannten Vertreter gehören zur Gruppe der Phospholipide. Sie bestehen aus einem Glyceringrundgerüst bei dem zwei der drei Hydroxylgruppen mit Fettsäuren verestert sind. Die dritte OH-Gruppe ist mit einer phosphathaltigen Kopfgruppe (zum Beispiel Ethanolamin und Glycerin) verestert. Die Länge der Fettsäuren und deren Sättigungsgrad differieren stark. Natürlich vorkommende Fettsäuren enthalten eine gerade Anzahl an Kohlenstoffatomen. Ungesättigte Fettsäuren findet man meist an der sn-2 Position des Glycerinrückgrates und die Doppelbindungen liegen in cis-Konformation vor. Cardiolipin ist ein Diphosphatidylglycerol bei dem zwei Phosphatidylreste über ein Glycerin miteinander verknüpft sind. Insgesamt können somit 4 Fettsäuren gebunden werden. Cardiolipin ist charakteristisch für bakterielle Membranen und Mitochondrien, also Membranen, über denen ein elektrochemisches Potential zur ATP-Generierung aufgebaut wird. Tatsächlich wurden Bindungstellen für Cardiolipin bei verschiedenen Enzymen der oxidativen Phosphorylierung gefunden (zum Beispiel Cytochrom Oxidase, F1F0-ATP-Synthase und Cytochrom bc₁-Komplex) [7].

Monomolekulare Schichten können je nach Temperatur und Oberflächendruck in verschiedenen Aggregatzuständen existieren (Abb. 3.59 [216]). Mit Hilfe einer Filmwaage kann der Langmuir-Film komprimiert werden. Unkomprimiert (>1 nm²) liegen die

Sekundärstruktur	Amid-I-Bande (cm^{-1})	Amid-II-Bande (cm^{-1})
α-Helix	1652 (1653-1658)	1548 (1510-1550)
β -Faltblatt	1629 (1615-1637)	1528 (1517-1560)
	1696 (1685-1694)	
β-turn	1672 (1655-1686)	1550 (1548-1568)
ungeordnet	1654 (1642-1657)	

Tab. 3.7: Amid-I- und Amid-II-Bande der Sekundärstrukturelemente in Wasser [100].



Abb. 3.59: Übersicht über die Phasenübergänge einer Lipid-Monoschicht.

Verallgemeinerte Darstellung der Isotherme eines Lipids mit zwei Acylketten in Abhängigkeit vom Oberflächendruck. Abbildung entnommen aus [102].

Phospholipide in der gasanalogen Phase (G) vor, Wechselwirkungen der Lipidmoleküle untereinander können in diesem Zustand vernachlässigt werden. Zunehmende Oberflächenkonzentration der Lipidmoleküle führt zur Verringerung der effektiven Fläche pro Molekül und somit zu Wechselwirkungen zwischen den Molekülen untereinander. Damit kommt es bei einer bestimmten Packungsdichte zu einem Phasenübergang in die flüssig-expandierte Phase (LE), in welcher die Acylketten miteinander in Kontakt treten. Diese LE-Phase kann nun bei einem konstanten Oberflächendruck einer Phasenumwandlung zu einer flüssig-kondensierten Phase (LC) unterliegen. Wird der Film noch weiter komprimiert, erfolgt eine Umwandlung in die feste Phase (S), in der die Acylketten nicht mehr beweglich sind.

Monoschichten mit einem Oberflächendruck von 30-35 mN/m zeigen ein mit biologischen Doppelschichtmembranen vergleichbares Verhalten [217][218]. Da bei IRRAS-Messungen bei 30 mN/m zwar eine Wechselwirkung stattfindet, aber diese meist nur sehr schwache Amid-Banden zeigt, wurden die Messungen bei 20 mN/m durchgeführt. Der Langmuir-Film liegt bei diesem Oberflächendruck in einem flüssig-expandierten Aggregatzustand vor (Abb. 3.59). Nach dem Einstellen dieses Druckes werden die Barrieren der Filmwaage gestoppt und die Änderung der Fläche pro Lipidmolekül während des Adsorptionsvorgangs wird gemessen. Bindet ein Peptidmolekül an die Membran, wird diese etwas auseinandergedrückt und auch die Barrieren der Filmwaage werden verschoben. Anhand der Änderung der Fläche nach der Peptid-Adsorption, können Aussagen über die Oberflächenaktivität des Peptides gewonnen werden.

Simultan mit den Druckkurven wurden auch FT-IR-Spektren von der Lipid/Wasser-Oberfläche aufgenommen. In Abbildung 3.60 ist ein Reflexions-Absorptions-Spektrum (RA_{Lipid/Peptid}) dargestellt. Die prominente Bande bei 3600 cm⁻¹ resultiert aus der Streckschwingung der OH-Gruppe der wässrigen Subphase (ν (OH)). Anhand der



Abb. 3.60: Darstellung der Reflexions-Absorptions-Spektren von Lipid und Peptid zu verschiedenen Zeitpunkten.

Zeitpunkte nach Start der Messung (– Lipidspektrum (Start); 200 nM Peptid: – 2 Stunden, – 5 Stunden; 500 nM Peptid: – 8 Stunden, – 10 Stunden, – 13 Stunden (vgl. Abb. 3.61 A)). 200 nM α -Peptid wurden 1 Stunde nach dem Start der Messung und weitere 300 nM α -Peptid 7 Stunden nach dem Start der Messung injiziert. Inset: Vergrößerter Ausschnitt im Bereich der Amid-Banden.

Intensität dieser Bande lassen sich Aussagen zur Schichtdicke des Lipidfilms treffen [219]. In diesem Bereich finden kaum Veränderungen während der Messzeit statt, so dass man daraus schließen kann, dass die Monoschicht während des gesamten Experimentes annähernd konstant bleibt. Die Bande ist positiv, da durch den Lipidfilm weniger Strahlung von dem Probentrog reflektiert wird, als von dem Referenztrog mit der reinen Subphase. Die Fluidität des Films kann anhand der Banden bei 2924 cm⁻¹ bzw. 2852 cm⁻¹ bewertet werden. Diese entsprechen der asymmetrischen bzw. symmetrischen Methylenstreckschwingung (v_{as} (CH₂)/ v_s (CH₂)) des Lipidfilms. In einem flüssig-expandierten Lipidfilm weisen die Methylenstreckschwingungsbanden charakteristische Werte unterhalb von 2919 bzw. 2850 cm⁻¹ auf.

Der Bereich von 1800-1500 cm⁻¹ ist in der kleineren Abbildung vergrößert dargestellt. In diesem Bereich liegen die Amid-I- und Amid-II-Banden des Peptides und die Streckschwingungen der Carbonyl-Gruppe des Lipides (ν (C=O)). Für die weiteren Betrachtungen wird nur der Bereich von 1800 bis 1500 cm⁻¹ herangezogen.

In Abbildung 3.61 A ist die Abhängigkeit der Flächenänderung der Monoschicht von der Zeit gezeigt. Nach Injektion von 200 nM α -Peptid wurde ein deutlicher Anstieg von 4 % beobachtet. Eine erneute Injektion von 300 nM nach 6 Stunden ließ die Flä-



Abb. 3.61: Darstellung der Flächenänderung der Monoschicht und der IRRA-Spektren des α -Peptides zu verschiedenen Zeitpunkten.

A Zeitlicher Verlauf der Flächenänderung pro Molekül. Eine Flächenvergrößerung lässt auf eine Bindung des Peptides in die Membran schließen. Zum Vergleich wurde der Oberflächendruck ebenfalls abgebildet, der allerdings konstant bei 20 mN/m gehalten wurde. **B** Auswahl an IRRA-Spektren zu den in Abbildung A farbig markierten Zeitpunkten (– Lipidspektrum (Start); 200 nM Peptid: – 2 Stunden; 500 nM Peptid: – 8 Stunden, – 10 Stunden, – 13 Stunden).

chenänderung auf 8 % ansteigen und blieb dann konstant bei diesem Wert. Aus dieser Kurve kann geschlossen werden, dass das α -Peptid an die Monoschicht adsorbiert. Die rot gezeichnete Kurve illustriert, dass der Oberflächendruck während des Experimentes konstant bei 20 mN/m gehalten wurde. Das Reflexions-Absorptions-Spektrum des Peptides (RA_{Peptid}) ist in Abbildung 3.61 B gezeigt. Es wird aus der Subtraktion von RA_{Lipid/Peptid} und RA_{Lipid} gewonnen und enthält nur die Strukturinformation des an die Monoschicht gebundenen Peptides. Nach der Injektion von 200 nM α -Peptid konnten keine aussagekräftigen Spektren (–) erhalten werden. Deshalb wurden nochmals 300 nM Peptid in die Subphase injiziert, so dass schließlich bei einer Konzentration von 500 nM Peptid gearbeitet wurde. Bereits 60 Minuten nach der zweiten Injektion (–) traten in der Amid-I- und Amid-II-Region Banden auf, die für die α -helikale Sekundärstruktur des Peptides sprechen (Tab. 3.7, [100]). Diese Sekundärstruktur blieb im Gegensatz zu den Messungen an der Luft/Wasser-Grenzfläche (– nach 10 Stunden und – nach 13 Stunden) auch nach sehr langen Zeiten erhalten.

In Übereinstimmung mit der Flächenänderung war auch bei 1740 cm⁻¹ eine Änderung im Differenz-Spektrum zu beobachten. Diese Bande entspricht der C=O-Streckschwingung (ν (C=O)) der Estergruppierung des Lipides. Wenn mehr Peptid an die Membran bindet und die Fläche pro Lipidmolekül größer wird, dann befindet sich weniger Lipid im Fokus des IR-Strahls. Dies ist eine Bestätigung für die den Lipidfilm aufspreitende Wirkung des α -Peptides und belegt, dass hydrophobe Seitenketten in den Bereich der Membranacylketten vordringen.

Die Ergebnisse der Experimente an der Luft/Wasser- und Lipid/Wasser-Grenzfläche sind bezüglich des Adsorptionsverhaltens und der Ausbildung der Sekundärstrukturen vergleichbar. So zeigt das α -Peptid in beiden Fällen eine Adsorption an die Grenzfläche. Da in den Experimenten eine physiologische Zusammensetzung der Monoschicht gewählt wurde und bei einem zur biologischen Membran vergleichbaren Oberflächendruck gearbeitet wurde, kann aus den Ergebnissen geschlossen werden, dass das α -Peptid die Fähigkeit besitzt an die physiologische Membran zu binden. Die vom Peptid während der nativen Adsorption eingenommene Sekundärstruktur ist α -helikaler Natur. Dieses Resultat ist konsistent mit der von Recny *et al.* mit Hilfe von Programmen zur Vorhersage der Sekundärstruktur postulierten helikalen Struktur der C-terminalen Domäne der *Ec*POX [80].

3.5.1.3 Strukturbestimmung mittels NMR

Die Bestimmungen der Sekundärstruktur des isolierten α -Peptides mit den zuvor beschriebenen Methoden liefern nur Hinweise auf die globale Faltung des kurzen Peptides. Die Aufklärung der Struktur im molekularen Detail kann weitere Aspekte der Membranbindung der EcPOX aufzeigen. Zur Strukturaufklärung wurde die magnetische Kernresonanz (NMR) verwendet. Mit dieser Methode können Strukturen von Proteinen oder Peptiden in Lösung charakterisiert werden. Wie bereits durch CD-Studien gezeigt, nimmt das isolierte α -Peptid in Gegenwart von SDS-Mizellen die membranbindungskompetente Konformation an. Aus diesem Grund sollte die Strukur des α -Peptides in Anwesenheit von SDS-Mizellen untersucht werden. Deuterierte SDS-Mizellen werden in der NMR-Spektroskopie häufig als Membranersatz für amphiphile Proteine oder Peptide verwendet [220][221][222][223]. Da das α-Peptid sehr kurz ist (23 Aminosäuren), konnte auf eine Markierung mit "NMR-aktiven Kernen" verzichtet werden. Es wurden nur die chemischen Verschiebungen der Protonen (¹H) bestimmt. Die Zuordnung der einzelnen Aminosäuren erfolgte durch zweidimensionale homonukleare ¹H-TOCSY- und ¹H-NOESY-NMR-Spektren (Abb. A.16 und A.17, Tab. A.5). In einem ¹H-TOCSY-Spektrum (*total correlation spectroscopy*) bilden alle Protonen einer Aminosäure ein Spinsystem und liefern entsprechend ihrer Natur NMR-Signale. Aromatische Aminosäuren haben in ihrer Ringstruktur noch ein zusätzliches Spinsystem, welches zu höheren ppm-Zahlen (Tieffeld) verschoben ist. Der Abstand der Protonen im Raum (unter 5 Å) wurde mit einem zwei-dimensionalen
homonuklearen ¹H-NOESY-NMR-Spektrum bestimmt. Anhand dieser Information kann die drei-dimensionale Struktur des α -Peptides mit der Optimierungsstrategie des *simulated annealing* und anschließender Energieminimierung berechnet werden. Beim *simulated annealing* wird versucht, die gemessenen Strukturparameter mit den bekannten Restriktionen (Bindungslängen und Bindungswinkel) einer chemischen Bindung bzw. im größeren Maßstab, dem einer Aminosäure, in Übereinstimmung zu bringen, wobei das Ziel die Auffindung des globalen Energieminimums ist [224].



Abb. 3.62: Darstellung der 10 NMR-Strukturen des α -Peptides mit der niedrigsten Energie.

Die drei-dimensionale Struktur das α-Peptides in Gegenwart von SDS-Mizellen konnte bestimmt werden. Dazu wurden insgesamt 30 Lösungsstrukturen berechnet. Die 10 Strukturen mit den niedrigsten Energien wurden überlagert (Abb. 3.62). Anhand der Strukturen können folgende Aussagen getroffen werden:

1. Die Strukturen weichen nur minimal voneinander ab (rmsd_{α -Peptid (3-20)} 0,73 Å), wobei die Aminosäuren 1, 22 und 23 stärker abweichen, als Aminosäure 2 und 21 (rmsd_{α -Peptid (2-21)} 0,86 Å). 2. Die Position der C-terminalen Aminosäure, Arginin 23, konnte nicht genau bestimmt werden.

Eine Mittelung dieser 10 Strukturen ist in Abbildung 3.63 dargestellt. Das α -Peptid ist in Gegenwart von SDS-Mizellen von Aminosäure 2 bis 22 α -helikal, wobei leichte Abweichungen von einer idealen Helix auftreten.



Abb. 3.63: NMR-Struktur des *α*-Peptides.

A Struktur in Längsrichtung gezeigt. **B** Peptidstruktur um 90° entlang der y-Achse gedreht. Hydrophobe ungeladene bzw. positiv geladene Reste sind gelb dargestellt, negativ geladene Reste wurden grün markiert. Dreht man das α -Peptid um 90° entlang der y-Achse (Abb. 3.63 B), wird die räumliche Trennung der Ladungen deutlich. Auf der einen Seite befinden sich die polaren, negativ geladenen Aminosäurereste (grün), auf der anderen Seite sind hydrophobe oder positiv geladene Reste (gelb) lokalisiert. Der von Recny et al. vorhergesagte amphipatische Charakter des Peptides [80] konnte somit bestätigt werden. Die verwendeten Mizellen sind durch die Sulfatkopfgruppe negativ geladen. Es ist somit wahrscheinlich, dass das Peptid mit der positiv geladenen Seite an die Mizelle bindet. SDS-Mizellen haben einen Durchmesser von ungefähr 4 nm [213]. Würde das α -Peptid nur an eine Mizelle binden, müsste es, sofern alle positiv geladenen Reste an der Membranbindung beteiligt sind, eine ausgeprägte Kurvatur annehmen. In der Literatur ist beschrieben, dass SDS in Abhängigkeit von der Detergenzkonzentration und der Konzentration verschiedener Salze in der Lage ist, langgestreckte (rodlike) Mizellen auszubilden [225][226][227][228]. Diese verfügen über einen planaren Bereich und könnten die nicht gefundene Kurvatur des α -Peptides in Gegenwart von SDS-Mizellen erklären. In diesem Fall wäre auch eine Vergleichbarkeit zur negativ geladenen Zellmembran von *E. coli* gegeben.

3.5.2 Zusammenfassung

In diesem Abschnitt wurde die Struktur des isolierten α -Peptides beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass das 23 Aminosäuren umfassende Peptid in Gegenwart von SDS-Mizellen eine helikale Sekundärstruktur aufweist. Dieses Ergebnis wurde mittels NMR-Strukturaufklärung bestätigt. Das α -Peptid ist in Gegenwart von SDS-Mizellen fast vollständig α -helikal. Lediglich die erste und die letzte Aminosäure entziehen sich dieser Sekundärstrukturform.

Die ausgebildete Helix hat einen amphipatischen Charakter. Auf der einen Seite befinden sich hydrophile und negativ geladene Aminosäurereste und auf der entgegengesetzten Seite hydrophobe und positiv geladene Aminosäurereste. Durch das Vorliegen positiv geladener Reste auf der hydrophob geprägten Seite wird das ursprüngliche Konzept der Helixamphipathie modifiziert, aber nicht aufgehoben. SDS-Mizellen sind negativ geladen und hydrophobe bzw. positiv geladene Gruppen können aufgrund des hydrophoben Effektes bzw. durch elektrostatische Wechselwirkungen an der Mizellenoberfläche gebunden werden.

Es konnte gezeigt werden, dass chemisch synthetisiertes α -Peptid auch an die physiologische Membran von *E. coli* (polarer Lipidextrakt aus *E. coli*) assoziieren kann. Durch Cardiolipin und Phosphatidylglycerol ist die Bakterienmembran negativ geladen. Somit kann angenommen werden, dass die Resultate der NMR-Strukturaufklärung in Gegenwart von SDS auf die Wechselwirkung des α -Peptides mit der Bakterienmembran *in vivo* übertragen werden kann.

4 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die membran-assoziierte Pyruvatoxidase aus *E. coli* hinsichtlich ihrer Struktur, Funktion und ihres Aktivierungsmechanismus im Detail charakterisiert.

Während der Aktivierung durchläuft das Enzym mindestens zwei Konformationsänderungen. Eine, die durch die kovalente Bindung von Pyruvat am ThDP ausgelöst wird, maskiert die Proteasebindestelle Tyr475, welche auf einem flexiblen *loop* in der Nähe des aktiven Zentrums lokalisiert ist. Somit wird die Abspaltung des β -Peptides verhindert. Die zweite Konformationsänderung wird durch die Reduktion des enzymgebundenen Flavins ausgelöst. In deren Verlauf wird die C-terminale Domäne exponiert, wodurch die Membranbindung vermittelt wird.

Die Konformationsänderungen, die durch die Reduktion des Flavins ausgelöst werden, betreffen weite Bereiche des Proteins. Mit Hilfe der redoxinduzierten FT-IR-Spektroskopie konnte gezeigt werden, dass sich Änderungen im Bereich der SH-Bindungen ergeben, was auf eine weitreichende Änderung der globalen Struktur hindeutet.

Mit Hilfe von Kristallstrukturen konnte bestätigt werden, dass das aktive Zentrum durch die Aktivierung lösungsmittelzugänglicher wird. Dies steht im Einklang mit den kinetischen und thermodynamischen Messungen. Durch die erhöhte Hydrophilie wird der K_D -Wert für das Substrat und für die Substratanaloga erniedrigt. Die C-terminale Domäne besitzt somit eine autoinhibitorische Funktion, die durch die Aktivierung aufgehoben wird.

Trotz der veränderten Zugänglichkeit des aktiven Zentrums ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in beiden Enzymspezies die kovalente Bindung des Substrates aus der *docking*-Position. Dieses Resultat steht im Widerspruch zu Befunden in der Literatur wonach die Decarboxylierung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist. Die C-C-Bindungsbildung zwischen dem Substrat und ThDP wird infolge der Aktivierung erheblich beschleunigt.

Desweiteren wird der Elektronentransfer durch die Aktivierung beeinflusst. Dies wird durch ein verändertes Redoxpotential des Flavins deutlich (ΔE_m 100 mV). In der aktivierten *Ec*POX können die Elektronen leichter auf das enzymgebundene FAD über-

tragen werden. In den Kristallstrukturen wurde eine Beteiligung eines Phenylalanins 465 auf den ET vermutet. Dieser Rest ist in der aktivierten Spezies zwischen den beiden Kofaktoren positioniert und ist somit um 6 Å im Vergleich zum nicht-aktivierten Enzym verschoben. Ein Austausch dieses Aminosäurerestes bestätigt diese Vermutung.

Reduziertes FAD in der nicht-aktivierten *Ec*POX weist eine stärkere Biegung um die N(5)-N(10)-Achse auf als oxidiertes FAD, was durch die Experimente mittels redoxinduzierter FT-IR-Spektroskopie detektiert werden konnte.

*Ec*POX verfügt über einen funktionalen Protonenkanal, der die aktiven Zentren eines funktionalen Dimers verbindet und somit eine Kooperativität ermöglicht. Ein weiterer Hohlraum im Protein könnte dafür verantwortlich sein, dass je zwei auf der einen Seite des Tetramers befindliche C-terminale Domänen exponiert werden und dadurch die Membranbindung vermittelt wird.

In der Kristallstruktur des nicht-aktivierten Enzyms besitzen die C-terminalen Reste, die für die Membranbindung verantwortlich sind, entweder keine definierte Sekundärstruktur oder sie sind zu einem β -Faltblatt gefaltet. Das aus den 23 C-terminalen Resten aufgebaute α -Peptid besitzt in Lösung eine weitgehend ungeordnete Struktur, nimmt jedoch in Gegenwart von SDS-Mizellen eine α -helikale Struktur an.

Die Bindung an die Membran erfolgt über eine amphipatische Helix. Im Gegensatz zu Sekundärstrukturvorhersagen konnte in zwei-dimensionalen NMR-Studien gezeigt werden, dass sich das gesamte 23 Aminosäure lange α -Peptid in Gegenwart von SDS-Mizellen α -helikal falten kann. Die Aminosäurereste werden dabei so ausgerichtet, dass auf der einen Seite die hydrophoben und positiv geladenen Reste und auf der gegenüberliegenden Seite die negativ geladenen Reste positioniert werden. Aufgrund der negativ geladenen Zellmembran von *E. coli* ist somit eine Membranbindung gewährleistet, wobei vermutlich zuerst eine elektrostatisch bedingte Orientierung und anschließend eine Wechselwirkung der hydrophoben Reste mit den Acylgruppen der Phospholipide stattfindet.

Literaturverzeichnis

- [1] Dobrindt, U. (2007) Escherichia coli der Klassiker seit 120 Jahren. BioSpektrum 04.
- [2] Said, H. M., Ortiz, A., Kumar, C. K., Chatterjee, N., Dudeja, P. K., Rubin, S. (1999) Transport of thiamine in human intestine: mechanism and regulation in intestinal epithelial cell model Caco-2. *Am J Physiol* 277(4 Pt 1), C645–51.
- [3] Said, H. M., Kumar, C. (1999) Intestinal absorption of vitamins. *Curr Opin Gastroenterol* 15(2), 172–6.
- [4] Neidhardt, F., et al. (1996) Escherichia coli and Salmonella Cellular and Molecular Biology. Second Edition. ASM Press, Washington.
- [5] Lengeler, J. W., Drews, G., Schlegel, H. G. (1998) Biology of the Prokaryotes. Thieme Verlag.
- [6] Derman, A. I., Beckwith, J. (1991) Escherichia coli alkaline phosphatase fails to acquire disulfide bonds when retained in the cytoplasm. *J. Bacteriol.* 173(23), 7719–7722.
- [7] Haines, T. H., Dencher, N. A. (2002) Cardiolipin: a proton trap for oxidative phosphorylation. FEBS Lett 528(1-3), 35–9.
- [8] Howe, A. G., McMaster, C. R. (2001) Regulation of vesicle trafficking, transcription, and meiosis: lessons learned from yeast regarding the disparate biologies of phosphatidylcholine. *Biochim Biophys Acta* 1534(2-3), 65–77.
- [9] Mulgrew-Nesbitt, A., Diraviyam, K., Wang, J., Singh, S., Murray, P., Li, Z., Rogers, L., Mirkovic, N., Murray, D. (2006) The role of electrostatics in protein-membrane interactions. *Biochim Biophys Acta* 1761(8), 812–26.
- [10] Sullivan, K. H., Hegeman, G. D., Cordes, E. H. (1979) Alteration of the fatty acid composition of Escherichia coli by growth in the presence of normal alcohols. *J. Bacteriol.* 138(1), 133–138.
- [11] Singer, S. J., Nicolson, G. L. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175(23), 720–31.
- [12] Vereb, G., Szöllosi, J., Matkó, J., Nagy, P., Farkas, T., Vigh, L., Mátyus, L., Waldmann, T. A., Damjanovich, S. (2003) Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades after the Singer-Nicolson model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(14), 8053–8.
- [13] McAuley, K. E., Fyfe, P. K., Ridge, J. P., Isaacs, N. W., Cogdell, R. J., Jones, M. R. (1999) Structural details of an interaction between cardiolipin and an integral membrane protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(26), 14706–14711.
- [14] Wakeham, M. C., Sessions, R. B., Jones, M. R., Fyfe, P. K. (2001) Is there a conserved interaction between cardiolipin and the type II bacterial reaction center? *Biophys J 80*(3), 1395–405.
- [15] Ingledew, W. J., Poole, R. K. (1984) The respiratory chains of Escherichia coli. *Microbiol Rev* 48(3), 222–71.

- [16] **Mitchell, P.** (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. *Nature 191*, 144–8.
- [17] Schneider, D., Pohl, T., Walter, J., Dörner, K., Kohlstädt, M., Berger, A., Spehr, V., Friedrich, T. (2008) Assembly of the *Escherichia coli* NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *Biochim Biophys Acta* 1777(7-8), 735–9.
- [18] Friedrich, T. (1998) The NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I) from *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* 1364(2), 134–46.
- [19] **Friedrich, T.** (2001) Complex I: a chimaera of a redox and conformation-driven proton pump? *J Bioenerg Biomembr* 33(3), 169–77.
- [20] Weidner, U., Geier, S., Ptock, A., Friedrich, T., Leif, H., Weiss, H. (1993) The gene locus of the proton-translocating NADH: ubiquinone oxidoreductase in Escherichia coli. Organization of the 14 genes and relationship between the derived proteins and subunits of mitochondrial complex I. *J Mol Biol* 233(1), 109–22.
- [21] Jaworowski, A., Mayo, G., Shaw, D. C., Campbell, H. D., Young, I. G. (1981) Characterization of the respiratory NADH dehydrogenase of Escherichia coli and reconstitution of NADH oxidase in ndh mutant membrane vesicles. *Biochemistry* 20(12), 3621–8.
- [22] Campbell, H. D., Young, I. G. (1983) Stereospecificity and requirements for activity of the respiratory NADH dehydrogenase of Escherichia coli. *Biochemistry* 22(25), 5754–60.
- [23] Yankovskaya, V., Horsefield, R., Törnroth, S., Luna-Chavez, C., Miyoshi, H., Léger, C., Byrne, B., Cecchini, G., Iwata, S. (2003) Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation. *Science* 299(5607), 700–4.
- [24] Abrahamson, J. L., Baker, L. G., Stephenson, J. T., Wood, J. M. (1983) Proline dehydrogenase from Escherichia coli K12. Properties of the membrane-associated enzyme. *Eur J Biochem* 134(1), 77–82.
- [25] Lorence, R. M., Koland, J. G., Gennis, R. B. (1986) Coulometric and spectroscopic analysis of the purified cytochrome d complex of Escherichia coli: evidence for the identification of "cytochrome a1" as cytochrome b595. *Biochemistry* 25(9), 2314–21.
- [26] Rice, C. W., Hempfling, W. P. (1978) Oxygen-limited continuous culture and respiratory energy conservation in Escherichia coli. J Bacteriol 134(1), 115–24.
- [27] Salerno, J. C., Bolgiano, B., Poole, R. K., Gennis, R. B., Ingledew, W. J. (1990) Heme-copper and heme-heme interactions in the cytochrome bo-containing quinol oxidase of Escherichia coli. *J Biol Chem* 265(8), 4364–8.
- [28] Weber, J., Senior, A. E. (1997) Catalytic mechanism of F1-ATPase. *Biochim Biophys Acta* 1319(1), 19–58.
- [29] Senior, A. E., Nadanaciva, S., Weber, J. (2002) The molecular mechanism of ATP synthesis by F1F0-ATP synthase. *Biochim Biophys Acta* 1553(3), 188–211.
- [30] Abrahams, J. P., Leslie, A. G., Lutter, R., Walker, J. E. (1994) Structure at 2.8 A resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* 370(6491), 621–8.
- [31] Gibbons, C., Montgomery, M. G., Leslie, A. G., Walker, J. E. (2000) The structure of the central stalk in bovine F(1)-ATPase at 2.4 A resolution. *Nat Struct Biol* 7(11), 1055–61.

- [32] Leslie, A. G. W., Walker, J. E. (2000) Structural model of F1–ATPase and the implications for rotary catalysis. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 355(1396), 465–471.
- [33] **Rastogi, V. K., Girvin, M. E.** (1999) Structural changes linked to proton translocation by subunit c of the ATP synthase. *Nature* 402(6759), 263–8.
- [34] **Fillingame, R. H., Jiang, W., Dmitriev, O. Y., Jones, P. C.** (2000) Structural interpretations of F(0) rotary function in the Escherichia coli F(1)F(0) ATP synthase. *Biochim Biophys Acta* 1458(2-3), 387–403.
- [35] Wilkens, S., Zhou, J., Nakayama, R., Dunn, S. D., Capaldi, R. A. (2000) Localization of the delta subunit in the Escherichia coli F(1)F(0)-ATPsynthase by immuno electron microscopy: the delta subunit binds on top of the F(1). *J Mol Biol 295*(3), 387–91.
- [36] Dmitriev, O., Jones, P. C., Jiang, W., Fillingame, R. H. (1999) Structure of the membrane domain of subunit b of the Escherichia coli F0F1 ATP synthase. *J Biol Chem* 274(22), 15598–604.
- [37] Ahmad, Z., Senior, A. E. (2005) Identification of phosphate binding residues of Escherichia coli ATP synthase. *J Bioenerg Biomembr* 37(6), 437–40.
- [38] Rossmann, M. G., Moras, D., Olsen, K. W. (1974) Chemical and biological evolution of nucleotide-binding protein. *Nature* 250(463), 194–9.
- [39] Parkinson, J. S. (1993) Signal transduction schemes of bacteria. Cell 73(5), 857–71.
- [40] Ulrich, L. E., Koonin, E. V., Zhulin, I. B. (2005) One-component systems dominate signal transduction in prokaryotes. *Trends Microbiol* 13(2), 52–6.
- [41] Stock, A. M., Robinson, V. L., Goudreau, P. N. (2000) Two-component signal transduction. Annu Rev Biochem 69, 183–215.
- [42] Johnson, J. E., Cornell, R. B. (1999) Amphitropic proteins: regulation by reversible membrane interactions (review). *Mol Membr Biol* 16(3), 217–35.
- [43] Xie, M., Smith, J. L., Ding, Z., Zhang, D., Cornell, R. B. (2004) Membrane binding modulates the quaternary structure of CTP:phosphocholine cytidylyltransferase. J Biol Chem 279(27), 28817–25.
- [44] Taneva, S., Dennis, M. K., Ding, Z., Smith, J. L., Cornell, R. B. (2008) Contribution of each membrane binding domain of the CTP:phosphocholine cytidylyltransferase-alpha dimer to its activation, membrane binding, and membrane cross-bridging. J Biol Chem 283(42), 28137–48.
- [45] Ostrovsky de Spicer, P., Maloy, S. (1993) PutA protein, a membrane-associated flavin dehydrogenase, acts as a redox-dependent transcriptional regulator. *Proc Natl Acad Sci U S A 90*(9), 4295–8.
- [46] Williams, F., Hager, L. (1966) Crystalline flavin pyruvate oxidase from Escherichia coli. I. Isolation and properties of the flavoprotein. *Arch Biochem Biophys* 116(1), 168–76.
- [47] **O'Brien, T. A., Blake, R., Gennis, R. B.** (1977) Regulation by lipids of cofactor binding to a peripheral membrane enzyme: binding of thiamin pyrophosphate to pyruvate oxidase. *Biochemistry 16*(14), 3105–9.
- [48] Blake, R., O'Brien, T., Gennis, R., Hager, L. (1982) Role of the divalent metal cation in the pyruvate oxidase reaction. J Biol Chem 257(16), 9605–11.
- [49] Dym, O., Eisenberg, D. (2001) Sequence-structure analysis of FAD-containing proteins. *Protein Sci* 10(9), 1712–28.

- [50] **Hager, L.** (1957) Trypsin activation of a ferricyanide-linked pyruvic acid oxidation. *J Biol Chem* 229(1), 251–63.
- [51] Breslow, R. (1958) On the Mechanism of Thiamine Action. IV. Evidence from Studies on Model Systems. J Am Chem Soc 80, 3719–3726.
- [52] Schellenberger, A. (1967) Structure and Mechanism of Action of the Active Center of Yeast Pyruvate Decarboxylase. *Angew Chem Int Ed* 6(12), 1024–35.
- [53] 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(5296), 67–70.
- [54] Cunningham, C., Hager, L. (1975) Reactivation of the lipid-depleted pyruvate oxidase system from Escherichia coli with cell envelope neutral lipids. *J Biol Chem* 250(18), 7139–46.
- [55] Marchal, D., Pantigny, J., Laval, J., Moiroux, J., Bourdillon, C. (2001) Rate constants in two dimensions of electron transfer between pyruvate oxidase, a membrane enzyme, and ubiquinone (coenzyme Q8), its water-insoluble electron carrier. *Biochemistry* 40(5), 1248–56.
- [56] Abdel-Hamid, A., Attwood, M., Guest, J. (2001) Pyruvate oxidase contributes to the aerobic growth efficiency of Escherichia coli. *Microbiology* 147(Pt 6), 1483–98.
- [57] Phue, J., Noronha, S., Hattacharyya, R., Wolfe, A., Shiloach, J. (2005) Glucose metabolism at high density growth of E. coli B and E. coli K: differences in metabolic pathways are responsible for efficient glucose utilization in E. coli B as determined by microarrays and Northern blot analyses. *Biotechnol Bioeng* 90(7), 805–20.
- [58] Brown, T. D., Jones-Mortimer, M. C., Kornberg, H. L. (1977) The enzymic interconversion of acetate and acetyl-coenzyme A in Escherichia coli. J Gen Microbiol 102(2), 327–36.
- [59] Chang, Y. Y., Cronan, J. E. (1983) Genetic and biochemical analyses of Escherichia coli strains having a mutation in the structural gene (poxB) for pyruvate oxidase. *J Bacteriol* 154(2), 756–62.
- [60] **Kornberg, H. L.** (1966) The role and control of the glyoxylate cycle in Escherichia coli. *Biochem J* 99(1), 1–11.
- [61] http://www.genome.jp pathway-map00250.
- [62] Muller, Y., Schulz, G. (1993) Structure of the thiamin- and flavin-dependent enzyme pyruvate oxidase. *Science* 259, 965–967.
- [63] Sedewitz, B., Schleifer, K., Götz, F. (1984) Purification and biochemical characterization of pyruvate oxidase from Lactobacillus plantarum. *J Bacteriol* 160(1), 273–8.
- [64] Sedewitz, B., Schleifer, K., Götz, F. (1984) Physiological role of pyruvate oxidase in the aerobic metabolism of Lactobacillus plantarum. *J Bacteriol* 160(1), 462–5.
- [65] Juan, E. C. M., Hoque, M. M., Hossain, M. T., Yamamoto, T., Imamura, S., Suzuki, K., Sekiguchi, T., Takénaka, A. (2007) The structures of pyruvate oxidase from *Aerococcus viridans* with cofactors and with a reaction intermediate reveal the flexibility of the active-site tunnel for catalysis. *Acta Crystallographica Section F* 63(11), 900–907.
- [66] 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(2), 95–103.
- [67] Cunningham, C., Hager, L. (1971) Crystalline pyruvate oxidase from Escherichia coli. 3. Phospholipid as an allosteric effector for the enzyme. *J Biol Chem* 246(6), 1583–9.

- [68] Cunningham, C., Hager, L. (1971) Crystalline pyruvate oxidase from Escherichia coli. II. Activation by phospholipids. J Biol Chem 246(6), 1575–82.
- [69] Recny, M., Hager, L. (1983) Isolation and characterization of the protease-activated form of pyruvate oxidase. Evidence for a conformational change in the environment of the flavin prosthetic group. J Biol Chem 258(8), 5189–95.
- [70] Mather, M., Gennis, R. (1985) Spectroscopic studies of pyruvate oxidase flavoprotein from Escherichia coli trapped in the lipid-activated form by cross-linking. J Biol Chem 260(19), 10395–7.
- [71] Russell, P., Hager, L., Gennis, R. (1977) Characterization of the proteolytic activation of pyruvate oxidase. Control by specific ligands and by the flavin oxidation-reduction state. *J Biol Chem* 252(21), 7877–82.
- [72] Russell, P., Schrock, H., Gennis, R. (1977) Lipid activation and protease activation of pyruvate oxidase. Evidence suggesting a common site of interaction on the protein. *J Biol Chem* 252(21), 7883–7.
- [73] Hager, L. (1991) Studies on the mechanism of activation of pyruvate oxidase by lipids and by limited proteolysis., 277–285. VCH.
- [74] Chang, Y. Y., Cronan, J. E. (1984) An Escherichia coli mutant deficient in pyruvate oxidase activity due to altered phospholipid activation of the enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A 81*(14), 4348–4352.
- [75] Bertagnolli, B., Hager, L. (1991) Minimum requirements for protease activation of flavin pyruvate oxidase. *Biochemistry* 30(33), 8131–7.
- [76] **Zhang, T., Hager, L.** (1987) Binding of pyruvate oxidase alpha-peptide to phospholipid vesicles. *Arch Biochem Biophys* 255(1), 201–4.
- [77] Grabau, C., Chang, Y., Cronan, J. J. (1989) Lipid binding by Escherichia coli pyruvate oxidase is disrupted by small alterations of the carboxyl-terminal region. *J Biol Chem* 264(21), 12510–9.
- [78] Wang, A., Chang, Y., Cronan, J. J. (1991) Role of the tetrameric structure of Escherichia coli pyruvate oxidase in enzyme activation and lipid binding. *J Biol Chem* 266(17), 10959–66.
- [79] Eisenberg, D. (1984) Three-dimensional structure of membrane and surface proteins. Annu Rev Biochem 53, 595–623.
- [80] Recny, M., Grabau, C., Cronan, J. J., Hager, L. (1985) Characterization of the alpha-peptide released upon protease activation of pyruvate oxidase. *J Biol Chem* 260(26), 14287–91.
- [81] Connell, N., Han, Z., Moreno, F., Kolter, R. (1987) An E. coli promoter induced by the cessation of growth. *Mol Microbiol* 1(2), 195–201.
- [82] Mülhardt, C. (2006) *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*. Elsevier GmbH, Spektrum Akademischer Verlag.
- [83] Lämmli, U. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(259), 680–685.
- [84] Bohannon, D. E., Connell, N., Keener, J., Tormo, A., Espinosa-Urgel, M., Zambrano, M. M., Kolter, R. (1991) Stationary-phase-inducible "gearbox" promoters: differential effects of katF mutations and role of sigma 70. *J Bacteriol* 173(14), 4482–92.
- [85] Müller, S., Hoege, C., Pyrowolakis, G., Jentsch, S. (2001) SUMO, ubiquitin's mysterious cousin. Nat Rev Mol Cell Biol 2(3), 202–10.

- [86] Butt, T. R., Edavettal, S. C., Hall, J. P., Mattern, M. R. (2005) SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins. *Protein Expr Purif* 43(1), 1–9.
- [87] Marblestone, J. G., Edavettal, S. C., Lim, Y., Lim, P., Zuo, X., Butt, T. R. (2006) Comparison of SUMO fusion technology with traditional gene fusion systems: enhanced expression and solubility with SUMO. *Protein Sci* 15(1), 182–9.
- [88] Macheroux, P. (1999) Flavoprotein Protocols (Methods in Molecular Biology), volume 131, chapter I, 1–7. Humana Press Inc.
- [89] Bradford, 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.
- [90] Weidner, A. (2003) Mechanistische und strukturelle Charakterisierung der Pyruvatoxidase aus Escherichia coli. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- [91] Weidner, A., Neumann, P., Wille, G., Stubbs, M. T., Tittmann, K. (2008) Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of full-length and proteolytically activated pyruvate oxidase from *Escherichia coli*. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun 64(Pt 3), 179–81.
- [92] Tittmann, K., Wille, G., Golbik, R., Weidner, A., Ghisla, S., Hübner, G. (2005) Radical Phosphate Transfer Mechanism for the Thiamin Diphosphate- and FAD-Dependent Pyruvate Oxidase from Lactobacillus plantarum. Kinetic Coupling of Intercofactor Electron Transfer with Phosphate Transfer to Acetyl-thiamin Diphosphate via a Transient FAD Semiquinone/Hydroxyethyl-ThDP Radical Pair. *Biochemistry* 44(40), 13291–303.
- [93] Bernad, S., Mäntele, W. (2006) An innovative spectroelectrochemical reflection cell for rapid protein electrochemistry and ultraviolet/visible/infrared spectroscopy. *Anal Biochem* 351(2), 214– 8.
- [94] Hellwig, P., Scheide, D., Bungert, S., Mäntele, W., Friedrich, T. (2000) FT-IR spectroscopic characterization of NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from Escherichia coli: oxidation of FeS cluster N2 is coupled with the protonation of an aspartate or glutamate side chain. *Biochemistry* 39(35), 10884–91.
- [95] Tittmann, K. (2000) Untersuchungen zu Katalysemechanismen von Flavin- und Thiamindiphosphat-abhängigen Enzymen. Aktivierung von Thiamindiphosphat in Enzymen. Katalysemechanismus der Pyruvatoxidase aus Lactobacillus plantarum. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- [96] O'Brien, T., Kluger, R., Pike, D., Gennis, R. (1980) Phosphonate analogues of pyruvate. Probes of substrate binding to pyruvate oxidase and other thiamin pyrophosphate-dependent decarboxylases. *Biochim Biophys Acta* 613(1), 10–7.
- [97] Nemeria, N., Chakraborty, S., Baykal, A., Korotchkina, L. G., Patel, M. S., Jordan, F. (2007) The 1',4'-iminopyrimidine tautomer of thiamin diphosphate is poised for catalysis in asymmetric active centers on enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(1), 78–82.
- [98] Reed, J., Reed, T. A. (1997) A set of constructed type spectra for the practical estimation of peptide secondary structure from circular dichroism. *Anal Biochem* 254(1), 36–40.
- [99] Sigma-Aldrich GmbH; Produkt: L6026; http://www.sigmaaldrich.com.

- [100] Goormaghtigh, E., Cabiaux, V., Ruysschaert, J. M. (1994) Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy. III. Secondary structures. *Subcell Biochem* 23, 405–50.
- [101] Goormaghtigh, E., Cabiaux, V., Ruysschaert, J. M. (1990) Secondary structure and dosage of soluble and membrane proteins by attenuated total reflection Fourier-transform infrared spectroscopy on hydrated films. *Eur J Biochem* 193(2), 409–20.
- [102] Kerth, A. M. (2003) Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie an Lipid-, Peptid- und Flüssigkristall-Filmen an der Luft/Wasser-Grenzfläche. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- [103] Dörfler, H.-D. (1994) Grenzflächen-und Kolloidchemie. VCH.
- [104] Amado, E., Kerth, A., Blume, A., Kressler, J. (2008) Infrared reflection absorption spectroscopy coupled with Brewster angle microscopy for studying interactions of amphiphilic triblock copolymers with phospholipid monolayers. *Langmuir* 24(18), 10041–53.
- [105] Dluhy, R. A., Stephens, S. M., Widayati, S., Williams, A. D. (1995) Vibrational spectroscopy of biophysical monolayers. Applications of IR and Raman spectroscopy to biomembrane model systems at interfaces. *Spectrochimica Acta Part A 51*, 1413–47.
- [106] **Mendelsohn, R., Brauner, J. W., Gericke, A.** (1995) External infrared reflection absorption spectrometry of monolayer films at the air-water interface. *Annu Rev Phys Chem* 46, 305–34.
- [107] Flach, C. R., Brauner, J. W., Taylor, J. W., Baldwin, R. C., Mendelsohn, R. (1994) External reflection FTIR of peptide monolayer films in situ at the air/water interface: experimental design, spectra-structure correlations, and effects of hydrogen-deuterium exchange. *Biophys J* 67(1), 402– 10.
- [108] Tittmann, K., Golbik, R., Uhlemann, K., Khailova, L., Schneider, G., Patel, M., Jordan, F., Chipman, D., Duggleby, R., Hübner, G. (2003) NMR analysis of covalent intermediates in thiamin diphosphate enzymes. *Biochemistry* 42(26), 7885–91.
- [109] **Gruys, K., Halkides, C., Frey, P.** (1987) Synthesis and properties of 2-acetylthiamin pyrophosphate: an enzymatic reaction intermediate. *Biochemistry* 26(24), 7575–85.
- [110] Kluger, R., Chin, J., Smyth, T. (1981) Thiamin-catalyzed decarboxylation of pyruvate. Synthesis and reactivity analysis of the central, elusive intermediate, alpha-lactylthiamin. *Journal of the American Chemical Society* 103(4), 884–888.
- [111] Krampitz, L. O., Greull, G., Miller, C. S., Bicking, J. B., Skeggs, H. R., Sprague, J. M. (1958) An Active Acetaldehyde-Thiamine Intermediate. *Journal of the American Chemical Society* 80(21), 5893–5894.
- [112] Piotto, M., Saudek, V., Sklenar, V. (1992) Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions. *J Biomol NMR* 2(6), 661–5.
- [113] Delaglio, F., Grzesiek, S., Vuister, G. W., Zhu, G., Pfeifer, J., Bax, A. (1995) NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J Biomol NMR* 6(3), 277–93.
- [114] Johnson, B. A. (2004) Using NMRView to visualize and analyze the NMR spectra of macromolecules. *Methods Mol Biol* 278, 313–52.
- [115] Linge, J. P., Habeck, M., Rieping, W., Nilges, M. (2003) ARIA: automated NOE assignment and NMR structure calculation. *Bioinformatics* 19(2), 315–6.

- [116] Rieping, W., Habeck, M., Bardiaux, B., Bernard, A., Malliavin, T. E., Nilges, M. (2007) ARIA2: automated NOE assignment and data integration in NMR structure calculation. *Bioinformatics* 23(3), 381–2.
- [117] **Cornilescu, G., Delaglio, F., Bax, A.** (1999) Protein backbone angle restraints from searching a database for chemical shift and sequence homology. *J Biomol NMR* 13(3), 289–302.
- [118] Laskowski, R. A., Rullmannn, J. A., MacArthur, M. W., Kaptein, R., Thornton, J. M. (1996) AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *J Biomol NMR 8*(4), 477–86.
- [119] Koch, M. H., Vachette, P., Svergun, D. I. (2003) Small-angle scattering: a view on the properties, structures and structural changes of biological macromolecules in solution. *Q Rev Biophys* 36(2), 147–227.
- [120] Roessle, M., Klaering, R., Ristau, U., Robrahn, B., Jahn, D., Gehrmann, T., Konarev, P., Round, A., Fiedler, S., Hermes, C., Svergun, D. (2007) Upgrade of the small-angle X-ray scattering beamline X33 at the European Molecular Biology Laboratory, Hamburg. J Appl Cryst 40, s190–s194.
- [121] Mylonas, E., Svergun, D. (2007) Accuracy of molecular mass determination of proteins in solution by small-angle X-ray scattering. J Appl Cryst 40, s245–s249.
- [122] Petoukhov, M., Konarev, P., Kikhney, A., Svergun, D. (2007) ATSAS 2.1 towards automated and websupported small-angle scattering data analysis. J Appl Cryst 40, s223–s228.
- [123] Konarev, P. V., Volkov, V. V., Sokolova, A. V., Koch, M. H. J., Svergun, D. I. (2003) PRIMUS: a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis. *Journal of Applied Crystallog*raphy 36(5), 1277–1282.
- [124] Svergun, D. I. (1992) Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. *Journal of Applied Crystallography* 25(4), 495–503.
- [125] Svergun, D. I. (1999) Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing. *Biophys J* 76(6), 2879–86.
- [126] König, S., Svergun, D., Koch, M. H., 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(37), 8726–31.
- [127] McPherson, A. (1982) The preparation and analysis of protein crystals. John Wiley and Sons.
- [128] Williams, F., Hager, L. (1961) A crystalline flavin pyruvate oxidase. J Biol Chem 236, PC36–7.
- [129] Garman, E. F., Schneider, T. R. (1997) Macromolecular Cryocrystallography. Journal of Applied Crystallography 30(3), 211–237.
- [130] Garman, E. (1999) Cool data: quantity AND quality. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 55(Pt 10), 1641–53.
- [131] Kabsch, W. (1993) Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *Journal of Applied Crystallography* 26(6), 795–800.
- [132] McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C., Read, R. J. (2007) Phaser crystallographic software. Journal of Applied Crystallography 40(4), 658–674.
- [133] Jones, T. A., Zou, J. Y., Cowan, S. W., Kjeldgaard, M. (1991) Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallogr* A 47 (Pt 2), 110–9.

- [134] Emsley, P., Cowtan, K. (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 60(Pt 12 Pt 1), 2126–32.
- [135] 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 D Biol Crystallogr 54*(Pt 5), 905–21.
- [136] Adams, P. D., Grosse-Kunstleve, R. W., Hung, L. W., Ioerger, T. R., McCoy, A. J., Moriarty, N. W., Read, R. J., Sacchettini, J. C., Sauter, N. K., Terwilliger, T. C. (2002) PHENIX: building new software for automated crystallographic structure determination. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 58*(Pt 11), 1948–54.
- [137] Neumann, P., Weidner, A., Pech, A., Stubbs, M. T., Tittmann, K. (2008) Structural basis for membrane binding and catalytic activation of the peripheral membrane enzyme pyruvate oxidase from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(45), 17390–5.
- [138] Wille, G. (2005) Infrarotspektroskopische, strukturelle und kinetische Untersuchung an Pyruvatoxidase aus *Lactabacillus plantarum*. *Dissertation*, *Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg*.
- [139] Bisswanger, H. (1981) Substrate specificity of the pyruvate dehydrogenase complex from Escherichia coli. J Biol Chem 256(2), 815–22.
- [140] Li, M., Ho, P. Y., Yao, S., Shimizu, K. (2006) Effect of lpdA gene knockout on the metabolism in Escherichia coli based on enzyme activities, intracellular metabolite concentrations and metabolic flux analysis by 13C-labeling experiments. *J Biotechnol* 122(2), 254–66.
- [141] Hill, A. (1910) The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves. *J Physiol* 40(Suppl), iv–vii.
- [142] Cornish-Bowden, A., Koshland, D. E. (1975) Diagnostic uses of the Hill (Logit and Nernst) plots. *J Mol Biol* 95(2), 201–12.
- [143] Frank, R. A. W., Titman, C. M., Pratap, J. V., Luisi, B. F., Perham, R. N. (2004) A molecular switch and proton wire synchronize the active sites in thiamine enzymes. *Science* 306(5697), 872–6.
- [144] Nemeria, N., Korotchkina, L., McLeish, M. J., Kenyon, G. L., Patel, M. S., Jordan, F. (2007) Elucidation of the chemistry of enzyme-bound thiamin diphosphate prior to substrate binding: defining internal equilibria among tautomeric and ionization states. *Biochemistry* 46(37), 10739– 44.
- [145] **Heinrich, C. P.** (1973) The number of coenzyme binding sites in transketolase from Baker's yeast. *Experientia 29*(10), 1227–8.
- [146] 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 U S A 99*(2), 591–5.
- [147] Killenberg-Jabs, M., König, S., Hohmann, S., Hübner, G. (1996) Purification and characterisation of the pyruvate decarboxylase from a haploid strain of Saccharomyces cerevisiae. *Biol Chem Hoppe Seyler* 377(5), 313–7.

- [148] 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 sitedirected mutagenesis. *Biochemistry* 36(7), 1900–5.
- [149] Jordan, F., Zhang, Z., Sergienko, E. (2002) Spectroscopic Evidence for participation of the 1',4'-Imino Tautomer of Thiamin Diphosphate in Catalysis by Yeast Pyruvate Decarboxylase. *Bioorg Chem* 30, 188–198.
- [150] 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'-iminopyrimidine tautomer along with its electrophilic role. *J Am Chem Soc* 125(42), 12732–8.
- [151] Nemeria, N., Baykal, A., Joseph, E., Zhang, S., Yan, Y., Furey, W., Jordan, F. (2004) Tetrahedral intermediates in thiamin diphosphate-dependent decarboxylations exist as a 1',4'-imino tautomeric form of the coenzyme, unlike the michaelis complex or the free coenzyme. *Biochemistry* 43(21), 6565–75.
- [152] Jordan, F., Nemeria, N. (2005) Experimental observation of thiamin diphosphate-bound intermediates on enzymes and mechanistic information derived from these observations. *Bioorg Chem* 33(3), 190–215.
- [153] Asztalos, P. (2008) Untersuchungen zu molekularen, strukturellen und biokatalytischen Aspekten des Vitamin B1-abhängigen Enzyms Transketolase A aus Escherichia coli. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- [154] Alstrup Lie, M., Schiøtt, B. (2008) A DFT study of solvation effects on the tautomeric equilibrium and catalytic ylide generation of thiamin models. J Comput Chem 29(7), 1037–47.
- [155] Seifert, F., Golbik, R., Brauer, J., Lilie, H., Schröder-Tittmann, K., Hinze, E., Korotchkina, L. G., Patel, M. S., Tittmann, K. (2006) Direct kinetic evidence for half-of-the-sites reactivity in the E1 component of the human pyruvate dehydrogenase multienzyme complex through alternating sites cofactor activation. *Biochemistry* 45(42), 12775–85.
- [156] O'Brien, T., Shelton, E., Mather, M., Gennis, R. (1982) Conformational studies of Escherichia coli pyruvate oxidase. *Biochim Biophys Acta* 705(3), 321–9.
- [157] Mather, M., Gennis, R. (1985) Kinetic studies of the lipid-activated pyruvate oxidase flavoprotein of Escherichia coli. *J Biol Chem* 260(30), 16148–55.
- [158] Barrow, G. (1984) Physikalische Chemie. Vieweg & Sohn.
- [159] Bertagnolli, B., Hager, L. (1991) Activation of Escherichia coli pyruvate oxidase enhances the oxidation of hydroxyethylthiamin pyrophosphate. *J Biol Chem* 266(16), 10168–73.
- [160] Fraaije, M. W., Mattevi, A. (2000) Flavoenzymes: diverse catalysts with recurrent features. *Trends Biochem Sci* 25(3), 126–32.
- [161] Massey, V. (2000) The chemical and biological versatility of riboflavin. *Biochem Soc Trans 28*(4), 283–96.
- [162] Wille, G., Meyer, D., Steinmetz, A., Hinze, E., Golbik, R., Tittmann, K. (2006) The catalytic cycle of a thiamin diphosphate enzyme examined by cryocrystallography. *Nat Chem Biol* 2(6), 324–8.
- [163] Rees, D. C., Farrelly, D. (1990) The Enzymes: Mechanisms of Catalysis, volume XIX, chapter II, 37–97. Academic Press Inc.

- [164] Gutowski, J. A., Lienhard, G. E. (1976) Transition state analogs for thiamin pyrophosphatedependent enzymes. *J Biol Chem* 251(9), 2863–6.
- [165] O'Brien, T., Gennis, R. (1980) Studies of the thiamin pyrophosphate binding site of Escherichia coli pyruvate oxidase. Evidence for an essential tryptophan residue. *J Biol Chem* 255(8), 3302–7.
- [166] Svergun, D. I., Petoukhov, M. V., Koch, M. H., König, S. (2000) Crystal versus solution structures of thiamine diphosphate-dependent enzymes. *J Biol Chem* 275(1), 297–302.
- [167] König, S., Wille, G., Koch, M. H. J. (2000) SAXS studies on the influence of substrate and cofactors on the conformation and oligomeric state of pyruvate oxidase from Lactobacillus plantarum. *Hasylab Annual Report* 319–320.
- [168] Mäntele, W. (1993) Reaction-induced infrared difference spectroscopy for the study of protein function and reaction mechanisms. *Trends Biochem Sci 18*(6), 197–202.
- [169] Tamm, L. K., Tatulian, S. A. (1997) Infrared spectroscopy of proteins and peptides in lipid bilayers. Q Rev Biophys 30(4), 365–429.
- [170] Barth, A., Zscherp, C. (2002) What vibrations tell us about proteins. *Q Rev Biophys* 35(4), 369–430.
- [171] Kötting, C., Gerwert, K. (2005) Proteins in action monitored by time-resolved FTIR spectroscopy. *Chemphyschem* 6(5), 881–8.
- [172] Zheng, Y.-J., Ornstein, R. L. (1996) A Theoretical Study of the Structures of Flavin in Different Oxidation and Protonation States. *Journal of the American Chemical Society* 118(39), 9402–9408.
- [173] **Rizzo, C. J.** (2001) Further computational studies on the conformation of 1,5-dihydrolumiflavin. *Antioxid Redox Signal* 3(5), 737–46.
- [174] Wille, G., Ritter, M., Friedemann, R., Mäntele, W., Hübner, G. (2003) Redox-triggered FTIR difference spectra of FAD in aqueous solution and bound to flavoproteins. *Biochemistry* 42(50), 14814–21.
- [175] Kao, Y.-T., Saxena, C., He, T.-F., Guo, L., Wang, L., Sancar, A., Zhong, D. (2008) Ultrafast dynamics of flavins in five redox states. *Journal of the American Chemical Society* 130(39), 13132–9.
- [176] Wohlfahrt, G., Witt, S., Hendle, J., Schomburg, D., Kalisz, H. M., Hecht, H. J. (1999) 1.8 and 1.9 A resolution structures of the Penicillium amagasakiense and Aspergillus niger glucose oxidases as a basis for modelling substrate complexes. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 55*(Pt 5), 969–77.
- [177] **Pollegioni, L., Diederichs, K., Molla, G., Umhau, S., Welte, W., Ghisla, S., Pilone, M. S.** (2002) Yeast D-amino acid oxidase: structural basis of its catalytic properties. *J Mol Biol* 324(3), 535–46.
- [178] Hecht, H. J., Kalisz, H. M., Hendle, J., Schmid, R. D., Schomburg, D. (1993) Crystal structure of glucose oxidase from Aspergillus niger refined at 2.3 A resolution. *J Mol Biol* 229(1), 153–72.
- [179] Wille, G., Ritter, M., Weiss, M., König, S., Mäntele, W., Hübner, G. (2005) The role of Val-265 for flavin adenine dinucleotide (FAD) binding in pyruvate oxidase: FTIR, kinetic, and crystallographic studies on the enzyme variant V265A. *Biochemistry* 44(13), 5086–94.
- [180] Dobritzsch, D., König, S., Schneider, G., Lu, G. (1998) High resolution crystal structure of pyruvate decarboxylase from Zymomonas mobilis. Implications for substrate activation in pyruvate decarboxylases. J Biol Chem 273(32), 20196–204.
- [181] Pang, S., Duggleby, R., Guddat, L. (2002) Crystal structure of yeast acetohydroxyacid synthase: a target for herbicidal inhibitors. *J. Mol. Biol.* 317, 249–62.

- [182] 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(3), 315–35.
- [183] Hasford, J. J., Kemnitzer, W., Rizzo, C. J. (1997) Conformational Effects on Flavin Redox Chemistry. *The Journal of Organic Chemistry* 62(16), 5244–5245.
- [184] 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(9), 2891–900.
- [185] Crosby, J., Lienhard, G. E. (1970) Mechanisms of thiamine-catalyzed reactions. A kinetic analysis of the decarboxylation of pyruvate by 3,4-dimethylthiazolium ion in water and ethanol. *J Am Chem Soc* 92(19), 5707–16.
- [186] Guo, F., Zhang, D., Kahyaoglu, A., Farid, R. S., Jordan, F. (1998) Is a hydrophobic amino acid required to maintain the reactive V conformation of thiamin at the active center of thiamin diphosphate-requiring enzymes? Experimental and computational studies of isoleucine 415 of yeast pyruvate decarboxylase. *Biochemistry* 37(38), 13379–91.
- [187] Kaplun, A., Binshtein, E., Vyazmensky, M., Steinmetz, A., Barak, Z., Chipman, D. M., Tittmann, K., Shaanan, B. (2008) Glyoxylate carboligase lacks the canonical active site glutamate of thiamine-dependent enzymes. *Nat Chem Biol* 4(2), 113–8.
- [188] Grabau, C., Cronan, J. J. (1986) In vivo function of Escherichia coli pyruvate oxidase specifically requires a functional lipid binding site. *Biochemistry* 25(13), 3748–51.
- [189] Chang, Y., Cronan, J. J. (1995) Detection by site-specific disulfide cross-linking of a conformational change in binding of Escherichia coli pyruvate oxidase to lipid bilayers. J Biol Chem 270(14), 7896–901. Abgelegt in : lipid binding site.
- [190] Frank, R. A. W., Leeper, F. J., Luisi, B. F. (2007) Structure, mechanism and catalytic duality of thiamine-dependent enzymes. *Cell Mol Life Sci 64*(7-8), 892–905.
- [191] Matthews, B. W. (1968) Solvent content of protein crystals. J Mol Biol 33(2), 491-7.
- [192] Liang, J., Dill, K. A. (2001) Are proteins well-packed? Biophys J 81(2), 751-66.
- [193] Dundas, J., Ouyang, Z., Tseng, J., Binkowski, A., Turpaz, Y., Liang, J. (2006) CASTp: computed atlas of surface topography of proteins with structural and topographical mapping of functionally annotated residues. *Nucleic Acids Res* 34(Web Server issue), W116–8.
- [194] **Meyer, D.** (2004) Mechanistische Analyse der Elektronentransferreaktion in Pyruvatoxidase aus *Lactobacillus plantarum. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg*.
- [195] Lim, L., Molla, G., Guinn, N., Ghisla, S., Pollegioni, L., Vrielink, A. (2006) Structural and kinetic analyses of the H121A mutant of cholesterol oxidase. *Biochem J* 400(1), 13–22.
- [196] Lyubimov, A. Y., Heard, K., Tang, H., Sampson, N. S., Vrielink, A. (2007) Distortion of flavin geometry is linked to ligand binding in cholesterol oxidase. *Protein Sci* 16(12), 2647–56.
- [197] Williams, S., Causgrove, T. P., Gilmanshin, R., Fang, K. S., Callender, R. H., Woodruff, W. H., Dyer, R. B. (1996) Fast events in protein folding: helix melting and formation in a small peptide. *Biochemistry* 35(3), 691–7.

- [198] Chen, E., Kumita, J. R., Woolley, G. A., Kliger, D. S. (2003) The kinetics of helix unfolding of an azobenzene cross-linked peptide probed by nanosecond time-resolved optical rotatory dispersion. J Am Chem Soc 125(41), 12443–9.
- [199] **Vu, D. M., Myers, J. K., Oas, T. G., Dyer, R. B.** (2004) Probing the folding and unfolding dynamics of secondary and tertiary structures in a three-helix bundle protein. *Biochemistry* 43(12), 3582–9.
- [200] Chang, Y., Cronan, J. J. (2000) Conversion of Escherichia coli pyruvate oxidase to an 'alphaketobutyrate oxidase'. *Biochem J* 352 *Pt* 3, 717–24.
- [201] Böhme, S. (2007) Analyse der katalytischen Funktion der hydrophilen Aminosäuren Glutamat 483 und Glutamin 122 im aktiven Zentrum der Pyruvatoxidase aus Lactobacillus plantarum. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- [202] Meyer, D. (2009) Kinetische und strukturelle Untersuchung der Katalysemechanismen ausgewählter Kofaktor-abhängiger Enzyme - Implikationen für die Decarboxylierung von alpha-Ketosäuren durch Thiamindiphosphat-abhängige Enzyme. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- [203] **Scopes, R. K.** (1978) Binding of substrates and other anions to yeast phosphoglycerate kinase. *Eur J Biochem* 91(1), 119–29.
- [204] Kyte, J. (1995) Mechanism in Protein Chemistry. Garland Publishing, Inc.
- [205] Turano, A., Furey, W., Pletcher, J., Sax, M., Pike, D., Kluger, R. (1982) Synthesis and crystal structure of an analog of 2-(.alpha.-lactyl)thiamin, racemic methyl 2-hydroxy-2-(2thiamin)ethylphosphonate chloride trihydrate. A conformation for a least-motion, maximumoverlap mechanism for thiamin catalysis. *J Am Chem Soc 104*(11), 3089–3095.
- [206] 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.
- [207] Zhang, S., Liu, M., Yan, Y., Zhang, Z., Jordan, F. (2004) C2-alpha-lactylthiamin diphosphate is an intermediate on the pathway of thiamin diphosphate-dependent pyruvate decarboxylation. Evidence on enzymes and models. *J Biol Chem* 279(52), 54312–8.
- [208] Bertagnolli, B., Hager, L. (1993) Role of flavin in acetoin production by two bacterial pyruvate oxidases. *Arch Biochem Biophys* 300(1), 364–71.
- [209] Chang, Y., Cronan, J. J. (1988) Common ancestry of Escherichia coli pyruvate oxidase and the acetohydroxy acid synthases of the branched-chain amino acid biosynthetic pathway. J Bacteriol 170(9), 3937–45.
- [210] Onuchic, J. N., Beratan, D. N., Winkler, J. R., Gray, H. B. (1992) Pathway analysis of protein electron-transfer reactions. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 21, 349–77.
- [211] Kentsis, A., Sosnick, T. R. (1998) Trifluoroethanol promotes helix formation by destabilizing backbone exposure: desolvation rather than native hydrogen bonding defines the kinetic pathway of dimeric coiled coil folding. *Biochemistry* 37(41), 14613–22.
- [212] **Buck, M.** (1998) Trifluoroethanol and colleagues: cosolvents come of age. Recent studies with peptides and proteins. *Q Rev Biophys* 31(3), 297–355.

- [213] Gao, X., Wong, T. C. (1998) Studies of the binding and structure of adrenocorticotropin peptides in membrane mimics by NMR spectroscopy and pulsed-field gradient diffusion. *Biophys J* 74(4), 1871–88.
- [214] **Maget-Dana, R.** (1999) The monolayer technique: a potent tool for studying the interfacial properties of antimicrobial and membrane-lytic peptides and their interactions with lipid membranes. *Biochim Biophys Acta* 1462(1-2), 109–40.
- [215] Brockman, H. (1999) Lipid monolayers: why use half a membrane to characterize proteinmembrane interactions? *Curr Opin Struct Biol* 9(4), 438–43.
- [216] Seelig, J., Seelig, A. (1980) Lipid conformation in model membranes and biological membranes. *Q Rev Biophys* 13(1), 19–61.
- [217] **Blume, A.** (1979) A comparative study of the phase transitions of phospholipid bilayers and monolayers. *Biochim Biophys Acta* 557(1), 32–44.
- [218] Marsh, D. (1996) Lateral pressure in membranes. Biochim Biophys Acta 1286(3), 183–223.
- [219] Hussain, H., Kerth, A., Blume, A., Kressler, J. (2004) Amphiphilic Block Copolymers of Poly(ethylene oxide) and Poly(perfluorohexylethyl methacrylate) at the Water Surface and Their Penetration into the Lipid Monolayer. *The Journal of Physical Chemistry B* 108(28), 9962–9969.
- [220] Henry, G. D., Sykes, B. D. (1994) Methods to study membrane protein structure in solution. *Methods Enzymol* 239, 515–35.
- [221] Opella, S. J., Kim, Y., McDonnell, P. (1994) Experimental nuclear magnetic resonance studies of membrane proteins. *Methods Enzymol* 239, 536–60.
- [222] Arseniev, A. S., Barsukov, I. L., Bystrov, V. F., Lomize, A. L., Ovchinnikov YuA (1985) 1H-NMR study of gramicidin A transmembrane ion channel. Head-to-head right-handed, single-stranded helices. *FEBS Lett* 186(2), 168–74.
- [223] Lomize, A. L., Pervushin, K. V., Arseniev, A. S. (1992) Spatial structure of (34-65)bacterioopsin polypeptide in SDS micelles determined from nuclear magnetic resonance data. *J Biomol NMR* 2(4), 361–72.
- [224] Kirkpatrick, S., Gelatt, C. D., Vecchi, M. P. (1983) Optimization by Simulated Annealing. Science 220(4598), 671–680.
- [225] Reiss-Husson, F., Luzzati, V. (1964) The Structure of the Micellar Solutions of Some Amphiphilic Compounds in Pure Water as Determined by Absolute Small-Angle X-Ray Scattering Techniques. J Phys Chem 68(12), 3504–3511.
- [226] Itri, R., Amaral, L. (1991) Distance Distribution Function of Sodium Dodecyl Sulfate Micelles by X-ray Scattering. J Phys Chem 95(1), 423–427.
- [227] Hassan, P. A., Fritz, G., Kaler, E. W. (2003) Small angle neutron scattering study of sodium dodecyl sulfate micellar growth driven by addition of a hydrotropic salt. *J Colloid Interface Sci* 257(1), 154–62.
- [228] Hassan, P. A., Sawant, S. N., Bagkar, N. C., Yakhmi, J. V. (2004) Polyaniline nanoparticles prepared in rodlike micelles. *Langmuir* 20(12), 4874–80.
- [229] Barlos, K., Gatos, D., Kallitsis, J., Papaphotiu, G., Sotiriu, P., Wenqing, Y., Schäfer, W. (1989) Darstellung geschützter Peptid-Fragmente unter Einsatz substituierter Triphenylmethyl-Harze. *Tetrahedron Letters* (30), 3943–3946.

- [230] Connors, K. A. (1990) Chemical Kinetics: The Study of Reaction Rates in Solution. Wiley-VCH, 1 edition.
- [231] Eigen, M., Hammes, G. G. (1963) ELEMENTARY STEPS IN ENZYME REACTIONS (AS STUD-IED BY RELAXATION SPECTROMETRY). *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 25, 1–38.
- [232] Fersht, A. (1999) *Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding*. W.H. Freeman and Company.
- [233] Wallace, A. C., Laskowski, R. A., Thornton, J. M. (1995) LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein Eng* 8(2), 127–34.

A Anhang

A.1 PCR-Programm zur Amplifizierung des alpha-Peptides

Schritt	Temperatur	Dauer (Sek.)	Bemerkungen
1	95 °C	300	
2	95 °C	60	
3	59 °C	60	Gradient 0,5 °C pro Zyklus
4	72 °C	30	zurück zu Schritt 2, 9x
5	95 °C	60	
6	72 °C	90	zurück zu Schritt 5, 19x
7	72 °C	180	
8	4 °C		

Tab. A.1: Verwendetes PCR-Programm zur Amplifizierung des *α*-Peptides

A.2 Synthesevorschrift zur Gewinnung des α -Peptides

Die Synthese des aus 23 Aminosäuren bestehenden α -Peptides (*EcPOX*_{550–572}, H-Met-Leu-Arg-Ala-Ile-Ile-Ser-Gly-Arg-Gly-Asp-Glu-Val-Ile-Glu-Leu-Ala-Lys-Thr-Asn-Trp-Leu-Arg-OH) erfolgte in Kooperation mit der AG Naturstoffbiochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg nach dem Prinzip der Festphasen-Synthese an einem Peptidsynthesizer (ABI 443A) im 0,125-mmol-Maßstab und unter Verwendung von Fmoc-Schutzgruppen. Die erste Aminosäure wurde nach bestehendem Protokoll an das Säulenmaterial (2-Chlorotritylchlorid) gebunden [229]. Die folgenden Syntheseschritte wurden in DMF (N,N-Dimethylformamid) unter Verwendung von 4 Teilen Aminosäure, 4 Teilen HCTU (2-(6-Chloro-1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylaminium hexafluoro-phosphat), 4 Teilen HOBt (4-Hydroxybenzotriazol) und 8 Teilen DIPEA (*N*,*N*-diisoproethylamin) durchgeführt. Die N-terminale Fmoc Schutzgruppe wurde mit einer Lösung von 2 %/ Piperidin/2 % DBU (1,8-Diaza-bicyclo[5.4.0]-7undecen) in DMF abgespalten. Nach beendeter Synthese wurden das Peptid vom Säulenmaterial abgespalten, indem es für 3 Stunden bei Raumtemperatur in einer Lösung aus 5 % TIS (Triisopropylsilan), 5 % Wasser und 90 % TFA (Trifluoressigsäure) inkubiert wurde. Gleichzeitig wurden bei dieser Prozedur auch die Seitenkettenschutzgruppen abgetrennt. Das Rohprodukt wurde mit Diethylether gewaschen, filtriert und mittels präparativer Umkehrphasen-HPLC (C18-Säule, 5-35 % Wasser/Acetonitril Gradient (mit 0,1 % TFA)) gereinigt. Die erfolgreiche Synthese wurde mittels Massenspektrometrie bestätigt [137].



A.3 Expression und Reinigung des *α*-Peptides

Abb. A.1: Reinigung des rekombinant exprimierten *α*-Peptides

A Elutionsprofil des HPLC-Laufs (präparative Säule) mit 1 mL/min. **B** MALDI-Massespektren der in A erhaltenen Peaks. Spektrum 2 zeigt den Peak des α -Peptides (MW 2641 Da).

A.4 Minimalmodell der Bindung von MAP

A.4.1 Zur Bindung von MAP im Gleichgewicht



Abb. A.2: Einzelne Schritte der Ligandenbindung

In Abbildung A.2 sind die auftretenden katalytischen Schritte der Bindung von MAP an das C(2)-Atom des ThDP zusammengefasst. Zur Verallgemeinerung wird folgendes Schema verwendet: In diesem Schema steht L für eine Ligandenspezies. In der

E + L
$$\xrightarrow{k_1}$$
 EL $\xrightarrow{k_2}$ EL'

Abb. A.3: Verallgemeinertes Schema zur Ligandenbindung

vorliegenden Arbeit wurden hierfür MAP bzw. Acetylphosphinat eingesetzt. In EL ist der Ligand nichtkovalent an das Enzym assoziiert, während in EL' eine kovalente Bindung des Liganden zum Kofaktor ThDP vorliegt. Es gelten definitionsgemäß $K_1 = \frac{k_{-1}}{k_1}$ und $K_2 = \frac{k_{-2}}{k_2}$.

Nach dem Massenwirkungsgesetz gelten im Gleichgewicht folgende Beziehungen:

$$K_1 = \frac{(E)_{eq}(L)_{eq}}{(EL)_{eq}}$$
$$K_2 = \frac{(EL)_{eq}}{(EL')_{eq}}.$$

Die mit *"eq"* indizierten Größen sind die Gleichgewichtskonzentrationen. Im vorliegenden Fall gilt $(L_0) \gg (E_0)$ und daher $(L)_{eq} \approx (L_0)$. Die Bilanzgleichung für die Enzymspezies ergibt sich zu:

$$(E_0) = (E) + (EL) + (EL')$$

= (E) $\left(1 + \frac{(L_0)}{K_1} + \frac{(L_0)}{K_1 K_2}\right).$

Folglich erhält man für die Konzentrationen der Enzymspezies im Gleichgewicht:

$$(E)_{eq} = \frac{\frac{K_1 K_2}{1 + K_2} \cdot (E_0)}{\frac{K_1 K_2}{1 + K_2} \cdot (L_0)}$$
$$(EL)_{eq} = \frac{\frac{K_2(E_0)}{1 + K_2} \cdot (L_0)}{\frac{K_1 K_2}{1 + K_2} + (L_0)}$$
$$(EL')_{eq} = \frac{\frac{1}{1 + K_2} \cdot (E_0)(L_0)}{\frac{K_1 K_2}{1 + K_2} + (L_0)}.$$

Die Konzentrationsabhängigkeit aller 3 Enzymspezies ist wesentlich durch die komplexe Größe $K_{app} = \frac{K_1K_2}{1+K_2}$ bestimmt. In den thermodynamischen CD-Titrationsexperimenten ist das CD-Signal bei 305 nm der Konzentration der chiralen Spezies EL' (enzymgebundenes Phosphonolaktyl-ThDP) direkt proportional. Somit ist K_{app} aus der Auftragung der CD-Signale gegen (L_0) erhältlich. Für die Gleichgewichtskonstante der Gesamtreaktion gilt:

$$K_D = K_1 K_2 = \frac{(E)_{eq}(L)_{eq}}{(EL')_{eq}}.$$

Der Zusammenhang zwischen *K*_{app} und *K*_D ist gegeben durch:

$$K_{\rm app} = \frac{K_D}{1+K_2}.$$

Weiterhin gilt:

$$\frac{K_{\text{app}}}{K_1} = \frac{K_2}{1+K_2}$$

Aufgrund dieser Beziehung ist durch die Bestimmung des K_1 -Wertes in kinetischen Experimenten auch eine Abschätzung des kinetisch unzugänglichen K_2 -Wertes möglich. Für die MAP-Bindung an die aktivierte *Ec*POX wird ein K_1 -Wert von 14,4 mM und ein K_{app} von 0,221 mM erhalten. Der resultierende K_2 -Wert (1,56·10⁻²) zeigt, dass die kovalente Bindungsbildung eine stark vorwärts gerichtete Reaktion darstellt. Dieser Befund steht in qualitativer Übereinstimmung mit den Resultaten für die Ligandenbindung an anderen ThDP-abhängigen Enzymen. Aufgrund dieser Tatsache gilt in guter Näherung $K_{app} \approx K_D$.

A.4.2 Zur Kinetik der MAP-Bindung

Das Reaktionsschema A.3 wird durch das folgende Differentialgleichungssystem beschrieben. Da in allen kinetischen Untersuchungen $(L_0) \gg (E_0)$ realisiert wurde, kann in guter Näherung $(L) \approx (L_0)$ gesetzt werden. Dies gewährleistet die analytische Lösbarkeit des Differentialgleichungssytems.

$$d(E)/dt = -k_1(E)(L_0) + k_{-1}(EL)$$
(A.1)

$$d(EL)/dt = k_1(E)(L_0) - (k_{-1} + k_2)(EL) + k_{-2}(EL')$$
(A.2)

$$d(EL')/dt = k_2(EL) - k_{-2}(EL')$$
(A.3)

Für $(E_0) \neq 0$ und $(EL)_0 = (EL')_0 = 0$ wird folgende Zeitfunktion für die Beobachtungsgröße (EL') gefunden:

$$(EL') = (EL')_{eq} \left\{ 1 + \frac{\lambda_2}{\lambda_1 - \lambda_2} e^{-\lambda_1 t} - \frac{\lambda_1}{\lambda_1 - \lambda_2} e^{-\lambda_2 t} \right\}$$
(A.4)

mit

$$(EL')_{eq} = \frac{k_1 k_2}{\lambda_1 \lambda_2} (L_0)(E_0)$$

und

$$\lambda_1 = \frac{\Sigma}{2} + \sqrt{\frac{\Sigma^2}{4} - P}$$

und

$$\lambda_2 = \frac{\Sigma}{2} - \sqrt{\frac{\Sigma^2}{4} - P}.$$

Weiterhin gelten:

$$\Sigma = k_1(L_0) + k_{-1} + k_2 + k_{-2}$$
$$P = k_1k_2(L_0) + k_1k_{-2}(L_0) + k_{-1}k_{-2}$$
$$= k_1(L_0)(k_2 + k_{-2}) + k_{-1}k_{-2}.$$

Da generell $\lambda_1 > \lambda_2$ sowie $\lambda_1 > 0$ und $\lambda_2 > 0$ gelten, zeigt Gleichung A.4, dass die Funktion (*EL*) = f(t) im allgemeinen durch eine lag-Phase gekennzeichnet ist. Sind λ_1 und λ_2 vergleichbar, sind in (*EL*) = f(t) 2 Exponentialterme auf derselben Zeitskala beobachtbar. Für den Fall, dass $\lambda_1 \gg \lambda_2$ gilt, ist die Länge der lag-Phase im Wesentlichen durch λ_1 , die Halbwertszeit der (*EL'*)-Bildung praktisch durch λ_2 bestimmt ($\tau_{1/2} \approx ln2/\lambda_2$). Im Extremfall wird auf der Beobachtungszeitskala nur eine Exponentialfunktion beobachtet, während die andere in die Totzeit der Messmethode fällt. Zwei Grenzfälle, in denen eine starke Separation der Zeitskalen vorliegt, werden im folgenden gegenübergestellt.

a) $k_1(L_0), k_{-1} \ll k_2, k_{-2}$

Für die langsame Phase gilt dann

$$K_2 = \frac{(EL)}{(EL')}.$$

Die Spezies (EL) und (EL') liegen in einem schnellen Gleichgewicht vor. Die Bilanzgleichung für die Enzymspezies lautet daher:

$$(E_0) = (E) + (EL)\left(1 + \frac{1}{K_2}\right).$$

 $\text{Mit } \gamma = \frac{K_2 + 1}{K_2} \text{ folgt}$

$$(EL) = \frac{1}{\gamma}((E_0) - (E)).$$

Eingesetzt in Gleichung A.1 ergibt sich:

$$d(E)/dt = -\left(k_1(L_0) + \frac{k_{-1}}{\gamma}\right)(E) + \frac{k_{-1}}{\gamma}(E_0).$$

Mit $\left(k_1(L_0) + \frac{k_{-1}}{\gamma}\right) = k_{obs}$ und $\frac{k_{-1}}{\gamma}(E_0) = Q$ ergibt sich:
 $d(E)/dt = -k_{obs}(E) + Q.$

Bestimmte Integration in den Grenzen von 0 bis t liefert:

$$(E) = \left\{ (E_0) - (E)_{eq} \right\} e^{-k_{obs}t} + (E)_{eq}$$

mit $k_{obs} = k_1(L_0) + \frac{k_{-1}K_2}{1+K_2}$ und $(E)_{eq} = \frac{Q}{k_{obs}} = \frac{\frac{K_1K_2}{1+K_2}(E_0)}{\frac{K_1K_2}{1+K_2} + (L_0)}.$

Langsame Bildung des Komplexes (*EL*) würde also eine lineare Abhängigkeit der beobachtbaren Geschwindigkeitskonstante von (L_0) bedingen. Empirisch ist das nicht der Fall. Damit kann ausgeschlossen werden, dass der Schritt 1 geschwindigkeitsbestimmend ist. Dies ist auch insofern plausibel, als dass typische K_1 -Werte im Bereich von 10⁴–10⁷ M⁻¹s⁻¹ liegen, die bei den niedrigsten hier verwendeten MAP-Konzentrationen (0,1 mM) wenigstens zu $k_{obs} \ge 1$ s⁻¹ führen würden. b) $k_1(L_0), k_{-1} \gg k_2, k_{-2}$

In diesem Fall stellt sich sehr schnell ein Gleichgewicht zwischen (E), (L) und (EL) ein. Für die dann folgende langsame Phase, in der (EL') generiert wird, gilt also:

$$(EL) = \frac{(E)(L_0)}{K_1}.$$

Die Bilanzgleichung lautet daher:

$$(E_0) = (E) \left(1 + \frac{(L_0)}{K_1} \right) + (EL').$$

Folglich gilt für (E): $(E) = ((E_0) - (EL')) \left(\frac{K_1}{K_1 + (L_0)}\right)$.

Eingesetzt in Gleichung A.1 erhält man:

$$d(EL')/dt = \left(\frac{k_2(L)}{K_1 + (L)}\right)(E_0) - \left\{\frac{k_2(L)}{K_1 + (L)} + k_{-2}\right\}(EL')$$

Mit $\left(\frac{k_2(L)}{K_1 + (L)}\right)(E_0) = R$ und $\left\{\frac{k_2(L)}{K_1 + (L)} + k_{-2}\right\} = k_{obs}$ ergibt sich:
 $d(EL')/dt = R - k_{obs}(EL').$

Integration führt auf:

$$(EL') = \left(\frac{R}{k_{obs}}\right) (1 - e^{-k_{obs}t}) = (EL')_{eq} (1 - e^{-k_{obs}t})$$

$$\operatorname{mit} k_{obs} = \frac{k_2(L_0)}{K_1 + (L_0)} + k_{-2} \operatorname{und} (EL')_{eq} = \frac{R}{k_{obs}} = \frac{\frac{1}{1 + K_2}(E_0)(L_0)}{\frac{K_1 K_2}{1 + K_2} + (L_0)}$$

Damit hängt bei Geschwindigkeitsbestimmung durch den zweiten Schritt k_{obs} hyperbol von (L_0) ab. Dies ist mit den vorliegenden Daten zur MAP-Bindung an *Ec*POX in Übereinklang.

A.5 Kinetisches Modell der reduktiven Halbreaktion



Abb. A.4: Minimalmodell der reduktiven Halbreaktion von nicht-aktivierter EcPOX.

In Abbildung A.4 sind die auftretenden katalytischen Schritte der reduktiven Halbreaktion nochmals zusammengefasst. Zur Vereinfachung sind die ThDP-Intermediate abgekürzt. Unter der stets erfüllten Bedingung $(S_0) \gg (E_0)$ ist das angegebene Reaktionsschema als Sequenz von Reaktionen erster Ordnung behandelbar. Die Bildung von *ES* aus *E* und *S* ist eine Reaktion pseudo-erster Ordnung. Daher existieren für die mit dem Reaktionsschema assoziierten Differentialgleichungen prinzipiell analytische Lösungen. Unter der naheliegenden Voraussetzung, dass die Bildung des Michaelis-Menten-Komplexes *ES* bei allen gewählten Substratkonzentrationen sehr viel schneller erfolgt als alle Folgeschritte, äquilibriert das System nach der Vereinigung von *E* und *S* im Reaktionsansatz unter Bildung von *ES* mit einer Geschwindigkeitskonstanten

$$k = k_1(S_0) + k_{-1}.$$

Dieser Prozess wird jedoch aufgrund der begrenzten Zeitauflösung der gewählten Untersuchungsmethode (1-2 ms im *stopped-flow*-Spektrometer) nicht beobachtet. Die katalytisch relevanten Folgeprozesse laufen unter permanenter Aufrechterhaltung des schnellen Gleichgewichts zwischen den Spezies *E*, *S* und *ES* ab. Die im Reaktionsschema angegebenen Schritte 2 bis 6 implizieren prinzipiell 5 Exponentialterme $e^{-\lambda_i t}$ (i=1,...,5) mit 5 effektiven beobachtbaren Geschwindigkeitskonstanten λ_i . Im folgenden wird analysiert, wie die Geschwindigkeitskonstanten k_i und k_{-i} der Elementarschritte in die λ_i -Werte eingehen. Hierzu werden zunächst die relevanten Differentialgleichungen für die Reaktionssequenz aufgestellt.

Es gelten generell:

$$d(E)/dt = -k_1(E)(S_0) + k_{-1}(ES)$$
(A.5)

$$d(ES)/dt = k_1(E)(S_0) - (k_{-1} + k_2)(ES) + k_{-2}(EL)$$
(A.6)

$$d(EL)/dt = k_2(ES) - (k_{-2} + k_3)(EL)$$
(A.7)

$$d(EH)/dt = k_3(EL) - k_4(EH) + k_{-4}(EAc)$$
(A.8)

$$d(EAc)/dt = k_4(EH) - (k_{-4} + k_5)(EAc) + k_{-5}(E_aAc)$$
(A.9)

$$d(E_aAc)/dt = k_5(EAc) - (k_{-5} + k_6)(E_aAc)$$
(A.10)

$$d(E_a)/dt = k_6(E_a A c). \tag{A.11}$$

Addition von A.5 und A.6 führt zu

$$d(E)/dt + d(ES)/dt = -k_2(ES) + k_{-2}(EL).$$
(A.12)

Da der erste Schritt bereits einem Gleichgewicht unterliegt, gilt das Massenwirkungsgesetz:

$$(ES) = \frac{(E)(S_0)}{K_1}.$$
 (A.13)

(E) und (ES) sind damit linear voneinander abhängig und die Anzahl der zu berücksichtigenden Differentialgleichungen verringert sich um eins. Man erhält aus A.12:

$$\left(1 + \frac{(S_0)}{K_1}\right) d(E)/dt = -k_2 \frac{(E)(S_0)}{K_1} + k_{-2}.$$
(A.14)

Mit den Abkürzungen $\mu^{-1} = \left(1 + \frac{(S_0)}{K_1}\right)$, $\kappa_2 = k_2 \frac{(S_0)}{K_1}$ und $\alpha = \mu k_2 \frac{(S_0)}{K_1} = \frac{k_2(S_0)}{K_1 + (S_0)}$ erhält man anstelle der Gleichungen A.5–A.7:

$$d(E)/dt = -\alpha(E) + \mu k_{-2}(EL)$$
(A.15)

$$d(EL)/dt = \kappa_2(E) - (k_{-2} + k_3)(EL).$$
(A.16)

Damit sind die Differentialgleichungen A.15 und A.16 sowie A.8–A.11 für die Aufgabenstellung relevant. Die gesuchten λ_i sind die Eigenwerte des Differentialgleichungssytems und ergeben sich als Lösungen der Koeffizientendeterminante [230]. Es gilt:

$$0 = \begin{vmatrix} -(\alpha - \lambda) & \mu k_{-2} & 0 & 0 & 0 & 0 \\ \kappa_2 & -(k_{-2} + k_3 - \lambda) & 0 & 0 & 0 \\ 0 & k_3 & -(k_4 - \lambda) & k_{-4} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & k_4 & -(k_{-4} + k_5 - \lambda) & k_{-5} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & k_5 & -(k_{-5} + k_6 - \lambda) & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & k_6 & \lambda \end{vmatrix}$$

Mit

$$D_r = \begin{vmatrix} -(k_4 - \lambda) & k_{-4} & 0 & 0 \\ k_4 & -(k_{-4} + k_5 - \lambda) & k_{-5} & 0 \\ 0 & k_5 & -(k_{-5} + k_6 - \lambda) & 0 \\ 0 & 0 & k_6 & \lambda \end{vmatrix}$$

folgt

$$0 = \{(\alpha - \lambda)(k_{-2} + k_3 - \lambda) - \mu \kappa_2 k_{-2}\} D_r \equiv D_\lambda$$

 D_{λ} wird Null falls

$$(\alpha - \lambda)(k_{-2} + k_3 - \lambda) - \mu \kappa_2 k_{-2} = 0$$
(A.17)

bzw.
$$D_r = 0.$$
 (A.18)

Gleichung A.17 lässt sich durch Ausmultiplizieren umformen zu:

$$0 = \lambda^2 - \lambda(k_{-2} + k_3 + \alpha) + \frac{k_2 k_3(S_0)}{K_1 + (S_0)}.$$

Dies ist eine quadratische Gleichung. Mit

$$\Sigma = k_{-2} + k_3 + \alpha$$
$$P = \frac{k_2 k_3 (S_0)}{K_1 + (S_0)}$$

lauten ihre Lösungen:

$$\lambda_{1} = +\frac{\Sigma}{2} + \sqrt{\frac{\Sigma^{2}}{4} - P}$$
(A.19)

$$\lambda_{2} = +\frac{\Sigma}{2} - \sqrt{\frac{\Sigma^{2}}{4} - P}.$$
(A.20)

Beide Eigenwerte hängen über Σ und P von (S_0) ab. D_r lässt sich darstellen als:

$$D_r = (-\lambda) \begin{vmatrix} -(k_4 - \lambda) & k_{-4} & 0 \\ k_4 & -(k_{-4} + k_5 - \lambda) & k_{-5} \\ 0 & k_5 & -(k_{-5} + k_6 - \lambda) \end{vmatrix}$$
$$= (-\lambda)(D_s).$$

 D_r wird Null falls

$$\lambda_0 = 0$$

bzw. $D_s = 0$.

 $D_s = 0$ ist eine algebraische Gleichung 3. Grades. Für D_s gilt:

$$D_s = -(k_4 - \lambda)\left((k_{-4} + k_5 - \lambda)(k_{-5} + k_6 - \lambda) - k_{-5}k_5\right) + k_{-4}k_4(k_{-5} + k_6 - \lambda).$$
(A.21)

Ausmultiplizieren und Ordnen nach Potenzen von λ liefert:

$$0 = \lambda^{3} - \lambda^{2}(k_{4} + k_{-4} + k_{5} + k_{-5} + k_{6}) + \lambda \left\{ (k_{4} + k_{6})k_{5} + (k_{4} + k_{-4})(k_{-5} + k_{6}) \right\} - k_{4}k_{5}k_{6}.$$

Diese Gleichung erzeugt drei λ_i -Werte (λ_3 , λ_4 , λ_5). Gleichungen 3. Grades sind prinzipiell lösbar. Die Resultate sind jedoch schwierig zu handhaben und im vorliegenden Fall kaum einer direkten Auswertung zugänglich.

Wesentlich ist hingegen, dass die Eigenwerte λ_3 , λ_4 und λ_5 nicht von (S_0) abhängen. Dies liegt in der vorausgesetzten Irreversibilität der Decarboxylierung begründet. Da die empirischen

 k_{obs} -Werte der reduktiven Halbreaktion deutlich von der Substratkonzentration abhängen, kommen λ_3 , λ_4 und λ_5 nicht als deren Erklärungsgrundlage in Frage. Damit entfällt insbesondere die Möglichkeit, dass die k_{obs} -Werte der reduktiven Halbreaktion die Geschwindigkeitskonstanten des Elektronentransfers selbst (k_4 , k_{-4}) in irgendeiner Weise reflektieren. Zwei Spezialfälle in Hinblick auf λ_3 , λ_4 und λ_5 , die der Realität nahe kommen könnten, seien näher betrachtet.

a) $k_{-4}pprox 0$

Dieser Fall liegt in guter Näherung bei der verwandten *Lp*POX vor. Gl. A.21 geht dann in folgende Gleichung über:

$$0 = (k_4 - \lambda) \left((k_5 - \lambda)(k_{-5} + k_6 - \lambda) - k_{-5}k_5 \right).$$
(A.22)

Die Lösungen lauten dann:

$$\lambda_3 = k_4 \tag{A.23}$$

$$\lambda_{4/5} = \frac{\Omega}{2} \pm \sqrt{\frac{\Omega^2}{4} - R} \tag{A.24}$$

mit $\Omega = k_5 + k_{-5} + k_6$ und $R = k_5 k_6$.

In diesem Falle wäre ein λ_i -Wert direkt mit k_4 zu identifizieren.

b)
$$k_5, k_{-5} \gg k_4, k_{-4}, k_6$$

In diesem Fall gilt:

$$\lambda_3 = k_5 + k_{-5} \tag{A.25}$$

$$\lambda_{4/5} = \frac{\Theta}{2} \pm \sqrt{\frac{\Theta^2}{4} - Q} \tag{A.26}$$

mit
$$\Theta = k_4 + \frac{k_{-4}K_5}{1+K_5} + \frac{k_6}{1+K_5}$$

und $Q = \frac{k_4k_6}{1+K_5}$
und $K_5 = \frac{k_{-5}}{k_5}$.

Das Vorliegen dieses Falles wäre für die *Ec*POX nicht unwahrscheinlich, da Helix-Coil-Übergänge sehr schnell erfolgen können [197][198][199] und eine solche Konformationsänderung in den Aktivierungsprozess involviert ist. Eine Verifikation ist jedoch mit den hier verwendeten Methoden nicht möglich und für die Diskussion der in den Progresskurven der reduktiven Halbreaktion zum Ausdruck kommenden Prozesse auch nicht wesentlich.

A.5.1 Diskussion des geschwindigkeitsbestimmenden Prozesses

Insgesamt ist anzunehmen, dass die in λ_3 , λ_4 und λ_5 zum Ausdruck kommenden Prozesse für die hier genutzten Messmethoden zu schnell ablaufen. Damit engt sich die Diskussion auf die Schritte 2 und 3, d.h. auf die Bildung der kovalenten C-C-Bindung am Kofaktor ThDP bzw. die Decarboxylierung des Laktyl-ThDP ein.

Sind die Schritte 2 und 3 durch größenordnungsmäßig verschiedene Geschwindigkeitskonstanten gekennzeichnet, so unterscheiden sich auch λ_1 und λ_2 stark voneinander ($\lambda_1 \gg \lambda_2$). Dies wird als kinetische "Entkopplung" bezeichnet und die Gleichgewichte stellen sich in Stufen ein. In diesem Falle gelten in guter Näherung:

$$\lambda_1 \approx \Sigma \tag{A.27}$$

$$\lambda_2 \approx \frac{P}{\Sigma}.$$
 (A.28)

Zwei wesentliche Grenzfälle sind denkbar:

c) $k_2, k_{-2} \gg k_3$

Man erhält:

$$\lambda_1 \approx k_{-2} + \frac{k_2(S_0)}{K_1 + (S_0)} \tag{A.29}$$

$$\lambda_2 \approx \frac{\frac{\kappa_3}{(1+K_2)}(S_0)}{\left(\frac{K_1K_2}{(1+K_2)}\right) + (S_0)}.$$
(A.30)

d) $k_3 \gg k_2, k_{-2}$

Man erhält:

$$\lambda_1 \approx k_3 \tag{A.31}$$

$$\lambda_2 \approx \frac{k_2(S_0)}{K_1 + (S_0)}$$
 (A.32)

In beiden Fällen würde sich in der Progresskurve der FAD-Reduktion jeweils der schnellere Prozess als kurze lag-Phase zeigen. Falls dieser Prozess in der Totzeit der Messmethode abgeschlossen ist, werden monoexponentiell abklingende Progresskurven erhalten, deren Zeitskalen durch $\frac{1}{\lambda_2}$ bestimmt sind. In beiden Grenzfällen hängt die somit beobachtbare Geschwindigkeitskonstante λ_2 hyperbol von (S_0) ab. Aus dem Verlauf der Auftragung von k_{obs} gegen

 (S_0) kann also nicht erschlossen werden, ob die Decarboxylierung (Fall c) oder die Substratbindungsbildung (Fall d) geschwindigkeitsbestimmend ist. Dennoch kann im vorliegenden Fall die C-C-Bindungsbildung als geschwindigkeitsbestimmender Schritt favorisiert werden. Die empirisch beobachtbaren Geschwindigkeitskonstanten der reduktiven Halbreaktion hängen tatsächlich hyperbol von (S_0) ab (siehe Abb. 3.14 und 3.18). Zur Unterscheidung der beiden Grenzfälle bietet sich die Betrachtung der Halbsättigungswerte (im Text als K1 bezeichnet) an. Diese sind mit 665,9 mM (nicht-aktivierte EcPOX) und 39,9 mM (aktivierte EcPOX) sehr hoch. Träfe der Fall c zu, so wären diese Werte als komplexe Größe $\frac{K_1K_2}{1+K_2}$ zu interpretieren. Da aus den Experimenten zur MAP-Bindung bekannt ist, dass die C-C-Bindungsbildung im Gleichgewicht weit auf der Seite des kovalenten Adduktes liegt ($K_2 \leq 10^{-2}$), hätte man dann für K_1 Werte von ≈ 60 M (nicht-aktivierte *EcPOX*) bzw. 3 M (aktivierte *EcPOX*) zu veranschlagen. Diese Werte wären selbst für eine primäre Bindung des Substrates am Enzym viel zu hoch und nicht charakteristisch für einen "spezifischen" Assoziationsprozess. Der typische Bereich für empirische K_1 -Werte der primären Substratbindung liegt bei 10⁻³–10 mM [231][232]. Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass die beobachteten Halbsättigungswerte unmittelbar K_1 repräsentieren. Dies ist bei Geschwindigkeitsbestimmung durch die C-C-Bindungsbildung der Fall. Die Beobachtung nichtkovalent assoziierter Pyruvatmoleküle in Kristallstrukturen der EcPOX kann als weiteres Indiz langsamer C-C-Bindungsbildung gewertet werden. Auch die Studien zur Intermediatanalyse mittels ¹H-NMR sprechen für eine schnelle Decarboxylierung ($k_{\text{decarb}} > 600s^{-1}$).
0.14 (u 0.13 0.12 0.12 0.12 0.11 0.10 0.1

A.6 Reduktive Halbreaktion

Abb. A.5: Amplituden a₁ **der reduktiven Halbreaktion von nicht-aktivierter** *Ec***POX.** Ansatz: 1 mg/mL Enzym in 100 mM KPP pH 6.0, 10 mM MgSO₄, 1 mM ThDP, Pyruvat (5-700 mM), anaerobe Bedingungen.

Tab. A.2: Apparente Geschwindigkeitskonstanten der reduktiven Halbreaktion vo	n ak-
tivierter EcPOX. Die erhaltenen Progresskurven wurden nach Gleichung 3.5 angepasst.	

Pyruvat	ka	k _b	k _c	<i>a</i> ₁	<i>a</i> ₂	<i>a</i> 3	n
mM	s^{-1}	s ⁻¹	s^{-1}				
1	$19,\!32\pm0,\!68$	8,88 ± 0,67	$0,\!42 \pm 0,\!03$	$5,58*10^{-2}$	3,33*10 ⁻²	$1,51*10^{-2}$	0,106
5	85,43 ± 0,29	$4,\!62\pm0,\!18$	$0,28\pm0,02$	8,63*10 ⁻²	$1,31*10^{-2}$	$1,13*10^{-2}$	0,095
20	$291,\!00 \pm 2,\!78$	22,14 ± 1,59	2,31 ± 0,21	$8,76*10^{-2}$	$0,85*10^{-2}$	$1,03*10^{-2}$	0,093
50	$430,20 \pm 10,25$	70,80 ± 7,30	$4,\!97\pm0,\!33$	$8,15*10^{-2}$	$6,63*10^{-2}$	$1,00*10^{-2}$	0,093
100	$574,\!60 \pm 15,\!45$	$42,\!67 \pm 2,\!91$	$\textbf{2,73} \pm \textbf{0,18}$	8,42*10 ⁻²	$0,62*10^{-2}$	$0,90*10^{-2}$	0,076

A.7 Reoxidation des FAD von nicht-aktivierter EcPOX



Abb. A.6: Kinetik der Reoxidation des enzymgebundenen FAD in nicht-aktivierter *Ec*POX unter aeroben Bedingungen.

Reduziertes Enzym (1 mg/mL in 300 mM KPP pH 6.0, 10 mM MgSO₄, 1 mM ThDP, 50 mM Pyruvat) wurde mit luftgesättigtem Puffer versetzt und die Reoxidation bei 438 nm verfolgt [90]. Die Geschwindigkeitskonstante der Reoxidation beträgt k_{reox} 0,08 s⁻¹. Die Ergebnisse stehen im Gegensatz zu Befunden in der Literatur [159], in denen enzymgebundenes FAD nicht reoxidierbar sein soll.

A.8 SAXS

Tab. A.3: Übersicht über die berechneten Gyrationsradien von nicht-aktivierter und aktivierter *Ec*POX. Die Kinetik der Proteolyse wurde in Gegenwart von 5 μ g/mL α-Chymotrypsin bei pH 6.0 verfolgt.

Protein	Konzentration	R _G	Molekulare
			Masse
	mg/mL ⁻¹	nm	kDa
EcPOX	2	3 <i>,</i> 85 ± 0 <i>,</i> 002	220
EcPOX	5	3,92 ± 0,001	244
EcPOX	10	3,95 ± 0,000	240
EcPOX	20	3,95 ± 0,000	248
EcPOX	40	3,97 ± 0,001	231
EcPOX	60	3,82 ± 0,009	194
EcPOX 20 mM MAP	5	3,82 ± 0,001	212
EcPOX 150 mM Pyruvat	3	$4,\!53\pm0,\!006$	236
EcPOX Proteolyse 4 min	3	$4,\!40\pm0,\!007$	198
<i>Ec</i> POX Proteolyse 7,8 min	3	4,17 ± 0,002	189
EcPOX Proteolyse 11,8 min	3	$4,07\pm0,002$	181
EcPOX Proteolyse 15,8 min	3	3,94 ± 0,002	177
$EcPOX_{\Delta 23}$	5	3,76 ± 0,015	135



A.9 Kinetiken der limitierten Proteolyse

Abb. A.7: Übersicht über die Kinetiken der Experimente mit limitierter Proteolyse. Ansatz: 3 mg/mL *Ec*POX in 100 mM KPP pH 6.0, 20 mM MgSO₄, 5 mM ThDP, Substrat oder substratanaloge Verbindung [137], 20 μ g/mL α -Chymotrypsin, Stopp der Reaktion nach definierten Inkubationszeiten mit SDS-Probenpuffer. Oberhalb der Gelabbildungen sind die Inkubationszeiten (in Minuten) angegeben. M steht für Proteingrößenmarker.

A ohne Pyruvat, **B** 200 mM Pyruvat, **C** 20 mM MAP, **D** 100 μ M Thiaminthiazolondiphosphat, **E** 290 μ M Dithionit unter anaeroben Bedingungen, **F** ohne ThDP.



Abb. A.8: Übersicht über die Kinetiken der Experimente mit limitierter Proteolyse bei den *Ec*POX-Varianten. A *Ec*POX-Phe465Ala-Variante B *Ec*POX-Phe465Ile-Variante Ansatz: 3 mg/mL *Ec*POX in 100 mM KPP pH 6.0, 20 mM MgSO₄, 5 mM ThDP, 200 mM Pyruvat, 20 μ g/mL α -Chymotrypsin, Stopp der Reaktion nach definierten Inkubationszeiten mit SDS-Probenpuffer. Oberhalb der Gelabbildungen sind die Inkubationszeiten (in Minuten) angegeben. M steht für Proteingrößenmarker.

stik für Datensammlung und Modellierung der Kristallstrukturen von nicht-aktivierter und proteolytisch aktivierter	e. Werte in Klammern beziehen sich auf den Bereich der höchsten Auflösung.	
Tab. A.4: Statisti	Pyruvatoxidase. I	$\sum F_{ohs} - F_{calc} $
۲.	—	6

 $R_{cryst} = \frac{\sum ||F_{obs}| - |F_{colc}||}{\sum ||F_{obs}|}, R_{free} \text{ ist } R_{cryst} \text{ fur 5 \% der Daten, die nicht der Verfeinerung unterlagen.}$

		—			6							_															
	$EcPOX_{\Delta 23}$ MAP	BESSY BL14.1	0,91840	$P2_{1}2_{1}2_{1}$	$201.61 \times 205.21 \times 214.3$	12	2,3	87,4 (74,9)	8,2 (80,9)	2263671	341742	15,27 (2,86)		20,0-2,3	48,96	18,05	22,52		48974	1410	06	1056	0,005	1,061		97,03	0,14
	EcPOX _{A23} Pyruvat	BESSY BL14.1	0,91840	P212121	$201.83 \times 205.81 \times 214.27$	12	2,2	78,3 (68,0)	7,2 (91,4)	1821869	350910	16,94 (2,26)		20,0-2,2	46,52	16,55	20,89		48561	2550	75	066	0,006	1,102		97,03	0,16
	EcPOX MAP	BESSY BL14.1	0,91840	$P4_{3}2_{1}2$	$152.51 \times 152.51 \times 154.71$. 61	3,2	92,7 (98,0)		456048	28505	29,70 (3,65)		37,5–3,2	68,36	25,21	30,05		8690	0	10	160	0,006	0,988		89,03	0,72
ensammlung	EcPOX Pyruvat	BESSY BL14.1	0,91840	P43212	$152.51 \times 152.51 \times 154.71$. 2	3,25	95,7 (96,7)		448560	28036	31,92 (3,90)	'erfeinerung	20,0-3,25	93,42	20,47	24,79		8703	0	10	160	0,006	1,045		88,5	0,54
Da	$EcPOX_{\Delta 23}$ —	BESSY BL14.1	0,91840	$P2_{1}2_{1}2_{1}$	$203.24 \times 207.05 \times 214.54$	12	2,5	99,7 (98,5)	13,1 (70,8)	1610583	309571	20,75 (1,95)		30,0–2,5	60,20	18,34	19,77		47891	1329	180	960	0,013	1,467		97,5	0'0
	EcPOX —	Rigaku MM007	1,54180	$P4_{3}2_{1}2$	$151.36 \times 151.36 \times 153.74$	2.	2,9	98,6 (99,6)	7,3 (74,4)	417728	39657	25,07 (2,54)		30,0–2,9	72,85	18,32	21,60		8684	0	10	160	0,007	1,129		95,2	0,3
	Enzym Substrat bzwanaloga	Strahlenquelle	Wellenlänge	Raumgruppe Finheitezellnarameter	a, b, c [Å]	Monomere pro asu	Auflösung [Å]	Vollständigkeit [%]	R _{meas} [%]	# Reflexe ingesamt	# Reflexe einzigartig	$1/\sigma_I$		Auflösung [Å]	Wilson B $[Å^2]$	R _{crust} [%]	Rfree [%]	# Atome im Modell	# Protein	# Wasser	# Sulfat/Phosphat	# ThDP, FAD, Mg ²⁺	r.m.s.d. Bindungslängen [Å]	r.m.s.d. Bindungswinkel [°]	Ramachandran-Plot	besonders bevorzugt [%]	nicht erlaubt [%]

A.10 Elektronendichte des C-Terminus



Abb. A.9: Elektronendichte des C-Terminus (Asp560 – Arg572) der nicht-aktivierten *Ec*POX (*SA omit map*). Die Karte wurde bis zu einem Signal/Rausch-Verhältnis von 3 σ konturiert.

A.11 Oberflächenstruktur der EcPOX



Abb. A.10: Darstellung der Hydrophobizität der Oberfläche von POX aus *E. coli*. Geladene Aminosäuren sind grau und hydrophobe Aminosäuren sind orange dargestellt. A Nichtaktivierte *Ec*POX und B Δ 23-*Ec*POX

A.12 Kofaktorbindung in EcPOX



Abb. A.11: Übersicht über die an der Kofaktorbindung beteiligten Reste. A ThDP **B** FAD. Diese Abbildung wurde mit dem Programm LIGPLOT generiert [233].



A.13 Temperaturfaktoren der EcPOX

Abb. A.12: Übersicht über die Temperaturfaktoren des Proteinrückgrates der nichtaktivierten *Ec*POX. Die Säulen geben den Mittelwert der B-Faktoren des Proteinrückgrates von Monomer A und B, die schwarzen Fehlerbalken die Unterschiede der B-Faktoren zwischen den beiden Untereinheiten wieder.



Abb. A.13: Übersicht über die Temperaturfaktoren des Proteinrückgrates der aktivierten *Ec***POX.** Die Säulen geben den Mittelwert der B-Faktoren des Proteinrückgrates der 12 Monomere, die schwarzen Fehlerbalken die Abweichungen der Untereinheiten untereinander wieder.



A.14 Knick des FAD um die N(5)-N(10)-Achse

Abb. A.14: Übersicht über die nichtplanaren Konformationen des FAD in verschiedenen Kristallstrukturen.

A Nicht-aktivierte *Ec*POX 18,8° (2 F₀F_c-Karte konturiert mit 1.0 σ) **B** Aktivierte *Ec*POX 26,5° (2 F₀F_c-Karte konturiert mit 1.8 σ) **C** Aktivierte *Ec*POX mit gebundenem PLThDP 14,9° (2 F₀F_c-Karte konturiert mit 1.6 σ) **D** Aktivierte *Ec*POX mit gebundenem LThDP 15,3° (2 F₀F_c-Karte konturiert mit 1.8 σ)



A.15 Hydrophobizitätsplot des *α*-Peptides

Abb. A.15: Hydrophobizitätsplot des α -Peptides. Die Hydrophobizität wurde anhand der Skala nach Eisenberg [79] aufgetragen. Positive Zahlenwerte bezeichnen hydrophobe Aminosäurereste, negative stehen für hydrophile Reste.



A.16 NMR-Spektren des α-Peptides

Abb. A.16: 2D-¹H-NMR-TOCSY-Spektrum des α -Peptides in Gegenwart von SDS-Mizellen Ansatz: chemisch synthetisiertes unmarkiertes α -Peptid (1 mM α -Peptid in 20 mM KPP pH 6.0 (10 % D₂O)) in Anwesenheit von SDS-Mizellen (150 mM deuteriertes SDS (d₂₅-SDS)).



Abb. A.17: 2D-¹H-NMR-NOESY-Spektrum des α -Peptides in Gegenwart von SDS-Mizellen Ansatz: chemisch synthetisiertes unmarkiertes α -Peptid (1 mM α -Peptid in 20 mM KPP pH 6.0 (10 % D₂O)) in Anwesenheit von SDS-Mizellen (150 mM deuteriertes SDS (d₂₅-SDS)).

Nr.	AS	Proton	ppm		Nr.	AS	Proton	ppm	Nr.	AS	Proton	ppm
1	Met	HA	4,128		9	Arg	HN	7,964	17	Ala	HN	7,561
		HB3	2,301				HA	4,463			HA	4,162
		HB2	2,300				HB3	1,945			HB*	1,369
		HG3	-				HB2	1,726	18	Lys	HN	8,318
		HG2	-				HG3	1,601		-	HA	3,899
		HE*	-				HG2	1,600			HB3	1,843
2	Leu	HN	8,638				HD3	3,097			HB2	1,809
		HA	4,070				HD2	3,096			HG3	-
		HB3	1,741				HE	7,201			HG2	-
		HB2	1,590		10	Gly	HN	8,360			HD3	-
		HG	1,669				HA1	3,878			HD2	-
		HD1*	0,893				HA2	3,667			HE*	-
		HD2*	0,840		11	Asp	HN	8,221			HZ*	-
3	Arg	HN	8,239				HA	4,305	19	Thr	HN	8,279
		HA	3,885				HB3	2,656			HA	4,013
		HB3	1,822				HB2	2,655			HB	3,944
		HB2	1,821		12	Glu	HN	7,974			HG2*	1,445
		HG3	1,766				HA	4,054	20	Asn	HN	7,854
		HG2	1,765				HB3	2,067			HA	4,537
		HD3	3,121				HB2	2,032			HB3	2,367
		HD2	3,120				HG3	2,318			HB2	2,308
		HE	7,012				HG2	2,120			HD21	7,406
4	Ala	HN	7,485		13	Val	HN	7,770			HD22	6,855
		HA	4,156				HA	3,628	21	Trp	HN	7,898
_	- 11	HB*	1,387				HB	2,168			HA	4,706
5	lle		7,612				HGI*	0,990			HB3	3,279
			3,910		14	T1.	HG2"	0,893			HB2	3,171
			1,927		14	ne		7,936				7.139
		HGI3	1,009					3,570				9,090 7.495
			1,219					1,900				7,485
		ПG2 ПD1*	0,001					-				7,555
6	По	HN	7 522				HC^{2*}	- 0.855			HH2	6 909
0	ne		3 911				HD1*	0,855	22	Lou	HN	7 589
		HB	1 881		15	Ghi	HN	7 802		Leu	HA	4 278
		HG13	-			Olu	HA	3 962			HB3	1,2,0
		HG12	_				HB3	1 996			HB2	1 589
		HG2*	0.851				HB2	1,995			HG	1,544
		HD1*	0.768				HG3	2.270			HD1*	0.830
7	Ser	HN	7.778				HG2	2.269			HD2*	0.781
·		HA	4,164		16	Leu	HN	7,898	23	Arg	HN	7,411
		HB3	3,875				HA	3,977		-0	HA	4,020
		HB2	3,835				HB3	1,775			HB3	1,749
8	Gly	HN	7,922				HB2	1,774			HB2	1,579
	,	HA1	4,151				HG	1,600			HG3	1,435
		HA2	3,640				HD1*	0,819			HG2	1,434
1	<u> </u>	1	.	1			HD2*	0,818			HD3	3,018
				1		1	1				HD2	3,017
											HE	6.937

Tab. A.5: Zuordnung der chemischen Verschiebungen zu den Aminosäuren des α -Peptides. AS: Aminosäure, ppm: chemische Verschiebung in ppm.

Dank

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich danke ganz herzlich Herrn Prof. Dr. Kai Tittmann für die Überlassung des interessanten Themas und die Möglichkeit diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu können. Weiterhin möchte ich mich für die Aufnahme und Auswertung der NMR-Spektren der *Ec*POX bedanken und für die Möglichkeit als Stipendiat des Graduiertenkolleg 1026 finanziert zu werden.

Prof. Dr. Milton T. Stubbs danke ich für die Möglichkeit die gewachsenen Proteinkristalle an seiner Drehanode untersuchen zu können und die Unterstützung bei der Auswertung und der Interpretation der Daten.

Dr. Piotr Neumann danke ich für die Hilfe bei den kristallographischen Messungen an der Drehanode und am Synchrotron in Berlin und der Auswertung der Datensätze. Auch möchte ich mich für die netten Gespräche im "Lager" bedanken.

Bei Dr. Andreas Kerth und Tina Weber möchte ich mich für die Aufnahme der IRRA-Spektren und die Hilfe bei der Interpretation dieser bedanken.

Ich danke sehr herzlich Dr. Georg Wille für die Aufnahme der zyklischen Voltammogramme und der redoxinduzierten FT-IR-Spektren und die Hilfe bei deren Interpretation. Weiterhin möchte ich mich für die nette Zeit in Hamburg bei den Synchrotronmessungen und für die geduldige Hilfe und Anregungen bei den anfänglichen Problemen des Laboralltags bedanken.

Ein besonderer Dank gebührt auch PD Dr. Stephan König für die Aufnahme und Auswertung der SAXS-Daten. Weiterhin möchte ich mich bei ihm für die sarkastische Art und die erquickende Betrachtung zwischenmenschlicher Beziehungen bedanken.

Für die Aufnahme und Zuordnung der 2D-NMR-Spektren des α -Peptides möchte ich mich bei Dr. Uli Weininger bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gebührt Michael Spinka, der mit seiner analytischen Art mathematische wie kinetische Problemfälle scheinbar mühelos durchschaut und in jeder Argumentation einen Haken findet. Für die Unterstützung bei der Abfassung des mathematischen Anhangs sowie für die Korrektur der Arbeit möchte ich mich bedanken. Außerdem möchte ich mich für die Gespräche über Gott und die Welt, Syrien, Grammatiken verschiedenster Länder und die heimische Flora bedanken. Frau Schröder-Tittmann danke ich für die Begleitung bei den molekularbiologischen Arbeiten zur Generierung des SUMO-alpha Fusionsproteins.

Herrn PD Dr. Ralph Golbik danke ich für die Synthese des Substratanalogon MAP wodurch eine Reihe von Experimenten erst möglich geworden sind.

Der Arbeitsgruppe Enzymologie und Molekulare Enzymologie danke ich für die schöne Zeit und die hilfreichen Diskussionen im Labor. Besonders möchte ich mich bei Herrn Danilo Meyer bedanken, der unter anderem die Phosphinat-Titrationen am Chirascan[™] von Prof. Dr. Frank Jordan in Newark durchgeführt hat. Und natürlich bedanke ich mich bei allen, die die Teepause zu einem Exkurs über weite Bereiche des gesellschaftlichen Lebens werden ließen.

Für die finanzielle Unterstützung bedanke ich mich bei der Graduiertenförderung des Landes Sachsen-Anhalt und beim DFG-Graduiertenkolleg 1026. In diesem Zusammenhang möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Milton T. Stubbs, Mechtild Wahle und den Mitgliedern des Kollegs für die schöne Zeit bedanken.

Bei meinen Freunden und meiner Familie möchte ich mich für die Unterstützung vor allem in schwierigen Zeiten bedanken.

Erklärung

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

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

Halle/Saale,

Lebenslauf

Persönliche Angaben	Name: Vorname: geboren: Familienstand: Nationalität: Adresse:	Weidner Annett 21. Januar 1979 in Halle/Saale ledig deutsch Ernst-Eckstein-Str. 28, 06110 Halle/Saale
	e-Mail:	annett.weidner@biochemtech.uni-halle.de
Schulbildung		
09/1985-08/1991	Polytechnische O	berschule "Karl Marx", Halle/Saale
09/1991-07/1998	Mathematisch-na	turwissenschaftliches Gymnasium
	"Georg Cantor",	Halle/Saale, Abschluss Abitur (1,6)
Universitäre Ausbildung		
10/1998-07/2003	Biochemiestudiu	m an der Martin-Luther-Universität
	Halle-Wittenberg	, Abschluss Diplom (1,3)
10/2003-05/2009	Promotion an der	r Martin-Luther-Universität
	Naturwissenscha	ftliche Fakultät I - Biowissenschaften
	Institut für Bioch	emie und Biotechnologie
	AG Molekulare E	Enzymologie
	Prof. Dr. Kai Tittr	nann
	Thema: "Studien	zur Struktur, Funktion und Aktivierung
	der membran-ass	oziierten Pyruvatoxidase aus Escherichia coli"
12/2009-	Wissenschaftliche	er Mitarbeiter (Post-doc)
	Martin-Luther-U	niversität Halle-Wittenberg
	Naturwissenscha	ftliche Fakultät I - Biowissenschaften
	Institut für Bioch	emie und Biotechnologie
	AG Physikalische	e Biotechnologie
	Prof. Dr. Milton 7	T. Stubbs

Ausseruniversitäre Praktika

08/2001-09/2001	Karolinska Institute, Stockholm, Schweden
	Molecular Structural Biology; Prof. Dr. Gunter Schneider
04/2002-05/2002	Aventis Pharma GmbH, Frankfurt/Main
	Biocenter/Analytics; Dr. Gudrun Wildegger
Stipendien	
10/2003-10/2005	Graduiertenförderung des Landes Sachsen-Anhalt
	inklusive: 10 Monate Elternzeit
11/2005-05/2009	DFG-Graduiertenkolleg 1026 "Conformational transitions
	macromolecular interactions"

Präsentationen

09/2006	9. Heart of Europe Meeting on Bio-Crystallography, Teistungenburg:
	Crystal structure of pyruvate oxidase from Escherichia coli
05/2008	7th International Conference on Mechanisms and Physiology
	of Thiamine, Wittenberg:
	Structural insights into the peripheral membrane protein
	pyruvate oxidase from <i>E. coli</i>
09/2008	11. Heart of Europe Meeting on Bio-Crystallography, Greifswald:
	Structural insights into the peripheral membrane protein
	pyruvate oxidase from <i>E. coli</i>
2005-2009	Präsentationen bei Frühlings- und Herbsttagungen des GRK 1026
Poster	
03/2007	MIPP (Membrane Interacting Peptides and Proteins), Halle
08/2007	Deutsche Gesellschaft für Kristallographie, workshop am BESSY, Berlin:
	"Data collection with synchrotron radiation"
02/2008	1. Internationales Meeting des Graduiertenkollegs 1026, Halle

- 05/2008 7th International Conference on Mechanisms and Physiology of Thiamine, Wittenberg
- 06/2009 8th European Symposium of The Protein Society, Zürich, Schweiz

Publikationen

K. Tittmann, G. Wille, R. Golbik, <u>A. Weidner</u>, S. Ghisla, G. Hübner (2005) Radical Phosphate Transfer Mechanism for the Thiamin Diphosphate- and FAD-Dependent Pyruvate Oxidase from *Lactobacillus plantarum*. Kinetic Coupling of Intercofactor Electron Transfer with Phosphate Transfer to Acetyl-thiamin Diphosphate via a Transient FAD Semiquinone/Hydroxyethyl-ThDP Radical Pair. *Biochemistry* 44, 13291–303

<u>A. Weidner</u>, P. Neumann, G. Wille, M.T. Stubbs, K. Tittmann (2008) Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of full-length and proteolytically activated pyruvate oxidase from *Escherichia coli Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 64, 179–81

P. Neumann*, <u>A. Weidner</u>*, A. Pech, M.T. Stubbs, K. Tittmann (2008) Structural basis for membrane binding and catalytic activation of the peripheral membrane enzyme pyruvate oxidase from *Escherichia coli*. *PNAS* 105, 17390–17395, * equal contribution

<u>A. Weidner</u>, P. Neumann, A. Pech, M.T. Stubbs, K. Tittmann (2009) New insights into the membrane-binding and activation mechanism of pyruvate oxidase from *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 61, 88–92