

Kinetische und strukturelle Untersuchungen zur  
Donorsubstrat- und Ligandenbindung an Transketolase  
aus *Saccharomyces cerevisiae*

**Dissertation**



zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

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

von

Erik Fiedler

geb. am 11.06.1972 in Quedlinburg

Gutachter:

1. Prof. Dr. G. Hübner
2. Prof. Dr. G. Schneider
3. Prof. Dr. G. Sprenger

Halle/Saale 21.11.2002

**urn:nbn:de:gbv:3-00004415**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-00004415>]

## Abkürzungsverzeichnis

BSA	Rinderserumalbumin
CD	Circulardichroismus
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTE	1,4-Dithioerythrit
DHETHDP	2-( $\alpha,\beta$ )-dihydroxyethyl-ThDP
DL-DHETHDP	racemisches 2-( $\alpha,\beta$ )-dihydroxyethyl-ThDP
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Ery-4-P	D-Erythrose-4-phosphat
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
Fru-6-P	D-Fructose-6-phosphat
G6P-DH	D-Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
GA	Glycolaldehyd
GDH	Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.8)
Gra-3-P	D-Glycerinaldehyd-3-phosphat
Gly-Gly	Glycyl-glycin (Diglycin)
HPA	3-Hydroxypyruvat
$K_D$	Dissoziationskonstante
$K_M$	Michaelis-Menten-Konstante
NADH	Nicotinsäureamidadeninucleotid, reduziert
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
G6PI	Glucose-6-Phosphat-Isomerase
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
Rib-5-P	D-Ribose-5-phosphat
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
ThDP	Thiamindiphosphat
TK	Transketolase (EC 2.2.1.1)
TK-E418A	Transketolasevariante E418A

TK-H263A	Transketolasevariante H263A
TPI	Triosephosphatisomerase (EC 5.3.1.1)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Xu-5-P	D-Xylulose-5-phosphat
WT-TK	Wildtyp von Transketolase

### **Anmerkungen zur Terminologie**

Die in dieser Arbeit verwendeten Anglizismen wurden nur dann benutzt, wenn sie feste Bestandteile des Sprachgebrauchs in der heutigen Biochemie sind. Diese Wörter sind kursiv gedruckt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind Bruchstellen in Zahlen durch „ . „ gekennzeichnet.

## Inhaltsverzeichnis

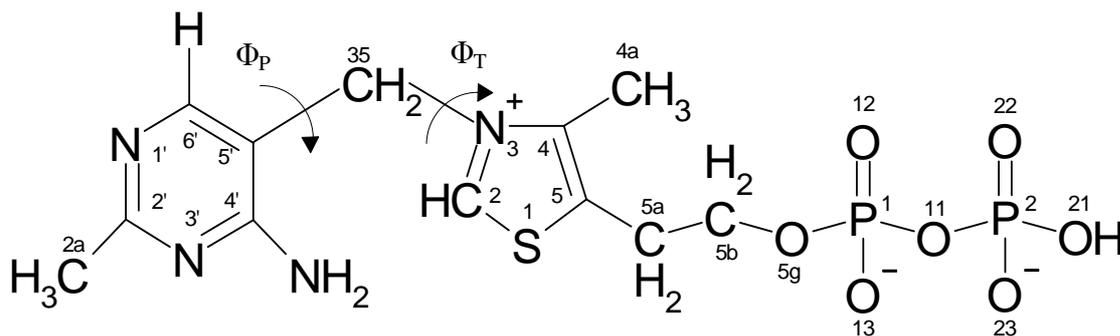
1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	10
2.1. Proteine	10
2.2. Chemikalien	10
2.3. Plasmide, Stämme, Stammhaltung und Anzucht der Hefezellen	12
2.4. Enzymreinigung	14
2.5. Aufkonzentrierung, Umpufferung und Enzymlagerung	15
2.6. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	15
2.7. Synthese von DL-DHETHDP	16
2.8. Synthese von N1'-CH <sub>3</sub> -ThDP und 4'-NHCH <sub>3</sub> -ThDP	16
2.9. Messmethoden	16
2.9.1. Proteinkonzentrationsbestimmung	16
2.9.2. Bestimmung der Enzymaktivität	17
2.9.3. Messungen zur Bindung und Umsetzung des Donorsubstrates	19
2.9.4. Messung der H/D Austauschgeschwindigkeit am C2-Atom von ThDP mittels <sup>1</sup> H-NMR Spektroskopie	20
2.9.5. Massenspektrometrie	20
2.9.6. CD-Messungen	21
2.9.7. Nachweis der Spaltung von DL-DHETHDP durch Transketolase	22
2.10. Röntgenkleinwinkelstreuexperimente mit Synchrotronstrahlung	23
2.11. Kristallisation	24
2.12. Datensammlung (Proteinkristallographie)	24
2.13. Modellierung und kristallographische Verfeinerung	25
3. Ergebnisse und Diskussion	28
3.1. Präparation von rekombinanter Transketolase aus dem Hefestamm H402×pTKL1	28
3.2. Synthese von DL-DHETHDP	30
3.3. Bindung, Spaltung und katalytisches Verhalten von DL-DHETHDP an Wildtyp-Transketolase	31
3.4. Die Kofaktoraktivierung bei den Transketolasevarianten H263A und H103A	34

3.5. Donorsubstratbindung und -spaltung durch Wildtyp-Transketolase und die Enzymvariante H263A	35
3.6. Untersuchungen zur Donorsubstratbindung und Intermediatbildung mittels CD- und Absorptionsspektroskopie	40
3.7. Rekombination von Wildtyp-Transketolase und der Variante E418A mit N1'-CH <sub>3</sub> -ThDP	45
4. Strukturelle Untersuchungen zur Donorsubstratbindung und Intermediatbildung an Transketolase aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	49
4.1. Röntgenkleinwinkelstreuung an Transketolase	49
4.2. Kristallisation von Transketolase und Etablierung einer Schockfrier-technik für Transketolasekristalle	57
4.3. Die dreidimensionale Struktur von Apotransketolase	58
4.4. Die Struktur des Reaktionsintermediates DHEThDP im aktiven Zentrum von Transketolase	60
5. Struktur der Komplexe von Transketolase mit N1'-CH <sub>3</sub> -ThDP und 4'-NHCH <sub>3</sub> -ThDP	70
5.1. Struktur des WT-TK-N1'-CH <sub>3</sub> -ThDP- und des TK-E418A-N1'-CH <sub>3</sub> -ThDP-Komplexes	70
5.2. Struktur von Wildtyp-Transketolase mit 4'-NHCH <sub>3</sub> -ThDP	73
6. Zusammenfassung	76
Literaturverzeichnis	79

## 1. Einleitung

Thiamindiphosphat (ThDP) ist der Kofaktor einer Reihe von Enzymen, die C-C Bindungen spalten oder knüpfen, die benachbart zu Carbonylgruppen sind. Es stellt die biologisch aktive Form des Vitamins B1 dar und wurde Anfang des 20. Jahrhunderts entdeckt (Funk, 1911). Die erstmalige Isolierung (Auhagen, 1932) und Identifizierung (Lohmann & Schuster, 1937) dieser „Cocarboxylase“ als Kofaktor des Enzyms Pyruvatdecarboxylase eröffnete einen bis heute aktuellen Zweig der Chemie und Biochemie.

ThDP besteht aus drei Teilen, einem 2-Methyl-4-aminopyrimidinring, der über eine Methylenbrücke mit einem 4-Methyl-5-ethyl-thiazoliumring verbunden ist, und einer Diphosphatgruppe, die sich an die Ethylgruppe des 4-Methyl-5-ethyl-thiazoliumringes anschließt (Abb. 1). Die erste Kristallstrukturbestimmung des isolierten Thiamindiphosphat-hydrochlorides gelang PLETCHER und SAX 1972 in wässriger Lösung. Dieser Arbeit folgten verschiedene andere Strukturbestimmungen von Thiamin und verwandter Verbindungen (Shin *et al.*, 1979; Shin *et al.*, 1981; Shin & Kim, 1986; Shin & Chae, 1993). Freies Thiamindiphosphat liegt in drei verschiedenen Konformationen vor, die als F-, S- und V-Konformation bezeichnet werden und sich lediglich in der relativen Lage der beiden Ringe zueinander unterscheiden.



**Abb. 1:** Strukturformel des Thiamindiphosphates (ThDP).

Die Nomenklatur der Atome entspricht der in der Proteindatenbank Brookhaven verwendeten und wird auch im weiteren Text benutzt.

Ausschlaggebend für die drei Konformationen des Thiamindiphosphates ist die Flexibilität in den Drehwinkeln um die N3-C35-Bindung ( $\Phi_T$ ) und C5'-C35-Bindung ( $\Phi_P$ ). Die energetisch ungünstigere V-Konformation ( $\Phi_T \approx \pm 90^\circ$ ,  $\Phi_P \approx \pm 90^\circ$ ) findet man lediglich in drei Strukturen des freien Kofaktors (Power *et al.*, 1970; Shin *et al.*, 1979; Shin & Kim, 1986). SCHELLENBERGER und Mitarbeiter postulierten aber bereits 1967, dass die V-Konformation des Kofaktors in den aktiven Zentren der ThDP-abhängigen Enzyme vorliegt. Weiterführende Arbeiten zur dreidimensionalen Struktur von ThDP-Enzymen bestätigten diese Annahme. Heute sind die Kristallstrukturen einer Reihe von ThDP-abhängigen Enzymen bekannt, so zum Beispiel die der Transketolase aus *Saccharomyces cerevisiae* (Lindqvist *et al.*, 1992), der Pyruvatoxidase aus *Lactobacillus plantarum* (Muller & Schulz, 1993), der Pyruvatdecarboxylase aus *Saccharomyces uvarum* (Dyda *et al.* 1993), der Pyruvatdecarboxylase aus *Saccharomyces cerevisiae* (Arjunan *et al.*, 1996), der Pyruvatdecarboxylase aus *Zymomonas mobilis* (Dobritzsch *et al.*, 1998), die der Benzoylformiatdecarboxylase aus *Pseudomonas putida* (Hasson *et al.*, 1998), der Pyruvat : Ferredoxin Oxidoreductase aus *Desulfovibrio africanus* (Chabriere *et al.*, 1999) sowie der E1-Komponente des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes aus *Escherichia coli* (Arjunan *et al.*, 2002) und der E1-Komponente des humanen Pyruvatdehydrogenase-Komplexes (Ciszak *et al.*, 2002). BRESLOW gelang 1958 die Identifizierung des eigentlichen Reaktionsortes des ThDP als das C2-Atom des Thiazoliumringes, welches nach Deprotonierung als ein Carbanion (Ylid) vorliegt und das Substrat nukleophil angreifen kann. Da die C2-H Dissoziationsgeschwindigkeit des freien Kofaktors aber für die Reaktionsgeschwindigkeit der Enzyme nicht ausreichend ist (Washabaugh & Jencks, 1988; Kern *et al.*, 1997), muss die Proteinkomponente diese Deprotonierung forcieren, um die gemessenen Reaktionsgeschwindigkeiten zu erklären. Kern *et al.* (1997) schlagen einen Mechanismus der Aktivierung des ThDP in Enzymen vor, deren wesentliche Punkte im folgenden zusammengefasst sind. Der Kofaktor liegt in einer so genannten iminotautomeren Form vor, welche aus der Protonierung des N1'-Atoms durch einen in allen ThDP-abhängigen Enzymen hochkonservierten Glutamatrest resultiert. Durch Versuche mit Modellverbindungen konnten Jordan *et al.* (1982) bereits zeigen, dass eine Protonierung des N1' in Pyrimidinderivaten den  $pK_a$  der 4'-Aminogruppe verschiebt. Durch die räumliche Nähe der so entstandenen basischeren 4'-Iminogruppe zum C2-Atom wird die C2-H Dissoziation erleichtert und um mehrere Größenordnungen beschleunigt. Die Beteiligung der 4'-Aminogruppe (Schellenberger, 1967) und des N1'-Atoms (Golbik *et al.*, 1991) am Katalysemechanismus der Enzyme Pyruvatdecarboxylase und Transketolase wurde durch den

Einsatz von modifizierten Kofaktoren herausgestellt. Die durch ThDP vermittelten enzymatischen Katalysen haben noch eine weitere Gemeinsamkeit, das Addukt, welches nach dem Angriff des C2-Ylids an das jeweilige Substrat entsteht und dessen weitere Reaktionsmöglichkeiten von Enzym zu Enzym unterschiedlich sind.

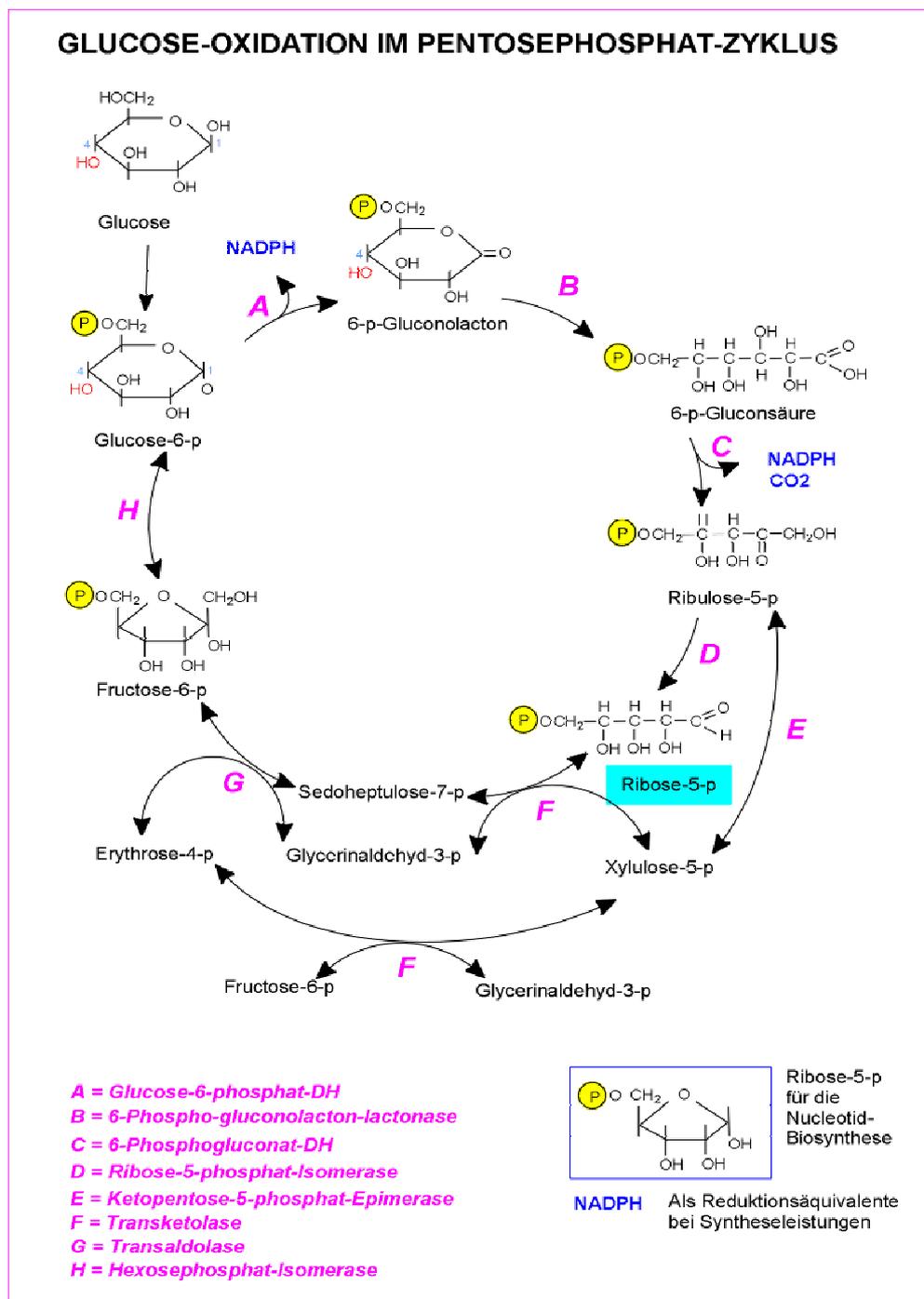


Abb. 2: Schema des Pentosephosphatweges mit den beteiligten Enzymen  
 (Quelle: <http://biochemie.web.med.uni-muenchen.de/biotutor/pentoseweg.htm>).

Eine Zusammenfassung über die Wirkungsweise von ThDP findet sich bei KLUGER (1987) und SCHELLENBERGER (1997, 1998).

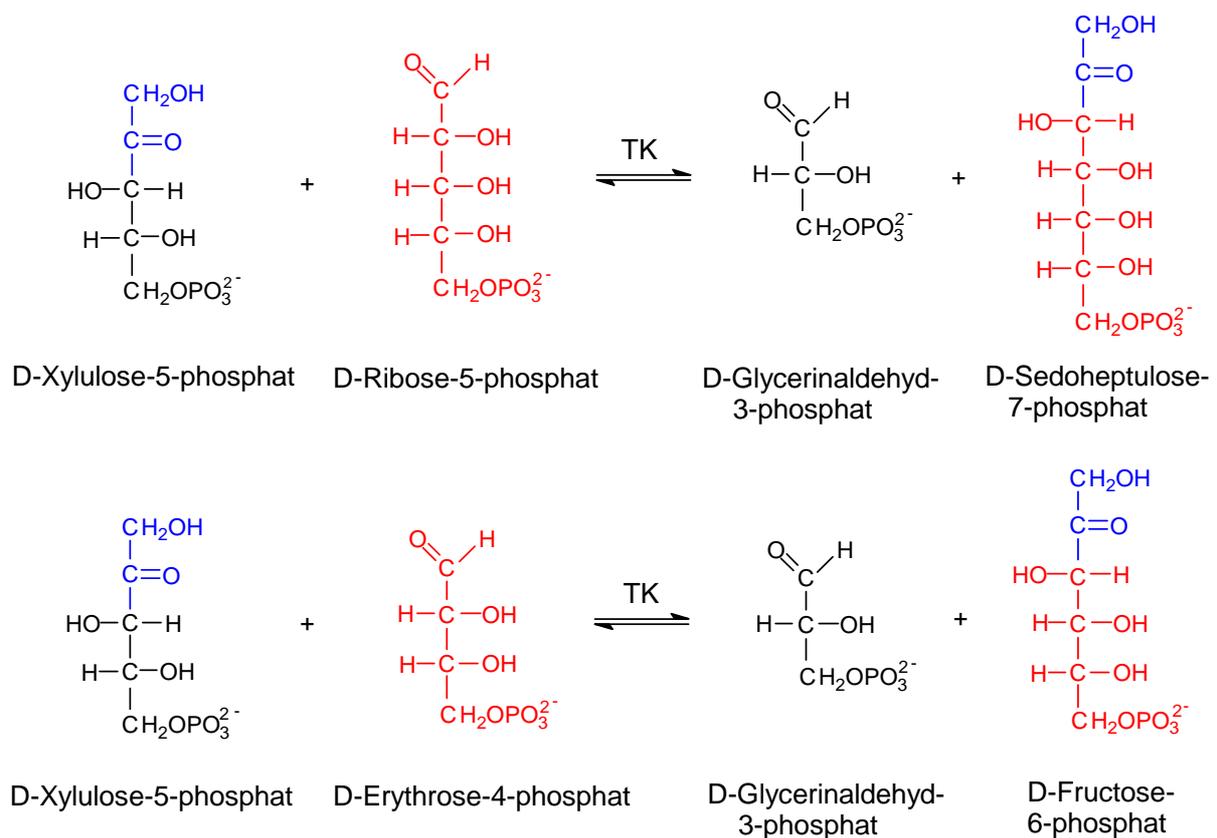
Das Enzym Transketolase (Sedoheptulose-7-Phosphat : D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat Glycolaldehydtransferase, EC 2.2.1.1) bildet zusammen mit Transaldolase (EC 2.2.1.2) eine reversible Reaktionskaskade zwischen den Hauptstoffwechselwegen Glykolyse und Pentosephosphatweg. Der Pentosephosphatweg (Abb. 2), entdeckt von WARBURG und Mitarbeitern (Warburg *et al.*, 1935; Warburg *et al.*, 1937), gliedert sich in einen oxidativen und nichtoxidativen Teil. Der nichtoxidative Teil mit Transketolase und Transaldolase ist verantwortlich für die Umwandlung von Zuckerphosphaten der Kettenlänge C3 bis C7.

Die von Transketolase katalysierten chemischen Umwandlungen im Organismus sind in Abbildung 3 veranschaulicht. Von großer Bedeutung ist die Tatsache, dass einige der Substrate von Transketolase Vorläufer der Biosynthese von essentiellen Biomolekülen sind. So ist Ribose-5-phosphat eine Ausgangsverbindung der Biosynthese von DNA, RNA, FAD, NAD<sup>+</sup>, ATP und CoA. Erythrose-4-phosphat ist in Hefen ein wichtiges Zwischenprodukt für die Synthese von aromatischen Aminosäuren (Sundström *et al.*, 1993). In Pflanzen ist Transketolase Teil des Calvin-Zyklus und dort an der Synthese von Ribulose-1,5-bisphosphat beteiligt.

In neuerer Zeit konnte gezeigt werden, dass Transketolase eine bestimmte Rolle bei den Krankheitsbildern des Wernicke-Korsakoff-Syndroms, des Alkoholismus, der Alzheimer Krankheit und bei der Vermehrung von Tumorzellgewebe spielt (Gibson *et al.*, 1988; Hèroux & Butterworth, 1995; Wang *et al.*, 1997; Paoletti *et al.*, 1991; Cascante *et al.*, 2000).

RACKER *et al.* (1953) und HORECKER & SMYRNIOTIS (1953) gelang der Nachweis, dass die von Transketolase vermittelte Spaltung von Xu-5-P streng an das Vorhandensein von ThDP geknüpft ist. Weitere mechanistische Untersuchungen schlossen sich an (Horecker *et al.*, 1953; De la Haba *et al.*, 1955; Datta & Racker, 1961; Holzer *et al.*, 1962) und legten den Grundstein für das heutige Verständnis der Transketolasereaktion. Demnach überträgt Transketolase, einem ping-pong Mechanismus folgend, einen Glycolrest von einem Ketozyucker auf einen Aldozyucker. Bevorzugt werden monophosphorylierte Zucker umgesetzt, aber auch unphosphorylierte Ketosen und Aldosen werden akzeptiert, allerdings mit geringeren Reaktionsgeschwindigkeiten (Usmanov & Kochetov, 1983). Die streng stereospezifisch verlaufende Transferasereaktion birgt ein großes Potential für die

enzymatische Darstellung von optisch reinen Substanzen und führte zu einer Reihe von Transketolase-vermittelten Synthesen (Demuynck *et al.*, 1991; Myles *et al.*, 1991; Kobori *et al.*, 1992; Effenberger *et al.*, 1992; Hecquet *et al.*, 1994; Zimmermann *et al.*, 1999; Turner, 2000).



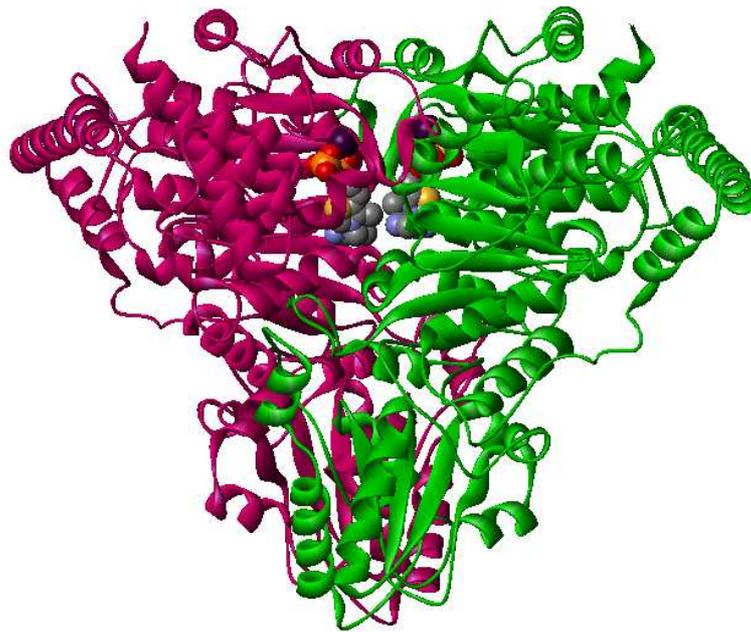
**Abb. 3:** Schema der durch das Enzym Transketolase (TK) im Organismus katalysierten chemischen Umwandlungen.

Das ubiquitär verbreitete Enzym wurde aus verschiedenen Organismen und Organen isoliert und charakterisiert, so zum Beispiel aus Rattenleber (Horecker *et al.*, 1953), Hefen (De la Haba *et al.*, 1955; Sreere *et al.*, 1958), Schweineleber (Simpson, 1960; Philippov *et al.*, 1980), Spinat (Villafranca & Axelrod, 1971; Takabe *et al.*, 1980), Maushirn (Blass *et al.*, 1982), menschlichen Erythrocyten (Heinrich & Wiss, 1971; Warnock & Prudhomme, 1982; Himmo *et al.*, 1988) und *Escherichia coli* (Sprenger *et al.*, 1995). Transketolase konnte ebenfalls in

der Cornea von Mäusen als ein Strukturprotein nachgewiesen werden (Sax *et al.*, 1996; Jester *et al.*, 1999).

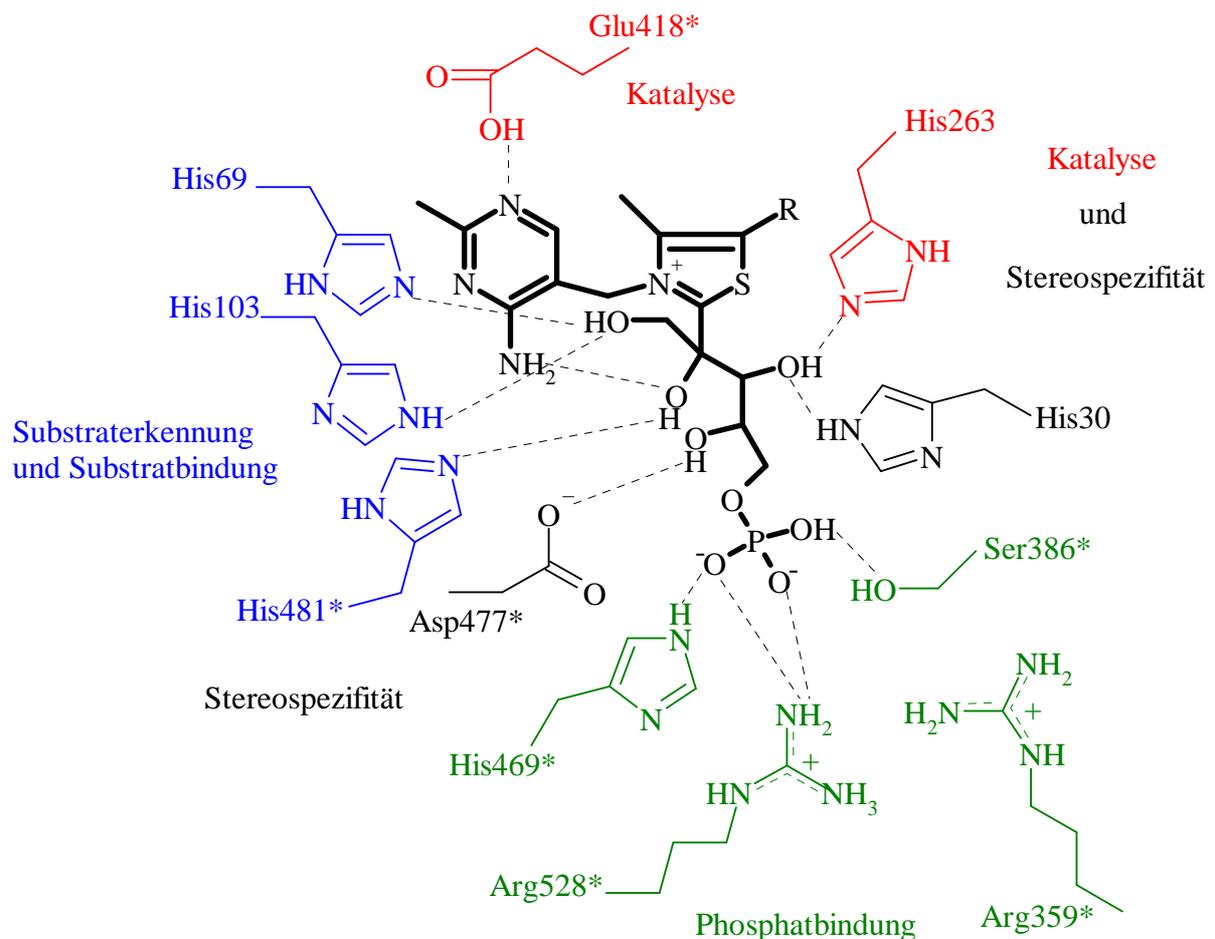
Transketolase aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* besteht aus zwei identischen Untereinheiten und bildet somit ein Homodimer (Cavalieri *et al.*, 1975). Jedes Monomer mit einem Molekulargewicht von 74.2 kDa besteht aus 680 Aminosäuren und setzt sich aus drei Domänen zusammen, der N-terminalen, der mittleren und der C-terminalen Domäne (Lindqvist *et al.*, 1992; Nikkola *et al.*, 1994). Die katalytische Aktivität ist, neben dem Vorhandensein von ThDP an divalente Metallionen wie  $\text{Ca}^{++}$  oder  $\text{Mg}^{++}$  gebunden (Heinrich *et al.*, 1972). EGAN und SABLE zeigten 1981, dass bei niedrigen Proteinkonzentrationen die langsame Dimerisierung zum aktiven Holoenzym in Anwesenheit von ThDP und divalenter Metallionen geschwindigkeitsbestimmend ist und sich in einer *lag*-Phase bemerkbar macht. KOCHETOV *et al.* (1976) und MESHALKINA & KOCHETOV (1979) wiesen durch Titrationsexperimente zwei aktive Zentren pro Transketolasemolekül nach. Diese Ergebnisse konnten durch die Röntgenkristallstruktur bestätigt werden (Lindqvist *et al.*, 1992). Außerdem konnten mit Hilfe von chemischen Modifikationsreagenzien gezielt Aminosäurereste für die Bindung des Kofaktors ThDP, der Substrate und für die katalytische Effizienz nachgewiesen werden. Es gelang der Nachweis von Carboxylgruppen (Kuimov *et al.*, 1985), Tryptophan (Heinrich *et al.*, 1972), Histidin (Meshalkina, 1979), Tyrosin (Kovina *et al.*, 1993) und Arginin (Kremer *et al.*, 1979) als Bestandteile des aktiven Zentrums bzw. des Substratkanals. Die dreidimensionale Struktur der Transketolase aus Hefe wurde von LINDQVIST *et al.* (1992) bestimmt und stellt die erste Struktur eines Thiamindiphosphat-abhängigen Enzyms dar (Abb. 4).

Die Strukturen des Apoenzyms (Sundström *et al.*, 1992) und der bis zu einer Auflösung von 2.0 Å verfeinerten Struktur des Holoenzym (Nikkola *et al.*, 1994) schlossen sich an. Dies erlaubte die Bestimmung der ThDP-Bindungsstellen in der Kontaktregion zwischen den Monomeren und führte zu mechanistischen Überlegungen über die Transketolasereaktion und der beteiligten Aminosäureseitenketten (Schneider & Lindqvist, 1993)



*Abb. 4: Dreidimensionale Struktur der Transketolase (Datenbankeintrag ITRK) aus Saccharomyces cerevisiae. Die Untereinheiten sind rot bzw. grün im Modus der Sekundärstrukturelemente dargestellt. Die beiden ThDP Moleküle und die beiden Calciumionen sind als raumfüllendes Kalottenmodell gezeichnet. Die Abbildung wurde mit dem Programm WEBLABVIEWER erstellt.*

In der Gruppe von SCHNEIDER und LINDQVIST schlossen sich eine Reihe von strukturellen Untersuchungen an, gepaart mit ortsgerichteter Mutagenese, Spektroskopie und kinetischen Experimenten. NILSSON *et al.* gelang die Kokristallisation von WT-TK mit Thiaminthiazolondiphosphat, eines Analogons des Reaktionsintermediates DHETHDP. Auf dieser Basis wurde ein Modell für die möglichen Wechselwirkungen des DHETHDP zur Proteinmatrix aufgestellt (Nilsson *et al.*, 1993). Später konnten WIKNER *et al.* (1994) das Glutamat 418 als das für die Aktivierung des Kofaktors verantwortliche Seitenkette identifizieren. Im gleichen Jahr gelang König *et al.* die Kokristallisation von Transketolase mit N1'-pyridyl-ThDP, N3'-pyridyl-ThDP und 6'-methyl-ThDP, wodurch die identische Bindung dieser Kofaktorderivate im aktiven Zentrum belegt wurde (König *et al.*, 1994). Wiederum WIKNER *et al.* (1995, 1997) und NILSSON *et al.* (1997, 1998) sowie MESHALKINA *et al.* (1997) identifizierten eine Reihe von Aminosäureseitenketten, die für die Erkennung, Bindung und Spaltung der Substrate und für die Kofaktorbindung wichtig sind.



*Abb. 5: Schematische Darstellung des Modells des gebundenen Donorsubstrates Xu-5-P im aktiven Zentrum von Transketolase und mögliche Wechselwirkungen. Die Reste der anderen Untereinheit sind mit einem Stern gekennzeichnet (nach SCHNEIDER & LINDQVIST, 1998).*

Es konnten aus diesen umfangreichen Arbeiten His481, His103, His69, H30 und H263 als Bindungsmotiv (Abb. 5) für das Donorsubstrat identifiziert werden. Desweiteren konnten Asp477 (Stereoselektivität), Arg528, Arg359, His469 und Ser386 (Phosphatbindung) als wichtige Bestandteile des Substratkanals von Transketolase charakterisiert werden (für eine Zusammenfassung siehe Schneider & Lindqvist, 1998).

Ziel der vorliegenden Arbeit war eine umfangreichere Untersuchung der Donorsubstratbindung und Intermediatbildung an Transketolase aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Es sollten unter Nutzung von bereits verfügbaren Enzymvarianten kinetische und

spektroskopische Daten gesammelt werden, um detaillierte mechanistische Einblicke in die Katalyse der Donorsubstratumsetzung zu erhalten.

Eine erste Charakterisierung von Komplexen aus Transketolase mit verschiedenen Donorsubstraten sollte unter Nutzung von Röntgenkleinwinkelstreuung angestrebt werden und die erhaltenen Formabschätzungen mit den verfügbaren Röntgenkristallstrukturen verglichen werden, um Aussagen über die Unterschiede zwischen der Struktur in Lösung und der Kristallstruktur zu ermöglichen.

Weiterhin beschäftigt sich der Verfasser mit dem strukturellen Nachweis des Reaktionsintermediates DHET<sub>h</sub>DP im aktiven Zentrum von Transketolase. Es sollte unter Nutzung von Kryokristallographie und der *soaking*-Technik der Versuch unternommen werden, erstmals den so genannten „aktiven Glycolaldehyd“ im aktiven Zentrum von Transketolase nachzuweisen und zu charakterisieren.

Weiterhin sollten die Kofaktorderivate DL-DHET<sub>h</sub>DP, N1'-CH<sub>3</sub>-ThDP und 4'-NHCH<sub>3</sub>-ThDP auf die Bindungsfähigkeit und das katalytische Verhalten am Wildtypenzym und ausgesuchter Transketolasevarianten untersucht werden. Die erhaltenen kinetischen Befunde sollten durch Röntgenkristallographie verifiziert werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Proteine

Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Markerproteine für PAGE	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Glucose-6-Phosphat-Isomerase (G6PI)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Rinderserumalbumin (BSA)	E. Merck, Darmstadt
TPI + GDH Mix	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

### 2.2. Chemikalien

Acrylamid (30 %ig)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Adeninsulfat	AppliChem, Darmstadt
Agar	E. Merck, Darmstadt
Ammoniumperoxodisulfat	SERVA Feinbiochemica GmbH, Heidelberg
Ammoniumsulfat	E. Merck, Darmstadt
Benzamidin (Hydrochlorid)	E. Merck, Darmstadt
Bisacrylamid (2 %ig)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Coomassie-Brilliantblau G250	SERVA Feinbiochemica GmbH, Heidelberg
D(+)-Galactose	AppliChem, Darmstadt
DTE	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Eichproteine für SDS-PAGE	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Essigsäure	E. Merck, Darmstadt
Ery-4-P	SIGMA Chemical Co, St. Louis MO, USA
Ethylenglycol	E. Merck, Darmstadt
Formaldehyd	E. Merck, Darmstadt
Fru-6-P	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Glycolaldehyd	SIGMA Chemical Co, St. Louis MO, USA
Glycerin	E. Merck, Darmstadt

---

Glycin	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Gly-Gly	Fluka Chemie AG, Buchs
Gra-3-P	SIGMA Chemical Co, St. Louis MO, USA
L-Arginin	AppliChem, Darmstadt
L-Glutaminsäure	AppliChem, Darmstadt
L-Histidin	AppliChem, Darmstadt
L-Isoleucin	AppliChem, Darmstadt
L-Lysin	AppliChem, Darmstadt
L-Methionin	AppliChem, Darmstadt
L-Phenylalanin	AppliChem, Darmstadt
L-Serin	AppliChem, Darmstadt
L-Threonin	AppliChem, Darmstadt
L-Tryptophan	AppliChem, Darmstadt
L-Valin	AppliChem, Darmstadt
Leupeptin	E. Merck, Darmstadt
Lithiumchlorid	E. Merck, Darmstadt
Methanol	E. Merck, Darmstadt
NADH	SIGMA Chemical Co, St. Louis MO, USA
Natriumchlorid	E. Merck, Darmstadt
Pepstatin A	E. Merck, Darmstadt
PMSF	SERVA Feinbiochemica GmbH, Heidelberg
Rib-5-P (Na-Salz)	SIGMA Chemical Co, St. Louis MO, USA
Salzsäure	E. Merck, Darmstadt
SDS	SERVA Feinbiochemica GmbH, Heidelberg
Sorbitol	SIGMA Chemical Co, St. Louis MO, USA
Streptomycinsulfat	AppliChem, Darmstadt
TEMED	Bio Rad Laboratories, Richmond, USA
Tris	E. Merck, Darmstadt
ThDP-HCl	E. Merck, Darmstadt
Uracil	AppliChem, Darmstadt
Xu-5-P (Na-Salz)	SIGMA Chemical Co, St. Louis MO, USA
<i>Yeast nitrogen base without amino acids and ammonium sulphate</i>	DIFCO, USA

### 2.3. Plasmide, Stämme, Stammhaltung und Anzucht der Hefezellen

Sämtliche Plasmide und Hefestämme wurden freundlicherweise von Dr. C. Wikner (Karolinska Institut, Stockholm; jetzige Adresse: Pharmacia Biotech, Uppsala) zur Verfügung gestellt.

Zur Expression von Transketolase wurde der Hefestamm H402, ein *tkl::HIS3* Abkömmling des Hefestammes W303-1A (Thomas & Rothstein, 1989), mit den entsprechenden Expressionsplasmiden transformiert und in einem vollsynthetischen Medium angezogen. Das Expressionsplasmid (pTKL1) enthält das Hefe-Transketolasegen (2040 bp) mit der Wildtyp-Promotorsequenz (472 bp) und einer Wildtyp-*downstream*-Sequenz (152 bp). Dieser *shuttle*-Vektor ist für die Replikation in *Escherichia coli* ( $\beta$ -Lactamase Gen) und Hefe (*URA3* und *LEU2-d*) geeignet. Das Gen der  $\beta$ -Lactamase vermittelt eine Ampicillinresistenz, *URA3* ermöglicht Wachstum auf uracilfreiem Medium und *LEU2-d* ergibt bei Wachstum auf L-Leucin -freiem Medium eine hohe Kopiezahl des Plasmides (Erhart & Hollenberg, 1983).

Zur Transformation der mutierten Expressionsplasmiden pTKL1(E418A) und pTKL1(H481A) in den Hefestammes H402 wurde die Methode der Elektroporation genutzt. Dazu wurden H402 Hefezellen in 500 ml YPD-Medium (enthielt 5 g Hefeextrakt, 10 g Pepton und 10 g D(+)-Galactose) aerob bis zu einer  $OD_{600}$  von 1.0–1.3 bei 30 °C kultiviert und wie folgt präpariert:

- Zentrifugation: 4000g, 5 min, 4 °C
- Waschen der Zellen mit 250 ml sterilem, eiskaltem Wasser
- Zentrifugation: 4000g, 5 min, 4 °C
- Waschen der Zellen mit 30 ml sterilem, eiskaltem 1 M Sorbitol
- Zentrifugation: 4000g, 5 min, 4 °C
- Aufnahme des Pellets in 0.5 ml sterilem, eiskaltem 1 M Sorbitol

Es wurden anschließend 50  $\mu$ l dieser elektrokompenten H402 Zellen in eine Elektroporationsküvette gegeben, mit 50 ng Plasmid / 2  $\mu$ l gemischt und in einer Elektroporationsanlage EasyjecT (NeoLab) elektroporiert (1,5 kV, 25  $\mu$ F, 200  $\Omega$ ). Nach erfolgter Elektroporation wurde der Ansatz sofort mit 200  $\mu$ l 1 M Sorbitol vermischt und 20  $\mu$ l bzw. 200  $\mu$ l der Zellen auf Selektionsplatten (ohne Uracil) ausplattiert. Die Platten wurden bei 30 °C im Brutraum inkubiert. Die Zusammensetzung der Selektionsplatten und des Expressionsmediums war wie folgt:

5 Liter Medium enthalten:

- D(+)-Galactose (100 g)
- *Yeast nitrogen base without amino acids and without ammonium sulphate* (33.5 g)
- Ammoniumsulfat (25.2 g)
- Adeninsulfat (0.10 g)
- Uracil (0.10 g), nicht bei Selektionsplatten der Elektroporation!
- L-Tryptophan (0.10 g)
- L-Histidin (0.10 g)
- L-Arginin (0.10 g)
- L-Methionin (0.10 g)
- L-Tyrosin (0.15 g)
- L-Isoleucin (0.15 g)
- L-Lysin (0.15 g)
- L-Phenylalanin (0.25 g)
- L-Glutaminsäure (0.50 g)
- L-Valin (0.75 g)
- L-Serin (2.00 g)
- optional für Kulturplatten: 20 g Agar / l

Das Medium wurde bis zur vollständigen Lösung gerührt und der pH-Wert mit NaOH auf 5.5 eingestellt. L-Threonin (2.0 g / 50 ml) wurde steril filtriert und dem autoklavierten Medium nachträglich (5 ml / l) zugegeben. D(+)-Galactose wurde separat vom Medium autoklaviert und nach dem Erkalten zu den Lösungen gegeben.

Zur Expression von Wildtyp-Transketolase und sämtlicher Transketolase-Varianten wurde eine 100 ml Vorkultur mit einer Einzelkolonie beimpft und bei 150 rpm aerob bei 30 °C bis zu einer Extinktion (600 nm) von ca. 2.0 inkubiert (ca. 2 Tage). Das Beimpfen der Hauptkulturen erfolgte mit 10 ml Vorkultur / l Hauptkultur, anschließend wurden die Kulturen bei 150 rpm aerob bei 30 °C bis zu einer Extinktion (600 nm) von ca. 2.0–2.1 inkubiert. Die Stämme wurden als Glycerinkultur (20 % v/v Glycerin) bei -80 °C aufbewahrt.

## 2.4. Enzymreinigung

Alle chromatographischen Trennschritte wurden mit einer FPLC-Anlage von Pharmacia bei 6–8 °C durchgeführt. Die pH-Werte beziehen sich auf Raumtemperatur und die Ausdehnung der Säulen sind in Klammern angegeben (cm / cm). Das Aufkonzentrieren von Proteinproben während der Reinigung erfolgte ausschließlich durch Fällern mit Ammoniumsulfatfällung (0.5 g / ml). Alle Proben wurden vor den chromatographischen Trennungen zentrifugiert (10000g, 4 °C, 5 min) und die Säulen mit den entsprechenden Elutionspuffern äquilibriert.

Die Enzymreinigung wurde nach einem leicht veränderten Reinigungsprotokoll nach Wikner *et al.* (1994) durchgeführt:

- Ernte der Hefezellen durch Zentrifugation (10000g, 4 °C, 5 min)
- Aufschluss der Zellen mittels Glasperlen (Ø 0.25–0.5 mm) in einer Kugelmühle (Aufschlusspuffer: 0.1 M Tris/HCl, 0.1 M EDTA, 0.1 M LiCl, 0.2 % (w/v) SDS, 1 mM Benzamidin, 1 mM PMSF, 5 µM Leupeptin, 5 µM Pepstatin A, 1 % (v/v) DMSO, pH 7.6), 6×30 s unter Eiskühlung
- Zentrifugation (96000g, 4 °C, 30 min), Pellet verwerfen
- Filtration des Überstandes durch Glaswolle
- Nukleinsäurefällung mit 0.05 % (w/v) Streptomycinsulfat, langsam unter Rühren zugegeben, 4 °C, 30 min
- Zentrifugation (96000g, 4 °C, 30 min), Pellet verwerfen
- Ammoniumsulfatfällung (44.5 g / 100ml), 4 °C, 30 min
- Zentrifugation (96000g, 4 °C, 30 min), Überstand verwerfen
- Pellet in 20 mM Tris / HCl, pH 7.7 (max. 40 ml) aufnehmen
- Abtrennung ungelöster Bestandteile durch Zentrifugation (96000g, 4 °C, 10 min)
- Gelfiltration an Sephacryl S-200 HR (5 / 100) (Pharmacia), 20 mM Tris / HCl, 0.3 M NaCl, 1 mM DTE, pH 7.7, Flussrate 1 ml / min
- Entsalzung: Sephadex G-50 fine (1.6 / 40) (Pharmacia), 20 mM Tris / HCl, pH 7.7, Flussrate 1 ml / min
- Anionenaustauschchromatographie an Source<sup>TM</sup> 15 Q (2.6 / 4) (Pharmacia), 20 mM Tris / HCl, pH 7.7, Gradient 0–75 mM NaCl in 500 ml, Flussrate: 1 ml / min

Das Enzym liegt nach dieser Reinigungsprozedur als Apoenzym vor.

## 2.5. Aufkonzentrierung, Umpufferung und Enzymlagerung

Zur Aufkonzentrierung von Enzymproben kamen Filtron Omegacell™ Zentrifugenröhrchen zum Einsatz (Ausschlussmolekulargewicht 10 kDa), umpuffert wurden die Proben mittels einer Gelfiltration (Flussrate 1 ml / min) über HiTrap-Säulen (3×5 ml) (Pharmacia). Die Aufbewahrung der Proteine erfolgte als Ammoniumsulfatpellet bei -20 °C, vor den Messungen wurde das Enzym wie oben beschrieben (Gelfiltration über HiTrap) in den gewünschten Puffer überführt.

## 2.6. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Um die Qualität eines Fällungs- oder Reinigungsschrittes beurteilen zu können, wurde die SDS-PAGE nach LAEMMLI (1970) angewandt. Benutzt wurde die Elektrophorese-Einheit EPS 600 von Pharmacia; die Acrylamidkonzentration der Sammelgele und Trenngele war 7.5 %, der pH-Wert des Sammelgelpuffers war 6.8, der des Trenngelpuffers 8.8. Die Gele waren 8×10 cm groß und 0.75 mm dick. Das Auftragen und die Trennung erfolgten unter Wasserkühlung, um eine allzu breite Diffusion der Probe in das Gel zu vermeiden. Aufgetragen wurden 5–15 µl pro Geltasche, die Stromstärke betrug 15 mA pro Gel bei 200 Volt. Die Konzentration der Proteinprobe wurde zwischen 0.12 und 0.3 mg / ml bemessen und die Probe für 5 min bei 95 °C in Probenpuffer (156 mM Tris, 4 % (v/v) Glycerin, 2.3 % (w/v) SDS, 0.03 % (v/v) Mercaptoethanol, Bromphenolblau) inkubiert. Entwickelt wurden die Gele nach der Coomassie-Brilliantblau Methode:

- 20–30 min Färbung (0.25 % (w/v) Coomassie-Brilliantblau G250, 30 % Methanol, 6 % Essigsäure)
- 2×30 min Entfärben (30 % Methanol, 10 % Essigsäure)
- 10 min Trocknen des Gels (3 % (v/v) Glycerin, 40 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure)

Die Gele wurden dann in Folie eingebettet und nachgetrocknet.

## 2.7. Synthese von DL-DHETHDP

DL-DHETHDP wurde nach einer veränderten Vorschrift von KRAMPITZ & VOTAW (1966) durch sukzessive Anlagerung von zwei Molekülen Formaldehyd an das C2-Atom des ThDP dargestellt. Im Unterschied zur Originalarbeit wurde das Reaktionsgemisch an einer QAE-Sephadex A25-Säule (2.6/30) (Pharmacia) getrennt und mit 50 mM Essigsäure bei einer Flussrate von 1.5 ml / min eluiert. Gegebenenfalls wurde eine Rechromatographie am selben Material durchgeführt, um eine hohe Reinheit der Substanz zu erzielen.

## 2.8. Synthese von N1'-CH<sub>3</sub>-ThDP und 4'-NHCH<sub>3</sub>-ThDP

Die Synthese von N1'-CH<sub>3</sub>-ThDP wurde basierend auf der Arbeit von Zoltewicz & Baugh (1980) und mit den Modifikationen nach EPPENDORFER (1991) durchgeführt. Das ThDP-Derivat 4'-NHCH<sub>3</sub>-ThDP wurde nach SCHELLENBERGER *et al.* (1966<sub>a</sub>, 1966<sub>b</sub>) dargestellt. Die Synthesen führten Dr. Neef und Dr. Golbik durch. Die Reinheit der Substanzen konnte durch Massenspektrometrie bestätigt werden.

## 2.9. Messmethoden

### 2.9.1. Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte entweder photometrisch nach Bradford (1976) oder über den Extinktionskoeffizienten von Transketolase (Gill & von Hippel, 1989).

Für die Proteinbestimmung nach BRADFORD (1976) wurde eine Eichreihe im Bereich 0.05–0.5 mg / ml mit Rinderserumalbumin angefertigt. Die Methode nach BRADFORD wurde zur Bestimmung des Proteingehaltes im Rohhefeextrakt, nach der Streptomycinsulfatfällung und der Ammoniumsulfatfällung angewendet.

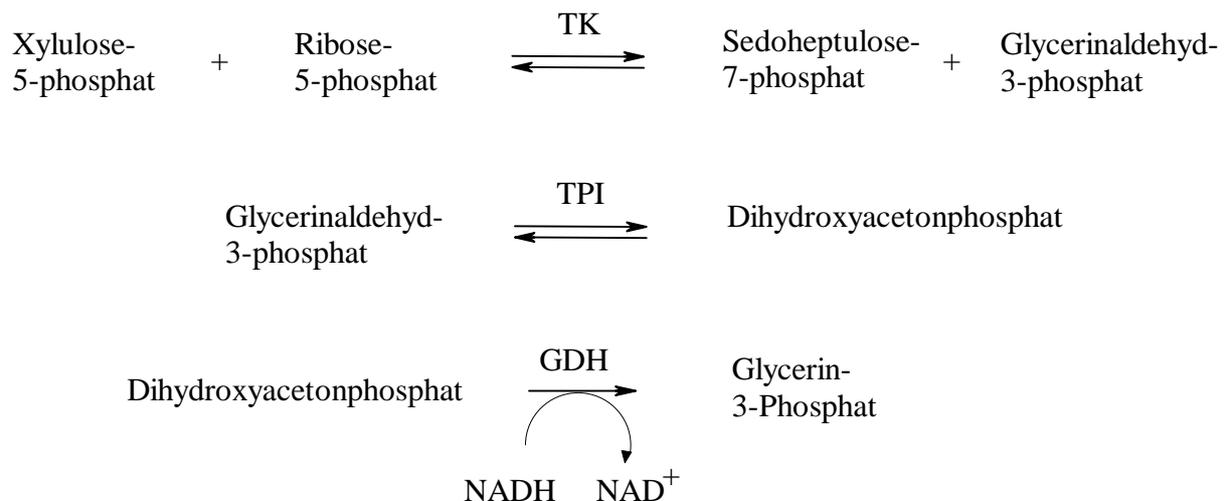
Zur Proteinbestimmung über den Extinktionskoeffizienten wurden die UV-Absorptionsspektren mit den Spektralphotometern DU 640 (Beckmann) oder U-3000 (Hitachi) in einem Wellenlängenbereich 240–340 nm aufgenommen. Die Konzentration von Transketolase wurde bei 280 nm mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten von  $157600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  (Gill & von Hippel, 1989) bestimmt.

## 2.9.2 Bestimmung der Enzymaktivität

Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität von Transketolase erfolgte durch zwei verschiedene Testsysteme:

*Gekoppelter optischer Test nach KOCHETOV (1982):*

Dieses Testsystem arbeitet mit den beiden Hilfsenzymen Triosephosphat-Isomerase (TPI) und Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase (GDH), es wird die Extinktionsabnahme bei 340 nm verfolgt (siehe Abb. 6). Der Messansatz enthielt 50 mM Gly-Gly (pH 7.6), 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1 mM ThDP, 1 mM Xu-5-P, 1.8 mM Rib-5-P, 5 U TPI, 5 U GDH, 0.3 mM NADH und 1–100 mU Transketolase. In diesem Test ist 1 U definiert als die Bildung von 1 μmol Gra-3-P / min.



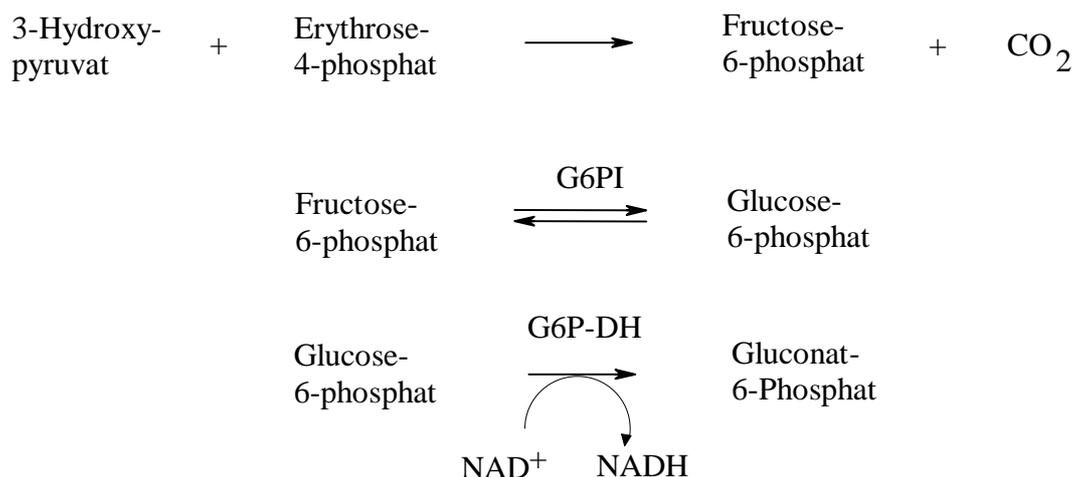
*Abb. 6: Schema des gekoppelten optischen Aktivitätstests für Transketolase (nach Kochetov, 1982).*

Bei der Bestimmung der Aktivität von WT-TK und TK-E418A gegenüber dem Kofaktorderivat N1'-CH<sub>3</sub>-ThDP gestaltete sich der Messansatz wie im folgenden beschrieben. Für WT-TK: 50 mM Gly-Gly (pH 7.6), 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 4 mM N1'-CH<sub>3</sub>-ThDP, 1 mM Xu-5-P, 1.8 mM Rib-5-P, 5 U TPI, 5 U GDH, 0.3 mM NADH und Transketolase. Für TK-E418A: 50 mM Gly-Gly (pH 7.6), 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 4 mM N1'-CH<sub>3</sub>-ThDP, 5 mM Xu-5-P, 3 mM

Rib-5-P, 5 U TPI, 5 U GDH, 0.3 mM NADH und TK-E418A. Beide Enzyme wurden vor der Messung 20 min bei 25 °C in 50 mM Gly-Gly pH 7.6 (5 mM CaCl<sub>2</sub>, 4 mM N1'-CH<sub>3</sub>-ThDP) vorinkubiert.

*Gekoppelter optischer Test nach SPRENGER et al. (1995):*

Zur Detektion der Reaktion von Transketolase mit dem artifiziellen Donorsubstrat HPA, sowie chemisch hergestelltem DL-DHETHDP, mit dem Akzeptorsubstrat Ery-4-P kam dieser Aktivitätstest zum Einsatz. Er nutzt die Hilfsenzyme Glucose-6-Phosphat-Isomerase (G6PI) und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH), sowie die Bildung von NADH und die damit verbundene Extinktionszunahme bei 340 nm. Der Messansatz enthielt 50 mM Gly-Gly (pH 7.6), 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1 mM ThDP, 4 mM HPA, 0.6 mM Ery-4-P, 4 U G6PI, 4 U G6P-DH, 0.37 mM NAD<sup>+</sup> und Transketolase. Um das katalytische Verhalten von DL-DHETHDP in Hinsicht auf die Übertragung des Glycolrestes auf einen Akzeptor zu testen, wurde ThDP durch 1 mM DL-DHETHDP ersetzt und in Abwesenheit von HPA gemessen. Da käuflich erworbenes Ery-4-P (Sigma) mit D-Glucose-6-phosphat verunreinigt war, wurde der komplette Testansatz, ohne Transketolase präinkubiert, bis keine messbare Blindreaktion mehr zu beobachten war. In diesem Testsystem ist 1 U definiert als die Bildung von 1 µmol Fru-6-P / min:



*Abb. 7: Schema des gekoppelten optischen Aktivitätstests für Transketolase (nach Sprenger et al., 1995).*

Die Kinetiken wurden an einem UVIKON-941-Spektrophotometer (Kontron Instruments) bzw. U-3000 (Hitachi) bei 25 °C aufgenommen.

### 2.9.3. Messungen zur Bindung und Umsetzung des Donorsubstrates

Zur Untersuchung der direkten Bindung von D-Fructose-6-phosphat (Fru-6-P), 3-Hydroxypyruvat (HPA) und D-Xylulose-5-phosphat (Xu-5-P) an Transketolase wurde die *stopped-flow* Technik angewendet. Hierzu wurde eine Spritze der *stopped-flow* Maschine (SX.18MV, Applied Photophysics, Leatherhead, Großbritannien) mit Wildtyp-Transketolase in 50 mM Gly-Gly, pH 7.6, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1 mM ThDP gefüllt. Die andere Spritze enthielt dieselbe Lösung, aber Transketolase wurde durch verschiedene Konzentrationen an Xu-5-P, HPA bzw. Fru-6-P ersetzt (0.05–1 mM). Beide Spritzen hatten das gleiche Volumen und die *stopped-flow* Maschine arbeitete im 1+1 Mischungsmodus, so dass die Endkonzentrationen aus einer 1:2 Verdünnung resultierten. Die Bindung der Donorsubstrate lässt sich bei einer Wellenlänge von 300 nm direkt verfolgen (Kochetov *et al.*, 1973), die Temperatur betrug 25 °C, die Schichtdicke der Küvette 1 cm. Der Spalt der Monochromatoren war auf 5 mm eingestellt, die Photomultiplier-Spannung betrug 571 V.

Die Reaktion von äquimolaren Mengen an Wildtyp-Transketolase mit HPA und verschiedenen Akzeptorsubstraten wurde folgendermaßen untersucht: Die *stopped-flow* Maschine arbeitet im Doppelmischungsmodus, die Reaktion wurde bei 300 nm und 25 °C verfolgt. Eine Spritze enthielt das Holoenzym (8.25 µM) in 60 µM ThDP, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 50 mM Gly-Gly, pH 7.6, die andere Spritze enthielt das Donorsubstrat HPA (8.25 µM) in 60 µM ThDP, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 50 mM Gly-Gly, pH 7.6. Nach einer Reaktionszeit von 8 s wurde Glycolaldehyd (100 µM), Rib-5-P (8.25 µM) oder Gra-3-P (8.25 µM) zugegeben.

Der Umsatz des Donorsubstrates Xu-5-P (ohne Akzeptorsubstrat) durch Wildtyp-Transketolase und die Enzymvariante H263A wurde unter den Bedingungen des vollständigen Testsystems (Kochetov, 1982) untersucht. Die Reaktion wurde ebenfalls mittels der *stopped-flow* Technik verfolgt. Die Messbedingungen waren wie folgt: Spritze 1 enthielt 50 mM Gly-Gly, pH 7.6, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1 mM ThDP, 0.3 mM NADH, 2 mM Xu-5-P, 4500 U TPI, 1550 U GDH (beide Hilfsenzyme wurden über 5×5 ml HiTrap-Säulen in 50 mM Gly-Gly entsalzt und mit Palfiltron-Konzentrationsröhrchen (Ausschlussmolekulargewicht 5000 Da) aufkonzentriert). Da das von Sigma bezogene D-Xylulose-5-phosphat mit Akzeptorsubstrat(en) verunreinigt war, war es notwendig diese Verunreinigungen in einer

vorgelagerten Reaktion zu beseitigen. Hierzu wurde der komplette Ansatz der Spritze 1 mit 20 µg / ml Wildtyp-Transketolase bzw. 50 µg / ml der Variante H263A für 5 min bzw. 20 min bei 25 °C präinkubiert. Spritze 2 enthielt das Holoenzym in verschiedenen Konzentrationen (4.8, 9.7, 19.4, 38 µM). Die Abhängigkeit der Donorsubstratspaltung von der Xu-5-P Konzentration wurde ebenfalls mittels *stopped-flow*-Technik untersucht. Die Ansätze und Parameter sind identisch, es wurde lediglich die Xu-5-P Konzentration im Bereich von 0–1 mM variiert und die Proteinkonzentration auf 7.4 µM (Wildtyp-Transketolase) bzw. 20.4 µM (TK-H263A) eingestellt.

Sämtliche Kinetiken wurden mit den Programmen Sigma Plot<sup>®</sup> (Jandel Scientific Software) bzw. DYNAFIT (Kuzmic, 1996) ausgewertet.

#### **2.9.4. Messung der H/D Austauschgeschwindigkeit am C2-Atom von ThDP mittels <sup>1</sup>H-NMR Spektroskopie**

Zur Messung der initialen Deprotonierungsgeschwindigkeit des C2-Atoms des ThDP für die Varianten H263A und der Variante H103A wurde die Methode des H/D Austausches verwendet. Die Messungen wurden wie bei Kern *et al.* (1997) beschrieben durchgeführt.

Die Aufnahme und Auswertung der <sup>1</sup>H-NMR Spektren übernahm freundlicherweise Dr. K. Tittmann.

#### **2.9.5. Massenspektrometrie**

Die Elektrospray-Massenspektren wurden mit einem VG BIO Q Tripel-Quadrupol-Massenspektrometer mit Elektrospray Interface aufgenommen. In einem konstanten Fluss (4 µl/min) von Acetonitril: Wasser (50 : 50 (v/v), 0.5 % Ameisensäure) (Pumpe HP 1050) wurden 10 µl der Probenlösung über ein Schleifendosierventil (Rheodyne 5717, 10 µl) direkt in die Quelle injiziert.

Die Massenspektren wurden freundlicherweise von Dr. A. Schierhorn aufgenommen.

### 2.9.6. CD-Messungen

Alle CD-Spektren wurden an einem Aviv 62 CD-Spektrophotometer (Aviv Associates, Lakewood, NJ) oder Jasco J710 CD-Spektrophotometer aufgenommen. Die Temperatur betrug 25 °C und die Proben wurden in 50 mM Gly-Gly, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.6 gemessen. Jedes Spektrum setzt sich aus 8 bzw. 10 Einzelmessungen im Bereich von 260–380 nm zusammen.

Die Elliptizität, bezogen auf die mittlere Aminosäuremasse  $[\Theta]_{\text{MRW}}$  (*mean residue weight ellipticity*) wurde nach folgender Gleichung berechnet:

$$[\Theta]_{\text{MRW}} = \frac{\Theta \cdot M \cdot 100}{n_{\text{AS}} \cdot c_{\text{P}} \cdot d} \cdot \text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$$

$\Theta$	gemessene Elliptizität
M	molare Masse des Proteins
$n_{\text{AS}}$	Anzahl der Aminosäuren im Protein
$c_{\text{P}}$	Proteinkonzentration in mg / ml
d	Schichtdicke der Küvette in cm

Diese optische Methode ist gut geeignet, um die Bindung von Apotransketolase mit ThDP und seinen Derivaten, genauso wie die Substratbindung an Holotransketolase zu verfolgen (Kochetov *et al.*, 1970; Heinrich *et al.*, 1971). Es wurden verschiedene Donorsubstrate (Xu-5-P, Fru-6-P und HPA) mit dem Holoenzym (30–60  $\mu\text{M}$  ThDP) inkubiert und die Spektren aufgenommen.

Im Falle von HPA wurde anschließend die Reaktion durch Zugabe der Akzeptorsubstrate (GA, und Gra-3-P) weitergeführt und durch erneute Spektrenaufnahme analysiert. Die verwendeten Substratkonzentrationen sind den jeweiligen Abbildungen zu entnehmen.

Zur Titration von Apoenzym mit chemisch synthetisiertem DL-DHETHDP wurde die Proteinlösung mit dem Derivat versetzt, die Rekombination abgewartet (Verfolgung der Reaktion bei  $\lambda = 320$  nm) und dann die Spektren aufgenommen. Für die nächste

Konzentration an DL-DHETHDP wurde eine frische Apoproteinlösung gemessen, um Verfälschungen durch eventuell gespaltenes DL-DHETHDP zu vermeiden.

Die Titration von WT-TK und TK-E418A mit N1'-CH<sub>3</sub>-ThDP zur Bestimmung des K<sub>D</sub>-Wertes wurde folgendermaßen durchgeführt: Die jeweiligen Apoenzyme wurden mit der entsprechenden Konzentration an N1'-CH<sub>3</sub>-ThDP versetzt. Es wurde 10 min bei 25 °C inkubiert und dann das Spektrum aufgenommen. Zur Ermittlung des K<sub>D</sub>-Wertes wurden die Werte im Bereich von 318–322 nm (negatives Extremum) gemittelt und gegen die Konzentration an eingesetzten N1'-CH<sub>3</sub>-ThDP aufgetragen.

### 2.9.7. Nachweis der Spaltung von DL-DHETHDP durch Transketolase

Apotransketolase (75 µM) wurde äquimolar mit DL-DHETHDP in 20 mM Natrium-Phosphatpuffer (5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.6) bei 25 °C inkubiert. Nach definierten Zeiten (0 min, 1 min, 5 min, 10 min, 20 min, 30 min, 60 min, 120 min, 300 min) wurde eine 300 µl-Probe entnommen und die Reaktion durch Zugabe von 200 µl Quenclösung (12.5 % (w/v) Trichloressigsäure, 1 M DCl) gestoppt. Das denaturierte Protein wurde durch Zentrifugation (10000g, 10 min, 4 °C) abgetrennt und der Überstand, zusätzlich über einen Spritzenfilter aus Zelluloseacetat (NALGENE<sup>®</sup>, 0.45 µm Porengröße) gefiltert und auf den Gehalt an DL-DHETHDP und ThDP <sup>1</sup>H-NMR-spektroskopisch untersucht. Hierzu wurde die Abnahme des relativen Integrals des C6'-H Signals von DHETHDP bei 7.30 ppm und die Zunahme des relativen Integrals des C6'-H Signals von ThDP bei 8.01 ppm verfolgt und zur Auswertung herangezogen.

Zusätzlich wurde die Spaltung von DL-DHETHDP durch Transketolase wie folgt untersucht: Apotransketolase (90 µM) wurde äquimolar mit DL-DHETHDP in 50 mM Gly-Gly (2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.6) bei 25 °C inkubiert. Nach 10 bzw. 30 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 Volumina kochendem Methanol beendet. Die Abtrennung von präzipitiertem Protein erfolgte durch Zentrifugation (15000g, 4 °C, 10 min), der Überstand wurde im Rotationsverdampfer (30 °C) eingengt und der pH-Wert auf 6.7 eingestellt. Die Probe wurde einer Anionenaustauschchromatographie an QAE-Sephadex A25 (2.6/30) bei 6–8 °C unterzogen. Die Elution erfolgte mit 50 mM Essigsäure. Die Analyse der eluierten Peaks erfolgte mit Massenspektrometrie, <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie sowie CD-Spektroskopie. Ein Kontrollversuch ohne Zugabe von Transketolase bestätigte die Stabilität von DL-DHETHDP gegenüber der gewählten Fällungsmethode mit kochendem Methanol.

## 2.10. Röntgenkleinwinkelstreuexperimente mit Synchrotronstrahlung

Zur Formabschätzung der Struktur von Transketolase in Gegenwart von Substraten auf der Basis der entsprechenden Kristallstruktur wurden Röntgenkleinwinkelstreuexperimente durchgeführt. Die Messungen wurden am Messplatz X33 des EMBL (Außenstelle Hamburg) im HASYLAB am DESY bei einer Wellenlänge von 1.5 Å bei verschiedenen Kameralängen (1.5–3.0 m) und Temperaturen von 7–10 °C realisiert. Als Detektoren dienten spezielle Proportional-Flächendetektoren (Linear- oder Quadrantenform) mit verzögerter Auslesung. Die Proteinproben lagen in 50 mM Gly-Gly, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM DTE, pH 7.6 vor. Substrate bzw. Kofaktorderivate wurden in folgenden Konzentrationen eingesetzt: 2 mM D-Fruktose-6-phosphat, 2 mM D-Xylulose-5-phosphat, 4 mM HPA und 1 mM DL-DHETHDP. Die Proteinkonzentration lag im Bereich 1–19 mg/ml. Die Kalibrierung der Streuvektorachse ( $s$ ) erfolgte mit Kollagen aus Truthahnsehne ( $d = 65$  mm) bzw. Tripalmitat ( $d = 4.05$  mm), die Berechnung mit dem Programm OTOKO (<http://www.embl-hamburg.de/ExternalInfo/Research/Sax/>). Die Subtraktion des Detektorrauschens, die Streuung der Pufferlösungen und das Evaluieren der Primärdaten (Reduktion und Normierung) wurden mit dem Programm SAPOKO realisiert. Die Ermittlung der Streuparameter  $I_0$  u.  $R_G$  erfolgte durch Fouriertransformation mit dem Programm GNOMOKO (Svergun, 1992) (<http://www.embl-hamburg.de/ExternalInfo/Research/Sax/>).

Der Vergleich der Proteinstruktur in Lösung und im Kristall unter verschiedenen Ligandierungsbedingungen wurde mit den Programmen CRY SOL und MASSHA (Konarev *et al.*, 2001) (<http://www.embl-hamburg.de/ExternalInfo/Research/Sax/>) realisiert.

Die Berechnung von  $\chi$  für die Diskrepanz der berechneten Modelle aus der Kristallstruktur und Lösungsstruktur erfolgte nach folgender Gleichung (Svergun *et al.*, 2000):

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

$N$	Anzahl der Messpunkte
$I(s)_{(\text{CRY SOL})}$	berechnete Streuintensitäten aus der Kristallstruktur
$I(s)_{(\text{MASSHA})}$	berechnete Streuintensitäten aus der Kristallstruktur, aber nach <i>rigid body refinement</i> und <i>simulated annealing</i>
$I_{\text{exp}}(s)$	experimentelle Streuintensitäten
$\sigma(s)$	Standardabweichung

Die Durchführung und Auswertung der Messungen übernahm freundlicherweise Dr. S. König.

### 2.11. Kristallisation

Alle pH-Werte der für die Kristallisation verwendeten Lösungen beziehen sich auf Raumtemperatur. Das Pipettieren sowie die Inkubation der Kristallisationsansätze erfolgte bei 6–8 °C im Kühlraum. Zur Anwendung kam die Methode der Gasphasendiffusion im hängenden Tropfen. Es wurden Tropfen aus gleichen Volumina Proteinlösung und Reservoirlösung gebildet, in der Regel 7.5 µl Proteinlösung und 7.5 µl Reservoirlösung. Zum Einsatz kamen Gewebekulturplatten Nr. 3047 (Falcon) bzw. Zellkultur-Testplatten (TPP), die 1 ml Reservoirlösung enthielten. Die Kristallisationsbedingungen wurden wie bei SCHNEIDER *et al.* (1989) beschrieben (50 mM Gly-Gly / NaOH, pH 7.9, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM ThDP, 13–17 % (w/v) PEG 6000, 6–9 mg/ml Protein), gewählt. Für die Kristallisation der Komplexe aus WT-TK und N1'-CH<sub>3</sub>-ThDP, WT-TK und 4'-NHCH<sub>3</sub>-ThDP sowie E418A und N1'-CH<sub>3</sub>-ThDP wurde das ThDP durch 10 mM des entsprechenden Kofaktorderivates ersetzt. Das Apoenzym des Wildtyps wurde in Abwesenheit von ThDP kristallisiert. Nach dem Pipettieren und Durchmischen der Lösungen wurden die Reservoire mit silanisierten Deckgläschen und Baysilone-Paste (Bayer Silicone) luftdicht verschlossen.

### 2.12. Datensammlung (Proteinkristallographie)

Die Datensammlung erfolgte an verschiedenen Messplätzen. Zur Analyse von schockgefrorenen Proteinkristallen bei 110 K wurde die *beamline* BW7B (EMBL Außenstelle Hamburg, DESY) mit einer Wellenlänge von 0.85 Å verwendet. Die schockgefrorenen Kristalle wurden zuvor mit einer Gefrierschutzlösung (50 mM Gly-Gly / NaOH, pH 7.9, 20 % (w/v) PEG 6000, 20 % (v/v) Ethylenglycol, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM ThDP bzw. 10 mM Kofaktorderivat (nicht bei Apoenzymkristallen) für ca. 15 s auf Eis inkubiert und dann direkt, mittels eines *loops* (0.05–0.1 mm Ø, Hampton Research) auf dem Goniometerkopf angebracht. Der Kristall befand sich für die Messung in einem kontinuierlichen Stickstoffstrom (110 K). Für die Datensammlung des Transketolase-DHETHDP-Komplexes wurde der Gefrierschutzlösung 40 mM HPA beigegeben, der pH-Wert mit NaOH auf 7.9

korrigiert und die Inkubationszeit auf 30 s, 30 min bzw. 6 h (bei 4 °C) festgesetzt. Die Analyse der nicht schockgefrorenen Kristalle wurde bei 277 K durchgeführt. Die Kristalle wurden in einer entsprechenden Glaskapillare (Hampton Research, 0.5 mm Ø) fixiert und an einer Rikagu-Drehanode (50 kV, 90 mA) bei einer Wellenlänge von 1.54 Å (Cu-K $\alpha$ ) am Karolinska Institut (Stockholm) gemessen. Alle erhaltenen Transketolasekristalle gehörten zur Raumgruppe P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>. Somit wurde für die Datensammlung ein absoluter Winkel von mindestens 90° gewählt, bei Drehwinkelabständen von 0.3° bzw. 0.5° pro Beugungsbild. Raumgruppe und Zelldimension der Kristalle wurden mit der Autoindexierungs-Routine in DENZO (Otwinowski, 1993) bestimmt. Alle Daten wurden mit den Programmen DENZO und SCALEPACK integriert bzw. skaliert (Otwinowski, 1993).

### 2.13. Modellierung und kristallographische Verfeinerung

Alle Strukturen von Transketolase und Transketolasekomplexen wurden mit der Methode des Molekularen Ersatzes (Hoppe, 1957; Rossmann & Blow, 1962) gelöst. Dabei diente das verfeinerte Modell des Transketolasedimers (Nikkola *et al.*, 1994) als Suchmodell (PDB-Zugangscode 1TRK). Die Verfeinerungen wurde mit dem Programm CNS (Brünger *et al.*, 1998) durchgeführt, gestartet wurde mit dem *rigid body refinement* (Programm XPLOR; Brünger *et al.*, 1987) gefolgt von einem *simulated annealing*. Hierbei wird in einer Simulation die Energie (Temperatur) der Atome zuerst erhöht und dann langsam minimiert, so daß Energiebarrieren und somit lokale Energieminima, die nicht der realen Struktur entsprechen, überwunden werden. Für die Berechnung des freien R-Faktors (R<sub>free</sub>) wurden 5 % zufällig ausgewählte Reflexe von der Verfeinerung ausgeschlossen (Brünger, 1992). Die „nicht kristallographischen Symmetrie“ (NCS)-Einschränkungen wurden auf beide Polypeptidketten der asymmetrischen Einheit bezogen. Auf jeden Verfeinerungszyklus folgten die Berechnung von Elektronendichtekarten und die manuelle Inspektion und Korrektur des Modells unter Nutzung des Programms O (Jones *et al.*, 1991), so oft bis der R-Faktor konvergierte. Die Modelle wurden in Hinblick auf ihre Geometrie mit dem Programm PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) analysiert.

Die R-Faktoren sind folgendermaßen definiert:

**R-Faktor** allgemeiner kristallographischer R-Faktor, Maß für die Korrektheit der Modellstruktur:

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

**R<sub>free</sub>** freier R-Faktor, ist von der Verfeinerung unbeeinflusst, da die zu Berechnung dieses R-Faktors verwendeten Einzelreflexionen ( $hkl \subset T$ ) von der Verfeinerung ausgeschlossen sind:

$$R_{free} = \frac{\sum_{hkl \subset T} \| |F_{obs}| - k |F_{calc}| \|}{\sum_{hkl \subset T} |F_{obs}|}$$

$ F_{obs} $	beobachtete Strukturfaktoramplituden
$ F_{calc} $	vom Modell berechnete Strukturfaktoramplituden
$T$	Testset
$k$	Skalierungsfaktor

Die Elektronendichtekarten definieren sich wie folgt:

### Einfache Elektronendichtekarte:

$$\begin{aligned} p(xyz) &= \frac{1}{V} \sum_{hkl} |F(hkl)| \exp[-2\pi i(hx - ky - lz) + i\alpha(hkl)] \\ &= \frac{1}{V} \sum_{hkl} |F(hkl)| \cos[2\pi(hx + ky + lz) - \alpha(hkl)] \end{aligned}$$

$|F(hkl)|$       Strukturfaktoramplituden der Einzelreflexe ( $hkl$ )

$\alpha$               Phasenwinkel

### Differenzelektronendichtekarten:

$F_o$ - $F_c$ -Karte:

$$p(xyz) = \frac{1}{V} \sum_{hkl} (|F_{obs}| - |F_{calc}|) \exp[-2\pi i(hx + ky + lz) + i\alpha_{calc}]$$

$2F_o$ - $F_c$ -Karte:

$$p(xyz) = \frac{1}{V} \sum_{hkl} (2|F_{obs}| - |F_{calc}|) \exp[-2\pi i(hx + ky + lz) + i\alpha_{calc}]$$

$F_{calc}$               Strukturfaktor eines Teilmodells

$\alpha_{calc}$              Phasenwinkel des Teilmodells

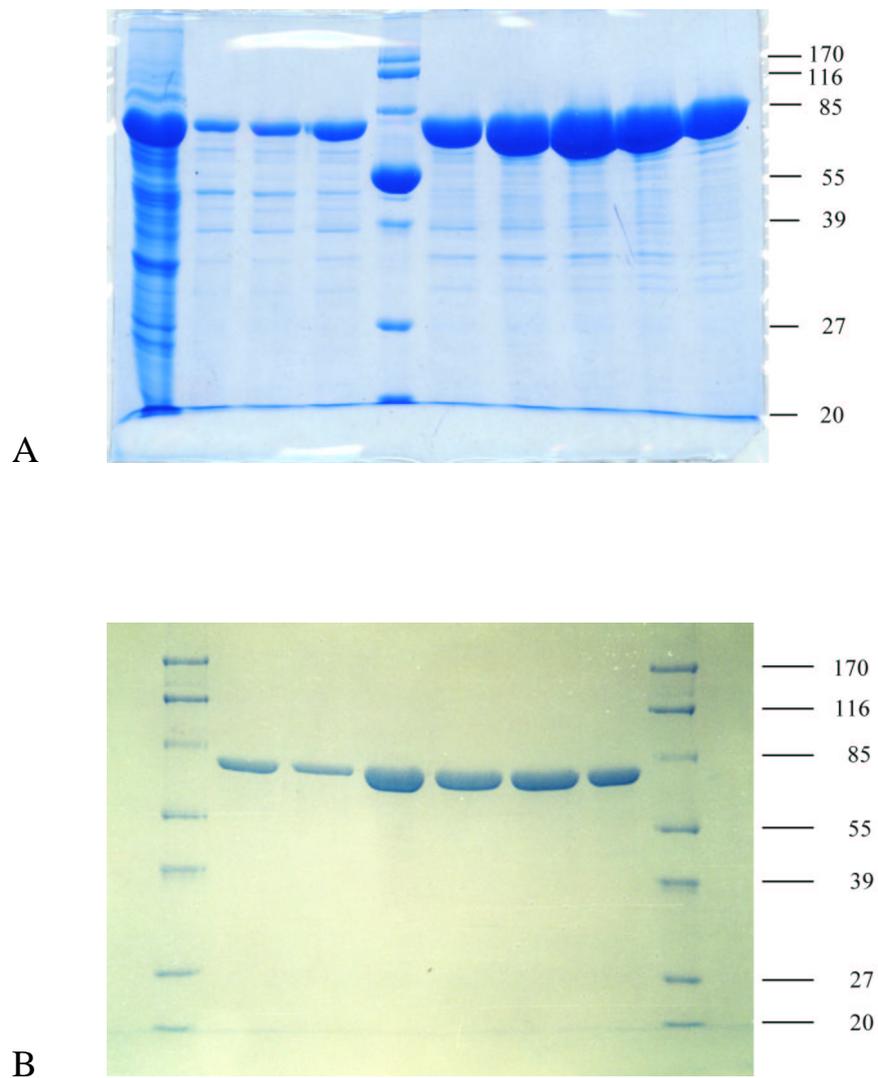
### 3. Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1. Präparation von rekombinanter Transketolase aus dem Hefestamm H402xpTKL1

Wildtyp-Transketolase aus *Saccharomyces cerevisiae* und die Enzymvarianten H263A, E418A, H103A und H481A wurden nach dem gleichen Präparationsprotokoll gereinigt. Dieses Protokoll orientiert sich an der von WIKNER *et al.* (1994) beschriebenen Vorschrift und umfasst Aufschluss, Nukleinsäurefällung, Ammoniumsulfatfällung, Gelfiltration und Anionenaustauschchromatographie. Ausgetauscht wurde das Material für die Gelfiltration (S-200 HR statt S-300 HR) und Anionenaustauschchromatographie (Source<sup>TM</sup> 15 Q statt Mono Q). Die Enzyme konnten bis zur Homogenität gereinigt werden (Abb. 8). Ausgehend von 5 Litern Kulturmedium lag die Ausbeute an Protein bei 80–100 mg. Einen Überblick über die bei den Präparationsschritten erzielten Ausbeuten gibt Tabelle 1.

Präparations- schritt	Protein in mg	Gesamtaktivität in U	Spez. Aktivität in U/mg	Aktivitätsausbeute in %
Rohextrakt	1280	7900	6.1	100.0
Streptomycin- sulfatfällung	1270	7840	6.1	99.2
Ammonium- sulfatfällung	865	6460	7.4	81.7
Gelfiltration S-200 HR	271	4480	16.5	56.7
Entsalzung G-50 fine	260	4290	16.5	54.3
Anionenaustauscher Source <sup>TM</sup> 15 Q	96	3450	36.0	43.6

*Tab. 1: Reinigung von Wildtyp-Transketolase (Die Angaben stellen Mittelwerte aus 15 Präparationen dar).*

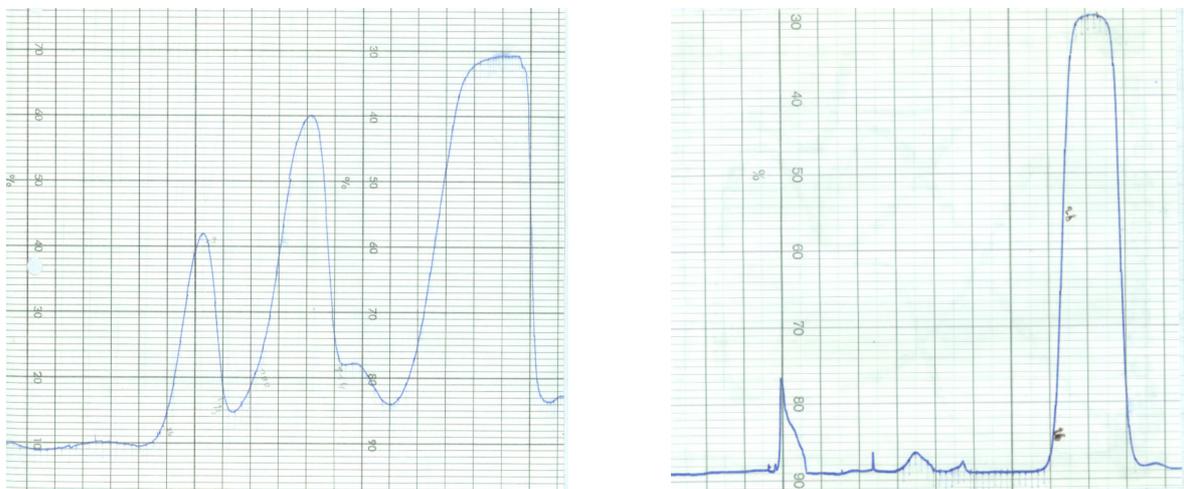


**Abb. 8:** SDS-PAGE (Coomassiefärbung) der Präparation von Wildtyp-Transketolase.

Gel A: Bahn 1 Rohhefeextrakt, Bahnen 2–4 und 6–10 ausgewählte Fraktionen der Gelfiltration über S-200 HR, Bahn 5 Marker. Gel B: Bahnen 1 und 8 Marker, Bahnen 2–7 ausgewählte Fraktionen der Anionenaustauschchromatographie über Source<sup>TM</sup> 15 Q. Die Molekulargewichte der verwendeten Markerproteine sind in kDa angegeben.

### 3.2. Synthese von DL-DHETHDP

Durch sukzessive Anlagerung von zwei Molekülen Formaldehyd an das C2-Atom von ThDP erhält man DHETHDP, welches als Racemat vorliegt (DL-DHETHDP). Ausgehend von 1 g ThDP konnten durch Umsetzung mit Formaldehyd 40–50 mg reines DL-DHETHDP erhalten werden. Es erwies sich als vorteilhaft, eine Rechromatographie des nach der ersten Trennung erhaltenen DL-DHETHDP-Peaks an QAE-Sephadex A 25 durchzuführen, um eine hohe Reinheit der Substanz zu erhalten. Abb. 9 zeigt die originalen Elutionsprofile der Trennung.



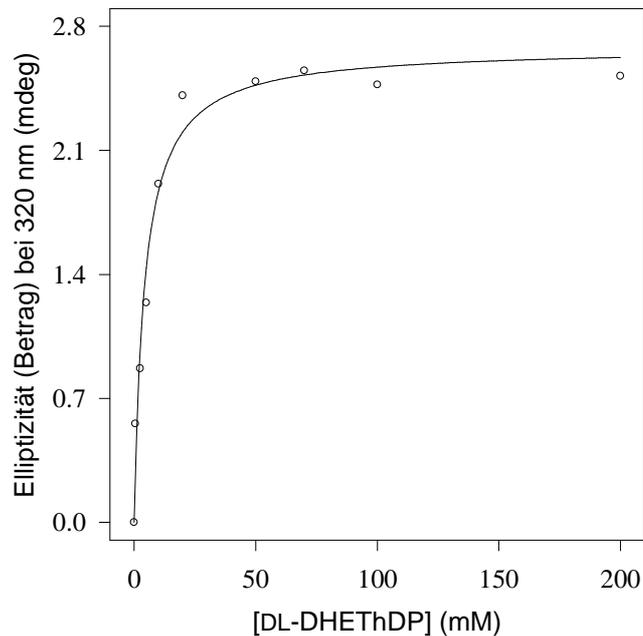
*Abb. 9: Elutionsprofile der Trennung von DL-DHETHDP an QAE-Sephadex A25. Links: Erste Trennung. Rechts: Rechromatographie des mittleren Peaks (DL-DHETHDP).*

Nach der Anionenaustauschchromatographie des Syntheseansatzes an QAE-Sephadex A25 konnten 3 Peaks erhalten werden, die als (von links nach rechts) 2-(1,2,3-trihydroxy-propyl)-ThDP, 2-(1,2-dihydroxyethyl)-ThDP (DL-DHETHDP) und ThDP durch Massenspektrometrie identifiziert werden konnten. Die Reinheit und Stabilität von DL-DHETHDP wurde zusätzlich durch  $^1\text{H-NMR}$  überprüft. Nach einer Inkubationszeit von 2 Wochen in 0.1 M Natriumphosphatpuffer (pH 7.6, 10 °C) waren nur 7 % DL-DHETHDP in ThDP gespalten.

### 3.3. Bindung, Spaltung und katalytisches Verhalten von DL-DHETHDP an Wildtyp-Transketolase

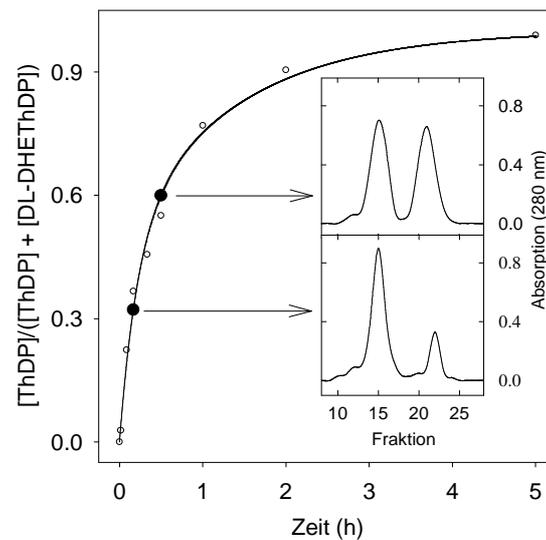
Zur Verfolgung der Rekombination von Wildtyp-Transketolase mit DL-DHETHDP wurden CD-Spektren im Nah-UV Bereich (260–380 nm) aufgenommen und ausgewertet. Es konnte, analog zur Bindung von ThDP, ein negatives Extremum bei 320 nm detektiert werden, welches als Signal zur Bestimmung des  $K_D$ -Wertes diente. Abb. 10 veranschaulicht die Abhängigkeit dieses Extremums bei 320 nm von der Konzentration an DL-DHETHDP. Aus den Messpunkten lässt sich ein  $K_D$ -Wert von  $4.3 \pm 0.8 \mu\text{M}$  für das Racemat errechnen, der im Vergleich zum  $K_D$ -Wert von ThDP ( $0.6 \pm 0.1 \mu\text{M}$ ) etwa siebenmal höher ausfällt.

Die Spaltung von DL-DHETHDP durch Wildtyp-Transketolase wurde mit zwei verschiedenen Methoden untersucht. Zum einen wurde Wildtyp-Transketolase mit DL-DHETHDP bei 25 °C inkubiert, nach definierten Zeiten ein Aliquot entnommen, das Protein mit Trichloressigsäure gefällt und abzentrifugiert und im Überstand das Verhältnis von DL-DHETHDP/ThDP durch  $^1\text{H-NMR}$  bestimmt. Die erhaltenen Daten wurden nach zwei Reaktionen erster Ordnung ausgewertet ( $R = 0.99$ ). Es ergab sich für die erste, schnellere Phase eine Geschwindigkeitskonstante von  $k_1 = 0.0012 \text{ s}^{-1}$  und für die zweite, langsamere Phase eine Geschwindigkeitskonstante von  $k_2 = 0.0002 \text{ s}^{-1}$ . Der Versuch, die Messpunkte mit einer einfach exponentiellen Funktion zu fitten, ergab eine schlechtere Anpassung ( $R = 0.97$ ).



*Abb. 10: Rekombination von Apotransketolase (Wildtyp, 4.5  $\mu$ M) mit DL-DHETHDP. Abhängigkeit des CD-Signals bei 320 nm von der Konzentration des Derivates. Die Messungen wurden in 50 mM Gly-Gly, 2.5 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 7.6 bei 25 °C durchgeführt. Es konnte ein  $K_D$ -Wert von  $4.3 \pm 0.8 \mu\text{M}$  ermittelt werden.*

Eine zweite Methode zur Verfolgung der Spaltung von DL-DHETHDP durch Transketolase stützte sich auf die unterschiedlichen Eigenschaften von ThDP und DL-DHETHDP während einer Anionenaustauschchromatographie an QAE Sephadex A25 (Pharmacia). So wurde Wildtyp-Transketolase mit DL-DHETHDP im äquimolaren Verhältnis rekombiniert und nach 10 bzw. 30 min die Reaktion mit kochendem Methanol gestoppt. Die Separation der Substanzen gelang an einer QAE Sephadex A25-Säule durch Elution mit 50 mM Essigsäure, wobei DL-DHETHDP vor ThDP eluiert wird.

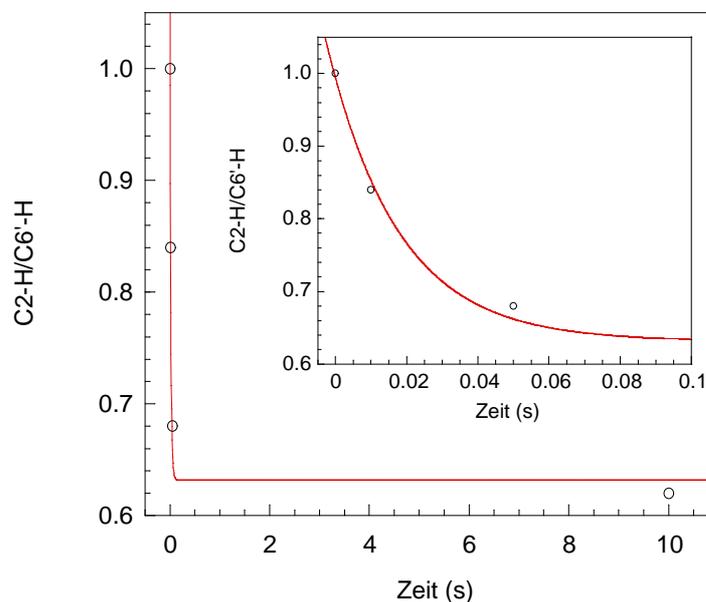


**Abb. 11:** Zeitabhängigkeit der enzymatischen Spaltung von  $75 \mu\text{M}$  DL-DHETHDP durch  $75 \mu\text{M}$  Wildtyp-Transketolase in  $20 \text{ mM}$  Natriumphosphat-Puffer ( $5 \text{ mM}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{pH}$  7.6), verfolgt mit  $^1\text{H-NMR}$ : Die experimentellen Daten (o) wurden nach zwei Reaktionen erster Ordnung gefittet (durchgezogene Linie), um die Spaltung der beiden Enantiomere von DL-DHETHDP zu analysieren. Die mit dem Programm KALEIDAGRAPH<sup>TM</sup> ermittelten Geschwindigkeitskonstanten sind  $k_1 = 0.0012 \text{ s}^{-1}$  und  $k_2 = 0.0002 \text{ s}^{-1}$ . Inset: Elutionsprofile der chromatographischen Trennung von DL-DHETHDP/ThDP nach 10-minütiger (unteres Diagramm) bzw. 30-minütiger (oberes Diagramm) Inkubation von  $90 \mu\text{M}$  DL-DHETHDP mit  $90 \mu\text{M}$  Apotransketolase in  $50 \text{ mM}$  Gly-Gly-Puffer ( $2.5 \text{ mM}$   $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{pH}$  7.6). Der erste Peak (von links) entspricht der DHETHDP-Fraktion, der zweite Peak entspricht der ThDP-Fraktion.

Das Inset in Abb. 11 zeigt die Elutionsprofile dieser Trennung. Deutlich ist die Zunahme des ThDP-Peaks nach längerer Inkubationszeit zu erkennen, während im gleichen Umfang der DHETHDP-Peak abnimmt. Die DHETHDP-Fraktion nach 30 - minütiger Inkubation von DL-DHETHDP mit Transketolase wurde zusätzlich durch CD-Messungen untersucht wobei sich eine optische Aktivität der Substanz im Wellenlängenbereich von 260–280 nm ergab (nicht gezeigt). Unter Berücksichtigung der Zweiphasigkeit der Umsatzkinetik von DL-DHETHDP durch WT-TK kann das Auftreten eines CD-Signals mit der bevorzugten Spaltung eines Enantiomeren von DL-DHETHDP erklärt werden. Die Spaltung von DL-DHETHDP kann in Anwesenheit von Substraten erheblich beschleunigt werden. Setzt man DL-DHETHDP anstelle von ThDP im Testsystem nach KOCHETOV (1982) ein (Umsetzung von Xu-5-P und Rib-5-P), erlangt man eine vollständige katalytische Aktivität des Enzyms.

### 3.4. Die Kofaktoraktivierung bei den Transketolasevariante H263A und H103A

Die Transketolasevariante H263A besitzt 0.5 % der Wildtyp-Aktivität, bei unveränderten  $K_M$ -Werten für die Donor- bzw. Akzeptorsubstrate Xu-5-P und Rib-5-P und einem ähnlichen  $K_D$ -Wert für ThDP (Wildtyp: 0.6  $\mu\text{M}$ , H263A: 1.2  $\mu\text{M}$ ) (Wikner *et al.*, 1997). Die Röntgenkristallstruktur (PDB-Datenbankeintrag 1AYO) ist ebenfalls verfügbar und es kann eine Störung der Enzymstruktur durch die Mutation ausgeschlossen werden (Wikner *et al.*, 1997). Es war somit zu klären, warum diese Variante eine so geringe katalytische Aktivität besitzt und welche Funktion His263 während der Katalyse ausübt. Die Geschwindigkeit des initialen Deprotonierungsschrittes des C2-Atoms des ThDP im enzymgebundenem Zustand wurde für die H263A und die H103A Variante bestimmt. Es konnte bei einer Temperatur von 5 °C eine Geschwindigkeitskonstante des H/D-Austausches von  $50 \pm 5 \text{ s}^{-1}$  (H263A) bzw.  $57 \pm 8 \text{ s}^{-1}$  (H103A) ermittelt werden, die etwa der des Wildtypenzym (61  $\pm 5 \text{ s}^{-1}$ ; Kern *et al.*, 1997) entspricht. Abbildung 12 zeigt eine typische Kinetik des H/D-Austausches.

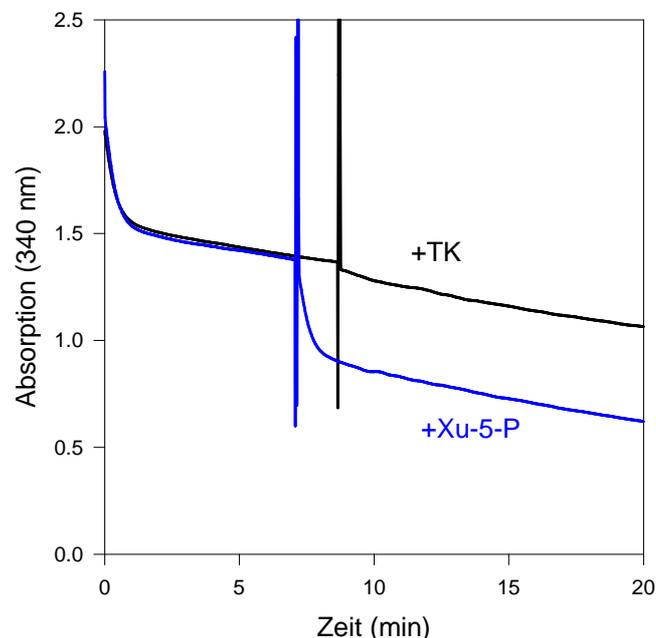


**Abb. 12:** Kinetik des H/D-Austauschs am C2-Atom von ThDP in der Transketolasevariante H263A durch Mischen gleicher Volumina von Proteinlösung (TK-H263A) mit  $\text{D}_2\text{O}$ . Das Verhältnis der relativen Signalintegrale von C2-H (9.5 ppm) und C6'-H (7.85 ppm) sind gegen die Zeit aufgetragen. Die Messwerte wurden mit dem Programm KALEIDAGRAPH nach pseudo-erster Ordnung gefittet (rote Linie); es ergab sich eine Geschwindigkeitskonstante von  $50 \pm 5 \text{ s}^{-1}$ . Die Messungen wurden in 0.1 M Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) bei 5 °C durchgeführt.

Die hochkonservierten Histidine 103 und 263 in Transketolase sind nicht am initialen Deprotonierungsschritt des C2-Atoms des Kofaktors ThDP beteiligt. Die Bedeutung des Histidins 263 während der Katalyse wird im folgenden erörtert.

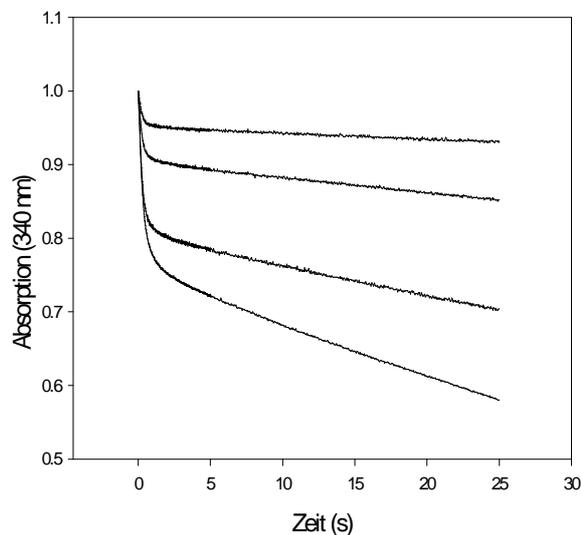
### 3.5. Donorsubstratbindung und -spaltung durch Wildtyp-Transketolase und die Enzymvariante H263A

Unter den Bedingungen des Aktivitätstests für Transketolase nach KOCHETOV (1982) beobachtet man in Abwesenheit des Akzeptorsubstrates Rib-5-P eine charakteristische *burst*-Phase in der Kinetik, die 4–6 % der vollständigen Reaktionsgeschwindigkeit ausmacht. Danach verläuft die Reaktion linear. Gibt man während dieser letzteren, linearen Phase erneut dieselben Mengen an entweder Enzym oder Xu-5-P dem Reaktionsansatz hinzu, bietet sich das folgende Bild: Bei der Zugabe von Xu-5-P reproduziert sich die *burst*-Phase, bei der Zugabe an Enzym verdoppelt sich lediglich die Geschwindigkeit der zweiten, linearen Phase der vorausgegangenen Reaktion (Abb. 13).



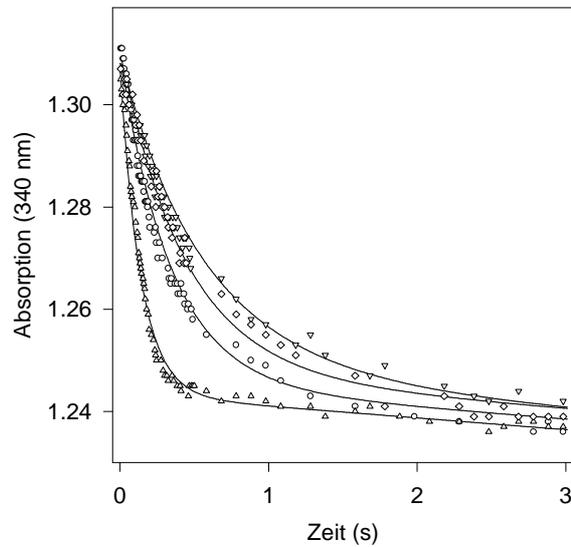
*Abb. 13: Blindreaktion von Wildtyp-Transketolase mit handelsüblichem Xu-5-P (Sigma-Aldrich) im Testsystem nach KOCHETOV (1982), ohne das Akzeptorsubstrat Rib-5-P. Die Konzentration von Xu-5-P beträgt 1 mM bzw. 2 mM nach erneuter Zugabe. Die Aktivität des Wildtypenzym war 0.1 U/ml, die Temperatur betrug 25 °C.*

Aus diesen Beobachtungen lässt sich schlussfolgern, dass kommerzielles Xu-5-P mit Akzeptorsubstrat(en) verunreinigt ist. Daher ist es erforderlich in einem vorgelagertem Reaktionsschritt diese Verunreinigung(en) zu entfernen. Dies erfolgte durch Vorinkubation von Xu-5P mit Transketolase. Das in dieser Weise vorbehandelte Substrat wird, wie die Abbildungen 14–16 zeigen, sowohl durch das Wildtypenzym als auch durch die H263A Variante gespalten. Die für das Wildtypenzym gemessene Abhängigkeit der Amplitude der *burst*-Phase (Abb.14) korreliert sehr gut mit einem *single turnover* der Donorsubstrat-spaltung. Legt man ein Reaktionsschema für die Donorsubstratbindung und -spaltung wie in Schema 1 angegeben zugrunde, lassen sich die kinetischen Konstanten aus den gemessenen Zeit-Umsatz-Kurven ermitteln (Tab. 2).

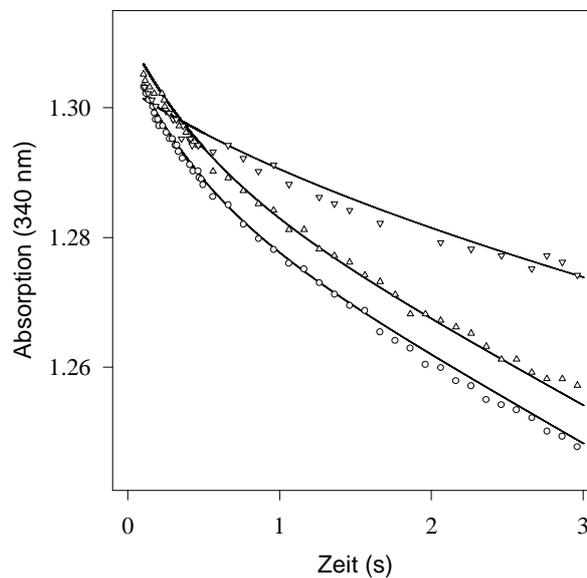


**Abb. 14:** Zeit-Umsatz-Kurven der Xu-5-P-Spaltung durch WT-TK.

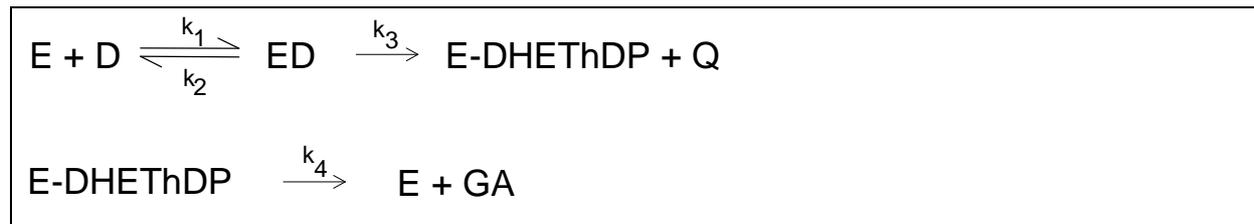
Die Reaktionen wurden mit Hilfe eines gekoppelten optischen Testsystems (TPI + GDH) durch Detektion des Spaltproduktes Gra-3-P verfolgt. Die verwendeten Konzentrationen an Transketolase waren wie folgt (von oben nach unten): 4.8, 9.7, 19.4 und 38  $\mu\text{M}$  bei einer konstanten Konzentration an Xu-5-P von 1 mM. Die Reaktionen wurden wie in „Material & Methoden“ beschrieben, durchgeführt.



**Abb. 15:** Zeit-Umsatz-Kurven der Reaktion von Wildtyp-Transketolase bei unterschiedlichen Xu-5-P Konzentrationen in Abwesenheit eines Akzeptorsubstrates. Konzentrationen an Xu-5-P: ▽ – 35 μM, ◇ – 50 μM, o – 70 μM und Δ – 1000 μM. Die Enzymkonzentration betrug 7.4 μM und die durchgezogenen Linien repräsentieren die Anpassungen, die mit dem Programm DYNAFIT gewonnen wurden.



**Abb. 16:** Progresskurven der Reaktion H263A mit unterschiedlichen Xu-5-P Konzentrationen in Abwesenheit eines Akzeptorsubstrates. Konzentrationen an Xu-5-P wurden gewählt: ▽ – 50 μM, Δ – 500 μM und o – 1000 μM. Die Enzymkonzentration betrug 20.4 μM und die durchgezogenen Linien repräsentieren die Anpassungen, die mit dem Programm DYNAFIT gewonnen wurden.



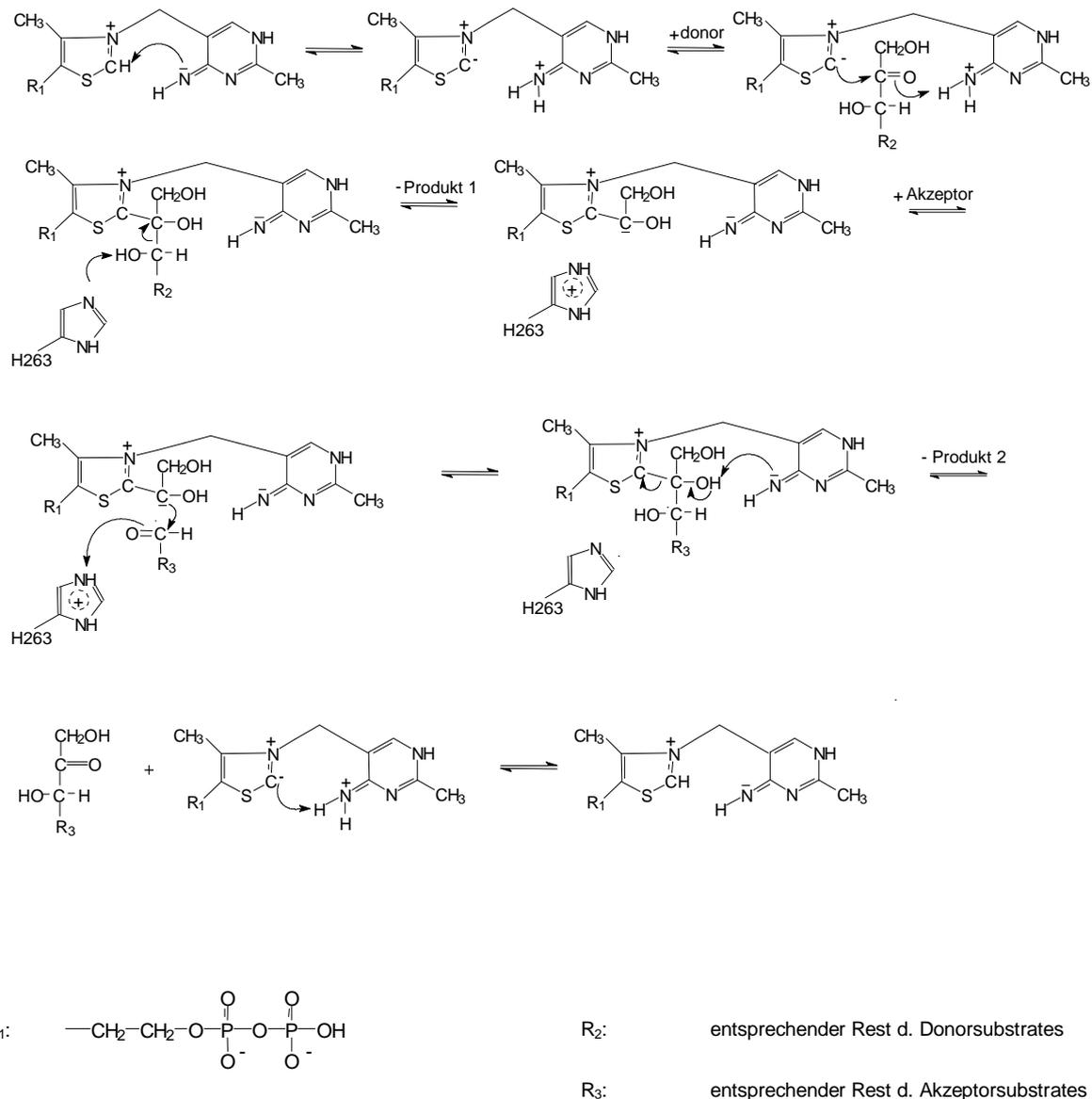
*Schema 1: Schema für die Reaktion von Transketolase (E) mit einem Donorsubstrat (D). Q ist das Spaltprodukt der ersten Halbreaktion und GA steht für Glycolaldehyd, dem Spaltprodukt des Transketolase-DHETHDP-Komplexes.*

Protein	K (mM <sup>-1</sup> )	k <sub>3</sub> (s <sup>-1</sup> )	k <sub>4</sub> (s <sup>-1</sup> )
Wildtyp	≈ 10	7.89 ± 0.120	0.036 ± 0.0210
H263A	≈ 8	1.60 ± 0.064	0.515 ± 0.0085

*Tab. 2: Katalytische Konstanten der Spaltung von Xu-5-P durch Transketolase (Wildtyp und H263A). Die Konstanten wurden auf der Grundlage von Schema 1 mit dem Programm DYNAFIT ermittelt, wobei K = k<sub>1</sub>/k<sub>2</sub>.*

Die Gleichgewichtskonstante K konnte lediglich approximativ angegeben werden, da die Einzelkonstanten  $k_1$  und  $k_2$  mit relativ hohen Fehlern erhalten wurden. Der Wert für K ist für beide Spezies etwa identisch, was auf ein unverändertes Bindungsverhalten bei der Transketolasevariante H263A hinweist. Die unveränderten  $K_M$ -Werte deuteten dies bereits an. Die Geschwindigkeitskonstante für die Abspaltung von Glycerinaldehyd-3-phosphat ( $k_3$ ) ist bei H263A etwa fünfmal kleiner. Den weitaus größten Effekt beobachtet man bei der Spaltung des Reaktionsintermediates DHETHDP und der damit verbundenen Freisetzung von Glycolaldehyd ( $k_4$ ). Hier ist der Wert für H263A etwa 14-mal größer als für das Wildtypenzym. Dies deutet darauf hin, dass an der Stabilisierung des Reaktionsintermediates DHETHDP Histidin 263 beteiligt ist, möglicherweise durch eine Stabilisierung der negativen Ladung des alpha-Carbanions des DHETHDP durch die positive Ladung des protonierten Histidins 263. Der Austausch dieser konservierten Aminosäure führt zu einer größeren Instabilität des Intermediates und somit zu einer schnelleren Spaltung des DHETHDP in ThDP.

und GA. Auf Grund der erhaltenen Ergebnisse zur Rolle des Histidins 263 kann folgendes Reaktionsschema der Transketolasereaktion angenommen werden:



*Schema 2: Modell des Katalysemechanismus von Transketolase (nach Fiedler et al., 2001).*

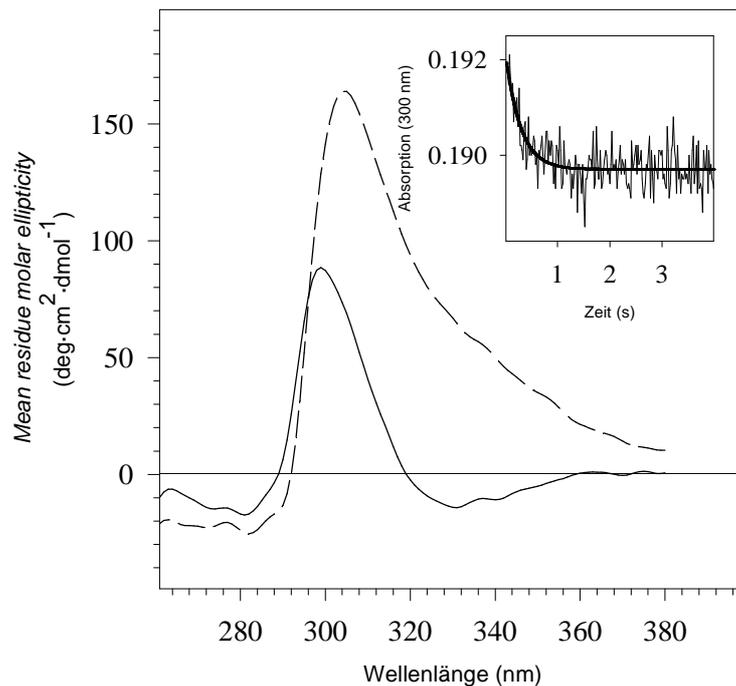
Dass Transketolase die Spaltung von Xu-5-P in Abwesenheit eines Akzeptorsubstrates katalysieren kann, konnten auch Bykova *et al.* (2001) bestätigen. Weiterhin gelang diesen Autoren der Nachweis von Erythrose, einem Nebenprodukt der Donorsubstratspaltung. Erythrose entsteht, wenn der nach der DHETHDP-Spaltung entstandene Glycolaldehyd als

Akzeptorsubstrat für das alpha-Carbanion des DHEThDP fungiert. Da Glycolaldehyd einen hohen  $K_M$ -Wert besitzt, spielt diese Reaktion in dem Teil der Spaltkinetik, der hier für die Auswertung herangezogen wurde, keine Rolle.

### **3.6. Untersuchungen zur Donorsubstratbindung und Intermediatbildung mittels CD – und Absorptionsspektroskopie**

Die Untersuchungen zur Bindung von Donorsubstraten an Holotransketolase konnten mit Hilfe der Nah-UV CD-Spektroskopie und Absorptionsspektroskopie weitergeführt werden. Es ist bekannt, dass sich die Bindung des Kofaktors und der Donorsubstrate sowohl in einer Änderung der Elliptizität im Nah-UV Bereich, als auch in der Änderung der Absorption im Bereich von 300–320 nm bei Transketolase aus Hefe zu erkennen gibt (Kochetov *et al.*, 1970; Heinrich *et al.*, 1971).

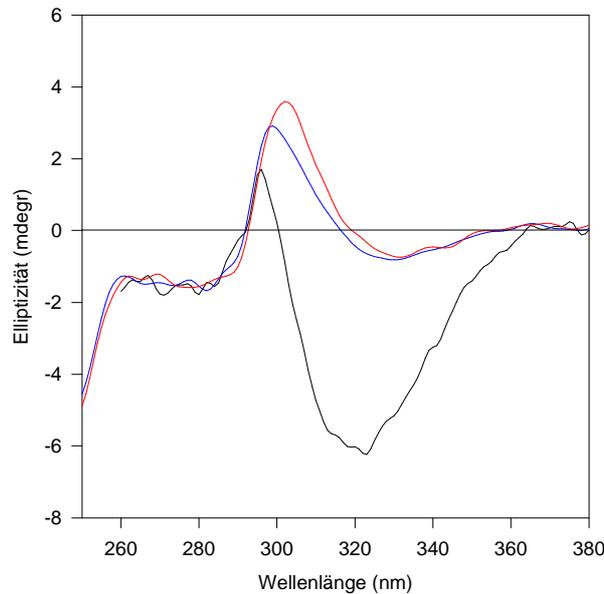
Nach Rekombination von Apotransketolase mit ThDP und  $Ca^{++}$  erhält man bei 320 nm ein negatives Extremum und bei 280 nm ein positives Extremum. Von KOCHETOV und Mitarbeitern wurde dieser Cotton-Effekt als ein Ladungstransfer-Komplex (*charge-transfer-complex*) diskutiert (Kochetov *et al.*, 1970; Kochetov *et al.*, 1973), der aber durch die strukturellen Arbeiten nicht bestätigt werden konnte. Neuere Arbeiten sehen die Ursache für diese CD-Bande in der Bildung der iminotautomeren Form des Kofaktors (Kovina *et al.*, 2002). Bei der Inkubation von Holotransketolase mit HPA beobachtet man eine Inversion des charakteristischen CD-Signals bei 320 nm, die sich nach Zugabe von Akzeptorsubstrat umkehren lässt. Abbildung 17 zeigt als Beispiel die Verfolgung der Reaktion von TK mit HPA und Gra-3-P mit Hilfe der CD-Spektroskopie und Absorptionsspektroskopie.



**Abb. 17:** Nah-UV CD Spektren von Wildtyp-Transketolase mit HPA als Donorsubstrat und Gra-3-P als Akzeptorsubstrat. Holotransketolase ( $8.4 \mu\text{M}$ ) wurde mit  $2 \text{ mM}$  HPA (gestrichelte Linie) und anschließend mit  $1 \text{ mM}$  Gra-3-P (durchgezogene Linie) bei  $25^\circ\text{C}$  inkubiert. Inset: Die Reaktion des nach  $8 \text{ s}$  erhaltenen Holotransketolase-HPA-Komplexes ( $8.25 \mu\text{M}$ ) mit Gra-3-P ( $8.25 \mu\text{M}$ ) wurde durch Absorptionsänderung bei  $300 \text{ nm}$  verfolgt. Die Reaktion wurde nach erster Ordnung mit dem Programm Sigma Plot gefittet und die Geschwindigkeitskonstante entspricht:  $k_{\text{obs}} = 3.5 \text{ s}^{-1}$ .

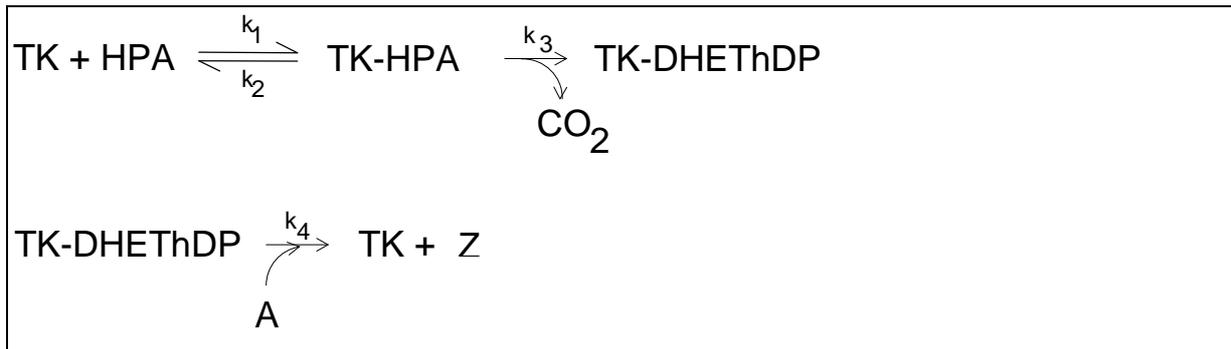
Nach Decarboxylierung von HPA entsteht enzymgebundenes DHETHDP, welches dann mit dem Akzeptorsubstrat Gra-3-P zu Xu-5-P weiterreagiert. Das erhaltene CD-Spektrum ist in seiner Qualität dem CD-Spektrum von Transketolase mit Xu-5-P und auch von Transketolase mit Fru-6-P identisch, was auf eine gleiche Asymmetrie im aktiven Zentrum hinweist (Abb. 18). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die asymmetrischen Eigenschaften der intermediären Zustände von Transketolase mit Xu-5-P, Fru-6-P und HPA + Gra-3-P gleich sind und damit in all diesen Fällen das gleiche Reaktionsintermediat populierte wird. Aufgrund der Reversibilität der Donorsubstratspaltung ist ein ständig ablaufender Reaktionszyklus von Bindung, Spaltung und Rückreaktion im aktiven Zentrum von Transketolase gegeben. Unterbricht man diesen Zyklus durch Einsatz eines Hilfsenzym-systems, welches das Spaltprodukt aus dem Gleichgewicht entfernt und somit die Rückreaktion unterbindet, erhöht sich die Intensität der CD-Bande für das Intermediat

(Solov'eva *et al.*, 2001). Auch der Umsatz von HPA durch Transketolase führt zu einer solchen Erhöhung der Intensität dieser Bande, da hier die Decarboxylierung irreversibel ist. Das Signal für den intermediären Zustand nach HPA-Zugabe ist nicht stabil und nimmt mit der Zeit ab, was bereits KOCHETOV *et al.* (1973) zeigen konnten.

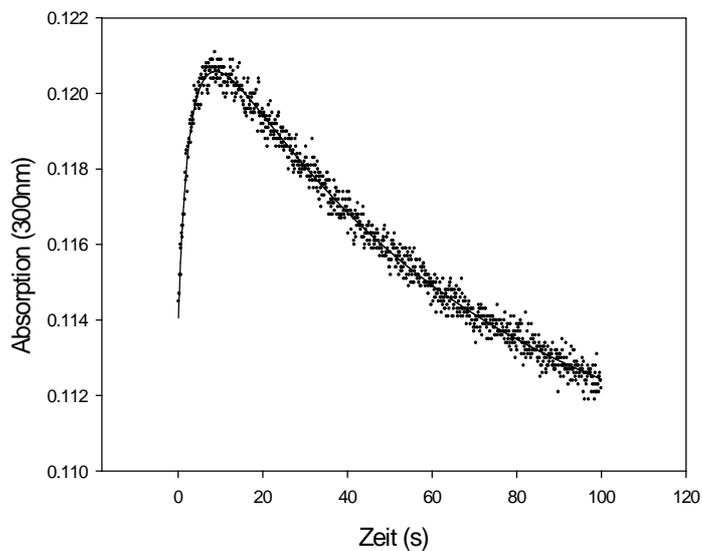


**Abb. 18:** Nah-UV CD-Spektren von Wildtyp-Transketolase mit den Donorsubstraten Xu-5-P und Fru-6-P. Die Spektren wurden in 50 mM Gly-Gly, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.6 bei 25 °C aufgenommen. Das Holoenzym (schwarze Linie) wurde mit 1 mM Xu-5-P (blaue Linie) bzw. 1 mM Fru-6-P (rote Linie) inkubiert.

Nach Zugabe eines Akzeptorsubstrates ändert sich das CD-Signal in Richtung des Holo-Transketolase-Signals. Mit Hilfe von Absorptionsmessungen lässt sich die Reaktion von HPA mit Transketolase ebenfalls verfolgen (Abb. 19). Durch Nutzung dieser Methode konnten Kinetiken für die Spaltung des Reaktionsintermediates DHETHDP und für die Reaktion mit den Akzeptorsubstraten GA, Gra-3-P und Rib-5-P aufgenommen und nach Schema 3 ausgewertet werden (Tab. 3). Für die Bindung des HPA ergibt sich in diesem Fall eine Geschwindigkeitskonstante von  $k_{on} = 42 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ .



*Schema 3: Schema für die Reaktion von Transketolase (TK) mit HPA. Enzymgebundenes DHETHDP (TK-DHETHDP) reagiert mit einem Akzeptorsubstrat (A) zu dem entsprechenden Spaltprodukt (Z) der zweiten Halbreaktion.*



*Abb. 19: Zeit-Umsatz-Kurve des äquimolaren Umsatzes von HPA durch WT-TK.*

*Diese stopped-flow Kinetik wurde bei 25 °C aufgenommen. Bedingungen: 50 mM Gly-Gly (pH 7.6), 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 60 μM ThDP, 6.7 μM TK, 6.7 μM HPA. Die Messwerte (schwarze Punkte) sind mit dem Programm DYNAFIT nach Schema 2 angepasst (schwarze Linie).*

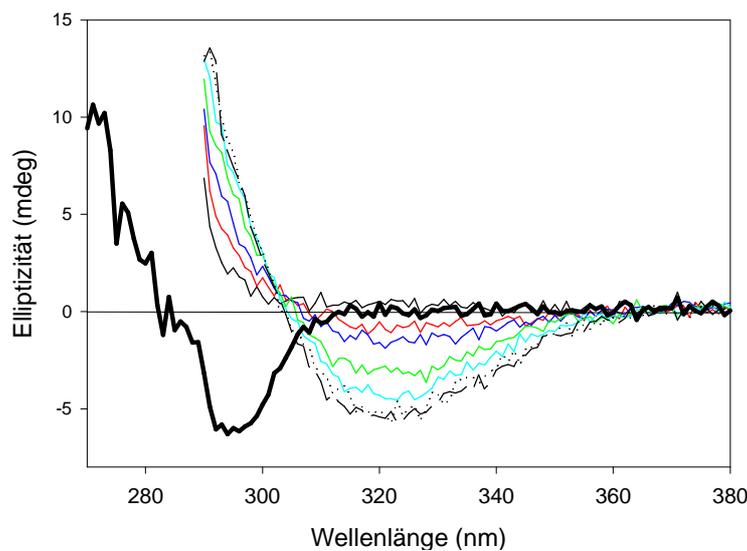
	$k_4$ (s <sup>-1</sup> )
<b>Ohne Akzeptor</b>	0.02
100 $\mu$ M GA	0.56
8.25 $\mu$ M Rib-5-P	1.04
8.25 $\mu$ M Gra-3-P	3.50

*Tab. 3: Geschwindigkeitskonstanten für die Reaktion des Komplexes aus WT-TK und HPA mit und ohne Akzeptorsubstrate. Bedingungen: 50 mM Gly-Gly, pH 7.6, 0.1 mM ThDP, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>; 8.25  $\mu$ M Holotransketolase wurden für 8 s mit 8.25  $\mu$ M HPA inkubiert und danach mit 100  $\mu$ M GA, 8.25  $\mu$ M Gra-3-P bzw. 8.25  $\mu$ M Rib-5-P versetzt. Die Reaktion wurde im sequential mode einer stopped-flow Maschine bei 300 nm und 25 °C verfolgt.*

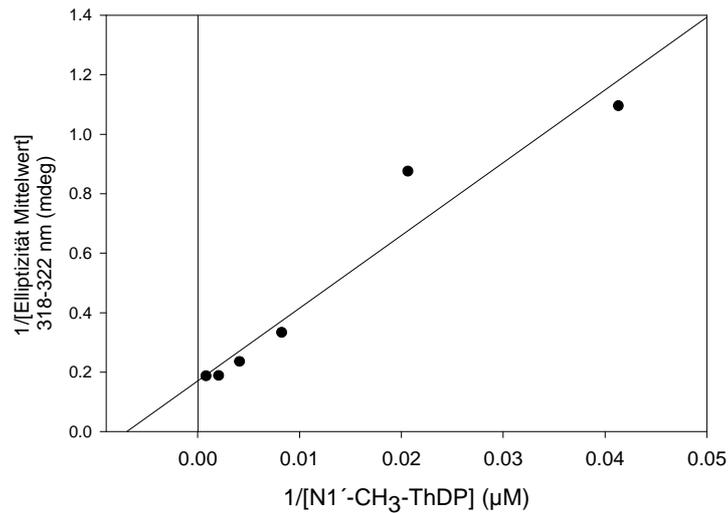
Von den untersuchten Substanzen ist Gra-3-P der beste Akzeptor für den Glycolrest, der nach Anlagerung von HPA an das Enzym entsteht.

### 3.7. Rekombination von Wildtyp-Transketolase und der Variante E418A mit N1'-CH<sub>3</sub>-ThDP

Das Kofaktorderivat N1'-CH<sub>3</sub>-ThDP wurde mit Apotransketolase (TK-WT und TK-E418A) rekombiniert und die Bindung mit Hilfe der CD-Spektroskopie verfolgt. Im Falle von TK-E418A ergab sich folgendes Bild: Die Bindung von N1'-CH<sub>3</sub>-ThDP spiegelt sich in einem negativen Extremum bei 320 nm wieder, wie es auch bei der Rekombination von WT-TK mit ThDP beobachtet wird. Dieses Extremum wurde für die Bestimmung des K<sub>D</sub>-Wertes herangezogen und ergab einen K<sub>D</sub> = 140.8 ± 28 μM (K<sub>D(ThDP)</sub> = 0.9 μM). Im Vergleich dazu ist das Extremum von TK-E418A mit dem nativen Kofaktor ThDP zu niedrigeren Wellenlängen verschoben, was bereits WIKNER *et al.* (1994) feststellten (Abb.20).



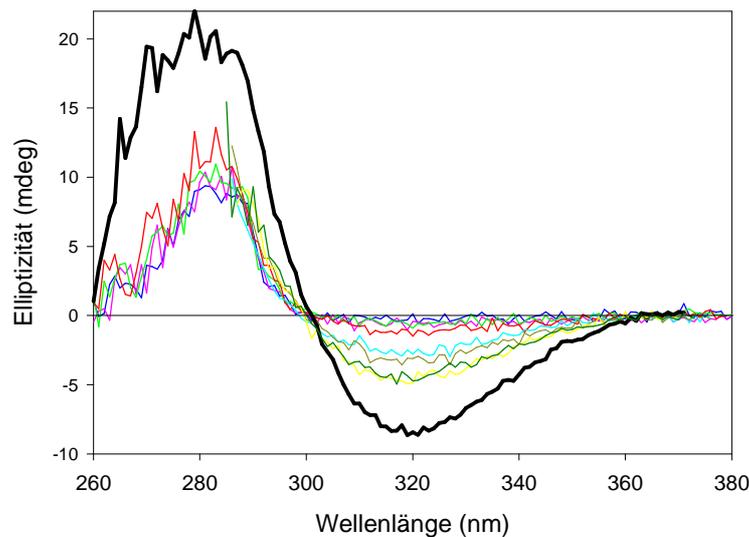
**Abb. 20:** Abhängigkeit des CD-Signals bei 320 nm von der Konzentration an N1'-CH<sub>3</sub>-ThDP bei der Rekombination von Apo-TK-E418A mit N1'-CH<sub>3</sub>-ThDP. Die eingesetzten Konzentrationen an N1'-CH<sub>3</sub>-ThDP waren: 0 μM (Apo-TK-E418A) (dünne, durchgezogene, schwarze Linie), 24 μM (rot), 48 μM (blau), 121 μM (grün), 24 μM (cyan), 484 μM (gepunktete, schwarze Linie) und 1200 μM (gestrichelte, schwarze Linie). Das Spektrum von TK-E418A mit 100 μM ThDP (fette, schwarze, durchgezogene Linie) ist ebenfalls dargestellt. Die Messungen wurden in 50 mM Gly-Gly, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.6, 13.17 μM TK-E418A bei 25 °C durchgeführt. Die Spektren wurden nach einer Inkubationszeit von 10 min pro Titrationschritt aufgenommen.



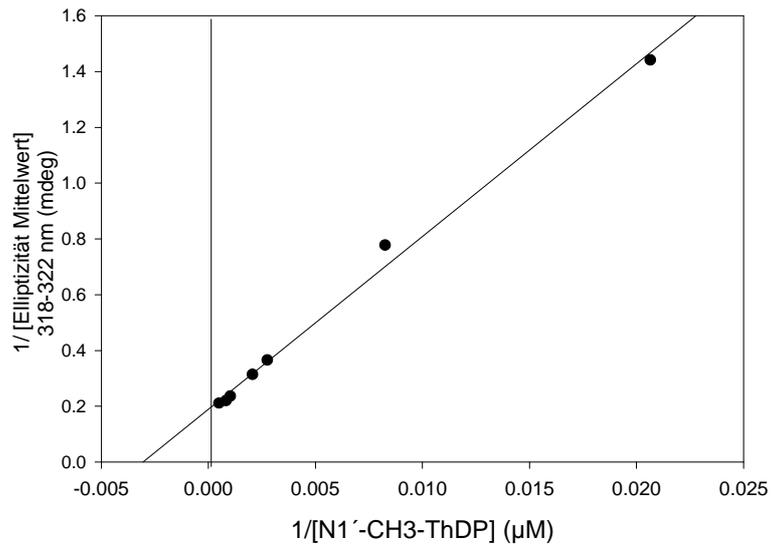
**Abb. 21:** Doppelt-reziproke Auftragung der Abhängigkeit des CD-Signals bei 320 nm von der  $N1'-CH_3-ThDP$ -Konzentration bei der Titration Apo-TK-E418A mit  $N1'-CH_3-ThDP$ . Als Messsignal diente der Mittelwert des negativen Extremums von 318–322 nm. Es konnte ein  $K_D$ -Wert von  $140 \pm 28 \mu M$  ermittelt werden.

Die essentielle Wechselwirkung des Glutamates 418 für die Aktivierung des Kofaktors ist bereits ausreichend diskutiert (Kern *et al.*, 1997). Interessant ist aber der Fakt, dass nach Rekombination von der Variante E418A mit  $N1'-CH_3-ThDP$  ein Spektrum detektiert wird, wie man es beim Holoenzym des Wildtyps beobachtet. So ist nicht nur das Extremum bei 320 nm wiederhergestellt, sondern dies geschieht auch mit der gleichen Intensität wie beim nativen Kofaktor ThDP im Wildtyp. Die elektronischen Eigenschaften am Aminopyrimidinring müssen demzufolge ähnlich denen beim Wildtyp-ThDP-Komplex sein, was auf eine korrekte Bindung des ThDP-Derivates im aktiven Zentrum hinweist. Unterstützt wird diese Aussage durch die katalytischen Aktivitäten der Komplexe hinsichtlich der physiologischen Substrate Xu-5-P und Rib-5-P. Hier erlangt der TK-E418A- $N1'-CH_3-ThDP$ -Komplex mit 3.3 % Aktivität eine 33-fach höhere Aktivität als der TK-E418A-ThDP-Komplex, der eine Aktivität von 0.1 % bezogen auf das Wildtypenzym besitzt. Da der heute allgemein akzeptierte Aktivierungsmechanismus des Kofaktors ThDP in Enzymen (Kern *et al.*, 1997) mit einer Protonierung des  $N1'$ -Atoms durch das konservierte Glutamat beginnt und somit eine positive Ladung im Aminopyrimidinring induziert wird, liegt mit dem Kofaktorderivat  $N1'-CH_3-ThDP$  eine „quasi aktivierte“ Form des Kofaktors vor. Die daraus resultierende 4'-iminotautomere Form des Aminopyrimidinringes könnte laut Kovina *et al.* (2002) die Ursache für die beobachteten charakteristischen optischen Eigenschaften des Holoenzym sein. Ferner konnte die Geschwindigkeitskonstante der C2-H Dissoziation des

enzymgebundenen  $N1'$ - $CH_3$ -ThDP mit der etablierten H/D-Austausch Methode (Kern *et al.*, 1997) nicht bestimmt werden, da der ermittelte  $K_D$ -Wert zu hoch für diese Untersuchung ist. Bei der Rekombination von Wildtyp-Transketolase mit  $N1'$ - $CH_3$ -ThDP ergab sich ein ähnliches Spektrum, wie man es auch beim nativen Kofaktor beobachtet. Das Extremum bei 320 nm blieb erhalten, wenn auch mit nur etwa der halben Intensität des Signals von ThDP, was auf eine gestörte Bindung in den aktiven Zentren hinweisen könnte.



**Abb. 22:** Abhängigkeit des CD-Signals bei 320 nm von der Konzentration an  $N1'$ - $CH_3$ -ThDP bei der Rekombination von Apo-WT-TK mit  $N1'$ - $CH_3$ -ThDP. Die eingesetzten Konzentrationen an  $N1'$ - $CH_3$ -ThDP waren: 0  $\mu M$  (Apo-WT-TK) (blau), 24  $\mu M$  (pink), 48  $\mu M$  (hellgrün), 121  $\mu M$  (rot), 363  $\mu M$  (hellblau), 484  $\mu M$  (dunkelgelb), 1200  $\mu M$  (dunkelgrün) und 2000  $\mu M$  (gelb). Das Spektrum von WT-TK mit 100  $\mu M$  ThDP (fette, schwarze, durchgezogene Linie) ist ebenfalls dargestellt. Die Messungen wurden in 50 mM Gly-Gly, 2.5 mM  $CaCl_2$ , pH 7.6, 13.17  $\mu M$  WT-TK bei 25 °C durchgeführt. Die Spektren wurden nach einer Inkubationszeit von 10 min pro Titrationsschritt aufgenommen.



**Abb. 23:** Doppelt-reziproke Auftragung der Abhängigkeit des CD-Signals bei 320 nm von der N1'-CH<sub>3</sub>-ThDP-Konzentration bei der Titration Apo-WT-TK mit N1'-CH<sub>3</sub>-ThDP. Als Messsignal diente der Mittelwert des negativen Extremums von 318–322 nm. Es konnte ein  $K_D$ -Wert von  $327 \pm 30 \mu\text{M}$  ermittelt werden.

Kristallographische Untersuchungen zur Charakterisierung der Bindung von N1'-CH<sub>3</sub>-ThDP im aktiven Zentrum von Transketolase werden im Kapitel 5.1. beschrieben.

## 4. Strukturelle Untersuchungen zur Donorsubstratbindung und Intermediatbildung an Transketolase aus *Saccharomyces cerevisiae*

### 4.1. Röntgenkleinwinkelstreuung an Transketolase

Die Methode der Röntgenkleinwinkelstreuung ist ein effektives Verfahren, um die Form (Quartärstruktur) und die molaren Massen von Proteinen zu untersuchen. Die damit gewonnenen *low-resolution* Strukturen besitzen den Vorteil, dass die Datenaufnahme unter nahezu physiologischen Bedingungen geschieht und die somit erhaltenen Modelle repräsentativ sind.

Transketolase	pH-Wert	Zusätze	Enzymkonz. (mg/ml)	Molmasse, bez. auf BSA (kDa)	Rg (nm)
WT	7.60	-	1.30	120	3.53
WT	7.61	-	2.40	149	3.49
WT	7.59	-	8.30	152	3.34
WT	7.58	-	12.20	146	3.32
WT	7.58	-	16.00	139	3.28
WT	7.59	-	19.10	158	3.23
WT	7.30	7.5 mM ThDP	2.45	140	3.26
H481A	8.50	7.5 mM ThDP	3.90	162	3.32
H481A	8.50	-	3.90	168	3.58
E418A	8.50	7.5 mM ThDP	4.40	149	3.28
E418A	8.60	-	4.55	136	3.20
H263A	7.40	-	5.70	118	3.29
H30A	7.40	-	15.8	155	3.93
H30N	7.40	-	8.30	115	3.06

*Tab. 4:* Aus den Streukurven gewonnene Daten für verschiedene Transketolasevarianten. Die Messbedingungen sind in „Material & Methoden“ beschrieben.

Es wurden im Rahmen der Arbeit mehrere Transketolasevarianten mit dieser Methode charakterisiert, um erstens den dimeren Aufbau der Enzyme in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration zu überprüfen und zweitens mögliche Änderungen der Quartärstruktur bei der Bindung von Liganden wie 3-Hydroxypyruvat, D-Fructose-6-phosphat, D-Xylulose-5-phosphat sowie des chemisch hergestellten Reaktionsintermediates DL-DHETThDP zu beobachten. Die Ergebnisse zur Dimerstruktur der Komplexe sind in den Tabellen 4 und 5 zusammengefaßt.

Es zeigte sich, dass die Transketolasespezies unter den gewählten Bedingungen ausschließlich als Dimer vorlagen. Den dimeren Charakter des Enzyms in seiner Apo- und Holoform bei Proteinkonzentrationen von größer als 0.3 mg / ml konnten KÖNIG und KOCH erstmalig 1995 durch die Methode der Röntgenkleinwinkelstreuung nachweisen. Die hier ermittelten Molmassen im Bereich von 136–168 kDa in An- und Abwesenheit von ThDP sind dem aus der Aminosäuresequenz berechneten Wert (148 kDa) sehr ähnlich und bestätigen die bereits 1995 ermittelten Werte (König & Koch, 1995). Die berechneten Werte für die Gyrationradien bewegen sich im Bereich von 3.26–3.38 nm, was auf eine praktisch identische Größe der Dimere hinweist. Auch bei der Erhöhung der Proteinkonzentration auf 19 mg / ml bleibt der dimere Charakter des Enzyms erhalten. Ausnahmen bilden die Proben von H30A und H30N, die teilweise dissoziiert bzw. aggregiert waren.

<b>Zusätze</b>	<b>Enzymkonz. mg/ml</b>	<b>Molmasse (kDa)</b>	<b>Rg (nm)</b>
-	3.75	92	3.28
1 mM DL-DHETThDP	4.90	137	3.31
4 mM HPA	3.70	152	3.38
1 mM Fru-6-P	5.20	101	3.26
1 mM Xu-5-P	7.40	109	3.27

*Tab. 5: Ermittelte Daten für die Molmasse und den Gyrationradius (Rg) aus den Streukurven von WT-TK mit verschiedenen Liganden. Der pH-Wert lag im Bereich von 7.4–7.5. Die Daten wurden mit den Programmen GNOM erhalten. Die Messbedingungen sind in „Material & Methoden“ beschrieben.*

Für die Komplexe aus Transketolase und ausgewählten Donorsubstraten ergab sich das in Tabelle 6 dargestellte Bild. Die zu den unterschiedlichen Transketolase-Ligand-Komplexen entsprechenden Abstandsverteilungsfunktionen sind in Abbildung 25 gezeigt.

Zusätze	$\chi$ CRY SOL	$\chi$ MASSHA	Translation (Å)	Rotation (°)
-	1.484	1.509	3.0	2.0
1 mM DL-DHETHDP	4.181	3.065	3.5	12.0
4 mM HPA	1.329	1.088	5.5	8.1
1 mM Fru-6-P	1.530	1.381	3.0	11.3
1 mM Xu-5-P	1.643	1.527	4.0	12.0

*Tab. 6: Vergleich von Lösungs- und Kristallstruktur von Transketolase auf der Grundlage der berechneten Streukurven des Kristalls (CRY SOL) und der experimentellen Streukurven der entsprechenden Transketolase-Komplexe nach der Anpassung mit Hilfe des Programms MASSHA.*

Auf der Grundlage der Kristallstruktur nativer Transketolase (Datenbankeintrag 1TRK) und der daraus berechneten Streukurve (Programm CRY SOL) sowie der experimentell gemessenen Streukurven verschiedener Enzym-Ligand-Komplexe ist es möglich, mit der Methode des *rigid body refinements* und dem *simulated annealing* (Programm MASSHA) Lösungsstruktur-Modelle zu berechnen. Aus dem Vergleich der Lösungs- und Kristallstrukturmodelle lassen sich eventuelle ligandinduzierte Konformationsänderungen erkennen und durch Translation und Rotation des einen Monomers im Verhältnis zum anderen quantitativ erfassen (Tabelle 6). Die Ergebnisse einer solchen Berechnung sind am Beispiel eines Transketolase-Komplexes in Abbildung 24 dargestellt.

Grundsätzlich kann man allen mit der Röntgenkleinwinkelstreuung charakterisierten Transketolasevarianten eine „aufgelockerte“ Struktur und höhere Flexibilität im Vergleich zu den durch Proteinkristallographie zugänglichen Strukturen zusprechen. Diese Aussagen

konnten Svergun *et al.* (2000) auch auf andere ThDP-abhängige Enzyme übertragen. Im Kristall herrschen durch die strenge Ordnung des Kristallgitters zusätzliche intermolekulare Kontakte, die zu kompakteren Molekülen führen. Weiterhin muss man die unterschiedliche Temperatur während der Datenaufnahme berücksichtigen, die von 105 K (Kristallographie) bis zu 278 K (SAXS) reicht.

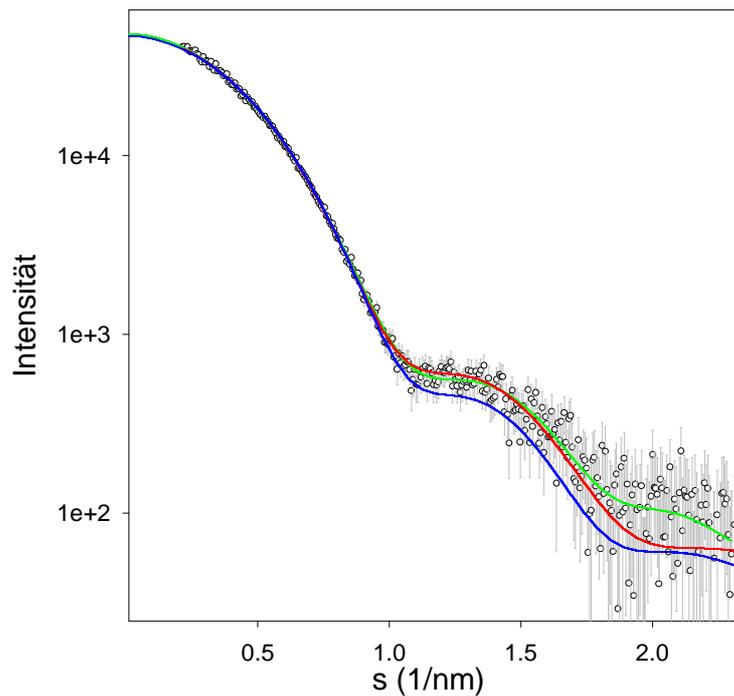
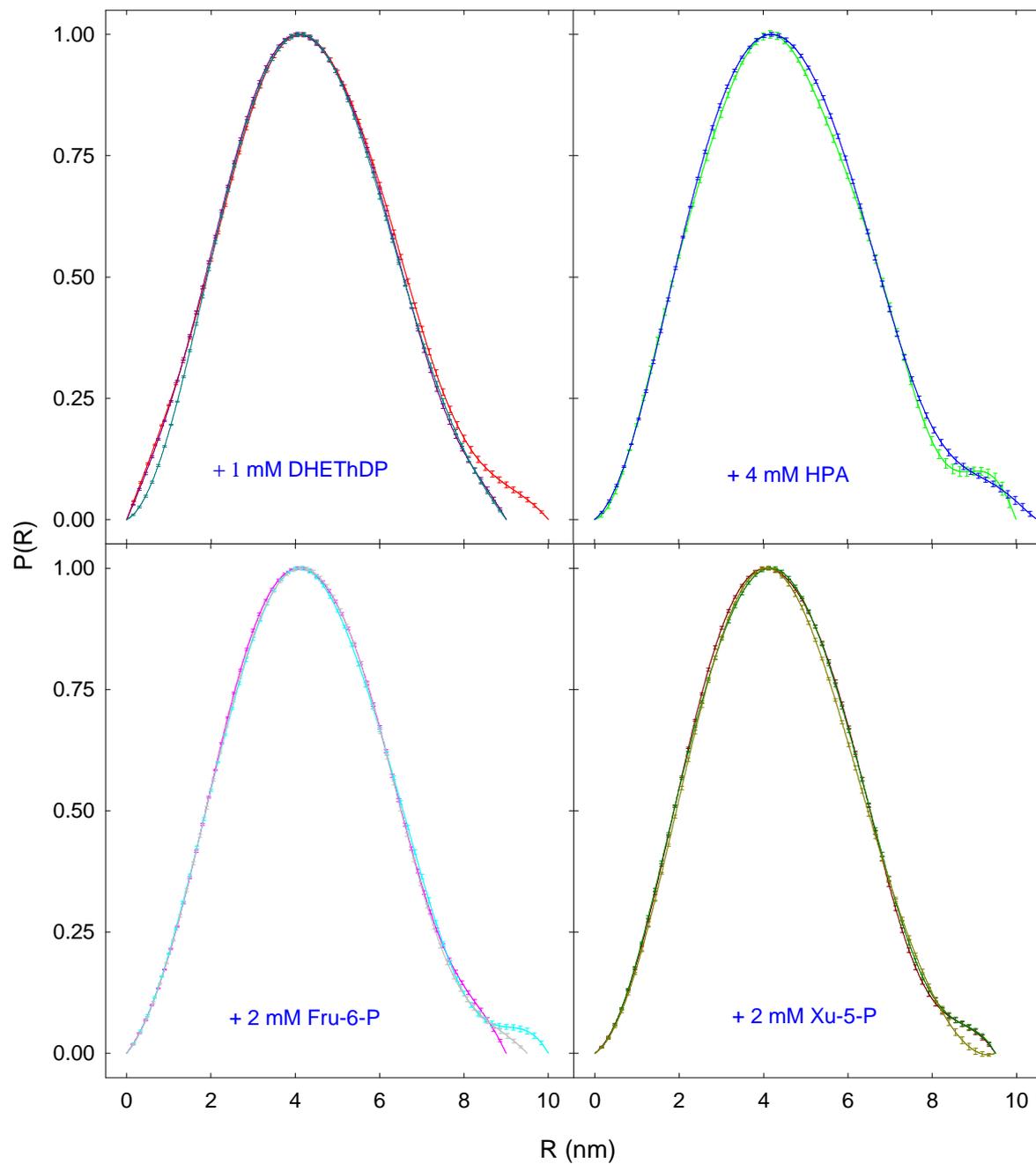
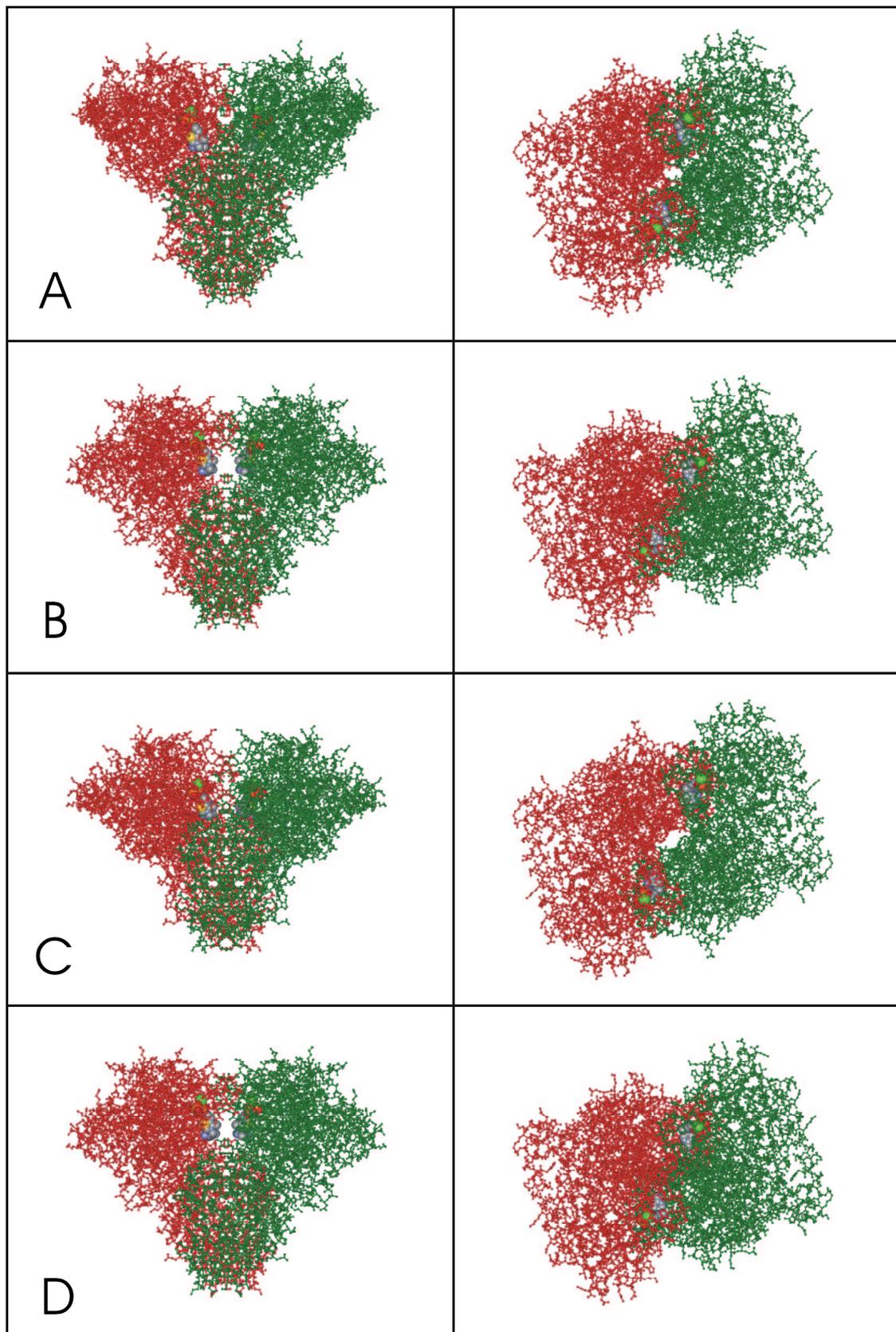


Abb. 24: Streukurven für den Komplex aus Holo-WT-TK und 4 mM HPA.

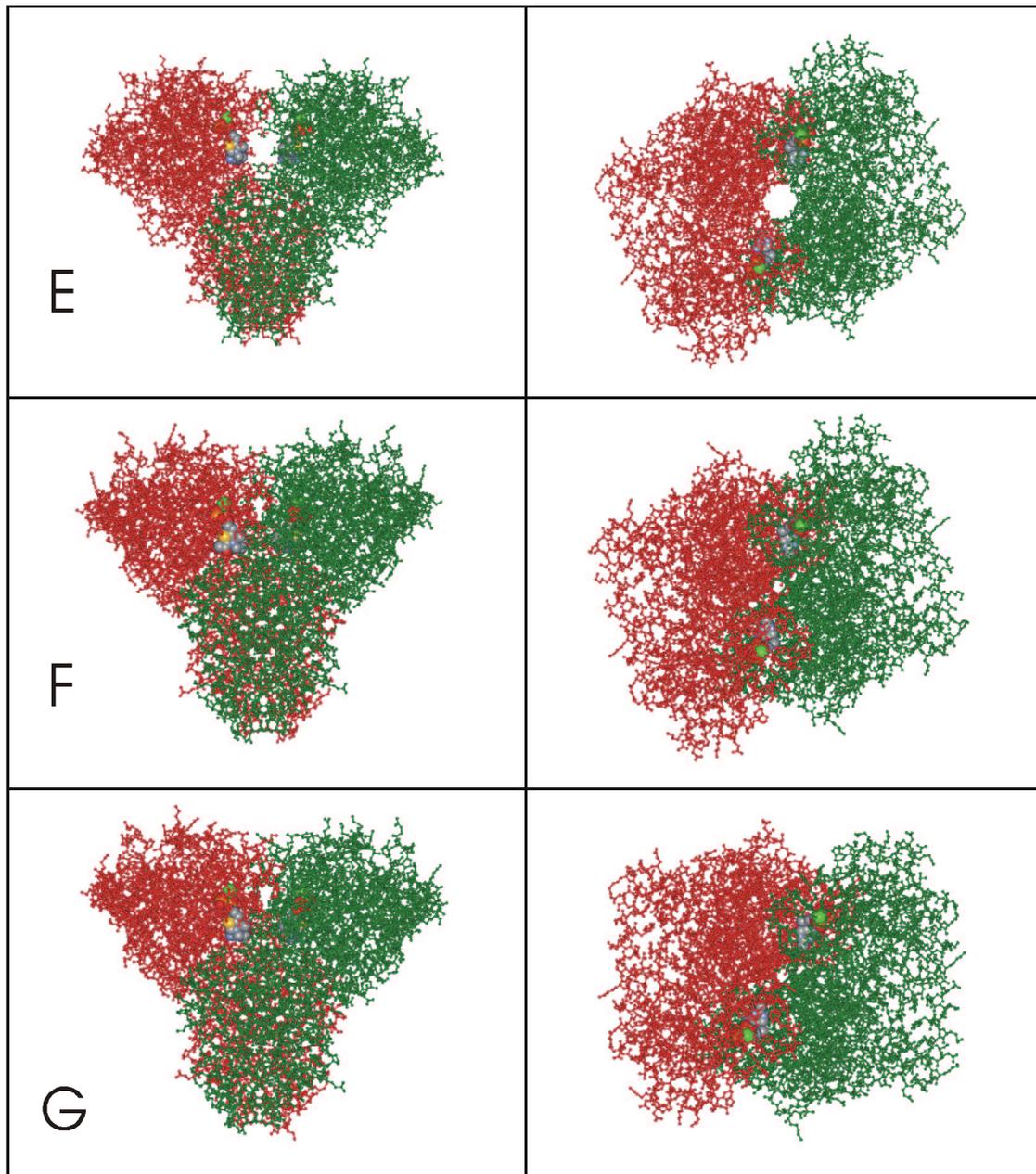
Die experimentellen Streudaten (o) wurden mit dem Programm GNOMOKO angepasst (grün). Unterlegt ist die mit dem Programm CRY SOL berechnete theoretische Streukurve der Kristallstruktur (blau) und die mit dem Programm MASSHA berechnete Anpassung (rot) an die experimentellen Daten. Die Messbedingungen sind in „Material & Methoden“ beschrieben.



**Abb. 25:** *Abstandsverteilungsfunktion  $P(R)$  für die Komplexe von Transketolase mit unterschiedlichen Donorsubstraten und DL-DHETHDP. Die Abstandsverteilungsfunktionen wurden aus den gemessenen Streukurven erhalten. Die Messbedingungen sind in „Material & Methoden“ beschrieben.*



*Abb. 26: Modelle der aus den SAXS-Messungen errechneten Strukturen für verschiedene Komplexe. **A** (Apo-WT-TK), **B** (Apo-WT-TK + 1 mM DL-DHETHDP), **C** (Holo-WT-TK + 2 mM Xu-5-P) und **D** (Holo-WT-TK + 2 mM Fru-6-P). Links: Seitenansicht. Rechts: Draufsicht.*



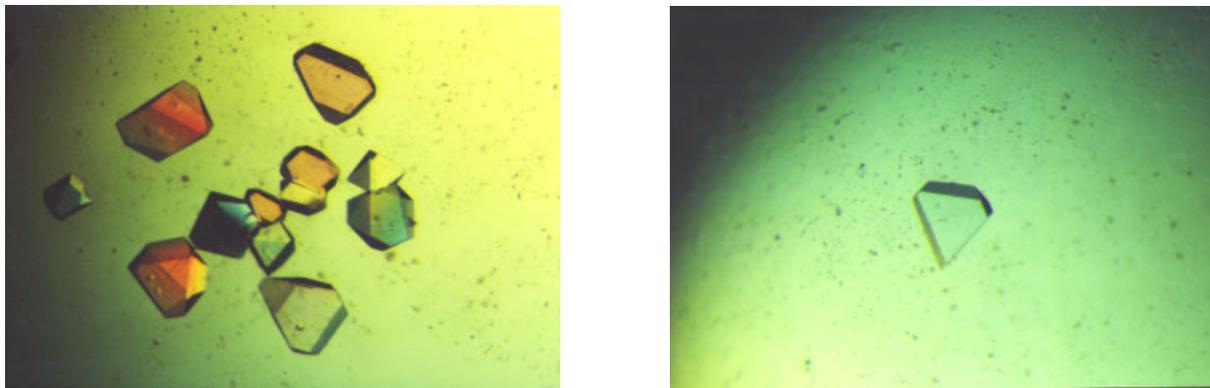
*Abb. 27: Vergleich der durch SAXS und Proteinkristallographie gewonnenen Strukturen am Beispiel der Komplexe aus WT-TK mit und ohne HPA. E (Holo-WT-TK + 4 mM HPA (SAXS)), F (Holo-WT-TK + 40 mM HPA (Proteinkristallographie, Datenbankeintrag 1GPU)) und G (Holo-WT-TK (Proteinkristallographie, Datenbankeintrag 1TRK)). Links: Seitenansicht. Rechts: Draufsicht.*

Die ermittelten Werte für die Translation der Dimere unterscheiden sich kaum von nicht ligandierter Transketolase. Die berechneten Rotationswerte sind in allen Komplexen aus Transketolase und den gewählten Liganden im Bereich von 8.1–12.0 ° zu finden. Die Bindung von Donorsubstraten und DL-DHETHDP führt also zu kleineren, aber signifikanten

Änderungen der Lage der Dimere zueinander. Diese erste Charakterisierung von Transketolase-Komplexen in Lösung kann nicht die Proteinkristallographie ersetzen, wenn es um die Detektion von intramolekularen Wechselwirkungen im Enzym geht. Die erhaltenen *low-resolution* Strukturen können aber die Quartärstruktur von Transketolase unter nahezu physiologischen Bedingungen beschreiben.

#### 4.2. Kristallisation von Transketolase und die Etablierung einer Schockfriertechnik für Transketolasekristalle

Das Wildtypenzym konnte in seiner Apo- und Holoform erfolgreich mit Hilfe der Gasphasendiffusion im hängenden Tropfen kristallisiert werden. Hierzu konnte auf die Erfahrungen der Gruppe um Prof. Schneider und Prof. Lindqvist vom Karolinska Institut in Stockholm zurückgegriffen werden (Schneider *et al.*, 1989). Die erhaltenen Kristalle waren von guter Qualität, stabil und in ausreichenden Mengen herstellbar. Einen Eindruck von der typischen Form der Transketolasekristalle gibt Abb. 28.



*Abb. 28: Proteinkristalle des Transketolase-Wildtyps (Holoenzym). Die Kristalle wurden durch Gasphasendiffusion im hängenden Tropfen erhalten. Die Bedingungen richteten sich nach SCHNEIDER *et al.* (1989). Linkes Bild: Gruppe von Einzelkristallen verschiedener Größe. Rechtes Bild: Einzelkristall. Die größten Kristalle haben eine Ausdehnung von etwa  $0.5 \times 0.5 \times 0.2$  mm. Die Kristalle gehören zur orthorhombischen Raumgruppe  $P2_12_12_1$ .*

Ein bisher ungelöstes Problem war das Schockfrieren von Transketolasekristallen. Die gefrorenen Kristalle beugten die Röntgenstrahlen nur bis zu einer niedrigen Auflösung bei gleichzeitiger hoher Mosaizität (Schneider, persönliche Mitteilung; Nilsson, Doktorarbeit, 1997). Das erfolgreiche Schockfrieren von Transketolasekristallen war deshalb für die Haltbarkeit der Kristalle während des Transports und der Datensammlung von großer Bedeutung. Weiterhin bietet das Schockfrieren die Möglichkeit, die Bindung von Substraten und die Bildung des Reaktionsintermediates durch das sogenannte *soaking* zu initiieren und durch Schockfrieren die Reaktion abzustoppen. Man könnte dann die Struktur dieser

Augenblicksaufnahmen des Enzyms lösen und Einblicke in die strukturellen Hintergründe der Enzymkatalyse gewinnen. Dieses *soaking* von Proteinkristallen mit Substraten, Inhibitoren, Aktivatoren und Kofaktoren ist eine etablierte Methode, um die Struktur von solchen Komplexen zu lösen. Allerdings können große Änderungen der Proteinstruktur, die durch die Effektoren ausgelöst werden, zur Zerstörung der Kristallstruktur und somit zum Verlust des Kristalls führen.

Das Problem des Schockfrierens von Transketolasekristallen konnte gelöst werden, in dem man etwa 3–4 Wochen alte Kristalle vor dem Einbringen in den Stickstoffstrom (110 K) in einer Gefrierschutzlösung - bestehend aus 50 mM Gly-Gly, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM ThDP (nicht bei Apoenzymkristallen), 20 % (w/v) PEG 6000, 20 % Ethylenglykol, pH 7.9 für 10–15 s bei 4 °C inkubiert. Optional konnte der Gefrierschutzlösung das artifizielle Donorsubstrat HPA zugesetzt und die Inkubationszeit auf bis zu 6 h ausgedehnt werden.

#### 4.3. Die dreidimensionale Struktur von Apotransketolase

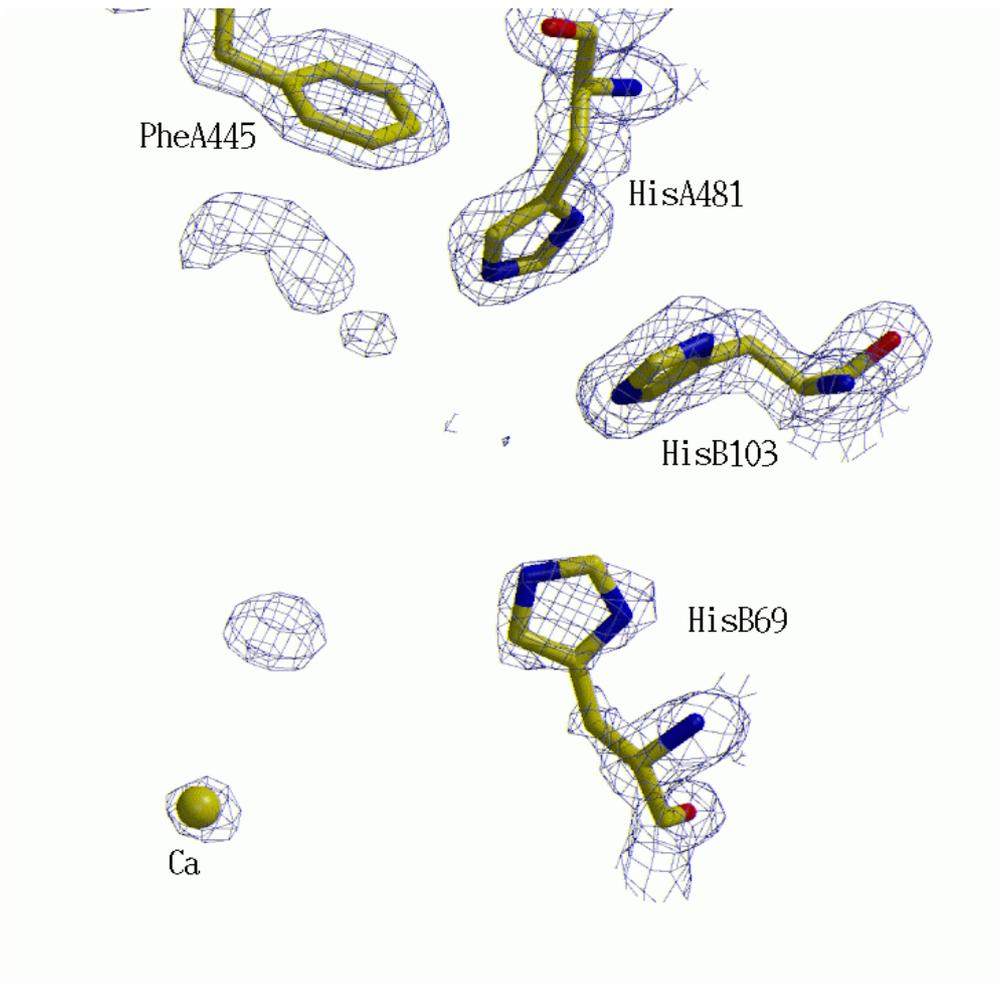
Die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur von Apotransketolase gelang SUNDSTRÖM *et al.* 1992 mit einer maximalen Auflösung von 2.8 Å. Im Unterschied zur Struktur des Holoenzym gab es neben dem Fehlen des Kofaktors einen weiteren Unterschied. Zwei *loop*-Regionen mit den Aminosäureresten 187–198 bzw. 383–393 waren nicht in der Kristallstruktur des Apoenzyms definiert. Da der *loop* mit den Aminosäureresten 187–198 eine Reihe von konservierten Seitenketten (Asn187, Ile189, Ile191 und Asp192) enthält, die Bindungen zum Metallion bzw. zum ThDP eingehen, kann man diesen *loop* als ein wichtiges strukturelles Merkmal der Kofaktorbindung ansehen. Dieser *loop* geht auch Wechselwirkungen zu der *loop*-Region 383–393 der anderen Untereinheit ein und ist so mitverantwortlich für die Stabilität der dimeren Struktur von Transketolase (Sundström *et al.*, 1992). In Abwesenheit des Kofaktors ThDP sind diese benannten Regionen sehr flexibel und erlauben es dem ThDP Zugang zum aktiven Zentrum zu bekommen. Die Wechselwirkung von Trp391 des einen *loops* mit Tyr370 der anderen *loop*-Region, die sich im Holoenzym in einer parallelen Anordnung zueinander befinden (Lindqvist *et al.*, 1992), wurde als eine mögliche Ursache der charakteristischen CD-Bande nach Bindung des Kofaktors ThDP angesehen. Experimente mit entsprechenden durch ortsgerichtete Mutagenese hergestellten Varianten konnten diese Hypothese aber widerlegen. (Meshalkina *et al.*, 1996).

Im Rahmen dieser Arbeit zu strukturellen Untersuchungen an verschiedenen Transketolasevarianten konnte die maximale Auflösung der Apoenzymstruktur auf 1.7 Å verbessert werden. Die Statistik der Datensammlung und der Verfeinerung ist in Tabelle 7 angegeben. Auch in dieser hochauflösenden Struktur sind die genannten *loops* nicht definiert, allerdings mit kleinen Unterschieden. In der hier vorgestellten Struktur sind die *loops* 189–199 und 383–394 nicht definiert und müssen als sehr flexibel angesehen werden. Dagegen sind sämtliche Reste im aktiven Zentrum gut definiert, wie Abb. 29 zeigt. Einzige Ausnahme ist Histidin 30, das eine erhöhte Mobilität aufweist (nicht gezeigt). Der Grund für die erhöhte Mobilität ist aus der Struktur des aktiven Zentrums nicht unmittelbar zu ersehen, da His30 keine direkte Wasserstoffbrückenbindung zum ThDP bilden kann.

Die hier mit verbesserter Auflösung vorgestellte dreidimensionale Struktur von Apotransketolase unterscheidet sich nicht von der bereits publizierten Struktur von SUNDSTRÖM *et al.* (1992), sie sollte lediglich den Vergleich von drei funktionellen Zuständen des Enzyms (Apoenzym, Holoenzym und Enzym-Intermediat-Komplex) erleichtern.

Parameter	Wert
Datensammlung	
Raumgruppe	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
Auflösung (Å)	1.7
Einheitszelle a, b, c, (Å)	73.53 113.0 159.74
Vollständigkeit (%)	98.1
Reflexe	
gemessene Reflexe	520380
Einzelreflexe	145355
I/σ	19.0
Verfeinerung	
R-Faktor (%)	22.31
R <sub>free</sub> (%)	23.86
Standardabweichung vom Idealwert	
Bindungslängen (Å)	0.00489
Bindungswinkel (°)	1.249

*Tab. 7: Statistik der Datensammlung und Verfeinerung der Struktur von Apotransketolase.*



*Abb. 29: Elektronendichtekarte ( $2F_o - F_c$ ) des aktiven Zentrums von Apotransketolase bei einer Auflösung von 1.7 Å. Das Konturniveau der Elektronendichte ( $2F_o - F_c$ ) entspricht  $1.2 \sigma$  (blau). Die Reste der einen Untereinheit sind mit „A“ bzw. die der anderen mit „B“ bezeichnet. Die Abbildung wurde mit dem Programm BOBSCRIPT (Esnouf, 1997) erstellt.*

#### **4.4. Die Struktur des Reaktionsintermediates DHETHDP im aktiven Zentrum von Transketolase**

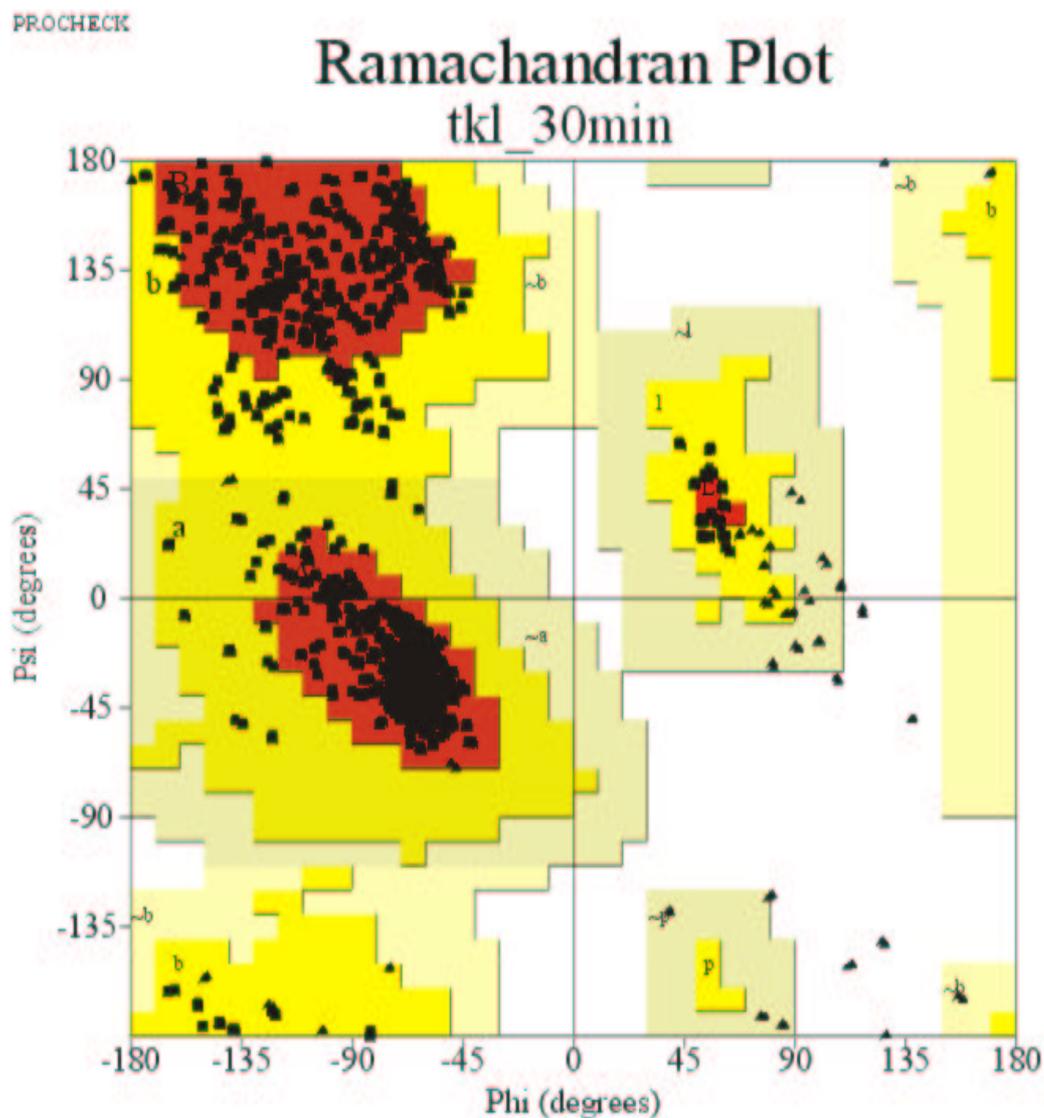
Nach Initiierung der Reaktion von Transketolase mit HPA durch Inkubation der Kristalle mit 40 mM HPA wurde die Reaktion nach 30 s, 30 min und 6 h durch Schockfrieren der Kristalle in einem Stickstoffstrom gestoppt. Die Kristalle waren im gefrorenen Zustand über die gesamte Dauer der Datensammlung stabil. Es konnten drei Datensätze gesammelt und ausgewertet werden.

Parameter	HPA-Inkubation					
	30 s		30 min		6 h	
Datensammlung						
Raumgruppe	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>		P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>		P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	
Auflösung (Å)	2.37		1.86		2.89	
Einheitszelle a, b, c (Å)	74.267,	113.170,	73.831,	113.120,	74.348	113.639
	159.408		159.173		159.747	
Vollständigkeit (%)	93.6		92.9		98.1	
Reflexe						
gemessene Reflexe	178260		333802		116724	
Einzelreflexe	51947		104364		30487	
I/σ	8.7		15.9		19.1	
Verfeinerung						
R-Faktor (%)	22.08		19.84		21.2	
R <sub>free</sub> (%)	25.69		22.60		25.6	
B-Faktor (Å <sup>2</sup> )	22.6		21.3		29.7	
Anzahl der Atome	10822		11330		10396	
Anzahl der Wasser- moleküle	370		854		416	
Standardabweichung vom Idealwert						
Bindungslängen (Å)	0.008		0.006		0.007	
Bindungswinkel (°)	1.42		1.28		1.28	
Reste (ohne Gly) in der bevorzugten Region des R. Plots (%)	87.9		88.0		85.2	
Reste in der erlaubten Region des R. Plots (%)	12.1		12.0		14.6	
Reste in der generell erlaubten Region des R. Plots (%)	0		0		0.2	

*Tab. 8: Statistik der Datensammlung und Verfeinerung für die zeitabhängige Inkubation von Wildtyp-Transketolase Kristallen mit HPA.*

Die maximale Auflösung der Datensätze betrug für die 30 s Inkubationszeit 2.37 Å, für 30 min 1.86 Å und für 6 h 2.89 Å.

Die Kristalle gehörten, ebenso wie die des Holoenzym (Schneider *et al.*, 1989; Lindqvist *et al.* 1992), zur orthorhombischen Raumgruppe  $P2_12_12_1$ . Einen Überblick über die Statistik der Datensammlung und Verfeinerung geben Tabelle 8 und der Ramachandran Plot in Abb. 30 wieder. Die resultierenden Strukturmodelle aller drei Komplexe sind sehr ähnlich. Der Datensatz nach Inkubation von 30 min soll aufgrund seiner höheren Auflösung Gegenstand der weiteren Erläuterungen sein.

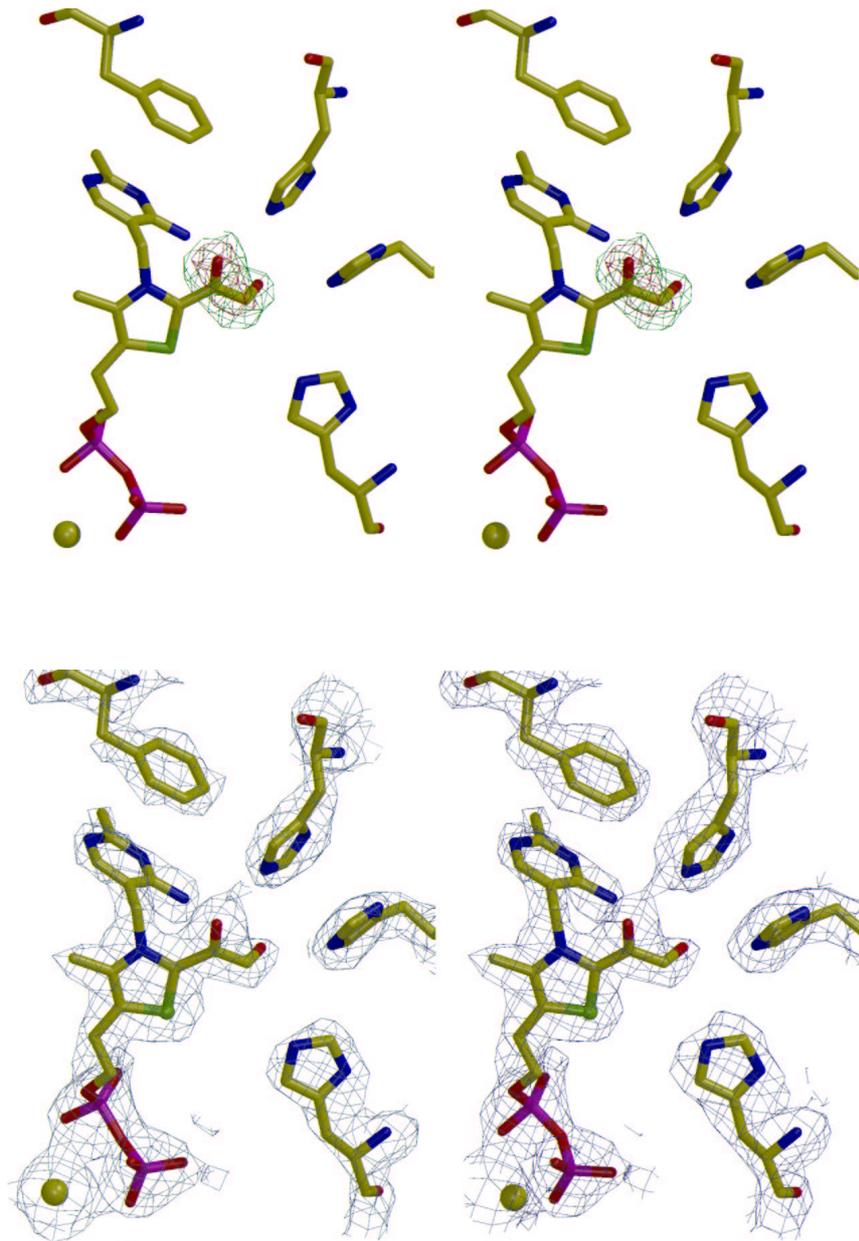


*Abb. 30:* Ramachandran Plot für das Dimer von Wildtyp-Transketolase im Komplex mit dem Reaktionsintermediat DHETHDP. Das Intermediat wurde durch Inkubation von Wildtyp-Transketolasekristallen mit 3-Hydroxypyruvat (40 mM) nach 30 min erhalten. Die Statistik des Plots ist in Tab. 8 zusammengefasst. Der Plot wurde mit dem Programm PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) erstellt.

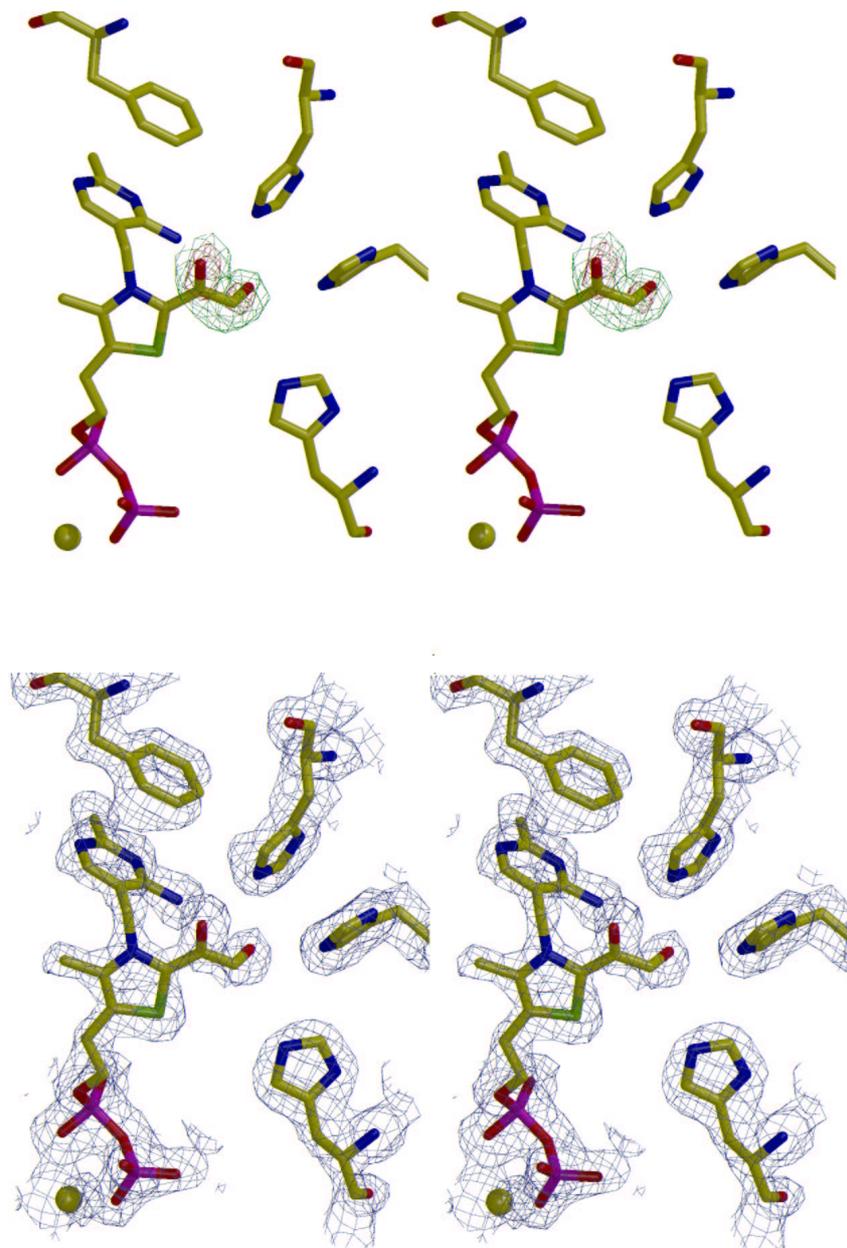
Basierend auf der Analyse der Aminosäuren 3–680 pro Monomer konnte eine sehr hohe Ähnlichkeit zwischen der Struktur des Holoenzym (Datenbankeintrag 1TRK) und des Transketolase-DHETHDP Komplexes gefunden werden.

Die Standardabweichung im Vergleich zum Holoenzym, bezogen auf 678 C $\alpha$ -Atome, betrug 0.3 Å und es konnten keine Abweichungen größer als 0.5 Å inklusive der Seitenketten detektiert werden. Das Reaktionsintermediat induziert also keine signifikanten Änderungen der Transketolasestruktur. Die erhaltene initiale Differenzelektronendichte ( $F_o - F_c$ ) zeigte deutlich eine stark positive Elektronendichte, die mit dem C2-Atom des Kofaktors ThDP verbunden ist (Abb. 31 und 32) und so auf ein kovalent gebundenes Intermediat in beiden aktiven Zentren hinweist. Es konnte ein Modell des planaren (Enaminstruktur) Dihydroxyethylrestes in die Dichte gelegt werden, was die erfolgreiche Detektion des DHETHDP im aktiven Zentrum von Transketolase beweist. Die B-Faktoren für die Atome des DHETHDP (22.8 Å<sup>2</sup>) waren denen des ThDP (19.9 Å<sup>2</sup>) in der Holoenzymstruktur sehr ähnlich.

Die Atome des Thiazoliumringes sowie das C $\alpha$ -Atom, das C $\beta$ -Atom und die C $\alpha$ -Hydroxylgruppe des Dihydroxyethylrestes befinden sich in einer Ebene. Diese planare Anordnung zeigt, dass das C $\alpha$ -Atom sp<sup>2</sup>-hybridisiert vorliegt. Versucht man das Modell mit einem sp<sup>3</sup>-hybridisiertem C $\alpha$ -Atom in die Elektronendichte zu fitten, erhöht sich der R-Faktor gering, aber signifikant, um 0.4 % und das Modell passt nicht mehr optimal in die Elektronendichte. Der Dihydroxyethylrest wird von einer Reihe von Wasserstoffbrücken fixiert. So bildet die  $\beta$ -Hydroxylgruppe des DHETHDP eine Wasserstoffbrücke zu dem konservierten Histidin 103 und zu einem Wassermolekül, welches wiederum vom Histidin 69 und den Hauptkettenatomen der Reste His69 und Gly116 fixiert wird. Aus kinetischen Daten, ortsspezifischer Mutagenese und strukturellen Untersuchungen, verbunden mit molekularer Modellierung konnte die Bedeutung von His103 bereits herausgearbeitet werden (Wikner *et al.*, 1995; Nilsson *et al.*, 1993). Die nun erhaltenen Strukturdaten vom DHETHDP unterstützen diese Befunde, welche His103 für die Erkennung und Bindung der C1-Hydroxylgruppe des Donorsubstrates und die Stabilisierung des Reaktionsintermediates DHETHDP verantwortlich machen.



**Abb. 31:** Stereobilder der Differenzelektronendichte  $F_o-F_c$  (oben) und der Elektronendichte  $2F_o-F_c$  (unten) mit dem Modell des  $\alpha$ -Carbanion/Enamin des DHETHDP im aktiven Zentrum von Transketolase für den Datensatz nach 30 s Inkubation mit HPA (max. Auflösung 2.37 Å). Das Konturniveau der Differenzelektronendichte ( $F_o-F_c$ ) entspricht 3.5  $\sigma$  (grün) bzw. 6.0  $\sigma$  (rot). Das Konturniveau der Elektronendichte ( $2F_o-F_c$ ) entspricht 1.0  $\sigma$  (blau). Die Abbildung wurde mit dem Programm BOBSCRIPT (Esnouf, 1997) erstellt.



**Abb. 32:** Stereobilder der Differenzelektronendichte  $F_o - F_c$  (oben) und der Elektronendichte  $2F_o - F_c$  (unten) mit dem Modell des  $\alpha$ -Carbanion/Enamin des DHETHDP im aktiven Zentrum von Transketolase für den Datensatz nach 30 min Inkubation mit HPA (max. Auflösung 1.86 Å). Das Konturniveau der Differenzelektronendichte ( $F_o - F_c$ ) entspricht 3.5  $\sigma$  (grün) bzw. 6.0  $\sigma$  (rot). Das Konturniveau der Elektronendichte ( $2F_o - F_c$ ) entspricht 1.0  $\sigma$  (blau). Die Abbildung wurde mit dem Programm BOBSCRIPT (Esnouf, 1997) erstellt.

Wie aus Abbildung 34 zu erkennen ist, bildet der Aminosäurerest His481 eine Wasserstoffbrücke zur C $\alpha$ -Hydroxylgruppe des DHETHDP und könnte somit eine Wasserstoffbrücke zur C2-Hydroxylgruppe des Donorsubstrates bilden. Ersetzt man dieses Histidin durch Glutamin, Serin oder Alanin, erhöht sich der  $K_M$ -Wert für das Donorsubstrat Xu-5-P während sich der  $K_M$ -Wert für das Akzeptorsubstrat Rib-5-P nicht verändert und die Änderungen der  $k_{cat}$ -Werte nicht dramatisch waren (Wikner *et al.*, 1997). In früheren Arbeiten wurde dieser Rest als möglicher Protonenakzeptor für die 4'-Aminogruppe des ThDP diskutiert, da er sich in einem geeignetem Abstand (2.9 Å) zu dieser Gruppe befindet (Wikner *et al.*, 1994). Messungen von Kern *et al.* (1997) zum Aktivierungsmechanismus des ThDP zeigten aber, dass das Histidin 481 nicht an der C2-Ylid Bildung beteiligt ist. Da das für das Intermediat DHETHDP charakteristische CD-Signal bei 320 nm in der H481A Variante nicht die Amplitude des Wildtyps erreicht (Meshalkina *et al.*, 1996) und der  $K_M$ -Wert für das Donorsubstrat Xu-5-P stark erhöht ist, kann man Histidin 481 somit für die Donorsubstratbindung und Intermediatstabilisierung verantwortlich machen.

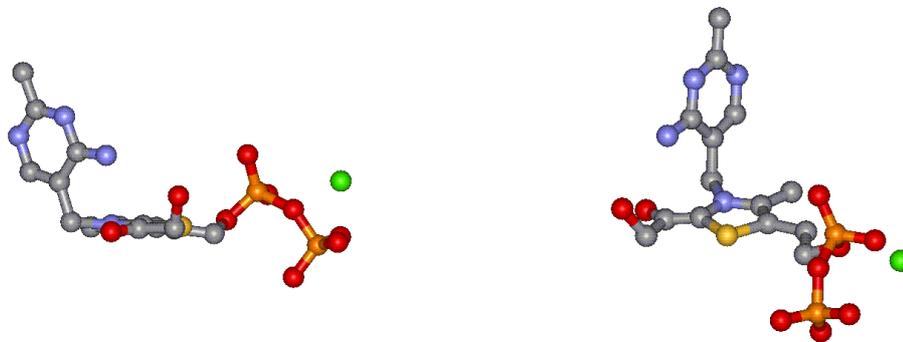
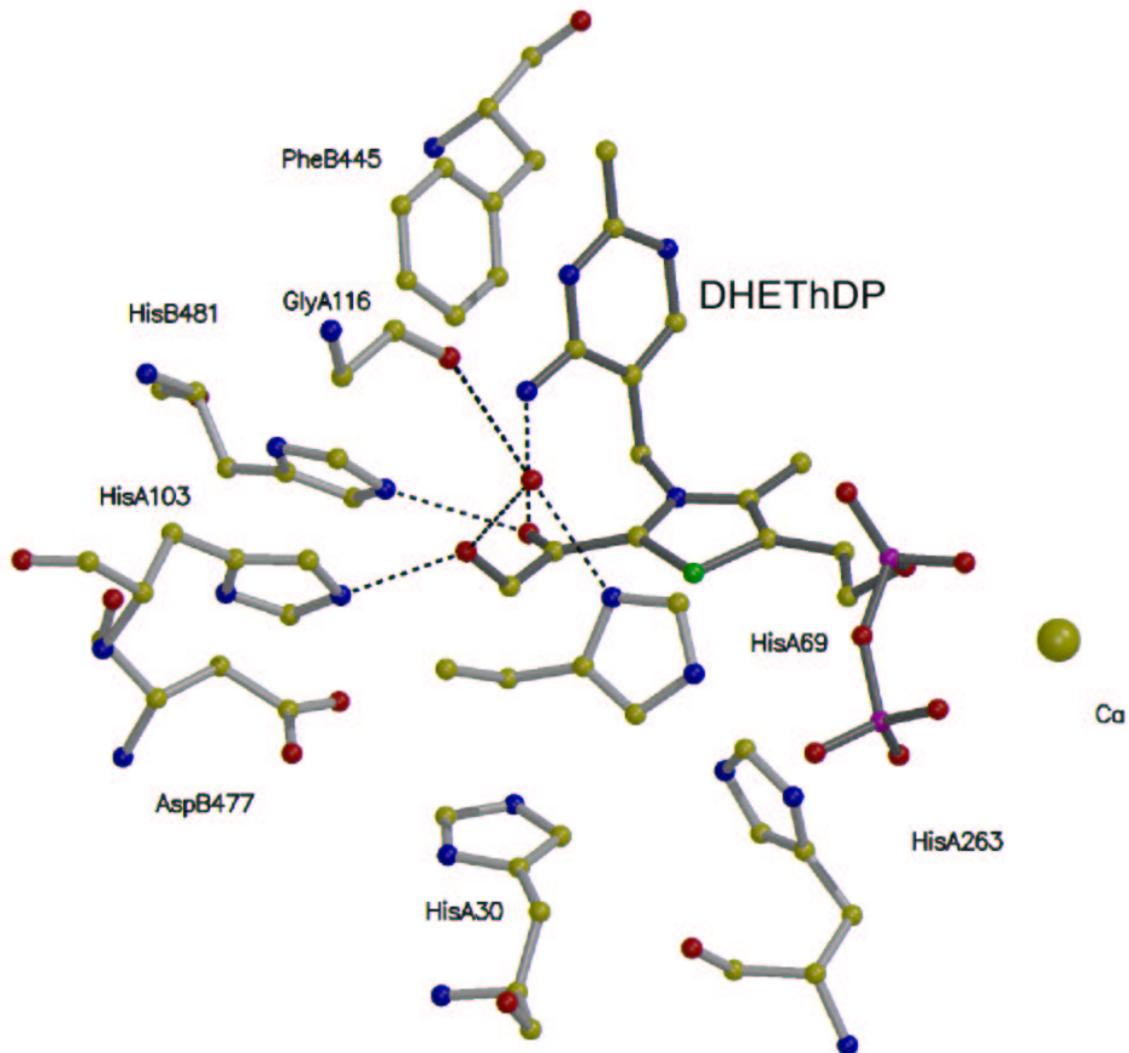


Abb. 33: Konformation des Reaktionsintermediates DHETHDP im aktiven Zentrum von Transketolase. Das DHETHDP ist so abgebildet, um die planare Struktur des Enamins von DHETHDP zu zeigen. Das Calciumion ist in grün dargestellt. Die Abbildung wurde mit dem Programm WEBLABVIEWER erstellt.

Die 4'-Aminogruppe des Kofaktors ist von essentieller Bedeutung während der Aktivierung des ThDP. Generiert man ein Kofaktorderivat, dem diese Aminogruppe fehlt, erhält man nach Kombination von ThDP-abhängigen Enzymen (PDC, PDH und TK) und diesem Desamino-ThDP inaktive Komplexe (Schellenberger, 1964; Golbik *et al.* 1991).

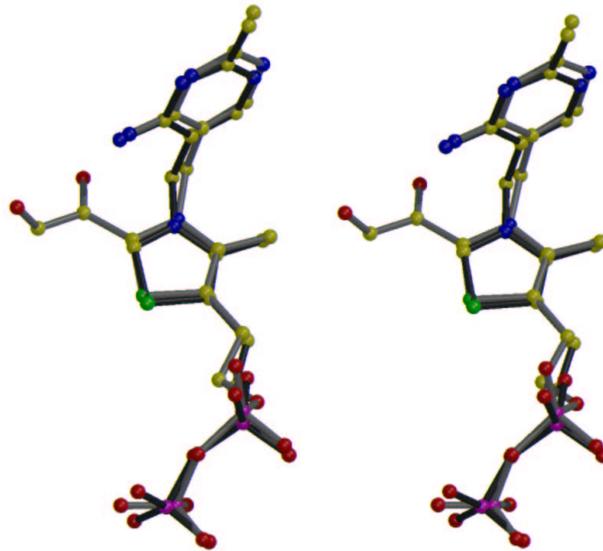
In der hier vorliegenden Struktur des DHETHDP im aktiven Zentrum von Transketolase befindet sich diese essentielle Gruppe in der Nähe der C $\alpha$ -Hydroxylgruppe des DHETHDP (2.95 Å). Der Winkel von 74° lässt aber keine Wasserstoffbrückenbindung zu. Wichtig bei dieser Betrachtung ist der Befund, dass hier das Intermediat DHETHDP in seiner planaren Enaminstruktur vorliegt und der C $\alpha$ -Kohlenstoff sp<sup>2</sup>-hybridisiert ist (Abb. 33). Am Beginn der Katalyse, wenn das C2-Ylid den Carbonylkohlenstoff des Donorsubstrates nukleophil angreift (vergl. Schema 2) ändert sich die Geometrie dieses Kohlenstoffatoms von sp<sup>2</sup> zu sp<sup>3</sup> und es entsteht ein ThDP-Donorsubstrat-Addukt. Unter diesen sterischen Verhältnissen ist es nun denkbar, dass die 4'-Aminogruppe eine Wasserstoffbrücke zur C $\alpha$ -Hydroxylgruppe ausbilden kann. Die über die Aktivierung weiterführende Rolle der 4'-NH<sub>2</sub>-Gruppe auch während der Katalyse wurde von SCHELLENBERGER bereits diskutiert (Schellenberger, 1991, 1998) und im Falle von Transketolase von SCHNEIDER und Mitarbeitern weiter verfolgt (Schneider *et al.*, 1993). Die hier erhaltenen strukturellen Daten untermauern die Bedeutung der 4'-NH<sub>2</sub>-Gruppe für den Katalysemechanismus von Transketolase. Einen Überblick über die wichtigsten Wechselwirkungen des DHETHDP im aktiven Zentrum von Transketolase gibt Abbildung 34. Die Struktur von Transketolase im Komplex mit dem Reaktionsintermediat DHETHDP wurde in der PDB-Datenbank mit dem Zugangscode 1GPU (Fiedler *et al.*, 2002) hinterlegt.



*Abb. 34: Das Reaktionsintermediat DHETHDP (dunkelgrau) im aktiven Zentrum von Wildtyp-Transketolase. Dargestellt sind ausgewählte Reste, die sich in einem Abstand von  $< 3.1 \text{ \AA}$  zum DHETHDP befinden. Die Wasserstoffbrücken sind mit gestrichelten Linien dargestellt und die Reste der einen Untereinheit sind mit „A“ bzw. die der anderen mit „B“ bezeichnet. Die Abbildung wurde mit dem Programm BOBSCRIPT (Esnouf, 1997) erstellt.*

Wie bereits am Anfang dieses Abschnittes erwähnt, konnten praktisch keine Veränderungen in der Proteinstruktur des DHETHDP-Transketolase-Komplexes im Vergleich zum Holoenzym detektiert werden. Die Analyse der Konformation von ThDP im Holoenzym und

von DHETHDP im aktiven Zentrum von WT-TK zeigt ebenfalls keine signifikanten Abweichungen (Abb. 35).



*Abb. 35:* Stereobild der Superposition von ThDP (grau) und DHETHDP (dunkelgrau). Die Koordinaten für ThDP wurden aus der Struktur der Holotransketolase (PDB-Zugangscode 1TRK) und die Koordinaten des DHETHDP aus dieser Arbeit (PDB-Zugangscode 1GPU) entnommen. Die Abbildung wurde mit dem Programm BOBSCRIPT (Esnouf, 1997) erstellt.

In der Literatur fanden sich immer wieder Hinweise auf eine mögliche strukturelle Änderung des Transketolasemoleküls bei der Bindung des Donorsubstrates oder im intermediären Zustand, sowie über die Kooperativität der beiden aktiven Zentren von Transketolase (Kovina *et al.*, 1997, 1998, 2000; Kochetov, 2001). Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zeigen zumindest für den Fall der irreversiblen Bindung des Donorsubstrates 3-Hydroxypyruvat ein anderes Bild. Beide aktive Zentren wiesen das Reaktionsintermediat DHETHDP in identischer Lage und Konformation auf und argumentieren damit gegen die publizierten Befunde.

## 5. Struktur der Komplexe von Transketolase mit N1'-CH<sub>3</sub>-ThDP und 4'-NHCH<sub>3</sub>-ThDP

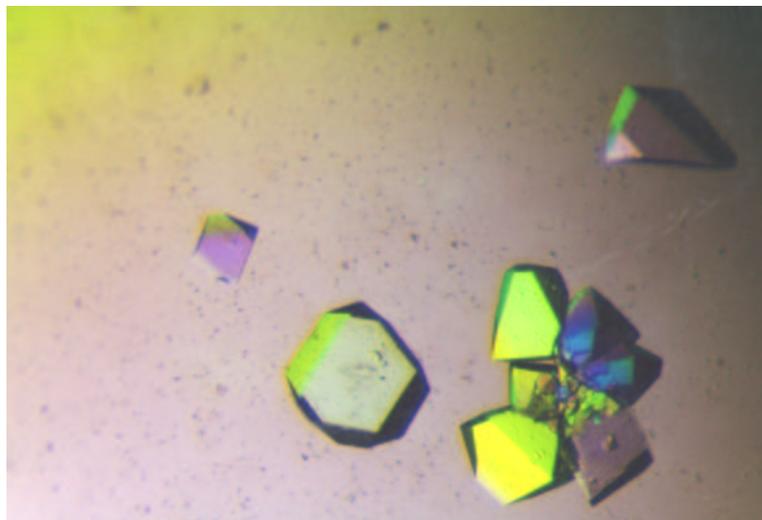
### 5.1. Struktur des WT-TK-N1'-CH<sub>3</sub>-ThDP- und des TK-E418A N1'-CH<sub>3</sub>-ThDP-Komplexes

Die Kristalle für beide Komplexe konnten unter den gleichen Bedingungen wie für das Holoenzym beschrieben (Schneider *et al.*, 1989) erhalten werden und waren isomorph den Kristallen der Holotransketolase (Raumgruppe P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>). Die Datenaufnahme erfolgte bei 277 K und die ermittelten Zelldimensionen der Komplexe waren wie folgt:

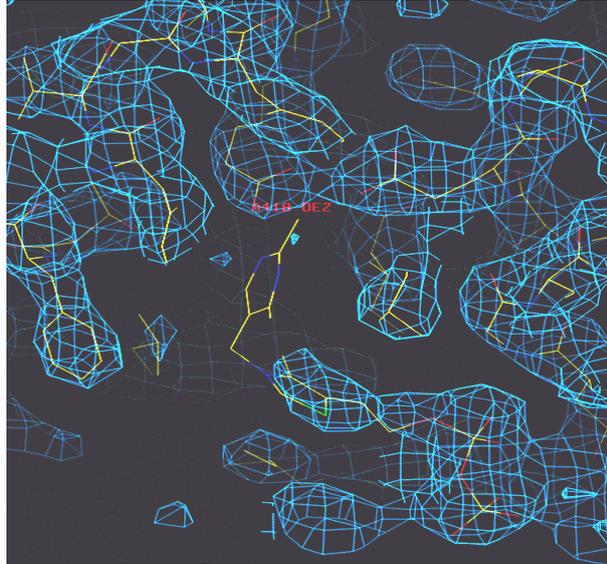
**WT-TK + N1'-CH<sub>3</sub>-ThDP** (a = 78.3 Å, b = 116.4 Å und c = 160.9 Å)

**TK-E418A + N1'-CH<sub>3</sub>-ThDP** (a = 78.4 Å, b = 117.2 Å und c = 160.7 Å)

Obwohl die gezüchteten Kristalle rein phänomenologisch identisch zu den Kristallen von Holotransketolase waren, konnte eine verminderte Stabilität der Kristalle gegenüber mechanischer und temperaturbedingter Beanspruchung (Schockfrieren) festgestellt werden.



*Abb. 36: Kristalle des Komplexes aus WT-TK und N1'-CH<sub>3</sub>-ThDP. Die Kristalle wurden durch Gasphasendiffusion im hängenden Tropfen erhalten. Bedingungen: 50 mM Gly-Gly (pH 7.9), 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 17 % (w/v) PEG 6000, 8 mg/ml WT-TK, 10 mM N1'-CH<sub>3</sub>-ThDP, 6 °C.*

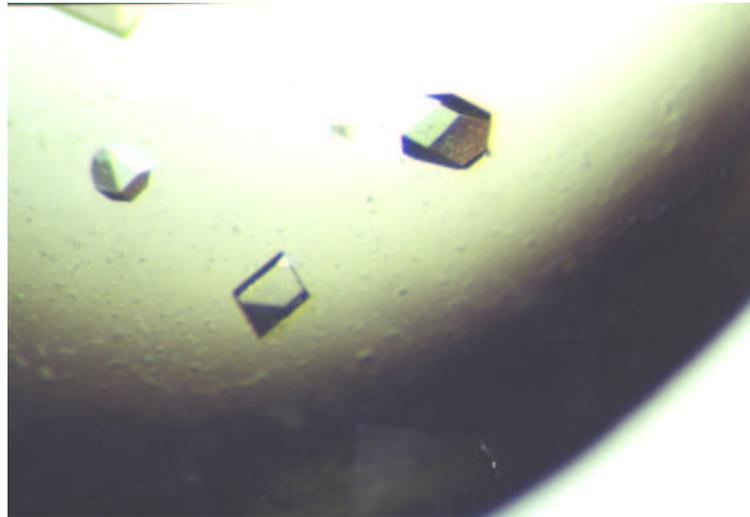


*Abb. 37: Ausschnitt aus dem aktiven Zentrum des WT-TK-N1'-CH<sub>3</sub>-ThDP Komplexes bei einer Auflösung von 2.89 Å. Das Konturniveau der 2F<sub>o</sub>-F<sub>c</sub>-Elektronendichtekarte (blau) entspricht 1.0 σ. Unterlegt ist das Modell von Holotransketolase nach NIKKOLA et al. (1994). Das Bild wurde mit dem Programm O (Jones et al., 1991) erstellt.*

Es konnten dennoch für jeden Komplex je ein Datensatz mit einer Auflösung von 2.89 Å gesammelt werden.

Die erste Sichtung der Elektronendichtekarte ergab für das aktive Zentrum folgendes Bild: Der Diphosphatrest und der Thiazoliumteil des N1'-CH<sub>3</sub>-ThDP sind gut definiert und sind deckungsgleich dem des ThDP in der Holotransketolasestruktur (Abb. 37). Für den Aminopyrimidinring ist hingegen keine Elektronendichte zu detektieren. Da die Stabilität des des N1'-CH<sub>3</sub>-ThDP gewährleistet ist, liegt der Schluss nahe, dass dieser Teil des Kofaktorderivates zu flexibel ist und deshalb nicht in der Elektronendichtekarte definiert ist. Da aber eine 11 % - ige Restaktivität gegenüber dem Holoenzym mit nativen Substraten besteht und das CD-Spektrum die charakteristische Bande bei 320 nm zeigt (siehe Abschnitt 3.7.), schließt eine hohe Flexibilität die Katalyse nicht aus. Dass die Bindung vom N1'-CH<sub>3</sub>-ThDP erschwert ist, beweist auch der in Kapitel 3.7. ermittelte K<sub>D</sub>-Wert von 327 μM (vgl. K<sub>D(ThDP)</sub> = 0.6 μM).

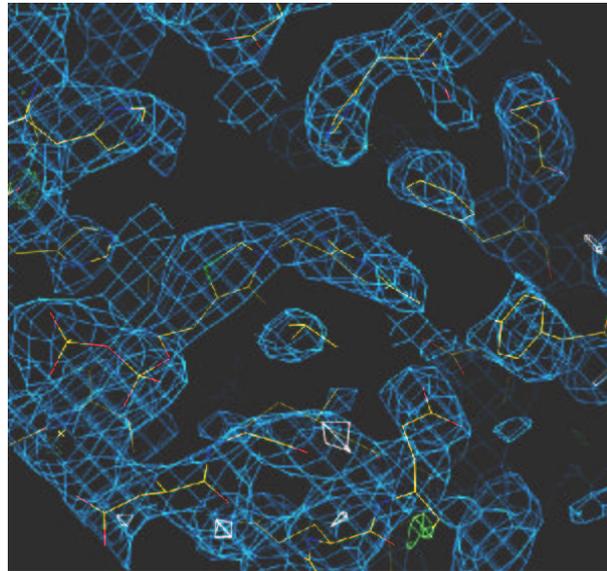
Im Falle des Komplexes aus der Transketolasevariante E418A und N1'-CH<sub>3</sub>-ThDP konnten ebenfalls gute Kristalle erhalten werden, die sich röntgenkristallographisch vermessen und auswerten ließen.



*Abb. 38: Kristalle des Komplexes aus der Variante E418A und N1'-CH<sub>3</sub>-ThDP. Die Kristalle wurden durch Gasphasendiffusion im hängenden Tropfen erhalten. Bedingungen: 50 mM Gly-gly (pH 7.9), 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 16 % (w/v) PEG 6000, 9 mg/ml TK-E418A, 10 mM N1'-CH<sub>3</sub>-ThDP, 6 °C.*

Die berechnete Elektronendichtekarte (Abb. 39) verdeutlicht eine vollständige Präsenz des Kofaktorderivates im aktiven Zentrum. Zwar kann man bei der erhaltenen Auflösung von 2.89 Å die genaue Position der zusätzlich angefügten Methylgruppe am N1'-Atom nicht detektieren, aber sicher ist, dass die Elektronendichte für den modifizierten Aminopyrimidinring im aktiven Zentrum definiert ist. Die Methylgruppe am N1'-Atom ist also in der Lage im durch die Mutation geschaffenen Raum zu binden. Es kommt zu keiner sterischen Hinderung, wie es bei dem Komplex aus WT-TK und N1'-CH<sub>3</sub>-ThDP der Fall ist. Auf Grund der in Abschnitt 3.7. beschriebenen Ergebnisse der CD-Spektroskopie und der hier erhaltenen proteinkristallographischen Daten kann von einer funktionell korrekten Bindung des Kofaktorderivates N1'-CH<sub>3</sub>-ThDP im aktiven Zentrum von TK-E418A ausgegangen werden. Die Erhöhung der Maximalgeschwindigkeit des TK-E418A-N1'-CH<sub>3</sub>-ThDP-Komplexes gegenüber dem TK-E418A-ThDP-Komplex hat seine Ursache demnach in der durch die Methylierung zusätzlich induzierten positiven Ladung des N1'-Atoms. Diese

Ergebnisse unterstützen den von Kern *et al.* (1997) vorgeschlagenen Mechanismus zur Kofaktoraktivierung bei ThDP-Enzymen.



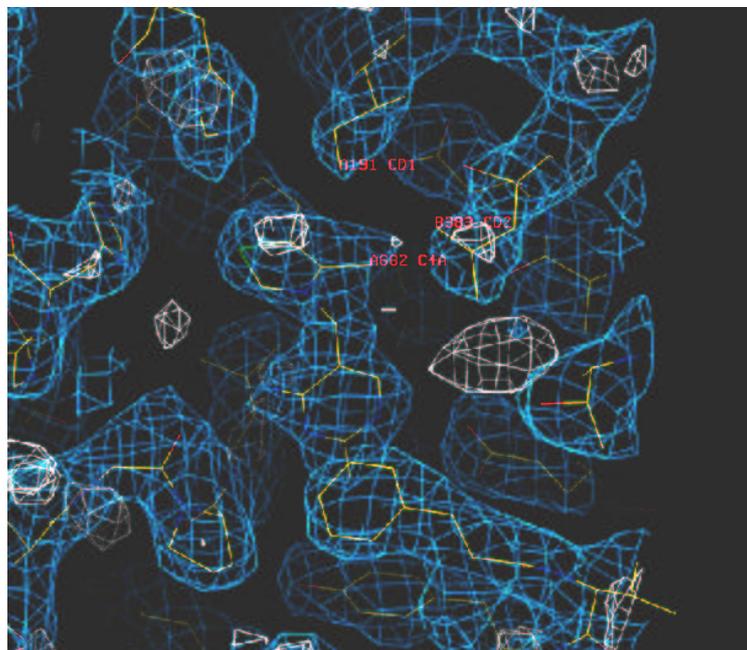
*Abb. 39: Ausschnitt aus dem aktiven Zentrum des TK-E418A – NI'-CH<sub>3</sub>-ThDP Komplexes bei einer Auflösung von 2.89 Å. Das Konturniveau der 2F<sub>o</sub>-F<sub>c</sub>-Elektronendichtekarte (blau) entspricht 1.0 σ. Unterlegt ist das Modell von Holotransketolase nach Nikkola *et al.* (1994). Das Bild wurde mit dem Programm O (Jones *et al.*, 1991) erstellt. Deutlich ist das vollständige Kofaktorderivat in der Mitte des Bildes zu erkennen.*

## 5.2. Struktur von Wildtyp-Transketolase mit 4'-NHCH<sub>3</sub>-ThDP

Die grundlegende Idee der Kokristallisation des Komplexes aus WT-TK und 4'-NHCH<sub>3</sub>-ThDP war der von Kern *et al.* (1997) vorgeschlagenen Aktivierungsmechanismus von ThDP, in dem die iminotautomere Form des Aminopyrimidinringes eine entscheidende Rolle bei der Bildung des C2-Carbanions spielt. Sollte diese iminotautomere Form in ausreichender Quantität im aktiven Zentrum von Transketolase populiert sein, könnte man mit Hilfe des 4'-NHCH<sub>3</sub>-ThDP und der aus der Kristallstruktur resultierenden Lage der Methylgruppe Rückschlüsse auf den Hybridisierungszustand ziehen. Weiterhin sollte durch die

Kristallstruktur der experimentelle Befund näher beleuchtet werden, warum dieses Kofaktorderivat mit WT-TK im nativen enzymatischen Testsystem nach KOCHETOV (1982) nur 1.4 % Aktivität des nativen Kofaktors besitzt, hingegen im artifiziellen Testsystem mit HPA und Ferricyanid 215 % der Aktivität des nativen Holoenzym erreicht (Usmanov *et al.*, 1985). Dass 4'-NHCH<sub>3</sub>-THDP im aktiven Zentrum von Transketolase bindet, konnte bereits mit Hilfe von CD-Spektroskopie nachgewiesen und ein K<sub>D</sub>-Wert von 14 μM bestimmt werden (Usmanov *et al.*, 1985). Es konnten Kristalle des Komplexes erhalten werden. Der Datensatz wurde einer ersten Sichtung und Auswertung unterzogen, die ermittelte Zelldimension war: a = 78.3 Å, b = 116.4 Å und c = 160.9 Å.

Es konnte die Elektronendichte für das Kofaktorderivat im aktiven Zentrum detektiert werden, aber die angefügte Methylgruppe an der 4'-Aminogruppe konnte nicht nachgewiesen werden. Es liegt nun der Schluss nahe, dass die 4'-Aminogruppe doch mehr den Charakter einer Aminogruppe als einer Iminogruppe besitzt und demzufolge, auf Grund der sp<sup>3</sup> Hybridisierung, frei drehbar um die C4'-NH<sub>2</sub>-Achse ist. Kritisch muss angemerkt werden, dass die erhaltene Auflösung von 2.89 Å relativ niedrig ist.



Die hier vorgestellten strukturellen Daten können die kinetischen Befunde nicht erklären. Es wäre klarzustellen, warum die langkettigen, physiologischen Substrate mit einer relativ geringen Geschwindigkeit umgesetzt werden und das artifizielle, kurzkettige Substrat HPA im Ferricyanidtest 215 % des nativen Enzyms erreicht. Die Aktivierung des Kofaktors ist durch die einfache Methylierung der 4'-Aminogruppe nicht gestört, die Geschwindigkeitskonstante der C2-H Dissoziation liegt bei  $57 \text{ s}^{-1}$  ( $5 \text{ }^\circ\text{C}$ ) und entspricht damit der des nativen Enzyms (Meshalkina *et al.*, unveröffentlicht). Anscheinend spielen bei folgenden Katalyseschritten sterische Faktoren eine entscheidende Rolle.

## 6. Zusammenfassung

Die Umsetzung des Donorsubstrates Xu-5-P konnte in Abwesenheit eines Akzeptorsubstrates bei Wildtyp-Transketolase und der Enzymvariante H263A untersucht werden. Die aus der Auswertung der kinetischen Messungen mit dem Programm DYNAFIT ermittelten Geschwindigkeitskonstanten lassen Aussagen über die Funktion des Histidins 263 bei der Katalyse zu. Die um den Faktor 14 größere Geschwindigkeit der Spaltung des Reaktionsintermediates DHETHDP bei H263A gegenüber dem Wildtypenzym spricht für eine Stabilisierung des  $\alpha$ -Carbanions des DHETHDP durch Histidin 263. Die fehlende Stabilisierung erklärt die geringe Aktivität der H263A Variante (0.5 %) bei unveränderten  $K_M$ -Werten.

Chemisch synthetisiertes DL-DHETHDP wird an Transketolase mit einem  $K_D$ -Wert von 4.3  $\mu\text{M}$  gebunden. Nach Bindung von DL-DHETHDP im aktiven Zentrum von WT-TK werden beide Enantiomere, allerdings mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten, gespalten. Kinetische Untersuchungen mit dem artifiziellen Donorsubstrat 3-Hydroxypyruvat zeigen, dass dies unter Decarboxylierung mit einer Geschwindigkeitskonstante von  $k_{on} = 42 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  zum  $\alpha$ -Carbanion des DHETHDP umgesetzt wird, wobei dieses Intermediat mit einer Reihe von Akzeptorsubstraten mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten reagiert.

Mit Hilfe der Röntgenkleinwinkelstreuung konnten erste Aussagen über die Oberflächenstruktur von Transketolase-Ligand-Komplexen gewonnen werden. Zum Einsatz kamen eine Reihe von Donorsubstraten und DL-DHETHDP. Das Enzym lag in allen Fällen als Dimer vor und hatte im Vergleich zur Kristallstruktur eine „aufgelockerte“ Struktur. Es konnten geringe Änderungen in der Position der Monomere zueinander detektiert werden, große Änderungen in den Formabschätzungen gab es jedoch nicht.

Es konnte die Struktur von Apo-Transketolase mit einer maximalen Auflösung von 1.7 Å aufgenommen werden. Diese Struktur unterscheidet sich nicht von der bereits publizierten Apoenzymstruktur (Sundström *et al.*, 1992), auch in diesem Fall waren zwei *loop*-Regionen auf Grund der hohen Flexibilität nicht definiert.

Durch den Einsatz der *soaking*-Technik und kinetischer Kryokristallographie gelang es erstmalig, das Reaktionsintermediat DHETHDP im aktiven Zentrum von Transketolase strukturell nachzuweisen. Diese Ergebnis stellt neben der Arbeit von Chabrière *et al.* (2001) das einzige durch Proteinkristallographie nachgewiesene Reaktionsintermediat eines ThDP-abhängigen Enzyms dar. Das DHETHDP konnte nach einer Inkubation von Holotransketolase-Kristallen mit HPA nach verschiedenen Zeiten im aktiven Zentrum und mit einer maximalen Auflösung von 1.86 Å nachgewiesen werden. Es konnten so wichtige Seitenketten für die Stabilisierung des DHETHDP herausgearbeitet werden. Histidin 103 bildet zur C $\beta$ -Hydroxylgruppe und Histidin 481 zur C $\alpha$ -Hydroxylgruppe des DHETHDP eine Wasserstoffbrückenbindung. Die 4'-Aminogruppe des Kofaktors befindet sich in einem günstigen Abstand zur C $\alpha$ -Hydroxylgruppe, um eine Wasserstoffbrücke auszubilden, jedoch ist der Winkel von 74 ° für eine solche Bindung wenig effektiv. Die C $\beta$ -Hydroxylgruppe des DHETHDP wird ausser von His103 auch von His69 über ein Wassermolekül fixiert. Das Reaktionsintermediat liegt in einer planaren Form vor, was die Enaminstruktur des DHETHDP im aktiven Zentrum beweist. Aus dem Vergleich dieser Intermediatsstruktur mit dem nativen Holoenzym konnten keine strukturellen Veränderungen des Proteins detektiert werden. Auf Grund dieser Erkenntnisse und der Ergebnisse aus der Struktur von WT-TK mit dem Akzeptorsubstrat Ery-4-P (Nilsson *et al.*, 1997) sind Konformationsänderungen der Transketolase während der Katalyse unwahrscheinlich.

Es wurden weiterhin die Kofaktorderivate N1'-CH<sub>3</sub>-ThDP und 4'-NHCH<sub>3</sub>-ThDP auf ihre Bindungsfähigkeit und katalytisches Verhalten an Transketolase untersucht. So konnte eine funktionell korrekte Bindung von N1'-CH<sub>3</sub>-ThDP im aktiven Zentrum von TK-E418A durch CD-Spektroskopie und Proteinkristallographie (2.9 Å Auflösung) nachgewiesen werden. Die Aktivität der E418A Variante war mit N1'-CH<sub>3</sub>-ThDP 33 mal höher als mit dem nativen Kofaktor (mit den physiologischen Substraten Xu-5-P und Rib-5-P). Im Fall des Komplexes aus WT-TK und N1'-CH<sub>3</sub>-ThDP konnte ein qualitativ identisches CD-Spektrum erhalten werden. Für den modifizierten Aminopyrimidinring konnte mit Hilfe der Proteinkristallographie (2.9 Å Auflösung) keine Elektronendichte detektiert werden, was auf eine hohe Flexibilität dieses Ringes hinweist. Dagegen waren der Thiazoliumring und die Diphosphatgruppierung gut definiert. Die Ursache für die hohe Flexibilität ist wahrscheinlich in der sterischen Hinderung der N1'-Methylgruppe durch das Glutamat 418 zu sehen. Es konnte ein weiterer Datensatz dieses Komplexes mit verbesserter Auflösung (1.9–2.1 Å) aufgenommen werden, dessen Auswertung noch aussteht.

Die Aktivität des Komplexes von WT-TK und 4'-NHCH<sub>3</sub>-ThDP betrug mit den physiologischen Substraten Xu-5-P und Rib-5-P noch 1.4 %. Die Bindung des Kofaktorderivates wurde mittels CD-Spektroskopie bereits 1985 durch USMANOV *et al.* beschrieben. Es konnte durch Proteinkristallographie (2.9 Å Auflösung) eine identische Bindung des 4'-NHCH<sub>3</sub>-ThDP im aktiven Zentrum von WT-TK festgestellt werden. Die zusätzlich angefügte Methylgruppe konnte nicht detektiert werden, was auf eine sp<sup>3</sup> Hybridisierung des 4'-N-Atoms und damit auf eine freie Drehbarkeit um die C4'-N-Achse hinweist.

- Arjunan, P., Umland, T., Dyda, F., Swaminathan, S., Furey, W., Sax, M., Farrenkopf, B., Gao, Y., Zhang, D. & Jordan, F. (1996)** Crystal structure of the thiamin diphosphate-dependent enzyme pyruvate decarboxylase from the yeast *S. cerevisiae* at 2.3 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 256, 590-600.
- Arjunan, P., Nemeria, N., Brunskill, A., Chandrasekhar, K., Sax, M., Yan, Y., Jordan, F., Guest, J. R. & Furey, W. (2002)** Structure of the pyruvate dehydrogenase multienzym complex E1 component from *Escherichia coli* at 1.85 Å resolution. *Biochemistry* 41, 5213-5221.
- Auhagen, E. (1932)** Co-carboxylase, ein neues Co-enzym der alkoholischen Gärung. *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 204, 149-167.
- Blass, J. P., Piacentini, S., Boldizsar, E. & Baker, A. (1982)** Kinetic studies of mouse brain transketolase. *J. Neurochem.* 39, 729-733.
- Bradford, M. M. (1976)** A rapid and sensitive method for quantification of microgram of protein utilising the principle of protein-dye-binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Breslow, R. (1958)** On the mechanism of thiamin action. IV. Evidence from studies on model systems. *J. Am. Chem. Soc.* 80, 3719-3726.
- Brünger, A. T., Kuriyan, J. & Karplus, M. (1987)** Crystallographic R factor refinement by molecular dynamics. *Science* 235, 458-460.
- Brünger, A. T. (1992)** Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structure. *Nature* 355, 472-475.
- Brünger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J.-S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N. S., et al. (1998)** *Acta Cryst. D* 54, 905-921.
- Bykova, I. A., Solovjeva, O. N., Meshalkina, L. E., Kovina, M. V. & Kochetov, G. A. (2001)** One-substrate transketolase-catalyzed reaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280, 845-847.
- Cascante, M., Centelles, J. J., Veech, R. L., Lee, W.-N. P. & Boros, L. G. (2000)** Role of thiamin (vitamin B1) and transketolase in tumor cell proliferation. *Nutrition And Cancer* 36, 150-154.
- Cavaliere, S. W., Neet, K. E. & Sable, H. Z. (1975)** Enzymes of pentose biosynthesis. The quaternary structure and reacting form of transketolase from baker's yeast. *Arch. Biochem. Biophys.* 171, 527-532.

- Chabrière, E., Charon, M. H., Volbeda, A., Pieulle, L., Hatchikian, E. C. & Fontecilla-Camps, J. C. (1999)** Crystal structure of the key anaerobic enzyme pyruvate:ferredoxin oxidoreductase, free and in complex with pyruvate. *Nat. Struct. Biol.* 6, 182-190.
- Chabrière, E., Vernède, X., Guigliarelli, B., Charon, M. H., Hatchikian, E. C. & Fontecilla-Camps, J. C. (2001)** Crystal structure of the free radical intermediate of pyruvate:ferredoxin oxidoreductase. *Science* 294, 2559-2563.
- Ciszak, E., Korotchkina, L. G., Dominiak, P., Sidhu, S. & Patel, M. S. (2002)** Structural studies of human pyruvate dehydrogenase. *International conference on thiamin, its biochemistry, and structural biology*. Lecture 33, Rutgers University, Newark.
- Datta, A. G. & Racker, E. (1961)** Mechanism of action of transketolase – I. Properties of the crystalline yeast enzyme. *J. Biol. Chem.* 236, 617-623.
- Datta, A. G. & Racker, E. (1961)** Mechanism of action of transketolase – II. The substrate-enzyme intermediate. *J. Biol. Chem.* 236, 624-628.
- De la Haba, G., Leder, I. G. & Racker, E. (1955)** Crystalline transketolase from baker's yeast. isolation and properties. *J. Biol. Chem.* 214, 409-426.
- Demuynck, C., Bolte, J., Hecquet, L. & Dalmas, V. (1991)** Enzyme-catalyzed synthesis of carbohydrates: synthetic potential of transketolase. *Tetrahedron Lett.* 32, 5085-5088.
- Dobritzsch, D., König, S., Schneider, G. & Lu, G. (1998)** High resolution crystal structure of pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis*. Implications for substrate activation in pyruvate decarboxylases. *J. Biol. Chem.* 273, 20196-20204.
- Dyda, F., Furey, W., Swaminathan, S., Sax, M., Farrenkopf, B. & Jordan, F. (1993)** Catalytic centers in the thiamin diphosphate enzyme pyruvate decarboxylase at 2.4 Å resolution. *Biochemistry* 32, 6165-6170.
- Effenberger, F., Null, V. & Ziegler, T. (1992)** Preparation of optically pure L-2-hydroxyaldehydes with yeast transketolase. *Tetrahedron Lett.* 33, 5157-5160.
- Egan, R. M. & Sable, H. Z. (1981)** Transketolase kinetics. The slow reconstitution of the holoenzyme is due to rate-limiting dimerization of the subunits. *J. Biol. Chem.* 256, 4877-4883.
- Eppendorfer, S. (1991)** Beiträge zur Affinität definierter Strukturelemente des Thiaminpyrophosphats und der Metallionen zum aktiven Zentrum der Hefe-Pyruvatdecarboxylase. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

- Erhart**, E. & Hollenberg, C. P. (1983) The presence of a defensive *LEU2* gene on 2  $\mu$  DNA recombinant plasmid of *Saccharomyces cerevisiae* is responsible for curing and high copy number. *J. Bacteriol.* 156, 625-635.
- Esnouf**, R. M. (1997) An extensively modified version of MolScript that includes greatly enhanced coloring capabilities. *J. Mol. Graph.* 15, 133-138.
- Fiedler**, E., Golbik, R., Schneider, G., Tittmann, K., Neef, H., König, S. & Hübner, G. (2001) Examination of Donor Substrate Conversion in Yeast Transketolase. *J. Biol. Chem.* 276, 16051-16058.
- Fiedler**, E., Thorell, S., Sandalova, T., Golbik, R., König, S. & Schneider, G. (2002) Snapshot of a key intermediate in enzymatic thiamin catalysis: Crystal structure of the alpha – carbanion of (alpha,beta-dihydroxyethyl)-thiamin diphosphate in the active site of transketolase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 99, 591-595.
- Funk**, C. (1911) On the chemical nature of the substance which cures polyneuritis in birds induced by a diet of polished rice. *J. Physiol.* 43, 395.
- Gibson**, G. E., Sheu, K. F. R., Baker, A. C., Carlson, K. C., Harding, B., Perrino, P. & Blass, J. P. (1988) Reduced activities of thiamine-dependent enzymes in brains and peripheral tissues of Alzheimer's patients. *Arch. Neurol.* 45, 836-840.
- Gill**, S. C. & von Hippel, P. H. (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* 182, 319-326.
- Golbik**, R., Neef, H., Hübner, G., König, S., Seliger, B., Meshalkina, L., Kochetov, G. A. & Schellenberger, A. (1991) Function of the aminopyrimidine part in thiamine pyrophosphate enzymes. *Biorg. Chem.* 19, 10-17.
- Hasson**, M. S., Muscate, A., McLeish, M. J., Polovnikova, L. S., Gerlt, J. A., Kenyon, G. L., Petsko, G. A. & Ringe, D. (1998) The crystal structure of benzoylformate decarboxylase at 1.6 Å resolution: diversity of catalytic residues in thiamin diphosphate-dependent enzymes. *Biochemistry* 37, 9918-9930.
- Hecquet**, L., Bolte, J. & Demuynck, C. (1994) Chemoenzymatic synthesis of 6-deoxy-d-fructose and 6-deoxy-l-sorbose using transketolase. *Tetrahedron* 29, 8677-8684.
- Heinrich**, C. P. & Wiss, O. (1971) Transketolase from human erythrocyte: purification and properties. *Helv. Chim. Acta* 54, 2658-2668.
- Heinrich**, C. P., Noack, K. & Wiss, O. (1971) A circular dichroism study of transketolase from baker's yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 44, 275-279.

- Heinrich, C. P.,** Noack, K. & Wiss, O. (1972) Chemical modification of tryptophan at the binding site of thiaminpyrophosphat in transketolase from baker`s yeast *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 49, 1427-1432.
- Heinrich, P.C.,** Steffen, H., Janser, P. & Wiss, O. (1972) Studies on the reconstitution of apotransketolase with thiamine pyrophosphate and analogs of the coenzyme. *Eur. J. Biochem.* 30, 533-541.
- Héroux, M. &** Butterworth, R. F. (1995) Regional alterations of thiamine phosphate esters and of thiamin diphosphat-dependent enzymes in relation to function in experimental Wernicke`s Encephalopathy. *Neurochem. Research* 20, 87-93.
- Himmo, S. D.,** Thompson, M. & Gubler, C. J. (1988) Isolation of transketolase from human erythrocytes. *Prep. Biochem.* 18, 261-276.
- Holzer, H.** (1961) Wirkungsmechanismus von Thiaminpyrophosphat. *Angew. Chemie* 7, 167-172.
- Holzer, H.,** Kattermann, R. & Busch, D. (1962) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 49, 1427-1432.
- Hoppe, W. Z.** (1957) *Elektrochemie* 61, 1076-1083.
- Horecker, B. L. &** Smyrniotis, P. Z. (1953) *J. Am. Chem. Soc.* 75, 1009.
- Horecker, B. L.,** Smyrniotis, P. Z. & Klenow, H. J. (1953) The formation of sedoheptulose phosphate from pentose phosphate. *J. Biol. Chem.* 205, 661-682.
- Jester, J. V.,** Moller-Pedersen, T., Huang, J., Sax, C. M., Kays, W. T., Cavanagh, H. D., Petroll, M. W. & Piatigorsky, J. (1999) The cellular basis of corneal transparency: evidence for ‘corneal crystallins’. *J. Cell Sci.* 112, 613-622.
- Jones, T. A.,** Zou, J.-Y., Cowan, S. & Kjølgaard, M. (1991) Improved methods for building protein models in electron density maps and location of errors in these models. *Acta Cryst. A* 47, 100 -119.
- Jordan, F.,** Chen, G., Nishikawa, S. & Wu, B. S. (1982) Potential roles of the aminopyrimidine ring in thiamin catalysed reactions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 378, 14-31.
- Kern, D.,** Kern, G., Neef, H., Tittmann, K., Killenberg - Jabs, M., Wikner, C., Schneider, G. & Hübner, G. (1997) How thiamine diphosphate is activated in enzymes. *Science* 275, 67-70.
- Kluger, R.** (1987) Thiamin diphosphate: a mechanistic update on enzymatic and nonenzymatic catalysis of decarboxylation. *Chem. Rev.* 87, 863-876.
- Kobori, Y.,** Myles, D. C. & Whitesides, G. M. (1992) Substrate specificity and carbohydrate synthesis using transketolase. *J. Org. Chem.* 57, 5899-5907.

- Kochetov, G. A., Usmanov, R. A. & Merzlov, V. P.** (1970) Thiaminepyrophosphate induced changes in the optical activity of baker's yeast transketolase. *FEBS Lett.* 9, 265-266.
- Kochetov, G. A., Usmanov, R. A. & Mevkh, A. T.** (1973) The role of the charge transfer complex in the transketolase catalyzed reaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 54, 1619-1626.
- Kochetov, G. A., Meshalkina, L. E. & Usmanov, R. A.** (1976) The number of active sites in a molecule of transketolase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 69, 839-842.
- Kochetov, G. A.** (1982) Transketolase from yeast, rat liver and pig liver. *Meth. Enzymol.* 90, 209-223.
- Kochetov, G. A.** (2001) Functional flexibility of the transketolase molecule. *Biochemistry (Moscow)* 66, 1077-1085.
- Konarev, P. V., Petoukhov, M. V. & Svergun, D. I.** (2001) MASSHA – a graphics system for rigid body modelling of macromolecular complexes against solution scattering data. *J. Appl. Cryst.* 37, 527-532.
- König, S. & Koch, M. H. J.** (1995) The quaternary structure of the enzyme transketolase from *Saccharomyces cerevisiae* in solution of high protein concentration studied by small-angle X-ray solution scattering. *Hasylab Jahresbericht 1995*, 839-840.
- König, S., Schellenberger, A., Neef, H. & Schneider, G.** (1994) Specificity of coenzyme binding in thiamin diphosphat-dependet enzymes. *J. Biol. Chem.* 269, 10879-10882.
- Kovina, M. V., Kuimov, A. N. & Kochetov G. A.** (1993) Essential tyrosine residues in transketolase of bakers yeast. 1. Determination of the type and number of essentiell residues. *Biochemistry-Engl. Tr.* 58. 9, 958-967.
- Kovina, M. V., Kuimov, A. N. & Kochetov G. A.** (1993) Essential tyrosine residues in transketolase of bakers yeast. 2. Investigation into the function of essentiell residues. *Biochemistry-Engl. Tr.* 58. 9, 968-975.
- Kovina, M. V., Selivanov, V. A., Kochevova, N. V. & Kochetov G. A.** (1997) Kinetic mechanism of active site non-equivalence in transketolase. *FEBS Lett.* 418, 11-14.
- Kovina, M. V. & Kochetov G. A.** (1998) Cooperativity and flexibility of active sites in homodimeric transketolase. *FEBS Lett.* 440, 81-84.
- Kovina, M. V., Tikhonova, O. V., Solov'eva, O. N., Bykova, I. A., Ivanov, A. S. & Kochetov, G. A.** (2000) Influence of transketolase substrates on its conformation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275, 968-972.

- Kovina, M. V., Bykova, I. A., Solov'eva, O. N., Meshalkina, L. E. & Kochetov, G. A. (2002)** The origin of the absorption band induced through the interaction between apotransketolase and thiamin diphosphat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 294, 155-160.
- Krampitz, L. O. & Votaw, R. (1966)** Alpha-hydroxyethylthiamine diphosphate and alpha, beta-dihydroxyethylthiamine diphosphate. *Meth. Enzymol.* 9,65-70.
- Kremer, A., Egan, R. M. & Sable, H. Z. (1979)** The active site of transketolase. Two arginine residues are essentiell for activity. *J. Biol. Chem.* 255, 2405 - 2410.
- Kuimov, A. N., Meshalkina, L. E. & Kochetov G. A. (1985)** An investigation of the carboxyl group function in the active center of transketolase. *Biochemistry International* 11, 913-920.
- Kuzmic, P. (1996)** Program DYNAFIT for the analysis of enzyme kinetic data: Application to HIV proteinase. *Anal. Biochem.* 237, 260-273.
- Laskowski, R. A., McArthur, M. W., Moss, D. S. & Thornton, J. M. (1993)** PROCHECK: A programm to check the quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.* 26, 282-291.
- Laemmli, U. K. (1970)** Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lindqvist, Y., Schneider, G., Ermler, U. & Sundström, M. (1992)** Three-dimensiomal structure of transketolase dependent enzyme, at 2.5 Å resolution. *EMBO* 11, 2373-2379.
- Lohmann, K. & Schuster, P. (1937)** Untersuchungen über die Cocarboxylase. *Biochem Z.* 294, 188-214.
- Meshalkina, L. E. & Kochetov, G. A. (1979)** *Dokl. Akad. Nauk SSSR* 246, 228-231.
- Meshalkina, L. E. & Kochetov, G. A. (1979)** The functional identity of the active centres of transketolase. *Biochimica et Biophysica Acta* 571, 218-223.
- Meshalkina, L. E., Neef, H., Tjaglo, M. V., Schellenberger, A. & Kochetov, G. A. (1995)** The presence of a hydroxyl group at the C-1 atom of the transketolase substrate molecule is necessary for the enzyme to perform the transferase Reaction. *FEBS Lett.* 375, 220-222.
- Meshalkina, L. E., Wikner, C., Nilsson, U., Lindqvist, Y. & Schneider, G. (1996)** CD spectra of recombinant wild-type and mutant transketolase. *Biochemistry and physiology of thiamin diphosphate enzymes* (Edt. H. Bisswanger & A. Schellenberger) A. u. C. Intemann, Wissenschaftlicher Verlag Prien, 532-542.
- Meshalkina, L., Nilsson, U., Wikner, C., Kostikowa, T. & Schneider, G. (1997)** Examination of the thiamin diphosphate binding site in yeast transketolase by site-directed mutagenesis. *Eur. J. Biochem.* 244, 646 652.

- Muller**, Y. A. & Schulz, G. E. (1993) Structure of the thiamine -and flavin-dependent enzyme pyruvate oxidase. *Science* 259, 965-967.
- Myles**, D. C., Andrullis III, P. J. & Whitesides (1991) A transketolase-based synthesis of (+)-exo-brevicommin. *Tetrahedron Lett.* 32, 4835-4838.
- Nikkola**, M., Lindqvist, Y. & Schneider, G. (1994) Refined structure of transketolase from *Saccharomyces cerevisiae* at 2.0 Å Resolution. *J. Mol. Biol.* 238, 387-404.
- Nilsson**, U., Lindqvist, U., Kluger, R. & Schneider, G. (1993) Crystal structure of transketolase in complex with thiamine thiazolone diphosphat, an analogue of the reaction intermediate, at 2.3 Å resolution. *FEBS Lett.* 326, 145-148.
- Nilsson**, U., Meshalkina, L., Lindqvist, Y. & Schneider, G. (1997) Examination of substrate binding in thiamin diphosphat-dependet transketolase by crystallography and site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 272, 1864-1869.
- Nilsson**, U., Hecquet, L., Gefflaut, T., Guerard, C. & Schneider, G. (1998) Asp<sup>477</sup> is a determinant of the enantioselectivity in yeast transketolase. *FEBS Lett.* 424, 49-52.
- Nilsson**, U. (1998) Substrate binding and stereospecificity in transketolase from *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertation, Karolinska Institutet, Stockholm, Schweden.
- Otwinowski**, Z. (1993) in *Proceedings of the CCP4 study weekend*, eds. Lawyer, L., Isaacs, N. & Bailey, S. (Daresbury Laboratory, Warrington , U. K.) 56-62.
- Pletcher**, J. & Sax, M. (1972) Crystal and molecular structure of thiamin pyrophosphate hydrochloride. *J. Am. Chem. Soc.* 94, 3998-4005.
- Paoletti**, F., Mocali, A. & Marchi, M. (1991) Transketolase abnormalities in extracts of foreskin fibroblasts from Alzheimer patients as biochemical marker of the disease. *Biochemistry and Physiology of Thiamin Diphosphate Enzymes* (Edt. H. Bisswanger & A. Schellenberger) VCH Verlagsgesellschaft Weinheim, 443-447.
- Philippov**, P. P., Shestakova, I. K., Tikhomirova, N. K. & Kochetov, G. A. (1980) Characterisation and properties of pig liver transketolase. *Biochimica et Biophysica Acta* 613, 359-369.
- Power**, L., Pletcher, J. & Sax, M. (1970) The crystal structure of N-benzyl-4-methyl-thiazolium. *Acta Crystallogr. Sect. B* 26, 143-148.
- Racker**, E., de la Haba, G. & Leder, I. G. (1953) *J. Am. Chem. Soc.* 75, 1010.
- Rossmann**, M. G. & Blow, D. M. (1962) The detection of subunits within the crystallographic asymmetric unit. *Acta Cryst.* 15, 24-31.

- Sax**, C.M., Salomon, C., Kays, W.T., Guo, J., Yu, F.X., Cuthbertson, R.A. & Piatigorsky, J. (1996) Transketolase Is a major protein in the mouse cornea. *J. Biol. Chem.* 271, 33568-33574
- Schellenberger**, A. & Winter, K. (1960) Untersuchungen zur Funktion der Aminogruppe in der Cocarboxylase. I. Zur cocarboxylatischen Wirkung von N-Methyl-TPP. *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 322, 164-172.
- Schellenberger**, A., Rödel, W. & Rödel, H. (1964) Darstellung und cocarboxylatische Wirkung von Desaminothiamin und seinen Phosphorsäureestern. *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 339, 122-134.
- Schellenberger**, A., Winter, K., Hübner, G., Schwaiberger, R., Helbig, D., Schumacher, S., Thieme, R., Bouillon, G. & Rädler, K. P. (1966<sub>a</sub>). Zur Theorie der Thiaminpyrophosphat-Wirkung. III. Rekombinations -und Funktionskinetik der Hefe-Pyruvatdecarboxylase. *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 346, 123-147.
- Schellenberger**, A., Müller, V., Winter, K. & Hübner, G. (1966<sub>b</sub>) Zur Theorie der Cocarboxylasewirkung. II. Ableitung und Begründung eines 'Zweizentrenmechanismus' der Thiaminpyrophosphatwirkung aus Modellversuchen und enzymatischen Messungen. *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 344, 244-260.
- Schellenberger**, A. & Winter, K. (1966<sub>c</sub>) Untersuchungen zur Funktion der Aminogruppe in Thiaminpyrophosphat (Cocarboxylase). III. Synthese und biochemische Eigenschaften einiger 4'-variiertes Analoges des TPP. *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 344, 16-24.
- Schellenberger**, A. & Hübner, G. (1967) Theory of the action of thiamin pyrophosphate. IV. Mechanism and kinetics of recombination and binding relations derived therefrom at the active center yeast pyruvate decarboxylase. *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 348, 491-500.
- Schellenberger**, A., Neef, H., Golbik, R., Hübner, G. & König, S. (1991) Mechanistic aspects of thiamin pyrophosphate enzymes via site-directed substitutions of the coenzyme structure. *Biochemistry and physiology of thiamin diphosphate Enzymes*. (Bisswanger & Ullrich) Seite. 3-15. VCH Verlagsgesellschaft Weinheim.
- Schellenberger**, A., Hübner, G. & Neef, H. (1997) Cofactor designing in functional analysis of thiamin diphosphate enzymes. *Meth. Enzymol.* 279, 131-146.
- Schellenberger**, A. (1998) Sixty years of thiamin diphosphate biochemistry. *Biochimica et Biophysica Acta* 1385, 177-186.
- Schneider**, G., Sundström, M. & Lindqvist, Y. (1989) Preliminary crystallographic data for transketolase from yeast. *J. Biol. Chem.* 264, 21619-21620.

- Schneider, G. & Lindqvist, Y. (1993)** Enzymatic Thiamine Catalysis: Mechanistic Implications from the Three-Dimensional Structure of Transketolase. *Bioorg. Chem.* 21, 109-117.
- Schneider, G. & Lindqvist, Y. (1998)** Crystallography and mutagenesis of transketolase: mechanistic implications for enzymatic thiamin catalysis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1385, 387-398.
- Shin, W., Pletcher, J., Sax, M. & Blank, G. (1979)** Crystal and molecular structure of oxythiamin chloride hydrochloride monohydrate. A thiamin antagonist with a conformation that differs from thiamin. *J. Am. Chem. Soc.* 101, 2462-2469.
- Shin, W., Pletcher, J. & Sax, M. (1981)** The structure of oxythiamin chloride dihydrate, a potent antagonist of vitamin B1. *Acta Crystallogr. Sect. B* 37, 1719-1724.
- Shin, W. & Kim, Y. C. (1986)** The crystal structure of thiamin thiazolone: A possible transitionstate analogue with an intramolecular N-H-O hydrogen bond in the V form. *J. Am. Chem. Soc.* 108, 7078-7082.
- Shin, W. & Chae, C. H. (1993)** Structure of 3-benzyl-5-(2-hydroxyethyl) 4-methyl-1,3-thiazolium chloride. *Acta Crystallogr. Sect. C* 49, 68-70.
- Simpson, F. (1960)** Preparation and properties of transketolase from pork liver. *Can. J. Biochem. Physiol.* 38, 115-124.
- Solov`eva, O. N., Bykova, I. A., Meshalkina, L. E., Kovina, M. V. & Kochetov, G. A. (2001)** Cleaving of ketosubstrates by transketolase and the nature of the products formed. *Biokhimiya.* 66, 1144-1149.
- Sprenger, G. A., Schörken, U., Sprenger, G. & Sahm, H. (1995)** Transketolase A of *Escherichia coli* K12. Purification and properties of the enzyme from recombinant strains. *Eur. J. Biochem.* 230, 525-532.
- Srere, P., Cooper, J. R., Tabachnick, M. & Racker, E. (1958)** The oxidative pentose-phosphate cycle. I. Preparation of substrates and enzymes. *Arch. Biochem. Biophys.* 274, 295-305.
- Sundström, M., Lindqvist, Y. & Schneider, G. (1992)** Three-dimensional structure of apotransketolase: flexible loops at the active site enable cofactor binding. *FEBS* 11805, 229-231.
- Sundström, M., Lindqvist, Y., Schneider, G., Hellmann, U. & Ronne, H. (1993)** Yeast TKL1 gene encodes a transketolase that is required for efficient glycolysis and biosynthesis of aromatic amino acids. *J. Biol. Chem.* 268, 24346-24352.

- Svergun**, D. I. (1992) Determination of the regularization parameter in indirect transform methods using perceptual criteria. *J. Appl. Cryst.* 25, 495-503.
- Svergun**, D. I., Petoukhov, M. V., Koch, M. H. J. & König, S. (2000) Crystal versus solution structures of thiamine diphosphate-dependent enzymes. *J. Biol. Chem.* 275, 297-302.
- Takabe**, T., Asami, S. & Akazawa, T. (1980) Glycolate formation catalysed by spinach leaf transketolase utilizing the superoxide radical. *Biochemistry* 19, 3985-3989.
- Thomas**, B. J. & Rothstein, R. J. (1989) Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. *Cell* 56, 619-630.
- Turner**, N. J. (2000) Applications of transketolase in organic synthesis. *Current Opinion in Biotechnology* 11, 527-531.
- Usmanov**, R. A. & Kochetov, G. A. (1983) Binding of substrates to baker's yeast transketolase. Function of the anionic group of the donor substrate. *Biokhimiya* 48, 550-558.
- Usmanov**, R. A., Neef, H. Pustynnikov, A., Schellenberger & Kochetov, G. A. (1985) The effect of thiamine pyrophosphate modification on its coenzyme function in a transketolase-catalyzed reaction. *Biochemistry International* 10, 479-486.
- Villafranca**, J. J. & Axelrod, B. (1971) Heptulose synthesis from nonphosphorylated aldoses and ketoses by spinach transketolase. *J. Biol. Chem.* 246, 3126-3131.
- Wang**, J. J.-L., Martin, P. R. & Singleton, C. K. (1997) A transketolase assembly defect in a Wernicke-Korsakoff syndrome patient. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 21, 576-580.
- Warburg**, O., Christian, W. & Griese, H. (1935) *Biochem. Z.* 282, 157-205.
- Warburg**, O. & Christian, W. (1937) *Biochem. Z.* 292, 287-295.
- Warnock**, L. G. & Prudhomme, C. R. (1982) The isolation preliminary characterisation of apotransketolase from human erythrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 106, 719-723.
- Washabaugh**, M. W. & Jencks, W. P. (1988) Thiazolium C(2)-proton exchange: structure-reactivity correlations and the pKa of thiamin C(2)-H revisited. *Biochemistry* 27, 5044-5053.
- Wikner**, C., Meshalkina, L., Nilsson, U., Nikkola, M., Lindqvist, Y., Sundström, M. & Schneider, G. (1994) Analysis of an invariant cofactor-protein interaction in thiamin diphosphat-dependent enzymes by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 169, 32144 - 32150.
- Wikner**, C., Meshalkina, L., Nilsson, U., Backstrom, S., Lindqvist, Y. & Schneider, G. (1995) His103 in yeast transketolase is required for substrate recognition and catalysis. *Eur. J. Biochem.* 233, 750-755.

**Wikner, C.** Nilsson, U., Meshalkina, L., Udekwu, C., Lindqvist, Y. & Schneider, G. (1997) Identification of catalytically important residues in yeast transketolase. *Biochemistry* 36, 15643-15649.

**Wikner, C.** (1997) Insights into enzymatic thiamine catalysis. Dissertation, Karolinska Institutet, Stockholm, Schweden.

**Zimmermann, F. T.,** Schneider, A., Schörken, U., Sprenger, G. A. & Fessner, W.-D. (1999) Efficient multi-enzyme synthesis of D-xylulose 5-phosphate. *Tetrahedron: Asymmetry* 10, 1643-1646.

**Zoltewicz, J. A. &** Baugh, T. D. (1980) An improved synthesis of 1'-methyl-thiaminium salts. *Synthesis* 3, 217-218.

## Lebenslauf

### Angaben zur Person

Name: Erik Fiedler  
Anschrift: Körnerstraße 26  
06114 Halle/Saale  
Tel.-Nr: 0345/6846242  
Geburtsdatum: 11.06.1972  
Geburtsort: Quedlinburg

### Bildungsweg

1979–1989 Polytechnische Oberschulen „Markt“ und „Hans Beimler“ in Quedlinburg  
1989–1992 Ausbildung zum Facharbeiter für Pflanzenproduktion mit Abitur in Böhnshausen (bei Halberstadt), Abitur 1992 am Käthe-Kollwitz-Gymnasium in Halberstadt  
1992–1997 Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
1996 Diplomprüfungen  
1997 Diplomarbeit zum Thema „Kinetische Untersuchungen des rekombinanten Wildtyps und ausgewählter Mutanten von Transketolase aus *Saccharomyces cerevisiae*“ am Institut für Biochemie, FB Biochemie/Biotechnologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, (Prof. Dr. G. Hübner)  
17.07.1997 Diplomverteidigung  
01.08.1997 Wissenschaftlicher Mitarbeiter und Doktorand am Institut für Biochemie am FB Biochemie/Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Prof. Dr. G. Hübner)  
01.11.1997 – 31.08.1998 Wehrdienst in der Panzerbrigade 21 „Lipperland“ in Augustdorf

- 01.09.1998            Forschungsstipendiat der Graduiertenförderung des Landes Sachsen-Anhalt und Doktorand am Institut für Biochemie am FB Biochemie/Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Prof. Dr. G. Hübner)
- 01.10.–31.10.2000    Kurzstipendium des Deutschen Akademischen Austauschdienstes (DAAD) für eine wissenschaftliche Aus- und Fortbildung im Ausland, Forschungsaufenthalt am Karolinska Institut, Abteilung Medizinische Biochemie und Biophysik, AG Molekulare Strukturbiologie (Prof. Schneider), Stockholm, Schweden
- seit 01.09.2001        Wissenschaftlicher Mitarbeiter und Doktorand am Institut für Biochemie am FB Biochemie/Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Prof. Hübner), im Rahmen des Promotionsstudiums mehrmaliger Aufenthalt am Karolinska Institut, Abteilung Medizinische Biochemie und Biophysik, AG Molekulare Strukturbiologie (Prof. Schneider), Stockholm, Schweden (3 Monate)

## **Danksagung**

*An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:*

*Ich danke Prof. Dr. G. Hübner für die Möglichkeit in der Arbeitsgruppe Enzymologie des Fachbereiches Biochemie / Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg diese Arbeit anfertigen zu können. Ich danke für viele wertvolle und kritische Hinweise, die mich Einblicke in die Wirkungsweise ThDP-abhängiger Enzyme gewähren ließen.*

*Ein herzlicher Dank geht an Dr. S. König für die Überlassung des Themas, wodurch mein Interesse an der Proteinkristallographie geweckt wurde. Ich danke für die stetige Diskussionsbereitschaft und die sehr angenehme Betreuung während der Anfertigung dieser Arbeit. Ich werde unsere Zusammenarbeit vermissen!*

*Ich möchte mich bei Dr. R. Golbik für die Betreuung und Unterstützung bei unzähligen Messungen bedanken. Weiterhin danke ich für die kritischen Korrekturlesungen und kleinere Exkursionen in die russische Sprache.*

*Ein großer Dank geht an Prof. Dr. G. Schneider und Prof. Dr. Y. Lindqvist, die es mir ermöglichten in ihrer Abteilung „Molekulare Strukturbiologie“ am Karolinska Institut in Stockholm etwas über das Handwerk eines Kristallographen zu lernen. Ich möchte mich für die sehr interessante Zeit bedanken. Prof. Dr. G. Schneider danke ich für sein stetiges Interesse am Fortgang der Experimente und manchen hilfreichen Tipp.*

*Bei Dr. T. Sandalova und Dr. S. Thorell möchte ich mich für die gewährte Unterstützung bei den Arbeiten zur Struktur von Transketolase sehr herzlich bedanken. Es hat mir sehr viel Spaß und Freude bereitet mit Euch zu arbeiten und ich danke für Eure immer freundliche Hilfe.*

*Dr. C. Wikner danke ich sehr herzlich für die Bereitstellung der mutagenisierten Expressionsplasmide und die ständige Diskussionsbereitschaft gerade am Anfang der Arbeit.*

*Bei der Arbeitsgruppe „Molekulare Strukturbiologie“ möchte ich mich für die sehr herzliche Aufnahme bedanken. Ich habe mich in Schweden sehr wohlgefühlt, es war eine sehr schöne und interessante Zeit für mich.*

*Herrn Dr. K. Tittmann danke ich für die Durchführung der NMR-Experimente, Dr. A. Schierhorn für die massenspektrometrischen Untersuchungen. Dr. H. Neef und Dr. R. Golbik danke ich für die Synthese der methylierten Kofaktorderivate.*

*Bei der Arbeitsgruppe Enzymologie möchte ich mich für das gute Arbeitsklima bedanken. Allen Mitgliedern danke ich für die gewährte Unterstützung, leckeren Tee, zahllose Hinweise und Tipps.*

*Dem EMBL (Außenstelle Hamburg) am DESY danke ich für den Zugang zu Synchrotronstrahlung. Dr. M. Weiss, Dr. P. Tucker und Dr. C. Enroth danke ich für die Unterstützung während der Datensammlung.*

*Ein Dankeschön geht nach Moskau zu Dr. L. Meshalkina für die gute Zusammenarbeit und die allzeit kritischen Diskussionen.*

*Bei Herrn Dr. A. Anton und Georg Wille möchte ich mich für die Hilfe bei Computerproblemen aller Art bedanken.*

*Die Anfertigung der Arbeit wäre nicht möglich gewesen ohne die Förderung durch die Graduiertenförderung des Landes Sachsen-Anhalt und den DAAD.*

*Ich möchte mich bei meiner Familie für die Unterstützung während des gesamten Studiums sehr herzlich bedanken. Ich danke Euch für Eure Hilfe, den Rückhalt in schlechten Tagen und das Vertrauen, dass ihr mir entgegen gebracht habt.*

## **Erklärung**

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

Weiterhin versichere ich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel herangezogen habe.

Halle/Saale, den 15.07. 2002