

1. Einleitung

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

Thiamin, das essentielle wasserlösliche Vitamin B_1 , wurde erstmals 1911 isoliert (Funk, 1911). Die biologisch aktive Form des Thiamins ist das Coenzym Thiamindiphosphat (ThDP). ThDP ist in einer Vielzahl wichtiger enzymatischer Reaktionen, die in energieproduzierenden Biosynthesewegen katalytisch agieren und bei denen C-C Bindungen von Substraten der allgemeinen Struktur R-CO-X gespalten bzw. geknüpft werden, involviert.

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

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

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

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

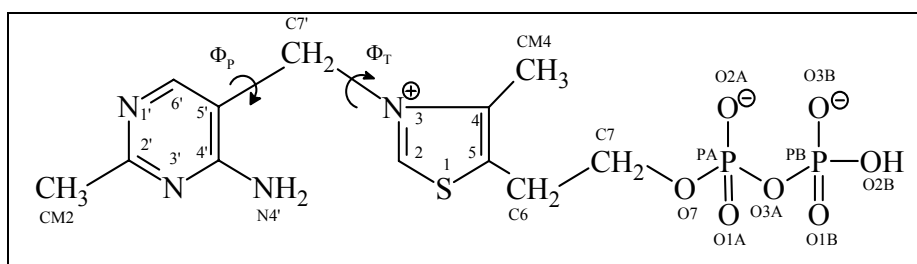


Abb. 1: *Strukturformel des Thiamindiphosphates (ThDP). Die Nomenklatur der Atome entspricht der in der Struktur der EcIPDC (1OVM, Zugangscode in der Proteindatenbank Brookhaven) und wird weiterhin im Text genutzt.*

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

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

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

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

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

Detaillierte Analysen von Struktur-Funktionsbeziehungen von vielen Schlüsselenzymen die ThDP als Coenzym nutzen, wurden durch die Fortschritte bei der Bestimmung der Raumstruktur möglich. Erste Hinweise zur Struktur eines ThDP-abhängigen Enzyms erhielt man durch die elektronenmikroskopische Untersuchung der Pyruvatdecarboxylase aus Hefe (Hübner *et al.*, 1975). Weitere strukturelle Informationen resultierten aus den Experimenten der Röntgenkleinwinkelstreuung. KÖNIG und Mitarbeiter (1992, 1993, 1998, 2004) analysierten die allgemeine Form ThDP-abhängiger Enzyme in Lösung und in Abhängigkeit von verschiedenen Effektoren (pH, Cofaktoren, Aktivatoren). Die detaillierten strukturellen Daten, die durch die Röntgenkristallstrukturanalyse zugänglich wurden, trugen wesentlich zum Verständnis des Mechanismus ThDP-abhängiger Enzyme bei. Die ersten Kristalle wurden von der Pyruvatoxidase aus *E. coli* im Rahmen der Proteinreinigung erhalten (Williams & Hager, 1966). Die erste Struktur eines ThDP-abhängigen Enzyms, der Transketolase aus *Saccharomyces cerevisiae*, wurde von LINDQVIST *et al.* (1992) bestimmt. Es folgten die Raumstrukturen der Pyruvatoxidase aus *Lactobacillus plantarum* und *Aerococcus viridans*, der Pyruvatdecarboxylase aus verschiedenen *Saccharomyces*-Stämmen und *Zymomonas mobilis*, der Transketolase aus *E. coli* und *Zea mays*, der Benzoylformiatdecarboxylase aus *Pseudomonas putida*, der E1-Komponenten der verzweigt-kettigen α -Ketosäuredehydrogenase aus *Pseudomonas putida*, *Homo sapiens* und *Thermus thermophilus*, der Pyruvat:Ferredoxinoxidoreduktase aus *Desulfovibrio africanus*, der katalytischen Untereinheit der Acetohydroxysäuresynthase aus *Saccharomyces cerevisiae* und *Arabidopsis thaliana*, der E1-Komponenten der bakteriellen und humanen Pyruvatdehydrogenase, der Acetolactatsynthase aus *Klebsiella pneumoniae*, sowie der N²-(2-carboxyethyl)argininsynthase aus *Streptomyces clavuligerus*.²

² Die Zugangscode in der Proteindatenbank Brookhaven entsprechen 1TRK (TK aus *Saccharomyces cerevisiae*), 1POW (POX *Lactobacillus plantarum*; Muller & Schulz, 1993; Muller *et al.*, 1994), 1VDE/1VDF (POX *Aerococcus viridans*, Hossain *et al.*, unveröffentlicht), 1PVD (*ScPDC*; Arjunan *et al.*, 1996), 1PYD (PDC aus *Saccharomyces uvarum*; Dyda *et al.*, 1990, 1993), 1ZPD (*ZmPDC*; Dobritsch *et al.*, 1998), 1QGD (TK *E. coli*; Isupov, M.N., Rupprecht, M.P., Wilson, K.S., Dauter, Z. & Littlechild, J.A. Crystal structure of *E. coli* transketolase., unveröffentlicht), 1ITZ (TK aus *Zea mays*; Gerhardt *et al.*, 2003), 1BFD (BFD; Hasson *et al.* 1998), 1QS0 (KsDH aus *Pseudomonas putida*; AEvansson *et al.*, 1999), 1DTW (humane zelluläre KsDH; AEvansson *et al.*, 2000), 1V11, 1V16, 1V1M, 1V1R (humane mitochondriale KsDH, Li *et al.*, unveröffentlicht), 1UMB (KsDH aus *Thermus thermophilus*; Nakai *et al.*, 2004), 1B0P (PFOR; Chabrière *et al.*, 1999), 1JSC (AHAS aus *Saccharomyces cerevisiae*; Pang *et al.*, 2002), AHAS aus *Arabidopsis thaliana*; (Pang *et al.*, 2004_a; Zugangscode nicht freigegeben), L8A (*E. coli* PDH; Arjunan *et al.*, 2002), 1NI4 (humane PDH; Ciszak *et al.*, 2003), 1OZF (ALS; Pang *et al.*, 2004_b) und 1UPA, 1UPB, 1UPC (N²-(2-carboxyethyl)argininsynthase aus *Streptomyces clavuligerus*, Caines *et al.*, 2004).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

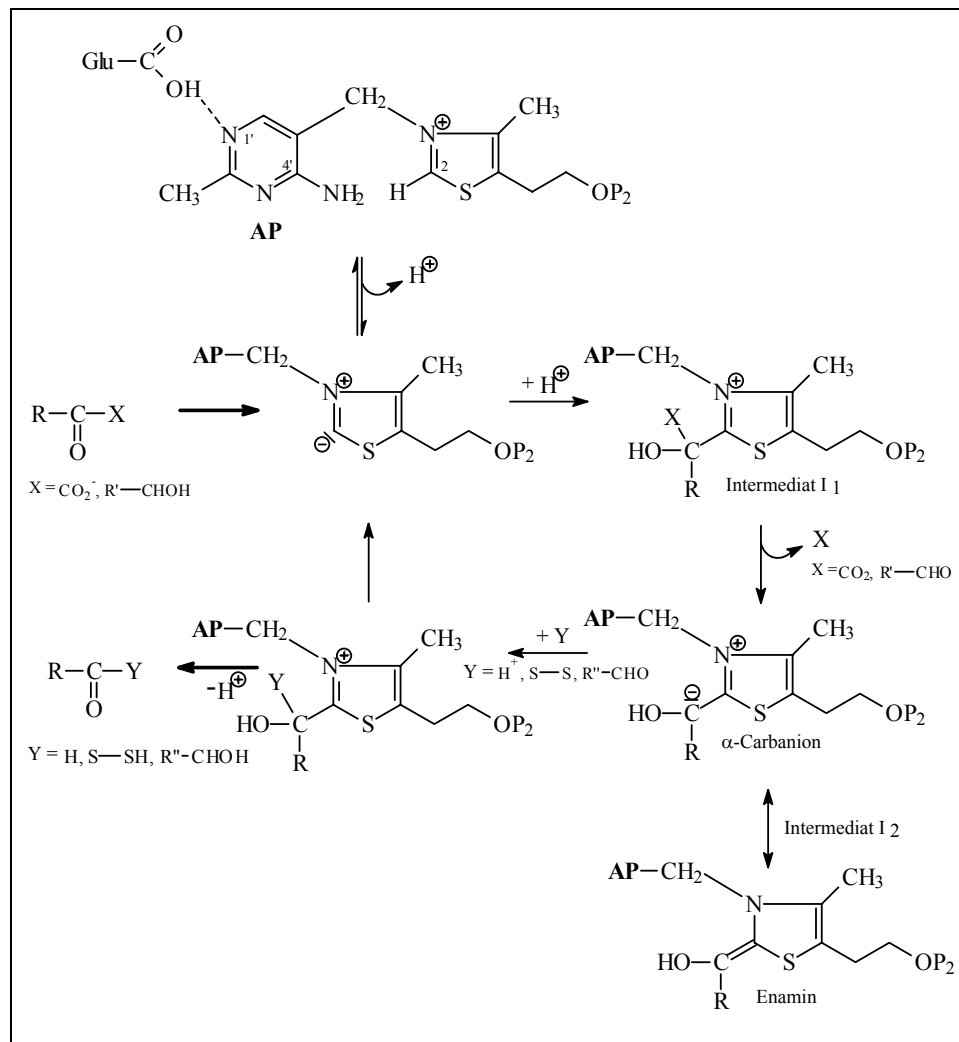


Abb. 2: *Vorgeschlagener Katalysemechanismus ThDP-abhängiger Enzyme. Abbildung modifiziert nach SCHELLENBERGER (1998). Erläuterungen siehe Text (AP, Aminopyrimidinring).*

Der erste Schritt der Katalyse ist die initiale Deprotonierung des C2-H-Atoms des Thiazoliumrings. Dabei spielt, wie schon erwähnt, die N1'-Glutamat-Interaktion eine wichtige Rolle. Das gebildete C2-Carbanion (Ylid) greift nukleophil am $C\alpha$ -Atom des Substrates $R-CO-X$ an. Das Carbonylsauerstoffatom des Substrates wird protoniert und das tetraedrale ThDP-Substrataddukt, das Intermediat I₁ wird gebildet. Die Abspaltung des Restes X resultiert in der Bildung des zweiten Reaktionsintermediates I₂, dem α -Carbanion/Enamin.

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

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

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

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

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

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

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

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

¹⁰ Costacurta & Vanderleyden (1995), Kawaguchi & Syono (1996), Patten & Glick (1996)

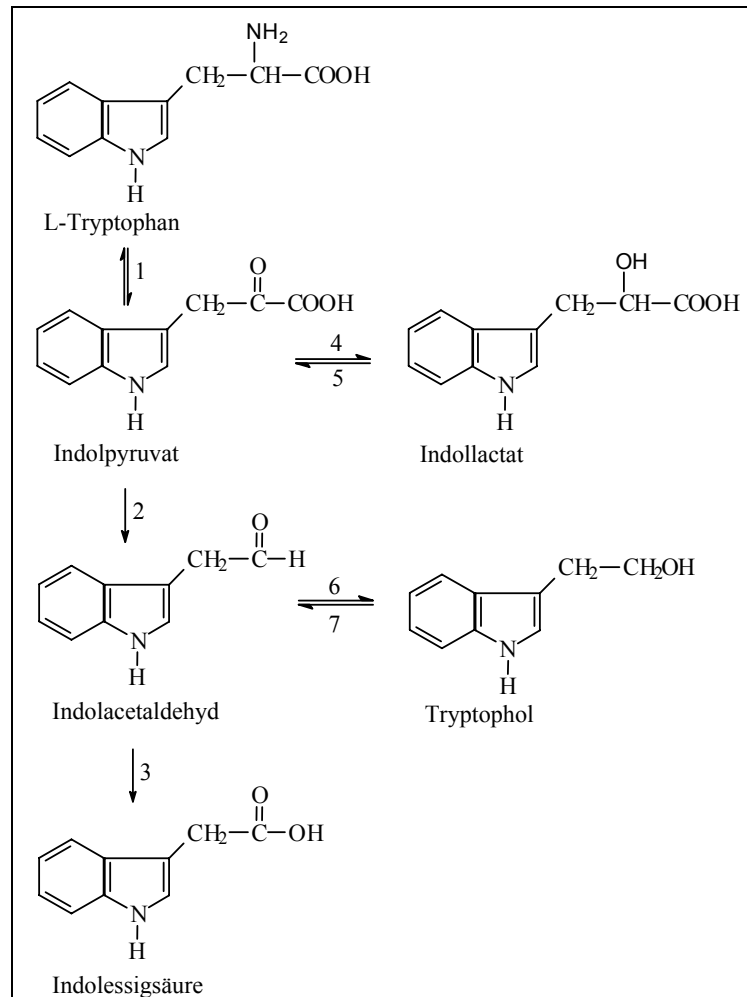


Abb. 3: *Schema des L-Tryptophan-abhängigen Indol-3-pyruvat-Weges zur Indolessigsäure-Biosynthese in Enterobacter cloacae.*
 Die Abbildung wurde nach Koga (1991_a, 1995) modifiziert. 1, L-Tryptophan-Aminotransferase, 2, Indolpyruvatdecarboxylase, 3, Aldehydoxidase, 4, Indolpyruvat-Reduktase, 5, Indollactat-Oxidase,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

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

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

Zur biochemischen Untersuchung der *Ec*IPDC wurde das Indolpyruvatdecarboxylase-Gen aus der genomischen Bibliothek von *Enterobacter cloacae* isoliert (Koga *et al.*, 1991_a). Erste Charakterisierungen der *Ec*IPDC sind durch KOGA *et al.* (1992) beschrieben. Die homotetramere *Ec*IPDC besteht aus 4×552 Aminosäuren, besitzt eine molare Masse von 240 kDa und hat einen aus der Aminosäuresequenz berechneten isoelektrischen Punkt von 5.67. Erste kinetische Untersuchungen wurden durch Anwendung der quantitativen HPLC-Produktanalyse durchgeführt. KOGA *et al.* bestimmten für die Umsetzung von Indolpyruvat und Pyruvat einen K_M -Wert von 15 μ M bzw. 2.5 mM. L-Tryptophan, Indollactat, β -Phenylpyruvat, Oxalacetat, Oxalat und Acetoacetat werden nicht decarboxyliert. Zudem wurde β -Phenylpyruvat als kompetitiver Inhibitor mit einem K_I -Wert von 50 μ M identifiziert. Für die Cofaktoren wurden K_D -Werte von 0.6 μ M (ThDP) und 2.5 mM (Mg^{2+}) angegeben. Dabei variiert der K_D -Wert für ThDP mit der Konzentration an Mg^{2+} im Bereich von 6 mM (0.01 mM $MgCl_2$) bis 0.6 μ M (5.0 mM $MgCl_2$). In Abwesenheit der Cofaktoren ThDP und Mg^{2+} dissoziiert das Tetramer, welches das aktive Holoenzym darstellt, in Dimere und Monomere.

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

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

Um die an der Katalyse beteiligten Aminosäurereste im aktiven Zentrum zu identifizieren, wurden die *Ec*IPDC-Varianten Asp²⁹Glu, Glu⁵²Asp, His¹¹⁵Lys, Gln³⁸³Thr und Glu⁴⁶⁸Asp generiert und deren *steady state* Kinetiken analysiert. Die einzelnen Reaktionsintermediate in der *Ec*IPDC-katalysierten Umsetzung von Indolpyruvat, Pyruvat und Benzoylformiat wurden durch die Anwendung der ¹H-NMR Spektroskopie qualitativ und quantitativ bestimmt. Anhand der Intermediatverteilung können die mikroskopischen Geschwindigkeitskonstanten der Teilreaktionen in der Katalyse bestimmt werden. Es wird ein Modell zum Katalyseme-

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

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

Die gewonnenen Erkenntnisse bezüglich der Struktur und des Katalysemechanismus der Indolpyruvatdecarboxylase aus *Enterobacter cloacae* wurden in mehreren Publikationen veröffentlicht (Schütz *et al.*, 2003_a, 2003_b, 2004).