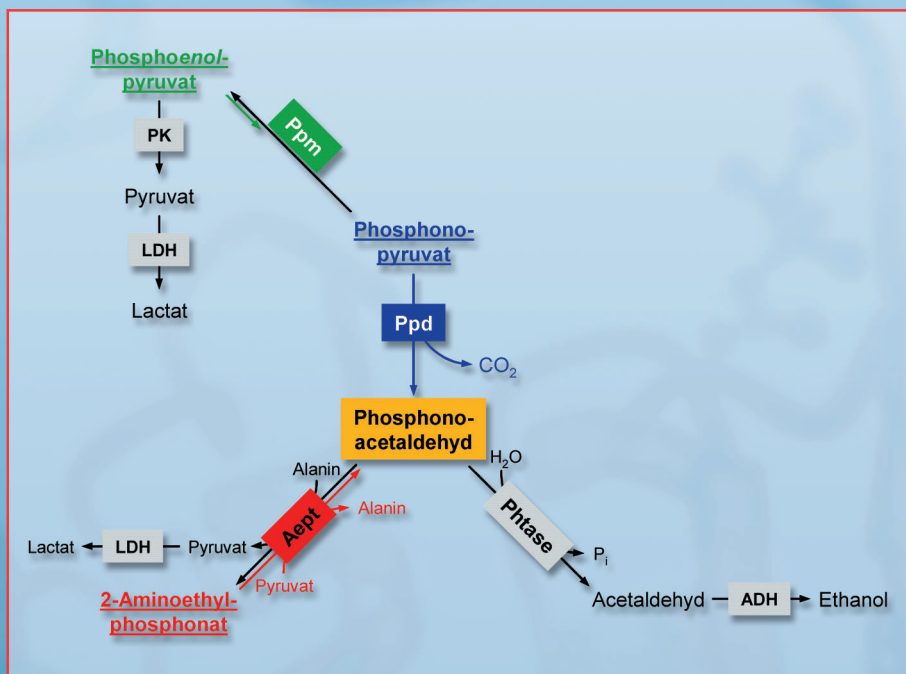


Biosynthese von Phosphonaten: Charakterisierung des rekombinanten Enzyms Phosphonopyruvat-Decarboxylase aus *Streptomyces viridochromogenes* Tü494

Sandra Johnen



Forschungszentrum Jülich GmbH
Institut für Biotechnologie 1

**Biosynthese von Phosphonaten:
Charakterisierung des rekombinanten
Enzyms Phosphonopyruvat-Decarboxylase
aus *Streptomyces viridochromogenes* Tü494**

Sandra Johnen

Schriften des Forschungszentrums Jülich
Reihe Lebenswissenschaften/Life Sciences

Band/Volume 17

ISSN 1433-5549

ISBN 3-89336-400-5

Bibliografische Information Der Deutschen Bibliothek
Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen
Nationalbibliografie; detaillierte Bibliografische Daten sind im Internet
über <<http://dnb.ddb.de>> abrufbar.

Herausgeber und Vertrieb: Forschungszentrum Jülich GmbH
Zentralbibliothek
D-52425 Jülich
Telefon: 02461 61-5368 · Telefax: 02461 61-6103
e-mail: zb-publikation@fz-juelich.de
Internet: <http://www.fz-juelich.de/zb>

Umschlaggestaltung: Grafische Betriebe, Forschungszentrum Jülich GmbH

Druck: Grafische Betriebe, Forschungszentrum Jülich GmbH

Copyright: Forschungszentrum Jülich 2005

Schriften des Forschungszentrums Jülich
Reihe Lebenswissenschaften / Life Sciences Band / Volume 17

D 61 (Diss., Düsseldorf, Univ., 2005)

ISSN 1433-5549
ISBN 3-89336-400-5

Alle Rechte vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf in irgendeiner Form (Druck, Fotokopie oder in einem anderen Verfahren) ohne schriftliche Genehmigung des Verlages reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Biosynthese von Phosphonaten: Charakterisierung des rekombinanten Enzyms Phosphonopyruvat-Decarboxylase aus *Streptomyces viridochromogenes* Tü494

Phosphonopyruvat (PnPyr), das physiologische Substrat der Phosphonopyruvat-Decarboxylase (Ppd), gehört zu den Phosphonaten, die sich durch eine stabile, kovalente Kohlenstoff-Phosphor-Bindung (C-P-Bindung) auszeichnen und infolgedessen resistent gegenüber chemischer Hydrolyse, thermischer Zersetzung und Photolyse sind. Phosphonate werden als Antibiotika oder als Herbizide genutzt und sind ökonomisch vielseitig verwendbar. Ferner kommen sie als Antimetabolite oder als Inhibitoren bei der Aufklärung von Enzymkristallstrukturen zum Einsatz. Ausgehend von Phosphoenolpyruvat (PEP) wird ihre Biosynthese zumeist durch die Enzymkombination PEP-Phosphomutase (Ppm) und Ppd eingeleitet. Die Ppd katalysiert die PnPyr-Decarboxylierung zum Phosphonoacetaldehyd (PnAA), was die PnPyr-Elimination aus der Ppm-katalysierten PEP/PnPyr-Isomerisierung und somit die Etablierung der C-P-Bindung bewirkt.

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der biochemischen Eigenschaften sowie der Zusammenhänge zwischen Struktur und Funktion der Ppd aus *S. viridochromogenes* Tü494, deren Aktivität von Thiamindiphosphat (ThDP) und Me^{2+} -Ionen abhängig ist. Dies bedurfte der Etablierung geeigneter Nachweissysteme. Des Weiteren sollte die Möglichkeit der chemoenzymatischen Synthese neuartiger C-P-Verbindungen, die beispielsweise als Inhibitoren zur Enzymstrukturaufklärung eingesetzt werden könnten, untersucht werden.

Das *ppd*-Gen wurde in einem rekombinanten *E. coli*-Stamm als Fusionsprotein mit einem aminoterminalen Polyhistidinschwanz exprimiert und mittels Ni^{2+} -Affinitätschromatographie bis zur apparenten Homogenität aufgereinigt. Die PnAA-Synthese wurde durch zwei gekoppelte Enzymtests nachgewiesen. Die für die 2-Aminoethylphosphonat-Transaminase (Aept) und die PnAA-Hydrolase (Phtase) kodierenden Gene aus *Pseudomonas putida* KT2440 und das Ppm-kodierende Gen aus *Mytilus edulis* wurden ebenfalls als Histidin-Fusionsproteine exprimiert und aufgereinigt. In Kombination mit der Alkohol-Dehydrogenase (ADH), der L-Lactat-Dehydrogenase (LDH) und der Pyruvat-Kinase wurden vier verschiedene Nachweisreaktionen etabliert. Die *in vitro*-Synthese von 2-Aminoethylphosphonat wurde durch den kombinierten Einsatz der Fusionsproteine Ppm, Ppd und Aept ermöglicht.

Die Ppd weist ein breites pH-Spektrum mit einem Optimum zwischen pH 7,5 und 8,5 auf. Bei einer Temperatur von -20°C bzw. 4°C betrug die Halbwertszeit ca. 50 Tage. Die Ppd hat eine hohe Affinität zu ihren Cofaktoren ThDP und Mg^{2+} -Ionen ($K_m \sim 40 \mu\text{M}$). Die Rekonstitution des Apo-Enzyms war auch mit Ca^{2+} - und Mn^{2+} -Ionen möglich. Unter Verwendung der Enzymkombinationen Phtase/ADH und Aept/LDH wurde bei pH 8,0 (HEPES-Puffersystem) und einer Temperatur von 30°C PnPyr von der Ppd mit einer maximalen Reaktionsgeschwindigkeit von $0,81 \pm 0,01 \text{ U/mg}$ und einer Michaelis-Konstante von $3,16 \pm 0,35 \mu\text{M}$ umgesetzt. Weder Pyruvat, noch β -Hydroxypyruvat und β -Fluoropyruvat wurden zum entsprechenden Aldehyd umgesetzt. Bei den Untersuchungen zur Phosphonoacyloin-Synthese konnte die in Bezug auf die Pyruvat-Decarboxylase (Pdc) vermutete Carboligase-Aktivität der Ppd nicht nachgewiesen werden.

Für die Ppd wurde ein Molekulargewicht von 72.100 ± 220 bestimmt, was, bei einer Größe der Untereinheit von ca. 44.000 Da, auf eine dimere Quartärstruktur hindeutet. Durch den Vergleich mit der Pdc aus *Zymomonas mobilis* war die Identifizierung von Aminosäuren möglich, deren potentielle Funktionen anschließend mittels ortsgerichteter Mutagenese untersucht wurden. Anhand der enzymkinetischen Daten dieser Ppd-Mutantenproteine konnte, unter Zuhilfenahme der Kristallstrukturen der ThDP-abhängigen Enzyme Pdc und Benzoylformiat-Decarboxylase, ein Modell des aktiven Zentrums erstellt werden. Demnach bewirkt Glutamat-48 die Aktivierung des ThDP. Die Reste Serin-25, Histidin-110 und Aspartat-297 beeinflussen die katalytische Aktivität und sind wahrscheinlich in unmittelbarer Nähe der Substratbindestelle lokalisiert. Die innerhalb der ThDP-Konsensussequenz vorkommenden Reste Aspartat-265, Asparagin-293 und Glycin-294 kennzeichnen die Bindestelle des Me^{2+} -Ions, das für die ThDP-Verankerung verantwortlich ist. Möglicherweise gehört der für die Sequenzen der PnPyr- und Sulfopyruvat-Decarboxylasen konservierte Aspartat-Rest 263 ebenfalls zur Metallionen-Bindestelle. Eine weitere, für die Sequenzen der PnPyr- und Sulfopyruvat-Decarboxylasen konservierte Aminosäure ist Glutamat-224, die unter Umständen für die katalytische Aktivität essentiell ist. Die für Glutamat-224 und Aspartat-263 postulierten Funktionen widersprachen den Ergebnissen, die für die korrespondierenden Aminosäurereste der Ppd aus *Bacteroides fragilis* beschrieben worden waren (Zhang, G. et al. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**: 41302-41308).

Biosynthesis of Phosphonates: Characterisation of the Recombinant Enzyme Phosphonopyruvate Decarboxylase from *Streptomyces viridochromogenes* Tü494

Phosphonopyruvate (PPyr), the physiological substrate of the phosphonopyruvate decarboxylase (Ppd), belongs to the phosphonates, which are characterised by a stable, covalent carbon to phosphorus (C-P) bond that makes these compounds resistant against chemical hydrolysis, thermal decomposition, and photolysis. Phosphonates are used as antibiotics, herbicides and in different fields of human economic activity. Furthermore, they are used as anti-metabolites or as inhibitors for the determination of enzyme crystal structures. Their biosynthesis starts from phosphoenolpyruvate (PEP) and is mostly initiated by the enzyme combination PEP phosphomutase (Ppm) and Ppd. The Ppd, that catalyses the decarboxylation of PPyr to phosphonoacetaldehyde (PnAA), causes the elimination of PPyr from the Ppm-catalysed PEP to PPyr rearrangement and therefore the establishment of the C-P bond.

The aim of this work was to investigate the biochemical characteristics as well as the correlation between structure and function of the Ppd from *S. viridochromogenes* Tü494, whose activity depends on thiamine pyrophosphate (TPP) and Me^{2+} ions. Thus, suitable assay systems were required. Another purpose was the chemo-enzymatic synthesis of new C-P compounds that could be used as inhibitory molecules (e.g., to resolve enzyme crystal structures).

The *ppd* gene was expressed in a recombinant *E. coli* strain as a fusion protein with an amino-terminal 10-fold histidine-tag and purified to homogeneity by Ni^{2+} -affinity chromatography. PnAA synthesis was verified by two coupled enzyme activity assays. The genes from *Pseudomonas putida* KT2440, which encode the 2-aminoethylphosphonate transaminase (Aept) and the PnAA hydrolase (Phtase), as well as the Ppm-encoding gene from *Mytilus edulis* were expressed and purified as histidine fusion proteins, too. In combination with alcohol dehydrogenase (ADH), L-lactate dehydrogenase (LDH), and pyruvate kinase four different assay reactions were established. The *in vitro* synthesis of 2-aminoethylphosphonate was carried out by the combined use of the fusion proteins Ppm, Ppd, and Aept.

The pH rate profile followed a bell-shaped curve and defined pH 7.5 – 8.5 as the range for optimal Ppd catalysis. A half-life of about 50 days was determined for storage at -20°C or 4°C . The Ppd has a high affinity to its cofactors TPP and Mg^{2+} ($K_m \sim 40 \mu\text{M}$). The metal ions Ca^{2+} and Mn^{2+} were further activators. Using the enzyme combinations Phtase/ADH and Aept/LDH at pH 8.0 (HEPES buffer system) and a temperature of 30°C , the Ppd followed Michaelis-Menten kinetics with PPyr, yielding a K_m value of $3.2 \pm 0.35 \mu\text{M}$ and a v_{max} value of $0.81 \pm 0.01 \text{ U/mg}$. Contrary to PPyr, neither pyruvic acid, nor β -hydroxyppyruvic acid and β -fluoropyruvic acid were converted to the respective aldehydes. The supposed carboligase activity of the Ppd, which would lead to the synthesis of phosphonoacyloins, could not be demonstrated.

Gel filtration chromatography indicated a molecular mass of $72,100 \pm 220$. Regarding the subunit size of about 44,000 Da, the quaternary structure of the Ppd appears to be homodimeric. A comparison with the pyruvate decarboxylase (Pdc) from *Zymomonas mobilis* allowed the identification of several amino acid residues, whose potential functions were examined by site-directed mutagenesis. Considering the kinetic data of these Ppd mutant proteins as well as the crystal structures of the TPP-dependent enzymes Pdc and benzoylformate decarboxylase, a model of the active site was generated. According to that, glutamate-48 seems to be responsible for TPP activation. The residues serine-25, histidine-110, and aspartate-297 affect the catalytic activity and are probably located in the direct vicinity of the substrate binding site. The residues aspartate-265, asparagine-293, and glycine-294 were found within the TPP-binding motif and mark the binding site of the Me^{2+} ion that is responsible for the anchoring of the TPP molecule. Likely, aspartate-263, being conserved in the sequences of PPyr and sulfopyruvate (SPyr) decarboxylases, appears to be part of the metal ion binding site. Glutamate-224, another amino acid conserved within the PPyr and SPyr decarboxylase sequences, is probably a residue essential for catalytic activity. The assumed roles for glutamate-224 and aspartate-263 were contradictory to the results, which had been described for the corresponding amino acid residues of the Ppd from *Bacteroides fragilis* (Zhang, G. et al. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**: 41302 – 41308).

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Phosphonate	1
1.1.1 Biosynthese von Phosphonaten	3
1.1.2 Biologischer Abbau von Phosphonaten	7
1.2 Thiamindiphosphat-abhängige Enzyme	10
1.2.1 Pyruvat-Decarboxylase	14
1.3 Zielsetzung der Arbeit	17
2. Material und Methoden	19
2.1 Chemikalien und Enzyme	19
2.2 Bakterienstämme, Phagen und Plasmide	20
2.3 Kultivierung von Bakterien	23
2.3.1 Nährmedien	23
2.3.2 Medienzusätze	23
2.3.3 Kultivierungsbedingungen	24
2.4 Transformation von <i>E. coli</i>	25
2.5 Molekularbiologische Methoden	25
2.5.1 DNA-Präparation	25
2.5.2 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen	26
2.5.3 DNA-Fällung mittels Ethanol	26
2.5.4 Agarose-Gelelektrophorese	26
2.5.5 Behandlung mit alkalischer Phosphatase	27
2.5.6 Ligation von DNA-Fragmenten	27
2.5.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)	27
2.5.8 DNA-Sequenzierung	28
2.5.9 Ortsgerichtete Mutagenese	29
2.5.10 λ DE3 Lysogenization Kit	31
2.6 Proteinbiochemische Methoden	31
2.6.1 Bestimmung der Proteinkonzentration	31
2.6.2 Protein-Fällung mittels Trichloressigsäure	32
2.6.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	32

2.6.4	Aufschluss von <i>E. coli</i> -Zellen	33
2.6.4.1	Zellaufschluss von <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS	33
2.6.4.2	Ultraschallaufschluss	33
2.6.5	Chromatographische Proteinreinigung	34
2.6.5.1	Ni ²⁺ -Affinitätschromatographie	34
2.6.5.2	Gelpermeationschromatographie (Gelfiltration)	35
2.6.6	Ultrafiltration von Proteinen	36
2.6.7	Dialyse von Proteinen	36
2.7	Enzymaktivitätsbestimmungen	37
2.7.1	Photometrische Enzymtests	37
2.7.1.1	Enzymatische Bestimmung der Phosphonopyruvat-Konzentration	37
2.7.1.2	Phtase/ADH- und Aept/LDH-Enzymtest	37
2.7.1.3	Ppd/ADH-Enzymtest	38
2.7.2	HPLC (High Performance Liquid Chromatography)	38
2.7.2.1	Synthese und Nachweis von Phosphonoacetaldehyd	39
2.7.2.2	Untersuchung alternativer Ppd-Substrate	40
2.7.2.3	Synthese von 2-Aminoethylphosphonat	40
2.7.2.4	Acyloin-Kondensation	41
2.7.3	MS (Massenspektroskopie)	42
3.	Ergebnisse	43
3.1	Enzyme	45
3.1.1	Phosphonopyruvat-Decarboxylase	45
3.1.1.1	Expression und Aufreinigung	45
3.1.1.2	Nachweis der enzymatischen Aktivität	48
3.1.2	2-Aminoethylphosphonat-Transaminase und Phosphonoacetaldehyd-Hydrolase	50
3.1.2.1	Expression und Aufreinigung	50
3.1.2.2	Nachweis der enzymatischen Aktivität	52
3.1.2.3	Aept- und Phtase-abhängiger Nachweis der Ppd-Aktivität	54
3.1.3	Phosphoenolpyruvat-Phosphomutase	55
3.1.3.1	Expression und Aufreinigung	55
3.1.3.2	Nachweis der enzymatischen Aktivität	56
3.1.3.3	Ppm-abhängige Bestimmung der Phosphonopyruvat-Konzentration	57
3.1.4	Synthese von 2-Aminoethylphosphonat	57
3.1.4.1	<i>In vitro</i> -Synthese mit gereinigten Enzymen	57
3.1.4.2	<i>In vivo</i> -Synthese in <i>E. coli</i>	58
3.1.5	Zusammenfassung	61

3.2	Biochemische Charakterisierung der Ppd	62
3.2.1	Einfluss von pH-Wert und Temperatur auf die Enzymaktivität und die Enzymstabilität	62
3.2.2	Enzymkinetik in Abhängigkeit von dem physiologischen Substrat Phosphonopyruvat	65
3.2.3	Affinität zu den Cofaktoren Thiamindiphosphat und zweiwertigen Metall-Ionen	66
3.2.4	Untersuchungen zum Substratspektrum	67
3.2.5	Untersuchungen zur Synthese von Phosphonoacyloinen	67
3.2.6	Zusammenfassung	71
3.3	Struktur-Funktionsbeziehungen der Ppd	71
3.3.1	Identifizierung des Oligomerisierungszustands	71
3.3.2	Ortsgerichtete Mutagenese	72
3.3.2.1	Funktion der Aminosäure Glutamat-48	78
3.3.2.2	Funktion der Aminosäuren Serin-25 und Aspartat-297	78
3.3.2.3	Funktion der Aminosäuren Histidin-110 und Histidin-111	81
3.3.2.4	Funktion der Aminosäuren Aspartat-265, Asparagin-293 und Glycin-294	83
3.3.2.5	Funktion der Aminosäuren Glutamat-224 und Aspartat-263	85
3.3.3	Zusammenfassung	86
4.	Diskussion	88
4.1	Enzyme	89
4.1.1	Genexpression und Proteinaufreinigung	89
4.1.2	Enzymatische Aktivität der Histidin-Fusionsproteine	92
4.2	Biochemische Charakterisierung der Ppd	95
4.3	Struktur-Funktionsbeziehungen der Ppd	101
4.3.1	Aktivierung des Cofaktors Thiamindiphosphat	105
4.3.2	Konsensussequenz der ThDP-abhängigen Enzyme	105
4.3.3	Substratbindung und katalytische Aktivität	107
4.3.4	Konservierte Aminosäuren der Phosphonopyruvat- und Sulfopyruvat-Decarboxylasen	111
5.	Zusammenfassung	113
6.	Literatur	115

Abkürzungen

AA	Acetaldehyd
ADH	Alkohol-Dehydrogenase
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AEP	2-Aminoethylphosphonat
Aept	2-Aminoethylphosphonat-Transaminase
AHAS	Acetohydroxysäure-Synthase
Als	Acetolactat-Synthase
Amp	Ampicillin
Amp ^R	Ampicillin-Resistenz
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
AU	Absorptionseinheit
b	Base
BA	Benzaldehyd
BFD	Benzoylformiat-Decarboxylase
BICINE	N,N-Bis(2-hydroxyethyl)glycin
Bla	β-Lactamase
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius (Temperatureinheit)
c	Präfix: zenti- (10 ⁻²)
CAPS	3-(Cyclohexylamino)-1-propansulfonsäure
Cat	Chloramphenicol-Acetyltransferase
C-C-	Kohlenstoff-Kohlenstoff-
CHES	2-(N-Cyclohexylamino)ethansulfonsäure
Cm	Chloramphenicol
Cm ^R	Chloramphenicol-Resistenz
CoA	Coenzym A
C-P-	Kohlenstoff-Phosphor-
d	Tag (Zeiteinheit)
Da	Dalton
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
DXS	1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat-Synthase
ε ₃₄₀	Extinktionskoeffizient bei einer Wellenlänge von 340 nm
EB	Elutionspuffer
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMS	Enhanced Mass Spectroscopy
EPI	Enhanced Product Ion
<i>et al.</i>	et aliter
etc.	et cetera
g	Gramm (Masseneinheit)
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
GLYGLY	Glycylglycin
h	Stunde (Zeiteinheit)
HAD	2-haloalkanoic acid dehalogenase
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography

IPDC	Indolpyruvat-Decarboxylase
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
J	Joule (Energieeinheit)
k	Präfix: kilo- (10^3)
K	Kelvin (Temperatureinheit)
k_{cat}	Wechselzahl (Einheit = $[1/s]$)
K_m	Michaelis-Konstante (Einheit = $[M]$)
l	Liter (Volumeneinheit)
Lac	Lactose
LB	Luria-Bertani
LDH	L-Lactat-Dehydrogenase
ln	natürlicher Logarithmus
LU	Lumineszenzeinheit
μ	Präfix: mikro- (10^{-6})
m	Meter (Längeneinheit); Präfix: milli- (10^{-3})
M	molar
Me^{2+} -Ion	zweiwertiges Metall-Ion
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
min	Minute (Zeiteinheit)
MM	Minimalmedium
mol	Mol (Stoffmengeneinheit)
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MS	Massenspektroskopie
n	Präfix: nano- (10^{-9})
N	normal
NAD(H_2)	β -Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (reduziert)
NMR	Kernresonanzspektroskopie
NTA	Nitrilotriessigsäure
N-terminal	aminoterminal
OD_{600}	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
p	Präfix: piko- (10^{-12})
PAC	Phenylacetylcarbinol
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
Pdc	Pyruvat-Decarboxylase
PDH	Pyruvat-Dehydrogenase
PEP	Phospho <i>enol</i> pyruvat
Phtase	Phosphonoacetaldehyd-Hydrolase
P_i	anorganisches Phosphat
PK	Pyruvat-Kinase
PLP	Pyridoxal-5'-Phosphat
PnAA	Phosphonoacetaldehyd
PnPyr	Phosphonopyruvat
Pox	Pyruvat-Oxidase
Ppc	Phospho <i>enol</i> pyruvat-Carboxylase
Ppd	Phosphonopyruvat-Decarboxylase
PPH	Phosphonopyruvat-Hydrolase
Ppm	Phospho <i>enol</i> pyruvat-Phosphomutase
Pyk	Pyruvat-Kinase
Pyr	Pyruvat

RE	Rohextrakt
s	Sekunde (Zeiteinheit)
SDS	Natriumdodecylsulfat
Spd	Sulfoxyruvat-Decarboxylase
TEA	Triethanolamin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetracyclin
Tet ^r	Tetracyclin-Resistenz
ThDP	Thiamindiphosphat
TKT	Transketolase
T _m	Schmelztemperatur
TRICINE	N-tris(Hydroxymethyl)methylglycin
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
U	Unit (Enzymeinheit in [μmol/min])
u. a.	unter anderem
UDP	Undekaprenyl
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt (Spannungseinheit)
V ₀	Säulenleervolumen
V _E	Elutionsvolumen
v/v	Volumen pro Volumen
V _{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit (Einheit = [U/mg])
wt	Wildtyp

Basen

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
U	Uracil

Ein- und Dreibuchstabencode der Aminosäuren

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure (Aspartat)	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure (Glutamat)	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

1. Einleitung

1.1 Phosphonate

Phosphonopyruvat (Abbildung 1), das physiologische Substrat der Phosphonopyruvat-Decarboxylase, gehört zur Stoffklasse der Phosphonate, deren Charakteristikum eine stabile, kovalente Kohlenstoff-Phosphor-Bindung ist. Diese direkte C-P-Verknüpfung, die die bei den Phosphatestern existierende Kohlenstoff-Sauerstoff-Phosphor-Bindung ersetzt, ist auf chemischer und thermischer Ebene sehr reaktionsträge. Infolgedessen sind Phosphonate, entgegen den reaktiveren Sauerstoff-, Schwefel- und Stickstoff-Phosphor-Verbindungen, erheblich resistenter gegenüber chemischer Hydrolyse, thermischer Zersetzung und Photolyse. Aufgrund der Analyse von Proben eines Meteoriten war die Hypothese aufgestellt worden, dass Phosphonate die Vorläufer der Phosphate waren (Cooper *et al.*, 1992; de Graaf *et al.*, 1995) und dass mit zunehmender Oxygenierung der Atmosphäre sowohl die Phosphonate als auch die C-P-bindungsbildenden und -bindungsspaltenden Enzyme von den Phosphaten und den dazugehörigen Enzymen ersetzt worden waren (Jia *et al.*, 1999).

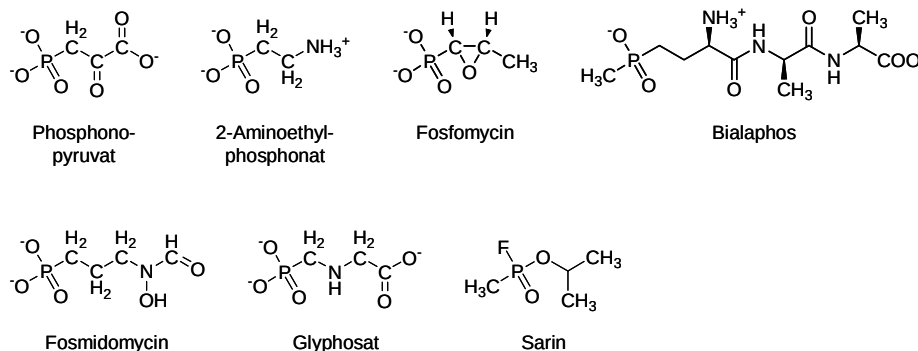


Abbildung 1 Strukturformeln verschiedener natürlich vorkommender und chemisch synthetisierter Phosphonate.

Verbindungen mit einer direkten Kohlenstoff-Phosphor-Bindung kommen in der Natur mehrfach vor. Desgleichen sind Phosphonate unter den chemisch synthetisierten Derivaten weit verbreitet.

Mit der Isolation von 2-Aminoethylphosphonat (AEP) (Abbildung 1), das aus in Pansen lebenden Flagellaten extrahiert worden war (Horiguchi und Kandatsu, 1959), war die erste Identifizierung einer C-P-Verbindung biogenen Ursprungs publiziert worden. AEP ist das Gegenstück zum polaren Phospholipid-Baustein Phosphoethanolamin $[\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-\text{PO}_3\text{H}_2]$ und ist in vielen niederen Organismen Bestandteil der so genannten Phosphonolipide (Baer

und Stanacey, 1964); ferner war 2-Aminoethylphosphonat in Polysacchariden (Korn *et al.*, 1973) und Proteinen (Kittredge und Roberts, 1969) nachgewiesen worden. Bei dem humanpathogenen Bakterium *Bacteroides fragilis*, das die Bildung von Abszessen innerhalb des Bauchraums verursacht, stellt der Phosphonolipid-haltige Kapsel-Polysaccharidkomplex den wichtigsten Virulenzfaktor dar. In anderen Fällen sind die AEP-enthaltenden Verbindungen für die Persistenz des Parasiten im Wirtsorganismus verantwortlich.

Antibiotika, die von verschiedenen *Streptomyces*-Stämmen als Sekundärmetabolite gebildet werden, repräsentieren eine weitere Phosphonat-Gruppe biogenen Ursprungs. Fosfomycin (Phosphonomycin) (Abbildung 1), das erste, aus Kulturen von *Streptomyces fradiae* isolierte Antibiotikum mit einer C-P-Bindung (Hendlin *et al.*, 1969), ist aufgrund seiner sehr geringen Toxizität gegenüber dem Menschen, seiner wenigen Nebenwirkungen sowie seines großen antibakteriellen Spektrums ein gebräuchliches Arzneimittel (Itoh *et al.*, 1995; Patel *et al.*, 1997). Als Analogon des Phosphoenolpyruvats hemmt Fosfomycin die UDP-GlcNAc-3-O-Enolpyruvyltransferase (Kahan *et al.*, 1974), das Enzym, das für den ersten Schritt der Bakterienzellwand-bildenden Peptidoglycan-Biosynthese verantwortlich ist (Gunetileke und Anwar, 1968; Marquardt *et al.*, 1992; Wanke *et al.*, 1992). Die Isolierung des Tripeptids Bialaphos (Abbildung 1) aus *S. viridochromogenes* Tü494 war erstmals von Bayer *et al.* (1972) beschrieben worden. Die antibiotische Wirkung dieser Substanz geht von Phosphinothricin, das neben zwei Alanin-Resten den dritten Peptid-Baustein darstellt, aus. Als Struktur-Analogon der Glutaminsäure inhibiert Phosphinothricin die enzymatische Aktivität der Glutamin-Synthetase (Bayer *et al.*, 1972). Das von *Streptomyces lavendulae* produzierte Sekundärmetabolit Fosmidomycin (Abbildung 1) hemmt die 1-Deoxy-D-xylulose-5-Phosphat-Reduktoisomerase (Kuzuyama *et al.*, 1998; Schwender *et al.*, 1999), das zweite Enzym des Mevalonat-unabhängigen Isoprenoid-Biosyntheseweges (Takahashi *et al.*, 1998). Diese alternative Isoprenoid-Synthese ist u. a. im Malaria-Erreger *Plasmodium falciparum* existent; demzufolge wird Fosmidomycin zur Malaria-Bekämpfung eingesetzt (Jomaa *et al.*, 1999; Missinou *et al.*, 2002).

Die chemische Synthese von Phosphonsäure-Derivaten war erstmals gegen Ende des neunzehnten Jahrhunderts beschrieben worden. Ihre industrielle Synthese war anhand der im Jahr 1905 entdeckten Arbuzov-Reaktion möglich geworden (zitiert in: Kononova und Nesmeyanova, 2002). Heutzutage bilden synthetische Phosphonate die Grundlage vieler Xenobiotika. Ein Beispiel ist das Herbizid Glyphosat (Abbildung 1), das als Analogon des Phosphoenolpyruvats die enzymatische Aktivität der 5-Enolpyruvylshikimat-3-Phosphat-Synthase inhibiert (Gruys *et al.*, 1992). Das Enzym katalysiert den sechsten Schritt des Shikimisäure-Weges, der u. a. in höheren Pflanzen für die Biosynthese der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan (zitiert in: Schmid und Amrhein, 1995) bzw. der Phenylpropanoide verantwortlich ist. Des Weiteren sind Phosphonate ökonomisch vielseitig einsetzbar. Beispiele hierfür sind korrosionshemmende und feuerlöschende Substanzen sowie in Haushaltsreinigern vorkommende Chelat-Zusätze (zitiert in: Kononova und Nesmeyanova, 2002). Das Phosphonat-Derivat Sarin (Abbildung 1) ist ein zu den Nervengasen zählender Kampfstoff. Dessen Wirkungsweise ist eine irreversible Hemmung

der Acetylcholinesterase, deren enzymatische Aktivität für die Übertragung von Nervenreizen zwischen zwei Nervenzellen essentiell ist (zitiert in: Abu-Qare and Abou-Donia, 2002).

Der unkontrollierte Einsatz chemisch synthetisierter Xenobiotika hat sich in den letzten Jahren aufgrund zunehmender Toxizität zu einem ökologischen Problem entwickelt. Demzufolge ist das Interesse am mikrobiellen Katabolismus von Phosphonaten gestiegen. Das Auffinden der diversen Phosphonat-Abbauwege und die Identifizierung der zugehörigen molekularen Reaktionsmechanismen sollen zur Auflösung der in der Umweltbiotechnologie auftretenden, praxisorientierten Probleme beitragen.

Wie bereits zuvor erwähnt, ist die enzymhemmende und die daraus resultierende antibiotische Wirkung der Moleküle Fosfomycin, Glyphosat und Phosphinothricin auf die Strukturanalogie zu den eigentlichen Substratmolekülen Phosphoenolpyruvat bzw. Glutaminsäure zurückzuführen. Bei der Aufklärung der Kristallstruktur von Enzymen macht man sich ebenfalls die inhibitorische Wirkung substratanaloger Substanzen zunutze: Zum Beispiel war Herzberg *et al.* (2002) mit Hilfe der C-P-Verbindung Phosphonopyruvat, das ein Struktur-Analogon des Phosphoenolpyruvats darstellt, die Kristallisierung des rekombinanten Enzyms Pyruvat-Phosphat-Dikinase aus *Clostridium symbiosum* gelungen. Auch bei der Verwendung von Antimetaboliten, die u. a. bei der Suche nach Aminosäure-überproduzierenden Mikroorganismen zum Einsatz kommen, ist die Strukturanalogie von entscheidender Bedeutung: Die C-P-Verbindung Aminomethylphosphonsäure [$\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-PO}_3\text{H}_2$] war beispielsweise als Glycin-Analogon für das Screening von Glycin-überproduzierenden *Ashbya gossypii*-Stämmen verwendet worden (Monschau, 1998).

1.1.1 Biosynthese von Phosphonaten

Die Entdeckung natürlich vorkommender Phosphonate brachte die Frage mit sich, welcher Reaktionsmechanismus (welche Reaktionsmechanismen) für die Bildung dieser in der Natur einzigartigen Kohlenstoff-Phosphor-Bindung verantwortlich ist (sind).

Untersuchungen zur Biosynthese des Phosphonolipid-Bausteins 2-Aminoethylphosphonat in *Tetrahymena pyriformis* sowie der Biosynthesewege verschiedener Antibiotika in diversen *Streptomyces*-Stämmen hatten darauf hingedeutet, dass Phosphoenolpyruvat ein Vorläufer der natürlich vorkommenden Phosphonate ist. Etwa 30 Jahre nach der Isolierung und Identifizierung von 2-Aminoethylphosphonat (Horiguchi und Kandatsu, 1959) hatten Bowman *et al.* (1988) von der reversiblen Umlagerung von Phosphoenolpyruvat und Phosphonopyruvat (Abbildung 2, A), die in Abhängigkeit von zweiwertigen Magnesium-Ionen durch die aus *Tetrahymena pyriformis* isolierte Phosphomutase katalysiert wird, berichtet. Die thermodynamisch bevorzugte Richtung dieser enzymkatalysierten Isomerisierung ist die Phosphoenolpyruvat-Bildung (Verhältnis $\geq 500:1$), d.h. die Bildung des Phosphatesters bzw. der Kohlenstoff-Sauerstoff-Phosphor-Bindung (Abbildung 2, A). Neben *Tetrahymena pyriformis* war das als Phosphoenolpyruvat-2,3-Phosphonomutase (Phosphoenolpyruvat-Phosphomutase; Ppm) bezeichnete Enzym u. a. auch aus der Miesmuschel *Mytilus edulis*

Einleitung

und dem Einzeller *Trypanosoma cruzi* isoliert und charakterisiert worden (Kim *et al.*, 1998; Sarkar *et al.*, 2003).

Die Phosphoenolpyruvat-Phosphomutase ist ein Mg^{2+} -abhängiges Tetramer und gehört zur Superfamilie der α/β -barrel-Enzyme, der u. a. auch das C-C-bindungsspaltende Enzym Isocitrat-Lyase angehört (Jia *et al.*, 1999). Kristallographische Studien sowie ortsgerichtete Mutagenesen diverser Aminosäurereste der Ppm aus *M. edulis* hatten veranschaulicht, dass der Umlagerung von Phosphoenolpyruvat zu Phosphonopyruvat ein dissoziativer Reaktionsmechanismus, bei dem das Metaphosphat-Molekül (PO_3^-) von der Pyruvyl-Einheit des Phosphoenolpyruvats getrennt wird, zugrunde liegt (Liu *et al.*, 2002).

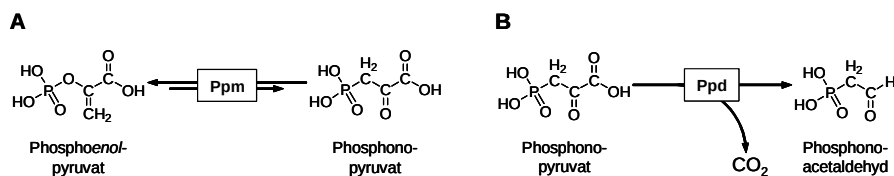


Abbildung 2 Schematische Darstellung der Reaktionen, die von der Phosphoenolpyruvat-Phosphomutase und der Phosphonopyruvat-Decarboxylase katalysiert werden. **A:** Reversible Isomerisierung von Phosphoenolpyruvat und Phosphonopyruvat, katalysiert durch die Mg^{2+} -abhängige Phosphoenolpyruvat-Phosphomutase (Ppm). **B:** Decarboxylierung von Phosphonopyruvat zum Phosphonoacetaldehyd, katalysiert durch die ThDP- und Me^{2+} -abhängige Phosphonopyruvat-Decarboxylase (Ppd).

Da das Gleichgewicht der Ppm-katalysierten Isomerisierung von Phosphoenolpyruvat und Phosphonopyruvat aufseiten des Phosphatesters liegt, bedarf es zur Etablierung der Kohlenstoff-Phosphor-Bindung einer zweiten, das Gleichgewicht verlagernden Reaktion. Der Mechanismus und die enzymatische Aktivität, die für den zweiten Schritt verantwortlich sind, waren im Jahr 1997 beschrieben worden: Anhand verschiedener *Streptomyces*-Mutanten, die in bestimmten Stadien der Phosphonat-Synthese blockiert waren, war die Identifizierung von Phosphonoacetaldehyd sowie der für dessen Bildung essentiellen Enzymaktivität gelungen (Nakashita *et al.*, 1997).

Phosphonoacetaldehyd entsteht durch die Decarboxylierung von Phosphonopyruvat (Abbildung 2, B). Das für diese Reaktion verantwortliche Enzym trägt den Namen Phosphonopyruvat-Decarboxylase (Ppd). Nakashita *et al.* (1997) hatten gezeigt, dass die enzymatische Aktivität der Phosphonopyruvat-Decarboxylase von den beiden Cofaktoren Thiamindiphosphat und Mg^{2+} -Ionen (jedoch auch von zweiwertigen Calcium- oder Mangan-Ionen (Zhang *et al.*, 2003b)) abhängig ist.

Ein bzw. drei Jahre nach den von Nakashita *et al.* (1997) publizierten Ergebnissen hatten Schwartz *et al.* (1998) und Nakashita *et al.* (2000) die Identifizierung und Charakterisierung der für die Phosphonopyruvat-Decarboxylase kodierenden Gene *ppd* aus *Streptomyces viridochromogenes* Tü494 und *bcpC* aus *Streptomyces hygroscopicus* veröffentlicht. Das *ppd*-Gen aus *S. viridochromogenes* Tü494, das zusammen mit den Genen *ppm* und *orfX*, die für die Phosphoenolpyruvat-Phosphomutase bzw. für ein Protein unbekannter Funktion

kodieren, isoliert worden war (Schwartz *et al.*, 1998), gehört zu einem vierundzwanzig Gene umfassenden Cluster, das für die Biosynthese des Sekundärmetabolits Bialaphos verantwortlich ist (Schwartz *et al.*, 2004). Die Tatsache, dass zur Etablierung der C-P-Bindung sowohl die enzymatische Aktivität der Phosphoenolpyruvat-Phosphomutase als auch die enzymatische Aktivität der Phosphonopyruvat-Decarboxylase erforderlich ist, war durch die translationale Kopplung der Gene *ppm* und *ppd* aus *S. viridochromogenes* Tü494 bestätigt worden (Schwartz *et al.*, 1998). Ebenso war beim *bcpC*-Gen aus *S. hygroscopicus* eine Überlappung des Stopp-Codons des *Ppm*-kodierenden Gens mit dem Start-Codon des *Ppd*-kodierenden Gens festgestellt worden (Nakashita *et al.*, 2000).

Die Proteinsequenzen der Phosphonopyruvat-Decarboxylasen aus *S. viridochromogenes* Tü494 und *S. hygroscopicus* umfassen 397 bzw. 401 Aminosäuren (Schwartz *et al.*, 1998; Nakashita *et al.*, 2000) und stimmen zu 74% überein. Anhand der Aminosäuresequenzen waren theoretische Größen von 41 kDa bzw. 41,6 kDa ermittelt worden (Schwartz *et al.*, 1998; Nakashita *et al.*, 2000). In beiden Proteinsequenzen war die für Thiamindiphosphat-abhängige Enzyme charakteristische Konsensussequenz (Reynen und Sahm, 1988; Hawkins *et al.*, 1989) identifiziert worden, was die von Nakashita *et al.* (1997) durchgeführten Enzymaktivitätsbestimmungen der Phosphonopyruvat-Decarboxylase bestätigte.

Zu Beginn dieser Arbeit waren Kenntnisse über die Phosphonopyruvat-Decarboxylase, die überwiegend auf der Identifizierung und Charakterisierung der jeweiligen *Ppd*-kodierenden Gene beruhten, auf die Antibiotika-Produzenten *Streptomyces hygroscopicus* (Nakashita *et al.*, 1997, 2000), *Streptomyces viridochromogenes* Tü494 (Schwartz *et al.*, 1998) und *Streptomyces wedmorensis* (Hidaka *et al.*, 1995; Kobayashi *et al.*, 2000) beschränkt. Die in dem 2-Aminoethylphosphonat-produzierenden Einzeller *Tetrahymena pyriformis* existierende Phosphonopyruvat-Decarboxylase ist ein membrangebundenes Enzym, weshalb sich deren Isolation zwecks Charakterisierung als schwierig erwiesen hatte (zitiert in: Zhang *et al.*, 2003b). Über die optimalen Reaktionsbedingungen, die kinetischen Parameter, das Substratspektrum, den Oligomerisierungszustand, die dreidimensionale Struktur und essentielle Aminosäurereste des Enzyms war zu Beginn dieser Arbeit nichts bekannt.

Im Jahr 2003 war erstmalig die biochemische und strukturelle Charakterisierung einer Phosphonopyruvat-Decarboxylase (aus *Bacteroides fragilis*) veröffentlicht worden (Zhang *et al.*, 2003b). Drei Jahre zuvor hatten Coyne *et al.* (2000) die Existenz der Gene *aepX*, *aepY* und *aepZ* in dem für Menschen pathogenen Organismus *B. fragilis* beschrieben, deren Genprodukte Phosphoenolpyruvat-Phosphomutase, Phosphonopyruvat-Decarboxylase und 2-Aminoethylphosphonat-Transaminase für die Synthese von 2-Aminoethylphosphonat (AEP) verantwortlich sind. Den Ergebnissen von Zhang *et al.* (2003b) zufolge hat die Phosphonopyruvat-Decarboxylase aus *Bacteroides fragilis* eine hohe Affinität gegenüber ihrem physiologischen Substrat Phosphonopyruvat, weist allerdings ein geringes Substratspektrum auf. Das pH-Optimum des Enzyms liegt zwischen 7,0 – 7,5 und neben Thiamindiphosphat und Mg^{2+} -Ionen können die zweiwertigen Metall-Ionen Calcium und Mangan als Cofaktoren eingesetzt werden. Das native Enzym besitzt eine trimere Quartärstruktur. Ferner waren Aminosäurereste identifiziert worden, die bedeutsam für die katalytische Aktivität und die Substrat-Bindung des Enzyms sind.

Einleitung

Die Kombination der beiden zuvor beschriebenen Reaktionen, die Ppm-katalysierte Isomerisierung von Phosphoenolpyruvat und die Ppd-katalysierte Decarboxylierung von Phosphonopyruvat ist für die Synthese vieler, in der Natur vorkommender Phosphonate identisch. Phosphonoacetaldehyd, das Produkt dieser gekoppelten Enzymkatalyse, stellt den Ausgangspunkt für die jeweilige artspezifische C-P-Verbindung dar (Abbildung 3).

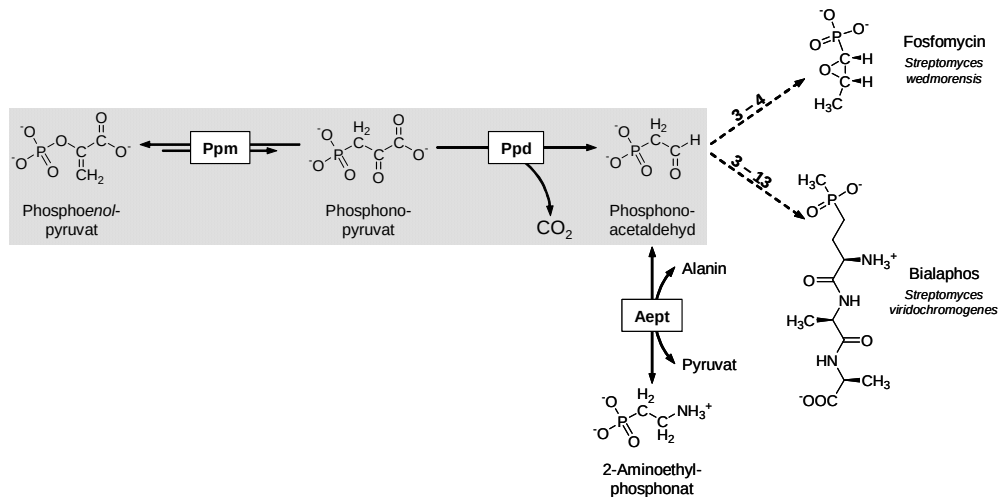


Abbildung 3 Schematische Darstellung der für viele Phosphonat-Biosynthesen essentiellen Enzymreaktionen (grauer Kasten), katalysiert durch die Phosphoenolpyruvat-Phosphomutase und die Phosphonopyruvat-Decarboxylase (verändert nach Schwartz *et al.*, 1998). Ausgehend vom Phosphonoacetaldehyd wird die jeweilige artspezifische Kohlenstoff-Phosphor-Verbindung (Beispiele: 2-Aminoethylphosphonat und die Sekundärmetabolite Bialaphos und Fostomycin) synthetisiert. Die Zahlenangaben 3 – 4 bzw. 3 – 13 kennzeichnen die Anzahl der einzelnen Syntheseschritte, die ausgehend von Phosphonoacetaldehyd für die Biosynthese von Fostomycin bzw. Bialaphos verantwortlich sind. **Aept**, 2-Aminoethylphosphonat-Transaminase; **Ppd**, Phosphonopyruvat-Decarboxylase; **Ppm**, Phosphoenolpyruvat-Phosphomutase.

Die Transaminierung von Phosphonoacetaldehyd resultiert in der Synthese des Phosphonolipid-Bausteins 2-Aminoethylphosphonat (AEP) (Abbildung 3). Diese Reaktion, bei der die Aminosäure Alanin als Donator der NH_3^+ -Gruppe fungiert, wird durch das Enzym 2-Aminoethylphosphonat-Transaminase (Aept) katalysiert, dessen Aktivität vom Cofaktor Pyridoxalphosphat abhängig ist. Allerdings ist die Übertragung der NH_3^+ -Gruppe eine Gleichgewichtsreaktion, was bedeutet, dass die 2-Aminoethylphosphonat-Transaminase neben der Alanin-abhängigen Transaminierung von Phosphonoacetaldehyd auch für die Pyruvat-abhängige Desaminierung von 2-Aminoethylphosphonat, die den AEP-Katabolismus einleitende Reaktion (Abbildung 5), verantwortlich ist. Pyridoxalphosphat dient bei der Aept-katalysierten Gleichgewichtsreaktion durch die abwechselnde Bildung eines internen und externen Aldimins als Zwischenstation für die zu transferierende NH_3^+ -Gruppe.

Der AEP-Biosyntheseweg war als erstes in dem einzelligen Organismus *Tetrahymena pyriformis* entdeckt worden (Barry *et al.*, 1988); die Existenz in dem humanpathogenen Bakterium *Bacteroides fragilis* war im Jahr 2000 veröffentlicht worden (Coyne *et al.*, 2000). Die von diversen *Streptomyces*-Spezies katalysierte Umsetzung von Phosphonoacetaldehyd zu 2-Hydroxypropylphosphonsäure [$\text{CH}_3\text{-CH(OH)-CH}_2\text{-PO}_3\text{H}_2$] führt im nachfolgenden Schritt zur Bildung des Antibiotikums Fosfomycin (Abbildung 3) (zitiert in: Seto und Kuzuyama, 1999). Demgegenüber ist die Synthese des Sekundärmetabolits Bialaphos, das sich aus der anormalen Aminosäure Phosphinothricin [$\text{HOOC-CH(NH}_2\text{)-(CH}_2\text{)}_2\text{-PO(OH)-CH}_3$] und zwei Alanin-Resten zusammensetzt, ungleich komplizierter (Abbildung 3). Das Charakteristikum des Phosphinothricin-Moleküls ist eine in der Natur nur sehr selten vorkommende Kohlenstoff-Phosphor-Kohlenstoff-Bindung: Die erste der beiden C-P-Bindungen wird mit Hilfe des Enzyms Carboxyphosphonoenolpyruvat-Phosphonomutase etabliert (Hidaka *et al.*, 1990; Pollack *et al.*, 1992). Die zweite, zwischen einer CH_3 -Gruppe und dem Phosphor-Atom ausgebildete Kohlenstoff-Phosphor-Bindung wird durch eine enzymatische Methylierung erzeugt (zitiert in: Seto und Kuzuyama, 1999).

1.1.2 Biologischer Abbau von Phosphonaten

Phosphor, der neben Kohlenstoff, Sauerstoff und Stickstoff ein grundlegendes Element der mikrobiologischen Zellphysiologie und Biochemie darstellt, ist Bestandteil von biologisch bedeutsamen Molekülen, wie beispielsweise Nukleinsäuren, Phospholipide, Polysaccharide, Proteine sowie Cofaktoren, die den Energietransport und die Katalyse vieler Zellprozesse beeinflussen. Die vorwiegend zugängliche Phosphorquelle der Mikroorganismen sind die Orthophosphate und die leicht zu hydrolysierenden Phosphatester, die Phosphor in seiner höchsten Oxidationsstufe enthalten. Demgegenüber gibt es Mikroorganismen, die vorwiegend unter Phosphat-limitierenden Bedingungen in der Lage sind, sowohl natürlich vorkommende als auch synthetisierte Phosphonate als Phosphorquelle zu nutzen.

Die strukturelle Vielfalt der Phosphonat-Verbindungen erfordert das Vorhandensein diverser Abbausysteme bzw. ein Enzymsystem mit einem breiten Substratspektrum. Bislang sind vier verschiedene bakterielle Enzyme bzw. Enzymkomplexe beschrieben worden, die die für die Phosphonat-Mineralisierung essentielle Spaltung der Kohlenstoff-Phosphor-Bindung katalysieren: C-P-Lyase, Phosphonoacetaldehyd-Hydrolase, Phosphonoacetat-Hydrolase und Phosphonopyruvat-Hydrolase.

Die C-P-Lyase ist ein Enzymkomplex mit einem breiten Substratspektrum, die in intakten Zellen die direkte C-P-Bindungsspaltung von Alkyl- und Arylphosphonaten katalysiert (Wackett *et al.*, 1987a); die Spaltprodukte sind anorganisches Phosphat und die jeweilige, substratanaloge Kohlenwasserstoff-Verbindung (Abbildung 4). Der für die C-P-Lyase postulierte Reaktionsmechanismus ist eine auf der Bildung von Radikalen basierende Dephosphorylierung (Frost *et al.*, 1987). Den Ergebnissen von Metcalf und Wanner (1993a) zufolge wird die C-P-Lyase in *E. coli* von dem vierzehn Gene umfassenden Operon

Einleitung

phnCDEFGHIJKLMNOP kodiert. Die Gene dieses *phn*-Operons werden vom *pho*-Regulon kontrolliert, so dass ihre Expression nur im Fall einer Phosphatlimitation stattfindet (Wackett *et al.*, 1987b). Potenziell membrangebundene Enzymkomplexkomponenten sind die mögliche Erklärung für die in zellfreien Extrakten nicht nachweisbare C-P-Lyase-Aktivität (Metcalf und Wanner, 1993b).

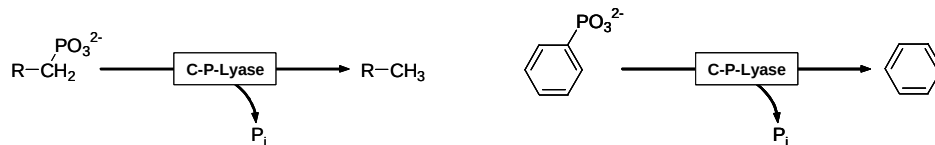


Abbildung 4 Abbau von Alkyl- und Arylphosphonaten, katalysiert durch die C-P-Lyase. Die Produkte dieser direkten C-P-Bindungsspaltung sind anorganisches Phosphat (P_i) und die jeweilige, substratanaloge Kohlenwasserstoff-Verbindung.

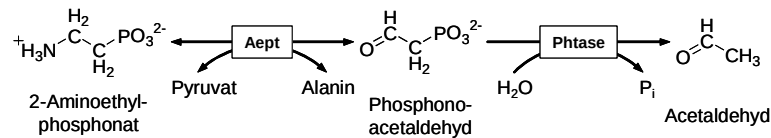


Abbildung 5 Abbau von 2-Aminoethylphosphonat, katalysiert durch die Enzyme 2-Aminoethylphosphonat-Transaminase (Aept) und Phosphonoacetaldehyd-Hydrolase (Phtase). Ausgehend von 2-Aminoethylphosphonat wird der durch die Übertragung der NH_3^+ -Gruppe entstandene Phosphonoacetaldehyd hydrolytisch gespalten; die Spaltprodukte sind Acetaldehyd und anorganisches Phosphat (P_i).

Die Phosphonoacetaldehyd-Hydrolase (Phosphonatase), die als erstes aus dem Bakterium *Bacillus cereus* aufgereinigt und charakterisiert worden war (La Nauze *et al.*, 1970), katalysiert die hydrolytische C-P-Bindungsspaltung von Phosphonoacetaldehyd. Diese Reaktion stellt den zweiten Schritt im Abbau von 2-Aminoethylphosphonat dar (Abbildung 5). Im Verlauf der Phosphonatase-katalysierten Reaktion kommt es zwischen einem konservierten Lysin-Rest und der Carbonylgruppe des Phosphonoacetaldehyds zur Bildung einer Schiff'schen Base (Olsen *et al.*, 1988). Die Mg^{2+} -abhängige Phosphonatase gehört zur Superfamilie der HAD-Enzyme (2-haloalkanoic acid dehalogenase) (Morais *et al.*, 2000); die Mitglieder dieser Enzymfamilie katalysieren unter Zuhilfenahme eines konservierten Aspartat-Restes die nukleophile Substitution an Phosphor- oder Kohlenstoff-Zentren.

Phosphonoacetaldehyd, das Substrat der Phosphonatase, entsteht durch die Pyridoxalphosphat-abhängige Übertragung der NH_3^+ -Gruppe von 2-Aminoethylphosphonat auf Pyruvat (La Nauze und Rosenberg, 1968) (Abbildung 5). Die Aufreinigung des für diese Reaktion verantwortlichen Enzyms 2-Aminoethylphosphonat:Pyruvat-Aminotransferase (2-Aminoethylphosphonat-Transaminase; Aept) aus dem Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* A237 war im Jahr 1983 beschrieben worden (Dumora *et al.*, 1983). Kim *et al.*

(2002) hatten die Aufreinigung und Charakterisierung der 2-Aminoethylphosphonat-Transaminase aus *Salmonella enterica* Serovar *typhimurium* veröffentlicht.

Genomanalysen, die u. a. in *Salmonella typhimurium* LT2 durchgeführt worden waren (Jiang *et al.*, 1995), hatten ergeben, dass die Gene der 2-Aminoethylphosphonat-Transaminase und der Phosphonoacetaldehyd-Hydrolase (*phnW* und *phnX*) Bestandteile eines ca. 7,2 kb großen Genclusters sind. Ihre Expression wird vom *pho*-Regulon kontrolliert und somit nur unter Phosphat-limitierenden Bedingungen induziert.

Die bakterielle Phosphonat-Nutzung ist bei der C-P-Lyase sowie beim Aept- und Phtase-katalysierten Abbau von 2-Aminoethylphosphonat von der Phosphatkonzentration innerhalb der Zelle abhängig. In beiden Fällen stehen sowohl die Phosphonat-Aufnahme als auch die Spaltung der C-P-Bindung unter der direkten Kontrolle des *pho*-Regulons, das wiederum nur unter Phosphat-limitierenden Bedingungen exprimiert wird. Demgegenüber werden die bakteriellen Enzyme Phosphonoacetat-Hydrolase und Phosphonopyruvat-Hydrolase durch ihr eigenes Substrat induziert; ferner ist ihre Expression vom zur Verfügung stehenden Phosphor unabhängig.

Die Hydrolyse von Phosphonoacetat, ein natürlich vorkommendes Phosphonat mit antibiotischer und antiviraler Wirkung, führt zur Freisetzung von Acetat und anorganischem Phosphat. Die Verwertung von Phosphonoacetat als alleinige Kohlenstoff- und Phosphorquelle war als erstes bei dem aus dem Boden isolierten Bakterium *Pseudomonas fluorescens* 23F beschrieben worden (McMullan *et al.*, 1992). Drei Jahre später hatten McGrath *et al.* (1995) die Aufreinigung und Charakterisierung der für die hydrolytische Spaltung verantwortlichen Phosphonoacetat-Hydrolase publiziert.

Phosphonoalanin ist ein in der Natur häufig vorkommendes Phosphonat, das von vielen niederen Organismen, wie beispielsweise der Seeanemone *Zoanthus sociatus* oder dem Einzeller *Tetrahymena pyriformis*, synthetisiert wird (Kittredge und Hughes, 1964). Im Jahr 1998 war unter Verwendung von zellfreien Extrakten des Stammes *Burkholderia cepacia* Pal6, der Phosphonoalanin als alleinige Kohlenstoff- und Energie-, Stickstoff- und Phosphorquelle nutzen kann (Ternan *et al.*, 1998), die bis zu diesem Zeitpunkt unbekannte enzymatische C-P-Bindungsspaltung von Phosphonopyruvat beschrieben worden (Ternan und Quinn, 1998). Phosphonopyruvat, das Produkt der Phosphonoalanin-Desaminierung, wird durch die als Phosphonopyruvat-Hydrolase bezeichnete Enzymaktivität, die unabhängig von der Phosphatkonzentration induziert wird, zu Pyruvat und anorganischem Phosphat abgebaut (Abbildung 6). Kulakova *et al.* (2003) war die Aufreinigung und Charakterisierung der aus dem Bodenbakterium *Variovorax* sp. Pal2 stammenden Phosphonopyruvat-Hydrolase, ein Enzym, das im nativen Zustand als Homodimer vorliegt, gelungen. Die Aminosäuresequenz hatte angedeutet, dass die Phosphonopyruvat-Hydrolase zur Familie der α/β -barrel-Enzyme der Phosphoenolpyruvat-Phosphomutase und der Isocitrat-Lyase (Jia *et al.*, 1999) gehört (Kulakova *et al.*, 2003).

Die Existenz der Phosphonopyruvat-Hydrolase zeigt, dass Phosphonopyruvat nicht nur ein essentielles Zwischenprodukt der Phosphonat-Biosynthese darstellt (siehe 1.1.1), sondern auch als Abbauprodukt des Phosphonoalanins verschiedenen Bakterien als Kohlenstoff- und Phosphorquelle dienen kann.

Einleitung

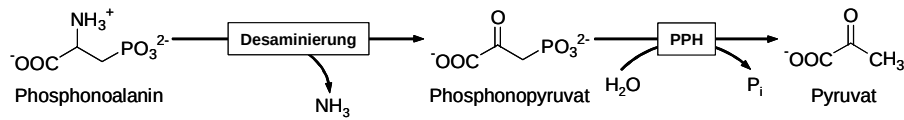


Abbildung 6 Abbau von Phosphonoalanin. Das durch die Phosphonoalanin-Desaminierung entstandene Phosphonopyruvat wird durch die Phosphonopyruvat-Hydrolase (PPH) hydrolytisch gespalten; die Spaltprodukte sind Pyruvat und anorganisches Phosphat (P_i).

1.2 Thiamindiphosphat-abhängige Enzyme

Thiamin, ein zur Gruppe der Vitamine gehörendes organisches Molekül (Vitamin B_1), ist der Vorläufer des Thiamindiphosphats, ein für viele Enzyme essentieller Cofaktor. Thiamin wird unter ATP-Verbrauch durch das Enzym Thiamin-Diphosphokinase zum biologisch aktiven Thiamindiphosphat (ThDP) umgesetzt (Nosaka *et al.*, 1993).

Das ThDP-Molekül besteht aus drei verschiedenen Untereinheiten (Abbildung 7): Das zentrale Fragment ist der Thiazoliumring, der aufgrund des katalytisch aktiven C2-Atoms für die chemische Reaktivität des Thiamindiphosphats verantwortlich ist (Breslow, 1958). Für dessen Aktivierung wird das im Pyrimidinring an der 1'-Position befindliche Stickstoff-Atom benötigt (Kern *et al.*, 1997). Die Verankerung des Cofaktors innerhalb des Enzyms wird sowohl vom Pyrimidinring als auch vom Diphosphat-Rest, der über ein zweiwertiges Metall-Ion gebunden wird (Muller *et al.*, 1993), gewährleistet. Demzufolge sind Enzyme, deren Aktivitäten von Thiamindiphosphat als Cofaktor abhängen, zusätzlich auf die Existenz eines bivalenten Metall-Ions angewiesen.

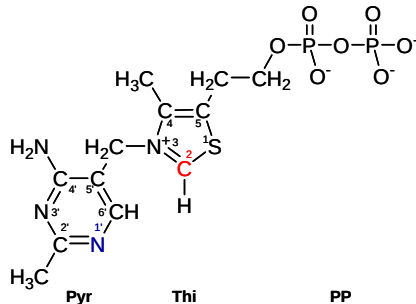


Abbildung 7 Strukturformel und Nomenklatur des Thiamindiphosphat-Moleküls. **Pyr:** Pyrimidinring mit dem für die Thiamindiphosphat-Aktivierung erforderlichen N1'-Atom (blau gedruckt); **Thi:** Thiazoliumring mit dem katalytisch aktiven C2-Atom (rot gedruckt); **PP:** Diphosphat-Rest.

Muller *et al.* (1993) hatten durch den Kristallstrukturen-Vergleich der ThDP-abhängigen Enzyme Transketolase aus *Saccharomyces cerevisiae* (Lindqvist *et al.*, 1992), Pyruvat-

Oxidase aus *Lactobacillus plantarum* (Muller und Schulz, 1993) und Pyruvat-Decarboxylase aus *Saccharomyces uvarum* (Dyda *et al.*, 1993) entdeckt, dass die Bindung des Cofaktors trotz beträchtlicher Unterschiede der Quartärstrukturen auf eine ähnliche Art und Weise erfolgt. Das als „ThDP-Bindungsfalte“ bezeichnete Strukturelement wird von zwei Domänen zweier verschiedener Enzym-Untereinheiten ausgebildet. In allen drei Enzymen weist das gebundene Thiamindiphosphat die so genannte „V-Konformation“, die eine der drei grundlegenden Ausrichtungen der beiden Ringstrukturen zueinander beschreibt (Pletcher und Sax, 1972), auf. Diese V-Konformation, die in Abwesenheit von Proteinen nur sehr selten vorzufinden ist, stellt die biologisch aktive Form des Thiamindiphosphats dar.

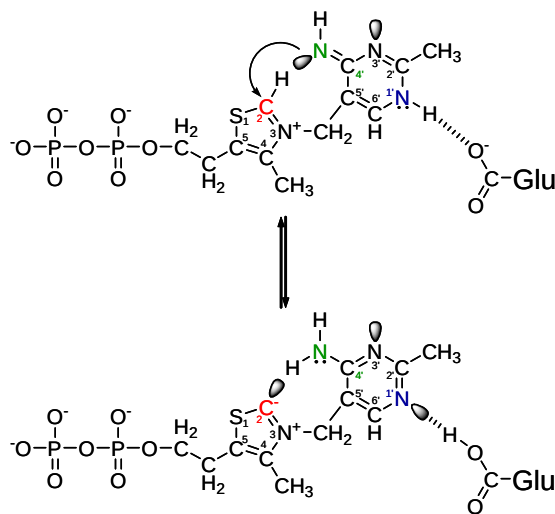


Abbildung 8 Aktivierung von Thiamindiphosphat innerhalb eines Enzyms, eingeleitet durch die Wechselwirkung eines konservierten Glutamat-Restes mit dem in der 1'-Position befindlichen Stickstoff-Atom des Pyrimidinrings (verändert nach Chabrière *et al.*, 2001).

Wie bereits erwähnt, hatte Breslow (1958) mit Hilfe seiner Deuterium-Austauschstudien gezeigt, dass die Reaktivität des Thiamindiphosphats vom C2-Atom des Thiazoliumrings ausgeht, da dieses als Carbanion einen nukleophilen Angriff auf den Carbonyl-Kohlenstoff des jeweiligen Substrats bewerkstelligen kann. Die die Ausbildung des Nukleophils einleitende Reaktion ist die Wechselwirkung eines konservierten Glutamat-Restes mit dem an der 1'-Position befindlichen Stickstoff-Atom des Pyrimidinrings (Kern *et al.*, 1997). Die Folge dieser Interaktion ist die Aktivierung der am C4'-Atom des Pyrimidinrings befindlichen Aminogruppe, die als effizienter Akzeptor für das Proton des reaktiven C2-Atoms fungieren kann (Abbildung 8).

Im deprotonierten Zustand (Abbildung 8) ist es dem C2-Atom des Thiazoliumrings möglich, den Carbonyl-Kohlenstoff des jeweiligen Substrats nukleophil anzugreifen, was im Substratmolekül die Spaltung einer C-C-Bindung zur Folge hat. Die Bindungsspaltung führt

Einleitung

zur Freisetzung eines Substratfragmentes und zur Ausbildung eines carbanionischen Aldehyd/ThDP-Intermediates („aktiver Aldehyd“).

Enzyme, deren Aktivitäten von Thiamindiphosphat und zweiwertigen Metall-Ionen abhängig sind, sind in nahezu allen wichtigen Stoffwechselwegen vorzufinden (Tabelle 1) und katalysieren eine große Bandbreite unterschiedlicher Reaktionen. Das Reaktionsspektrum dieser Enzyme umfasst die nicht-oxidative Decarboxylierung sowie die oxidative Decarboxylierung von α -Ketosäuren, die Spaltung einer C-C-Bindung und die Carboligase (Tabelle 1). Das Charakteristikum dieser Enzymkatalysen ist die Bildung eines ThDP-gebundenen „aktiven Aldehyds“ (Schellenberger, 1967), der in Abhängigkeit vom jeweiligen Enzym entweder protoniert und freigesetzt (nicht-oxidative Decarboxylierung von α -Ketosäuren), oxidiert und freigesetzt (oxidative Decarboxylierung von α -Ketosäuren) oder auf ein Akzeptorsubstrat übertragen (Carboligase) wird.

Einige der in Tabelle 1 aufgelisteten Enzyme sind in einer Carboligase-Nebenreaktion, die als Acyloin-Kondensation bezeichnet wird, zur Bildung von α -Hydroxyketonen befähigt (Sprenger und Pohl, 1999). Zu diesen Enzymen gehört u. a. die Pyruvat-Decarboxylase (Chen und Jordan, 1984; Bringer-Meyer und Sahm, 1988; Crout *et al.*, 1991), deren Reaktionszyklus als Beispiel einer ThDP-abhängigen Enzymkatalyse in Abbildung 9 schematisch dargestellt ist.

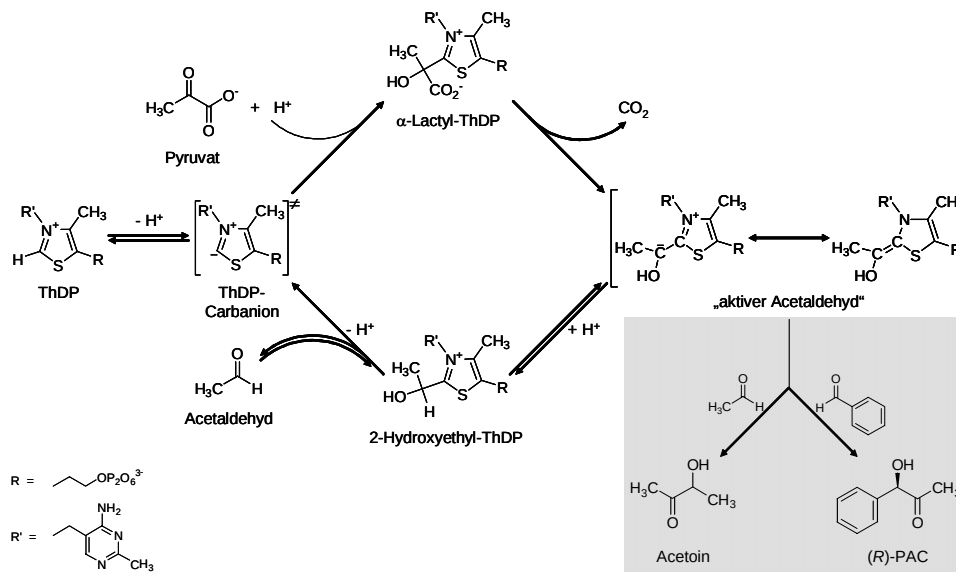


Abbildung 9 Thiamindiphosphat-abhängiger Reaktionszyklus der Pyruvat-Decarboxylase (verändert nach Goetz *et al.*, 2001). Die Pyruvat-Decarboxylierung führt nach der Abspaltung von Kohlendioxid zur Freisetzung des Acetaldehyds. Die Carboligase-Nebenreaktion resultiert in Gegenwart von Acetaldehyd oder Benzaldehyd in der Synthese von Acetoin bzw. (R)-Phenylacetylcarbinol (grauer Kasten).

Tabelle 1 Übersicht über verschiedene Thiamindiphosphat-abhängige Enzyme (zuzüglich der Organismen/Organelle und der Stoffwechselwege, in denen sie vorzufinden sind), sortiert nach den von ihnen katalysierten Hauptreaktionen (verändert nach Pohl *et al.*, 2004). **AHAS**, Acetohydroxysäure-Synthase; **ALS**, Acetolactat-Synthase; **BAL**, Benzaldehyd-Lyase; **BFD**, Benzoylformiat-Decarboxylase; **DXS**, 1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat-Synthase; **IPDC**, Indolpyruvat-Decarboxylase; **Pdc**, Pyruvat-Decarboxylase; **PDH**, Pyruvat-Dehydrogenase; **Pox**, Pyruvat-Oxidase; **Ppd**, Phosphonopyruvat-Decarboxylase; **TK**, Transketolase.

Enzym	Organismus/Organell	Stoffwechselweg	Referenz
nicht-oxidative Decarboxylierung von α-Ketosäuren			
BFD	<i>Pseudomonas putida</i> ; diverse Bakterien	Mandelsäure-Abbau	Hasson <i>et al.</i> (1998); Iding <i>et al.</i> (2000)
IPDC	<i>Enterobacter cloacae</i> ; diverse Bakterien	Tryptophan-Abbau	Koga <i>et al.</i> (1992); Koga (1995); Schütz <i>et al.</i> (2003)
Pdc	Bakterien (<i>Zymomonas mobilis</i> und <i>Zymobacter palmae</i>); diverse Hefen (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>); verschiedene Pflanzen	Glykolyse; alkoholische Gärung	Bringer-Meyer <i>et al.</i> (1986); Dyda <i>et al.</i> (1993)
Ppd	<i>Bacteroides fragilis</i> ; diverse <i>Streptomyces</i> -Stämme; <i>Tetrahymena pyriformis</i>	AEP-Synthese; Sekundärmetabolit- Synthese	Nakashita <i>et al.</i> (1997); Schwartz <i>et al.</i> (1998); Zhang <i>et al.</i> (2003b)
oxidative Decarboxylierung von α-Ketosäuren			
PDH	Prokaryonten und Eukaryonten (nahezu ubiquitär)	Glukose-Metabolismus (Acetyl-CoA-Synthese)	Stephens <i>et al.</i> (1983); Arjunan <i>et al.</i> (2002)
Pox	<i>Lactobacillus plantarum</i> ; diverse Bakterien	Essigsäure-Bildung	Sedewitz <i>et al.</i> (1984a, b); Tittmann <i>et al.</i> (2000)
Spaltung einer C-C-Bindung			
BAL	<i>Pseudomonas fluorescens</i>		González und Vicuña (1989); Hinrichsen <i>et al.</i> (1994); Demir <i>et al.</i> (2001)
Carboligation			
AHAS	Bakterien; Pilze; verschiedene Pflanzen; Säugetiere; Chloroplasten; Mitochondrien	Synthese der Aminosäuren mit verzweigter Seitenkette	Chang und Duggleby (1997); Hill <i>et al.</i> (1997); Pang <i>et al.</i> (2002)
ALS	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,3-Butandiol-Weg	Pang <i>et al.</i> (2004)
DXS	diverse Bakterien; Pflanzen	Mevalonat-unabhängige Isoprenoid-Synthese	Sprenger <i>et al.</i> (1997); Schürmann (2001)
TK	Bakterien; Hefen; Pflanzen; Säugetiere	Pentosephosphat-Weg	Sprenger <i>et al.</i> (1995b); Schörken und Sprenger (1998)

Der Reaktionszyklus der Pyruvat-Decarboxylase wird durch die enzymkatalysierte Aktivierung des Thiamindiphosphats (Kern *et al.*, 1997) und den nachfolgenden nukleophilen Angriff des dabei entstandenen ThDP-Carbanions auf den Carbonyl-Kohlenstoff des Pyruvats eingeleitet. Das daraus resultierende Molekül α -Lactyl-ThDP wird durch die Abspaltung von Kohlendioxid stabilisiert, was die Bildung eines carbanionischen Acetaldehyd/ThDP-Intermediates zur Folge hat. Dessen Protonierung führt über die Zwischenstufe des 2-Hydroxyethyl-ThDP zur Acetaldehyd-Freisetzung und zur Regeneration des ThDP-Carbanions (zitiert in: Pohl, 1997; Sprenger und Pohl, 1999). Die α -Hydroxyketone Acetoin und (R)-Phenylacetylcarbinol entstehen durch die Kondensation des „aktiven Acetaldehyds“ mit einem zweiten Acetaldehyd-Molekül bzw. einem Benzaldehyd-Molekül (Chen und Jordan, 1984; Bringer-Meyer und Sahm, 1988; Crout *et al.*, 1991).

1.2.1 Pyruvat-Decarboxylase

Die Pyruvat-Decarboxylase (Pdc) gehört zur Enzymfamilie der α -Ketodecarboxylasen. Dieses Enzym vereinigt mit der nicht-oxidativen Decarboxylierung von Pyruvat und einer Nebenreaktion als Carboligase, die in der Bildung von α -Hydroxyketonen resultiert, zwei unterschiedliche Syntheseigenschaften (Abbildung 9). Die von fermentierender Hefe katalysierte Pyruvat-Decarboxylierung war erstmals in den Jahren 1911 und 1913 beschrieben worden (Neuberg und Karczag, 1911a, b; Neuberg und Rosenthal, 1913). Die Carboligase-Aktivität fermentierender Hefen war 1921 anhand der Synthese von (R)-Phenylacetylcarbinol entdeckt worden (Neuberg und Hirsch, 1921). Die durch intakte Hefezellen katalysierte Produktion von (R)-Phenylacetylcarbinol war eine der ersten kommerzialisierten Biotransformationsprozesse; bis in die heutige Zeit kommt diese, durch die Pyruvat-Decarboxylase katalysierte Reaktion als Vorstufensynthese des Anti-Asthmatikums L-Ephedrin zum Einsatz (Knoll-Verfahren) (Hildebrandt und Klavehn, 1932).

Die Pyruvat-Decarboxylase ist eines der am besten charakterisierten ThDP-abhängigen Enzyme. Die dreidimensionale Struktur der Pdc aus *Saccharomyces uvarum* war als erstes aufgeklärt worden (Dyda *et al.*, 1993). Drei bzw. fünf Jahre später waren die Kristallstrukturen der Pyruvat-Decarboxylasen aus *Saccharomyces cerevisiae* und *Zymomonas mobilis* beschrieben worden (Arjunan *et al.*, 1996; Dobritzsch *et al.*, 1998). Kombiniert mit den Techniken der ortsgerichteten Mutagenese und der Struktur-Modellierung ermöglichten die kristallographischen Studien die Analyse des Pdc-Reaktionsmechanismus und die Aufklärung der Interaktionen zwischen Enzym und Cofaktor bzw. Substrat.

Entsprechend den Pyruvat-Decarboxylasen der Hefen *S. uvarum* und *S. cerevisiae* weist das bakterielle Enzym aus *Zymomonas mobilis* eine homotetramere Struktur auf, dessen Polypeptidketten sich in die drei Domänen PYR, R und PP unterteilen lassen (Dobritzsch *et al.*, 1998) (Abbildung 10). Die räumliche Anordnung der vier identischen Untereinheiten führt innerhalb des *Z. mobilis* Pdc-Moleküls zur Ausbildung von vier Cofaktor- und Substrat-

bindestellen. Diese Bindestellen sind in schmalen Spalten angeordnet, die zwischen den Oberflächen der PYR-Domänen einer Untereinheit und den Oberflächen der PP-Domänen einer anderen Untereinheit ausgebildet werden.

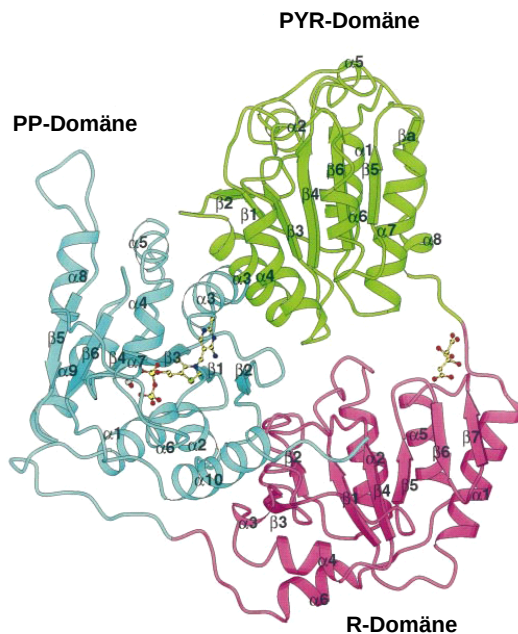


Abbildung 10 Schematische Darstellung der Untereinheit der Pyruvat-Decarboxylase aus *Zymomonas mobilis* mit der Kennzeichnung der Sekundärstrukturelemente sowie den gebundenen Cofaktoren und dem Citrat-Ion (verändert nach Dobritzsch *et al.*, 1998).

Analog zu anderen ThDP-abhängigen Enzymen (Lindqvist *et al.*, 1992; Muller und Schulz, 1993; Dyda *et al.*, 1993) liegt der gebundene Cofaktor in der so genannten V-Konformation vor. Der Pyrimidinring des Thiamindiphosphats interagiert mit der PYR-Domäne einer Untereinheit. Demgegenüber reagiert der Rest des ThDP-Moleküls mit der PP-Domäne einer anderen Untereinheit, wobei die Verankerung des Diphosphat-Restes über ein bivalentes Magnesium-Ion erfolgt. Dieses Mg^{2+} -Ion bildet zusammen mit zwei Sauerstoffatomen des Diphosphat-Restes, den beiden Seitenketten-Sauerstoffatomen der Aminosäuren Aspartat-440 und Asparagin-467, dem Hauptketten-Sauerstoffatom des Glycin-Restes 469 (Nummerierung entsprechend der *Z. mobilis* Pdc) und einem Wassermolekül eine oktaedrische Struktur (Dobritzsch *et al.*, 1998) (Abbildung 11).

Mit Hilfe der von Tittmann *et al.* (2003) durchgeführten NMR-Studien war bestätigt worden, dass die enzymkatalysierte Aktivierung des Thiamindiphosphats durch den konservierten Aminosäurerest Glutamat-50 (Nummerierung entsprechend der *Z. mobilis* Pdc) eingeleitet wird (Kern *et al.*, 1997; Dobritzsch *et al.*, 1998) (Abbildung 11). Das aktive Zentrum der

Einleitung

Z. mobilis Pdc wird u. a. von den Seitenketten der Aminosäuren Aspartat-27, Histidin-113, Histidin-114 und Glutamat-473 umgeben (Dobritzsch *et al.*, 1998) (Abbildung 11).

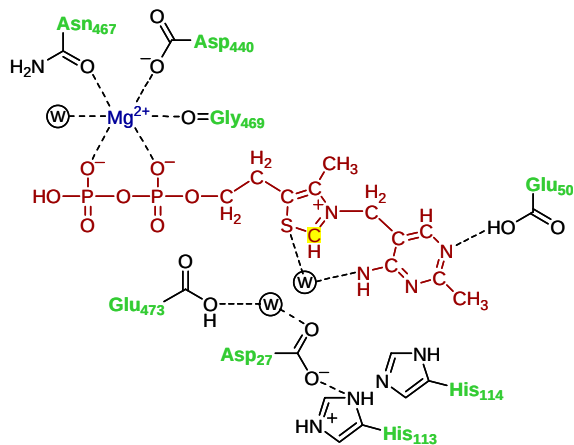


Abbildung 11 Schematische Darstellung des aktiven Zentrums der Pyruvat-Decarboxylase aus *Z. mobilis* (verändert nach Chang *et al.*, 1999). Wechselwirkungen der essentiellen Aminosäuren (Bezeichnung in grün) mit den Cofaktoren Thiamindiphosphat (rot) und Mg²⁺ (blau) sind als unterbrochene Linien dargestellt. Das reaktive C2-Atom im Thiazoliumring des Thiamindiphosphats ist gelb unterlegt. Die beiden Wassermoleküle (W) in der Nähe des C2-Atoms kennzeichnen die Substratbindestelle.

Die Nebenaktivität der Pyruvat-Decarboxylase, die in der Bildung von α -Hydroxyketonen resultiert, war aufgrund des Potentials zur Synthese neuartiger Acyloin-Verbindungen eingehend untersucht worden. Bruhn *et al.* (1995) hatten mittels ortsgerichteter Mutagenese entdeckt, dass die Carboligase-Aktivität der *Z. mobilis* wt-Pdc von dem sperrigen Aminosäurerest Tryptophan-392, der in dem zum aktiven Zentrum hinführenden Kanal lokalisiert ist, negativ beeinflusst wird. Anhand von Untersuchungen zur Steigerung der Carboligase-Aktivität, die einen möglichst geringen Einfluss auf die enzymatische Aktivität hat, war das Mutein PDCW392M, das heutzutage zur Produktion von (*R*)-Phenylacetylcarbinol eingesetzt wird (Goetz *et al.*, 2001; Rosche *et al.*, 2004), identifiziert worden (Pohl, 1997).

Die Pyruvat-Decarboxylase stellt zusammen mit der Acetohydroxysäure-Synthase, der Benzaldehyd-Lyase, der Benzoylformiat-Decarboxylase, der 1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat-Synthase und der Transketolase eine große Gruppe von Thiamindiphosphat-abhängigen Enzymen dar, deren biochemische Eigenschaften und Substratspektren bereits sehr gut charakterisiert sind. Diese Enzyme bieten aufgrund der von ihnen katalysierten Carboligation vielfältige Möglichkeiten zur Etablierung neuartiger Synthesewege, die in der Produktion neuer chiraler Acyloin-Verbindungen resultieren (zitiert in: Schörken und Sprenger, 1998; Sprenger und Pohl, 1999; Pohl *et al.*, 2002; Pohl *et al.*, 2004).

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung des für die Biosynthese von Phosphonaten essentiellen Enzyms Phosphonopyruvat-Decarboxylase (Ppd) aus *Streptomyces viridochromogenes* Tü494, das zur großen Familie der Thiamindiphosphat-abhängigen Enzyme gehört, im Hinblick auf seine biochemischen, strukturellen und funktionellen Eigenschaften.

Die zu Beginn der Arbeit vorliegenden Kenntnisse beschränkten sich vornehmlich auf die Identifizierung und Charakterisierung verschiedener Ppd-kodierender Gene und deren Genprodukte; über die biochemischen Eigenschaften (Kinetik, Substratspektrum, etc.) und die Struktur-Funktionsbeziehungen (Oligomerisierungszustand, dreidimensionale Struktur und konservierte Aminosäurereste) des Enzyms war bis dato nichts bekannt. Allerdings hatte die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. D. Dunaway-Mariano (Department of Chemistry, University of New Mexico, Albuquerque, USA) im Jahr 2003 erstmals einen Artikel über die biochemische und strukturelle Charakterisierung der Phosphonopyruvat-Decarboxylase aus dem für den Menschen pathogenen Organismus *Bacteroides fragilis* veröffentlicht (Zhang *et al.*, 2003b).

Zunächst musste für die Untersuchungen die Existenz ausreichender Ppd-Konzentrationen gewährleistet sein, was die Etablierung eines stabilen Überexpressionssystems gekoppelt mit einer effizienten Aufreinigungsmethode erforderlich machte. Zu diesem Zweck sollte das His/Ni-NTA-System (Crowe *et al.*, 1994) verwendet werden.

Für den direkten Nachweis der Ppd-Aktivität bzw. der Phosphonoacetaldehyd-Synthese mussten analytische Verfahren [HPLC; Massenspektroskopie] etabliert werden, wobei nicht verfügbare Standards die Suche nach geeigneten Methoden erschweren würde. Ferner wurden zusätzliche Enzyme des Phosphonat-Metabolismus [2-Aminoethylphosphonat-Transaminase; Phosphonoacetaldehyd-Hydrolase; Phosphoenolpyruvat-Phosphomutase] benötigt, deren Überexpression und Aufreinigung analog zu den Protokollen für die Phosphonopyruvat-Decarboxylase aus *Streptomyces viridochromogenes* Tü494 etabliert werden sollten.

Des Weiteren mussten sowohl die stetige Verfügbarkeit als auch die Konzentrationsbestimmung von Phosphonopyruvat, dem physiologischen Substrat der Phosphonopyruvat-Decarboxylase, sichergestellt werden. Phosphonopyruvat, das nicht im Handel erhältlich ist, sollte gemäß den Literaturangaben von Coutrot und Savignac (1978) sowie Freeman *et al.* (1991) chemisch synthetisiert werden. Da neben der Analyse mittels ^1H NMR kein Verfahren zur Bestimmung der Phosphonopyruvat-Konzentration bekannt war, sollte ein Enzymtest, der u. a. auf der enzymatischen Aktivität der Phosphoenolpyruvat-Phosphomutase beruht, entwickelt werden.

Ausgehend von Phosphoenolpyruvat und Phosphonopyruvat sollte durch den kombinierten Einsatz der verschiedenen Histidin-Fusionsproteine die *in vitro*- und bzw. oder die *in vivo*-Synthese der C-P-Verbindungen Phosphonoacetaldehyd und 2-Aminoethylphosphonat ermöglicht werden. Analog zum direkten Nachweis der Phosphonoacetaldehyd-Bildung

musste für die Entstehung von 2-Aminoethylphosphonat ein geeignetes Analyseverfahren etabliert werden.

Die Charakterisierung der biochemischen Eigenschaften und des Substratspektrums sollte ein besseres Verständnis der Ppd-katalysierten Reaktion ermöglichen. Bezogen auf die zur gleichen Familie gehörenden Enzyme Benzaldehyd-Lyase, Benzoylformiat-Decarboxylase, 1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat-Synthase und Pyruvat-Decarboxylase stellte sich die Frage, ob die Phosphonopyruvat-Decarboxylase ebenfalls über eine Nebenaktivität als Carboligase verfügt, die zur enzymatischen Synthese von neuartigen C-P-Verbindungen genutzt werden könnte. Außerdem sollte überprüft werden, ob Phosphonoacetaldehyd, das Produkt der Ppd-katalysierten Reaktion, ein mögliches Akzeptorsubstrat für die Pyruvat-Decarboxylase darstellt, was ebenfalls in der Bildung neuartiger Phosphonate resultieren würde. Wie im Fall der Phosphonoacetaldehyd- und der 2-Aminoethylphosphonat-Synthese bedurfte es zum Nachweis dieser neuartigen C-P-Verbindungen der Etablierung einer adäquaten Analytik, deren Auffinden aufgrund nicht verfügbarer Standards erschwert werden würde.

Da die Kristallstruktur der Phosphonopyruvat-Decarboxylase bislang nicht bekannt ist, sollten mit Hilfe der ortsgerichteten Mutagenese Erkenntnisse über den Zusammenhang zwischen verschiedenen Aminosäureresten und ihren denkbaren Funktionen in der katalytischen Aktivität der Thiamindiphosphat-abhängigen Phosphonopyruvat-Decarboxylase gewonnen werden. Zusammen mit den Aminosäuresequenzen verschiedener Phosphonopyruvat-Decarboxylasen sollte die zur gleichen Enzymfamilie gehörende und bereits sehr gut charakterisierte Pyruvat-Decarboxylase aus *Zymomonas mobilis* die Identifizierung solcher konservierten und essentiellen Aminosäurereste erleichtern.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag in der Gewinnung grundlegender biochemischer und struktureller Erkenntnisse über die zur Familie der Thiamindiphosphat-abhängigen Enzyme gehörende Phosphonopyruvat-Decarboxylase aus *Streptomyces viridochromogenes* Tü494 sowie in der Überprüfung ihrer Verwendbarkeit für die enzymatische Synthese neuartiger Phosphonat-Verbindungen.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Enzyme

Die verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, von den Firmen Biomol GmbH (Hamburg), Merck KGaA (Darmstadt) und Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen) im höchsten erhältlichen Reinheitsgrad bezogen. Hilfsenzyme für enzymatische Umsetzungen sowie Biochemikalien und Enzyme für molekularbiologische Arbeiten stammten von Roche Diagnostics GmbH (Mannheim).

In Kooperation mit Prof. Dr. M. Müller (jetzt am Institut für Pharmazeutische Wissenschaften, Lehrstuhl für Pharmazeutische und Medizinische Chemie, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg), Dr. A. Cosp und L. Walter wurde Phosphonopyruvat gemäß den Angaben von Coutrot und Savignac (1978) sowie Freeman *et al.* (1991) hergestellt. Die Vorstufe Triethylphosphonopyruvat wurde in einem Ein-Schritt-Verfahren basierend auf der Reaktion des 1-Cupromethan-diethylphosphonats mit Oxalsäureethylesterchlorid synthetisiert (Coutrot und Savignac, 1978). Die Abspaltung der Ethyl-Schutzgruppen erfolgte durch die Behandlung mit Trimethylsilylbromid und der nachfolgenden Hydrolyse des dabei entstandenen Produktes. Phosphonopyruvat wurde durch Kristallisation als Tricyclohexylammonium-Salz isoliert (Freeman *et al.*, 1991) und im Anschluss daran mittels ^1H NMR analysiert.

Produkte weiterer Hersteller sind nachstehend aufgeführt:

Amersham Biosciences Europe GmbH (Freiburg):

Chromatographie-Leersäule XK 16/40 und Adapter AK 16;
Gelfiltrationssäule HiLoad 26/60 Superdex 200 prep grade;
APS; TEMED; Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP

Becton Dickinson GmbH (Heidelberg):

Bacto Agar; Bacto Hefeextrakt; Bacto Trypton

Bio-Rad Laboratories GmbH (München):

HPLC-Säule und Zubehör

Cambrex Bio Science (Rockland, ME USA):

Long Ranger Gel Solution

Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe):

Acrylamid- und Bisacrylamidstammlösung

CS – Chromatographie Service GmbH (Langerwehe):

HPLC-Säulen und Zubehör

Gibco, Invitrogen GmbH (Karlsruhe):

Agarose

Material und Methoden

Millipore GmbH (Eschborn):

Ultrafiltrationseinheiten Centricon YM-10 und Centriprep YM-30

MWG Biotech AG (Ebersberg):

Oligonukleotide für die Amplifikation von Genen, die ortsgerichtete Mutagenese und die Sequenzierung

New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main):

vorgefärbter Proteingrößenstandard

Novagen, Merck Biosciences GmbH (Schwalbach):

λ DE3 Lysogenization Kit

Phenomenex (Aschaffenburg):

HPLC-Säule und Zubehör

Pierce, Perbio Science Deutschland GmbH (Bonn):

Dialyseschlauch; Färbelösung für SDS-Polyacrylamid-Gele;
o-Phthalaldehyd-Fertigreagenz

Qiagen GmbH (Hilden):

DNA-Präparations- und DNA-Aufreinigungskits; Ni-NTA Superflow

Stratagene Europe (Amsterdam):

QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit

2.2 Bakterienstämme, Phagen und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 2 aufgelistet, die Plasmide befinden sich in Tabelle 4. Im Text sind die in den Stämmen verwendeten Plasmide hinter der Stammbezeichnung in eckigen Klammern angegeben. Die im „ λ DE3 Lysogenization Kit“ (Novagen, Schwalbach) enthaltenen Phagen sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 2 Verwendete Bakterienstämme und ihre relevanten genetischen Marker.

Bakterienstamm	Genotyp	Referenz
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	<i>supE44 ΔlacU169 (ϕ80lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	zitiert in: Rodríguez-Quirónes und Benedí, 1993
BL21(DE3)	F' <i>ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm</i> (DE3) exprimiert die T7-RNA-Polymerase	Novagen, Schwalbach
BL21(DE3)pLysS	F' <i>ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm</i> (DE3) pLysS (Cm ^R) exprimiert die T7-RNA-Polymerase	Novagen, Schwalbach
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI^q ΔM15 Tn10 (Tet^r)</i>]	Stratagene, Amsterdam

Bakterienstamm	Genotyp	Referenz
<i>Escherichia coli</i>		
F41	LJ110 $\Delta pykA \Delta pykF \Delta ppc$	B. Anderlei
F41(DE3)	LJ110 $\Delta pykA \Delta pykF \Delta ppc$ (DE3) exprimiert die T7-RNA-Polymerase	diese Arbeit
<i>Pseudomonas putida</i>		
KT2440	Wildtyp, prototroph	Nelson <i>et al.</i> , 2002

Tabelle 3 Verwendete Phagen und ihre relevanten genetischen Marker.

Phage	Genotyp	Referenz
λ DE3	<i>lacUV5-gene 1 imm²¹ $\Delta nin5$ Sam7</i>	Studier und Moffatt, 1986
λ B10	$\Delta att int \Delta cl$	Novagen, Schwalbach
λ B482	<i>att int imm²¹ cl</i>	Novagen, Schwalbach
T7 4107	T7-Deletionsmutante	Studier und Moffatt, 1986

Tabelle 4 Verwendete Plasmide und ihre relevanten genetischen Marker.

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pLysS	Cm ^R , ori _{p15A} , P _{tet} , T7-Lysozym	Novagen, Schwalbach
pET-16b	Amp ^R , ori _{pBR322} , P _{T7lac} , N-terminal 10x His	Novagen, Schwalbach
pDS55	<i>ppm</i> , <i>ppd</i> und <i>orfX</i> <i>S. viridochromogenes</i> Tü494 in pUC 18	W. Wohlleben
pJF119ppdbgl	<i>ppd</i> <i>S. viridochromogenes</i> Tü494 aus pDS55 <i>Bgl</i> II/ <i>Nru</i> I über <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III in pJF119EH	G. A. Sprenger
pET16ppd	PCR-Produkt <i>ppd</i> <i>S. viridochromogenes</i> Tü494 aus pJF119ppdbgl <i>Nde</i> I/ <i>Xho</i> I in pET-16b	diese Arbeit
pET16ppdA337-339	pET16ppd; <i>ppd</i> : AS-Codons 315 – 317 durch GCT GCA GCC ersetzt	diese Arbeit
pET16ppdS25D	pET16ppdA337-339; <i>ppd</i> (A337-339): AS-Codon 25 durch GAC ersetzt	diese Arbeit
pET16ppdS25N	pET16ppdA337-339; <i>ppd</i> (A337-339): AS-Codon 25 durch AAC ersetzt	diese Arbeit
pET16ppdS25D/D297E	pET16ppdA337-339; <i>ppd</i> (S25D): AS-Codon 297 durch GAA ersetzt	diese Arbeit

Material und Methoden

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pET16ppdE48Q	pET16ppdA337-339; <i>ppd</i> (A337-339): AS-Codon 48 durch CAG ersetzt	diese Arbeit
pET16ppdH110A	pET16ppdA337-339; <i>ppd</i> (A337-339): AS-Codon 110 durch GCC ersetzt	diese Arbeit
pET16ppdH111A	pET16ppdA337-339; <i>ppd</i> (A337-339): AS-Codon 111 durch GCC ersetzt	diese Arbeit
pET16ppdE224A	pET16ppdA337-339; <i>ppd</i> (A337-339): AS-Codon 224 durch GCG ersetzt	diese Arbeit
pET16ppdD263A	pET16ppdA337-339; <i>ppd</i> (A337-339): AS-Codon 263 durch GCA ersetzt	diese Arbeit
pET16ppdD265A	pET16ppdA337-339; <i>ppd</i> (A337-339): AS-Codon 265 durch GCA ersetzt	diese Arbeit
pET16ppdN293A	pET16ppdA337-339; <i>ppd</i> (A337-339): AS-Codon 293 durch GCA ersetzt	diese Arbeit
pET16ppdG294A	pET16ppdA337-339; <i>ppd</i> (A337-339): AS-Codon 294 durch GCC ersetzt	diese Arbeit
pET16ppdD297E	pET16ppdA337-339; <i>ppd</i> (A337-339): AS-Codon 297 durch GAA ersetzt	diese Arbeit
pET16ppdD297N	pET16ppdA337-339; <i>ppd</i> (A337-339): AS-Codon 297 durch AAC ersetzt	diese Arbeit
pYJ-102	PCR-Produkt <i>ppm M. edulis</i> <i>NdeI/BamHI</i> in pET-3c	Jia <i>et al.</i> , 1999
pET16ppm	<i>ppm M. edulis</i> aus pYJ-102 <i>NdeI/BamHI</i> in pET-16b	diese Arbeit
pET16aapt	PCR-Produkt <i>phnW P. putida</i> KT2440 <i>NdeI/XhoI</i> in pET-16b	diese Arbeit
pET16ptase	PCR-Produkt <i>phnX P. putida</i> KT2440 <i>NdeI/XhoI</i> in pET-16b	diese Arbeit
pETDuet-1	Amp ^R , ori _{pBR322} , P ¹ _{T7lac} , 6x His, P ² _{T7lac}	Novagen, Schwalbach
pETDuet-Ppd	<i>ppd</i> (A337-339) <i>S. viridochromogenes</i> Tü494 aus pET16ppdA337-339 <i>NdeI/XhoI</i> in pETDuet-1	diese Arbeit
pETDuet-Ppd-BamHI	pETDuet-Ppd; <i>ppd</i> (A337-339): AS-Codon 355 durch GGT ersetzt	diese Arbeit
pETDuet-Ppm-Ppd	<i>ppm M. edulis</i> aus pET16ppm <i>NcoI/BamHI</i> in pETDuet-Ppd-BamHI	diese Arbeit
pACYCDuet-1	Cm ^R , ori _{p15A} , P ¹ _{T7lac} , 6x His, P ² _{T7lac}	Novagen, Schwalbach
pACYCDuet-Aept	<i>phnW P. putida</i> KT2440 aus pET16aapt <i>NdeI/XhoI</i> in pACYCDuet-1	diese Arbeit

2.3 Kultivierung von Bakterien

2.3.1 Nährmedien

Die Standardanzucht von *E. coli* und *P. putida* KT2440 erfolgte in Luria-Bertani (LB)-Medium (Sambrook *et al.*, 1989). Zur Herstellung von Agarplatten wurde dem Medium 2% Agar beigelegt.

LB-Medium:	10 g/l	Trypton
	5 g/l	Hefeextrakt
	5 g/l	NaCl

Zur Untersuchung der *in vivo* AEP-Synthese in *E. coli* wurde ein Minimalmedium (MM) nach Tanaka verwendet (Tanaka *et al.*, 1967). Zur Herstellung flüssiger Medien wurden entsprechende Aliquots der konzentrierten Stammlösungen A und B mit demineralisiertem Wasser auf das gewünschte Endvolumen aufgefüllt und autoklaviert. Die Kohlenstoffquelle (Glukose) sowie die verschiedenen Supplemente wurden nach dem Autoklavieren als sterile Stammlösungen zugegeben.

Lösung A (10x):	46,9 g/l	NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O
	115 g/l	K ₂ HPO ₄
	26,4 g/l	(NH ₄) ₂ SO ₄
Lösung B (100x):	7,4 g/l	MgSO ₄ * 7 H ₂ O
	0,147 g/l	CaCl ₂ * 2 H ₂ O
	0,0135 g/l	ZnCl ₂
	0,028 g/l	FeSO ₄ * 7 H ₂ O
	1 ml	1N HCl

2.3.2 Medienzusätze

Zur Selektion Antibiotika-resistenter *E. coli*-Stämme wurden den Medien die entsprechenden Antibiotika nach dem Autoklavieren in folgender Endkonzentration steril zugesetzt:

Ampicillin	(gelöst in Wasser)	100 µg/ml
Chloramphenicol	(gelöst in 70% Ethanol)	34 µg/ml

Material und Methoden

Zur Expression von Genen, die unter der Kontrolle des T7lac-Promotors stehen, wurde Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) in einer Endkonzentration von 500 μ M steril zugegeben.

Die flüssigen Minimalmedien wurden wie folgt supplementiert:

Glukose wurde in einer Endkonzentration von 0,4% steril zugesetzt.

Thiamin wurde in einer Endkonzentration von 10 mg/l steril zugegeben.

Biotin wurde in einer Endkonzentration von 200 μ g/ml steril hinzugefügt.

Zur Kultivierung von *E. coli*-Stämmen mit deletierter PEP-Carboxylase wurde Succinat in einer Endkonzentration von 0,1% steril zugegeben.

2.3.3 Kultivierungsbedingungen

Die Anzucht von *E. coli*- und *P. putida*-Stämmen erfolgte aerob bei 37°C auf Agarplatten oder in Flüssigkulturen unter Schütteln bei 180 Upm. Bis zu einem Volumen von 5 ml wurden Flüssigkulturen in sterilen Reagenzgläsern angezogen. Größere Volumina (50 – 400 ml) wurden in Erlenmeyerkolben kultiviert, wobei die Kolben mit höchstens 20% des Gesamtvolumens befüllt wurden.

Zur Expression rekombinanter Proteine in *E. coli* wurden Einzelkolonien in 50 ml LB-Medium angezogen. Davon ausgehend wurden die Hauptkulturen (LB-Medium) auf eine Start-OD₆₀₀ von 0,05 angeimpft. Nach 75-minütiger Kultivierung bei 37°C wurde die Temperatur auf 30°C herabgesetzt. Die IPTG-Zugabe erfolgte bei einer Zelldichte von OD₆₀₀ $\approx$ 0,8 – 1,0. Die nachfolgende Expressionszeit betrug 5 Stunden.

Zur Untersuchung der *in vivo* AEP-Synthese in *E. coli* wurden Einzelkolonien zunächst in 5 ml LB-Medium kultiviert und anschließend 1%-ig in Minimalmedium mit Kohlenstoffquelle und den entsprechenden Supplementen überimpft. Aus diesen Vorkulturen wurden die MM-Hauptkulturen auf eine Start-OD₆₀₀ von 0,08 angeimpft. Die anfängliche Inkubationstemperatur (37°C) wurde nach vier Stunden auf 30°C herabgesetzt. Die Genexpression wurde bei einer Zelldichte von OD₆₀₀ $\approx$ 0,6 – 0,8 mittels IPTG induziert und nach 5 bzw. 18 Stunden beendet.

Die langfristige Stammhaltung erfolgte in Form von Glycerin-Dauerkulturen. Hierzu wurde eine Übernachtskultur mit 50% (v/v) sterilem Glycerin versetzt und bei -80°C gelagert.

2.4 Transformation von *E. coli*

Die für die Transformation benötigten kompetenten *E. coli*-Zellen wurden gemäß der in der Literatur beschriebenen Rubidiumchlorid-Methode hergestellt (Hanahan, 1983). Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer RF1 und RF2 ist nachfolgend aufgelistet:

RF1 (steril filtriert):	100 mM	RbCl
	50 mM	MnCl ₂ * 4 H ₂ O
	30 mM	CH ₃ COO ⁻ K ⁺
	10 mM	CaCl ₂ * 2 H ₂ O
	15 g	Glycerin (87%)
	pH 5,8 mit Essigsäure	
RF2 (steril filtriert):	10 mM	MOPS
	10 mM	RbCl
	75 mM	CaCl ₂ * 2 H ₂ O
	15 g	Glycerin (87%)
	pH 6,8 mit NaOH	

Die kompetenten Zellen wurden entweder sofort verwendet oder in 200 µl Aliquots bei -80°C gelagert. Zur Transformation wurden 200 µl kompetente Zellen mit 10 – 200 ng Plasmid-DNA versetzt. Bei einer Ligation wurde der komplette Ansatz für die Transformation verwendet. Nach 30-minütiger Inkubation im Eisbad erfolgte der Hitzeschock bei 42°C für 90 Sekunden. Zur Regeneration wurden die Zellen mit 800 µl LB-Medium versetzt und anschließend 30 Minuten bei einer Temperatur von 37°C leicht schüttelnd inkubiert. Mittels Zentrifugation (Sigma 2K 15, 12148 Rotor, 1 Minute, 15.300 Upm, 25°C) wurden die Zellen geerntet und das Kulturvolumen auf 50 µl reduziert. Die resuspendierten Zellen wurden auf Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet.

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 DNA-Präparation

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte mit Hilfe des „QIAprep Spin Miniprep Kit“ (Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers. Die Isolierung chromosomaler DNA aus *P. putida* KT2440 erfolgte über „Genomic-tip 100/G“-Säulen mit Hilfe des „Genomic DNA Buffer Set“ (Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers. Die isolierte DNA wurde immer in EB-Puffer (Qiagen, Hilden) aufgenommen.

2.5.2 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Die Restriktion von DNA erfolgte gemäß den Herstellerhinweisen (Roche Diagnostics, Mannheim). Analytische Restriktionsansätze mit ca. 200 ng DNA umfassten ein Volumen von 10 µl. Für präparative Ansätze wurde bis zu 5 µg DNA in einem Gesamtvolumen von bis zu 40 µl eingesetzt. Um eine vollständige Restriktion zu gewährleisten, wurden pro µg DNA jeweils 4 – 5 Units Restriktionsendonuklease eingesetzt. Die Ansätze wurden 1 – 2 Stunden bei der entsprechenden Temperatur (in der Regel 37°C) inkubiert.

Zum Umpuffern von DNA-Lösungen aus Restriktionsansätzen wurde das „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers verwendet.

2.5.3 DNA-Fällung mittels Ethanol

Zum Entsalzen von Plasmid-DNA wurde die DNA-Lösung zunächst mit 0,25 M NaCl sowie dem 2,5-fachen Volumen an absolutem Ethanol (Lagerung bei -20°C) versetzt und zur Fällung mindestens 15 Minuten bei -80°C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert (Sigma 2K 15, 12148 Rotor, 15.300 Upm). Das DNA-Sediment wurde mit 200 µl 70% Ethanol (Lagerung bei -20°C) gewaschen, nochmals zentrifugiert, in der Vakuumzentrifuge getrocknet und anschließend in sterilem Wasser (zweifach destilliert) aufgenommen.

2.5.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. In Abhängigkeit von der Größe der zu trennenden DNA-Fragmente betrug die Agarose-Konzentration 0,8 – 1,0%. Die DNA-Proben wurden mit 5x Probenpuffer versetzt. Die Gelelektrophorese wurde in 1x TAE-Puffer bei 100 – 120 V durchgeführt. Zum Sichtbarmachen der DNA wurde das Gel für jeweils 5 – 10 Minuten in einer verdünnten Ethidiumbromid-Lösung gefärbt und anschließend in Wasser entfärbt.

5x Probenpuffer:	0,1%	Bromphenolblau
	30%	Glycerin
50x TAE-Puffer:	242 g/l	TRIS
	18,61 g/l	Titriplex III (Merck, Darmstadt)
	pH 8,0 mit Essigsäure	

Zur Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen wurde das „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers verwendet.

2.5.5 Behandlung mit alkalischer Phosphatase

Zur Verhinderung der Religation linearisierter Plasmid-DNA wurden die 5'-endständigen Phosphatgruppen mit Hilfe der alkalischen Phosphatase aus arktischen Garnelen (Roche Diagnostics, Mannheim) nach den Angaben des Herstellers entfernt.

2.5.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation linearisierter und mit alkalischer Phosphatase behandelter Plasmid-DNA mit restringierten DNA-Fragmenten wurde mit dem „Rapid DNA Ligation Kit“ (Roche Diagnostics, Mannheim) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Im Ligationsansatz wurde ein molares Verhältnis von Vektor zu Fragment von ungefähr 1:3 eingesetzt.

2.5.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) (Mullis und Faloona, 1987) wurde genutzt, um einen definierten DNA-Abschnitt von Plasmiden oder chromosomaler DNA *in vitro* zu amplifizieren, wobei der zu amplifizierende DNA-Bereich von zwei komplementär konvergenten Oligonukleotiden (Primern) flankiert wurde. Zur nachfolgenden Klonierung der amplifizierten Gene in entsprechende Vektoren wurden mit Hilfe der Primer Erkennungssequenzen für bestimmte Restriktionsendonukleasen eingeführt.

Aufgrund des hohen GC-Gehalts (73,7%) wurde zur Amplifikation des *ppd*-Gens aus *S. viridochromogenes* Tü494 das „GC-RICH PCR System“ (Roche Diagnostics, Mannheim) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Zur Amplifikation der Gene *phnW* und *phnX* aus *P. putida* KT2440 wurde die *Pwo*-DNA-Polymerase (Roche Diagnostics, Mannheim) nach den Angaben des Herstellers eingesetzt.

Das Volumen der PCR-Ansätze betrug 50 µl. Als Matrize wurde ca. 10 ng Plasmid-DNA bzw. 30 ng chromosomale DNA eingesetzt. Die verwendeten Oligonukleotide wurden von MWG Biotech (Ebersberg) bezogen und sind in Tabelle 5 aufgelistet. Alle Reaktionen wurden in einem Peltier Thermal Cycler (PTC-200, MJ Research) durchgeführt, wobei die Temperaturprofile sowie die Dauer und Anzahl der Zyklen den jeweiligen Gegebenheiten angepasst wurden. Die Anlagerungstemperatur richtete sich nach den Schmelztemperaturen (T_m) der Primer (ca. 2°C niedriger als T_m). Die Dauer der Polymerisierung war von der Länge des zu erwartenden Amplifikates (45 Sekunden Elongation pro kb DNA) abhängig.

Material und Methoden

Tabelle 5 Bezeichnung und Sequenz der verwendeten Oligonukleotide zur Amplifikation der aufgeführten Gene. Die Erkennungssequenzen der eingeführten Restriktionschnittstellen sind unterstrichen. Bei den Primern für die *phnW*- und *phnX*-Amplifikation sind die entsprechenden Positionen im Genom von *P. putida* KT2440 (GenBank Accession: NC_002947) aufgeführt.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Schnittstelle
<i>ppd</i> aus <i>Streptomyces viridochromogenes</i> Tü494 in pET-16b		
L- <i>ppd</i> -pET16/22- <i>Nde</i> I	CGGTGCACATATGATCGGCGCGGC	<i>Nde</i> I
R- <i>ppd</i> -pET16- <i>Xho</i> I	ATCTGCTCGAGGCTCATCGTGC GGTC	<i>Xho</i> I
<i>phnW</i> aus <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 in pET-16b		
L-AEPT-16/22- <i>Nde</i> I	GTGAGGAATAACCATATGAGCAACGCCCG	<i>Nde</i> I
korrespondierende Genomsequenz:	2.516.539 – 2.516.510	
R-AEPT-16- <i>Xho</i> I	TTCGGCTCGAGAAAGCGTCAGATATCCAGC	<i>Xho</i> I
korrespondierende Genomsequenz:	2.515.401 – 2.515.430	
<i>phnX</i> aus <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 in pET-16b		
L-Phtase-16/22- <i>Nde</i> I	GAGTTAGCGCATATGAAC TACAACAACCCC	<i>Nde</i> I
korrespondierende Genomsequenz:	2.515.395 – 2.515.366	
R-Phtase-16- <i>Xho</i> I	GAAACCTCGAGGGTCAGAAAGGCTTGCGG	<i>Xho</i> I
korrespondierende Genomsequenz:	2.514.543 – 2.514.570	

Die gewünschten PCR-Amplifikate wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese von möglichen Nebenprodukten getrennt (siehe 2.5.4).

2.5.8 DNA-Sequenzierung

Die verwendete Sequenziertechnik nach Sanger *et al.* (1977) beruht auf dem Abbruch der Polymerasekettenreaktion beim Einbau eines Didesoxynukleotids. Für die Sequenzierreaktion wurde das „Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP“ (Amersham Biosciences, Freiburg) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Für Sequenzierungen aus dem pET-16b Vektor wurden die 5' IRD800-fluoreszenzmarkierten Primer T7-Promotor und T7-Terminator verwendet. Zur Komplettierung der Sequenzierung des *ppd*-Gens aus *S. viridochromogenes* Tü494 wurden sequenzspezifische 5' IRD800-fluoreszenzmarkierte Primer benutzt. Die Sequenzierprimer wurden von MWG Biotech (Ebersberg) bezogen und sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Die Reaktionsansätze hatten ein Volumen von 6 µl und enthielten ca. 0,5 pmol fluoreszenzmarkierten Primer sowie ca. 200 ng entsalzte (siehe 2.5.3) doppelsträngige Plasmid-DNA. Die PCR wurde in einem Peltier Thermal Cycler (PTC-200, MJ Research)

durchgeführt, wobei die Anlagerungstemperatur in Abhängigkeit von der Primer-Schmelztemperatur verändert wurde. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 5 µl „Formamide Loading Dye“ und nachfolgendem Erhitzen auf 95°C gestoppt.

Tabelle 6 Bezeichnung und Sequenz der verwendeten Sequenzierprimer. Die entsprechenden Positionen im Vektor pET-16b bzw. im *ppd*-Gen aus *S. viridochromogenes* Tü494 (GenBank Accession: Y14337, Region: 994..2187) sind aufgeführt.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Position
pET-16b Sequenzierprimer		
T7-Promotor	TAATACGACTCACTATAGGG	482 – 463
T7-Terminator	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	256 – 274
<i>S. viridochromogenes</i> Tü494 <i>ppd</i>-spezifische Sequenzierprimer		
SvPpd for	AGGACAGGTCGTACGGTACGC	537 – 557
SvPpd rev2	CATGTAGAAGTGCTGGTCGC	711 – 692

Die Sequenzierung wurde mit einem LI-COR DNA Sequencer 4200 (MWG Biotech, Ebersberg) durchgeführt. Für die Gelelektrophorese wurde ein 4,6%-iges, 66 cm langes und 0,25 mm dickes „LongRanger“-Polyacrylamid-Gel mit 1x TBE-Puffer als Laufmittel verwendet. Die Herstellung und Handhabung des Polyacrylamid-Gels erfolgte nach den Angaben des Geräteherstellers. Von den Reaktionsansätzen wurden jeweils 1,8 µl aufgetragen. Die fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente wurden mit Hilfe der Software „Base ImagIR 4.1“ erfasst und ausgewertet.

10x TBE-Puffer:	108 g/l	TRIS
	55 g/l	Borsäure
	9,3 g/l	EDTA

2.5.9 Ortsgerichtete Mutagenese

Die ortsgerichtete Mutagenese eignet sich zur Erzeugung von Punktmutationen, die zum Austausch, zur Insertion oder zur Deletion einzelner oder mehrerer Aminosäuren führen. In dieser Arbeit diente die Methode hauptsächlich der gezielten Veränderung einzelner Aminosäuren des Enzyms Phosphonopyruvat-Decarboxylase aus *S. viridochromogenes* Tü494.

Alle ortsgerichteten Mutagenesen wurden mit Hilfe des „QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit“ (Stratagene, Amsterdam) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Als Matrizen-DNA dienten folgende Plasmide: pET16ppd, pET16ppdA337-339; pET16ppdS25D und pETDuet-Ppd. Beim Plasmid pET16ppd konnte mit Hilfe der ortsgerichteten Mutagenese die Originalaminosäuresequenz der Phosphonopyruvat-Decarboxylase wiederhergestellt werden; zugleich wurde eine *Pst*I-Schnittstelle erzeugt. Das resultierende Plasmid pET16ppdA337-339 diente als Matrize zur Herstellung der

Material und Methoden

verschiedenen Ppd-Muteine. Beim Ppd-Doppelmutein S25D/D297E wurde das Plasmid pET16ppdS25D als Matrizen-DNA eingesetzt. Im Fall des Plasmids pETDuet-Ppd wurde mittels ortsgerichteter Mutagenese eine *Bam*HI-Schnittstelle innerhalb des *ppd*-Gens entfernt; die Ppd-Aminosäuresequenz blieb jedoch unverändert.

Die Ansätze hatten ein Reaktionsvolumen von 50 µl und enthielten ca. 40 ng doppelsträngige Plasmid-DNA. Die für die einzelnen Mutagenesen benötigten Oligonukleotide wurden von MWG Biotech (Ebersberg) bezogen und sind in Tabelle 7 aufgelistet. Alle Reaktionen wurden in einem Peltier Thermal Cycler (PTC-200, MJ Research) durchgeführt, wobei Dauer und Anzahl der Zyklen in Abhängigkeit von der Plasmidgröße (2 Minuten Elongation pro kb Plasmid) bzw. der durchgeführten Mutation abgeändert wurden. Die anschließende Behandlung mit *Dpn*I diente dem Abbau der methylierten, nicht-mutierten Matrizen-DNA. Nachfolgend wurden 5 µl des jeweiligen Reaktionsansatzes in superkompetente *E. coli* XL1-Blue Zellen (Stratagene, Amsterdam) transformiert (siehe 2.4).

Tabelle 7 Bezeichnung und Sequenz der verwendeten Oligonukleotide für die ortsgerichtete Mutagenese des *ppd*-Gens aus *S. viridochromogenes* Tü494. Die ausgetauschten Nukleotide sind unterstrichen.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
Wiederherstellung der Ppd-Originalamino-säuresequenz	
A337-339a	CCCGCCGTCGC <u>T</u> GCA <u>G</u> CCCTGCGGGCTACCG
A337-339b	CGGTAGCCGCAGGC <u>T</u> GCA <u>G</u> CGACGGCGGG
Konstruktion der Ppd-Muteine	
S25D1	GCCGGAGTGCCCTGCGACTACCTGACCCCG
S25D2	CGGGGTCAAGTAGT <u>C</u> GCA <u>G</u> GGCACTCCGGC
S25N1	CGTGGCCGAGTGCCCTGCA <u>A</u> ACTACCTGACCCCGTTGATCAACC
S25N2	GGTTGATCAACGGGGTCAGGTAGT <u>T</u> TGCAAGGGCACTCCGGCCACG
E48Q1	CCTCACGGTCACGCAGCAGGGCGAGGCCGC
E48Q2	GCGGCCTCGCCCTGCTGCGTGACCGTGAGG
H110A1	GGACGAGCCCCAGG <u>C</u> CCACCTGATGGGCCGG
H110A2	CCGGCCCATCAGGTGGGCTGGGGCTCGTCC
H111A1	CGAGCCCCAGCACGCCCTGATGGGCCGGATCACC
H111A2	GGTGATCCGGCCCATCAGGG <u>C</u> GTGCTGGGGCTCG
E224A1	GGCAAGTCCAGCCGGGCGCTGTACACCCTCG
E224A2	CGAGGGTGACAGCGCCCGCTGGACTTGCC
D263A1b	CCGCCGGTCGTGGTCGT <u>C</u> GCA <u>G</u> GGCGACGGCTCGGTGCTGATGCG
D263A2b	CGCATCAGCACCGAGCCGTGCGCT <u>G</u> CGACGACCACGACCGGGCGG
D265A1	GTCGTGGTCGTGACGGCGCAGGCTCGGTGCTGATG
D265A2	CATCAGCACCGAGCCTGCGCCGTGACGACCACGAC
N293A1	CCACCTGGTCCTCGACGCAGGCGTCCACGACTCC
N293A2	GGAGTCGTGGACGCCTGCGT <u>C</u> GAGGACCAAGGTGG
G294A1	CCTGGTCCTCGACAACG <u>C</u> CGTCCACGACTCCACC
G294A2	GGTGGAGTCGTGGACGGCGTTGTGCGAGGACCAGG

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
Konstruktion der Ppd-Muteine	
D297E1	CGACAACGGCGTCCACGAATCCACCGGCGGCCAGC
D297E2	GCTGGCCGCCGGTGGATTCTGTGGACGCCGTTGTCG
D297N1	CGACAACGGCGTCCACA ^A CTCCACCGGCGGCCAGC
D297N2	GCTGGCCGCCGGTGGAGT ^T TGTGGACGCCGTTGTCG
Entfernung der <i>Bam</i>HI-Schnittstelle innerhalb des <i>ppd</i>-Gens	
Ppd-BamHI(a)1	GGCGATCCGGCCGGGTTCCCTGGACGGGCTGG
Ppd-BamHI(a)2	CCAGCCCCTCCAGGGAACCCGGCCGGATCGCC

Die Richtigkeit der eingeführten Mutationen wurde jeweils mittels DNA-Sequenzierung überprüft (siehe 2.5.8).

2.5.10 λ DE3 Lysogenization Kit

Das „ λ DE3 Lysogenization Kit“ (Novagen, Schwalbach) wurde nach den Angaben des Herstellers verwendet. Es diente der Integration des Gens für die T7-RNA-Polymerase in das Genom des *E. coli*-Stammes F41, so dass unter der Kontrolle des T7/*lac*-Promotors stehende Gene im resultierenden Stamm *E. coli* F41(DE3) zur Expression gebracht werden konnten. Die ortsspezifische Integration des λ DE3 Prophagen wurde durch einen Helferphagen (λ B10) ermöglicht; die Selektion positiver Klone erfolgte mit Hilfe eines Selektionsphagen (λ B482). Unter Verwendung eines Testerphagen (T7 4107) konnte die Anwesenheit des Phagen im Bakteriengenom überprüft werden.

2.6 Proteinbiochemische Methoden

2.6.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Der Proteingehalt von Lösungen wurde in einem UV/Visible Spectrophotometer (Ultrospec 3000 pro, Amersham Biosciences) bei einer Wellenlänge von 595 nm nach der Methode von Bradford (1976) ermittelt. Die Kalibrierungsreihe mit Rinderserumalbumin war im Bereich von 25 – 400 μ g/ml linear.

Bradford-Reagenz:	100 mg	COOMASSIE Brilliant Blue G-250
	50 ml	Ethanol (96%)
	100 ml	<i>ortho</i> -Phosphorsäure (85%)
	ad 1000 ml	destilliertes Wasser

2.6.2 Protein-Fällung mittels Trichloressigsäure

Zum Aufkonzentrieren von Proteinen wurden Proteinlösungen mit 7% Trichloressigsäure versetzt und zur Fällung mindestens 10 Minuten bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert (Sigma 2K 15, 12148 Rotor, 15.300 Upm). Das Protein-Sediment wurde mit 200 µl 80% Aceton gewaschen, nochmals zentrifugiert, bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in sterilem Wasser (zweifach destilliert) aufgenommen.

2.6.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrer molekularen Masse erfolgte unter denaturierenden Bedingungen durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese in Anwesenheit von SDS (Laemmli, 1970). Es wurden 12%-ige bzw. 15%-ige Trenngel (überschichtet mit 6%-igem Sammelgel) verwendet. Vor dem Auftragen wurden die Proteinproben mit 2x Probenpuffer versetzt und zur Denaturierung 5 Minuten bei 95°C inkubiert. Als Standard wurde der „Premixed Protein Molecular Weight Marker, Low-range Marker“ (Roche Diagnostics, Mannheim) bzw. der „Prestained Protein Marker, Broad Range“ (New England Biolabs, Frankfurt am Main) verwendet. Die Proteine wurden bei 100 – 150 V in 1x SDS-Laufpuffer aufgetrennt und anschließend mit Hilfe des „GelCode Blue Stain Reagent“ (Pierce, Bonn) nach den Angaben des Herstellers angefärbt.

12% (15%) Trenngel:	4,0 ml (5,0 ml)	Acrylamid:Bisacrylamid (37,5:1)
	2,5 ml (2,5 ml)	1,5 M TRIS/HCl, pH 8,8
	3,3 ml (2,3 ml)	bidestilliertes Wasser
	0,1 ml (0,1 ml)	10% SDS
	0,1 ml (0,1 ml)	10% APS
	5 µl (5 µl)	TEMED
6% Sammelgel:	0,83 ml	Acrylamid:Bisacrylamid (37,5:1)
	1,25 ml	0,5 M TRIS/HCl, pH 6,8
	2,82 ml	bidestilliertes Wasser
	0,05 ml	10% SDS
	0,05 ml	10% APS
	5 µl	TEMED
2x Probenpuffer:	10 ml	1,5 M TRIS/HCl, pH 6,8
	6 ml	20% SDS
	30 ml	Glycerin (87%)
	15 ml	β-Mercaptoethanol
	1,8 mg	Bromphenolblau

10x SDS-Laufpuffer:	30,3 g/l	TRIS
	141,1 g/l	Glycin
	10 g/l	SDS

2.6.4 Aufschluss von *E. coli*-Zellen

2.6.4.1 Zellaufschluss von *E. coli* BL21(DE3)pLysS

Das pLysS-kodierte T7-Lysozym, ein natürlicher Inhibitor der T7-RNA-Polymerase, wird in λ DE3-lysogenen *E. coli*-Stämmen eingesetzt, um die basale Expression der T7-Promotoren zu unterdrücken. Durch Einfrieren und Wiederauftauen der in Puffer resuspendierten Expressionsstämme gelangt das T7-Lysozym ins Periplasma und lysiert die Zellen. Diese Methode stellt einen Zellaufschluss dar, bei dem im Gegensatz zum Aufschluss mittels Ultraschall, Kugelmühle oder French-Press keine harschen mechanischen Kräfte auftreten. Expressionskulturen von rekombinanten *E. coli* BL21(DE3)pLysS-Stämmen wurden 5 Stunden nach der IPTG-Zugabe durch Zentrifugation geerntet (Beckman Avanti J-25, JA10 Rotor, 10 Minuten, 5.000 Upm, 4°C). Die Sedimente wurden in 1/20 Volumen 20mM-Imidazol-Puffer (Tabelle 8) resuspendiert, nochmals zentrifugiert, 80-fach konzentriert in 20mM-Imidazol-Puffer aufgenommen und anschließend über Nacht bei -80°C gelagert. Der Zellaufschluss erfolgte durch vollständiges Auftauen der Suspension bei 25°C und nachfolgender 60-minütiger Inkubation im Eisbad. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (Beckman Avanti J-25, JA10 Rotor, 60 Minuten, 20.000 Upm, 4°C) vom Rohextrakt abgetrennt.

2.6.4.2 Ultraschallaufschluss

Für die *in vivo* AEP-Synthese wurden die Zellen der rekombinanten *E. coli*-Stämme BL21(DE3) und F41(DE3) nach beendeter Expression durch Zentrifugation geerntet (Beckman Avanti 30, C0650 Rotor, 10 Minuten, 5.000 Upm, 4°C). Die Sedimente wurden in 1/20 Volumen AEP-Puffer resuspendiert, nochmals zentrifugiert und in 1/50 des Ausgangsvolumens aufgenommen.

Mittels Ultraschall (Dr. Hielscher Ultraschallprozessor UP200s, Cycle 0,5, Amplitude 55%, 4x 45 Sekunden mit jeweils 30 Sekunden Pause unter Eiskühlung) wurden die Zellen aufgeschlossen und die Zelltrümmer durch Zentrifugation (Sigma 2K 15, 12148 Rotor, 60 Minuten, 15.300 Upm, 4°C) vom Rohextrakt abgetrennt.

Material und Methoden

AEP-Puffer:	20 mM	HEPES (pH 8,0)
	200 mM	NaCl
	1 mM	ThDP
	5 mM	MgCl ₂
	0,1 mM	PLP
	1 mM	DTT

2.6.5 Chromatographische Proteinreinigung

Die Proteinreinigung erfolgte mit Hilfe des ÄKTAexplorer (Amersham Biosciences, Freiburg). Zur Steuerung des Gerätes sowie zur Aufzeichnung und Auswertung der Daten wurde die Software „Unicorn 3.00“ verwendet.

2.6.5.1 Ni²⁺-Affinitätschromatographie

Die Ni²⁺-Affinitätschromatographie stellt eine effiziente Methode zur Reinigung von Histidin-Fusionsproteinen dar. Sie basiert auf der Bindung von sechs oder zehn aufeinander folgenden Histidin-Resten an immobilisierten zweiwertigen Nickel-Ionen. Diese Bindung kann durch hohe Imidazol-Konzentrationen gelöst werden, was zur Elution der Fusionsproteine führt (Crowe *et al.*, 1994).

Zur Proteinaufreinigung wurde eine mit 25 ml Ni-NTA Superflow (Qiagen, Hilden) gepackte XK 16/40 Chromatographie-Säule (Amersham Biosciences, Freiburg) verwendet. Die Rohextrakte (siehe 2.6.4.1) wurden mit einer Flussrate von 2 ml/min auf die mit 20mM-Imidazol-Puffer (Tabelle 8) äquilibrierte Säule aufgetragen. Das Auswaschen der nicht bzw. schwach bindenden Proteine erfolgte mit 3 Säulenvolumen 20mM-Imidazol-Puffer. Bei den Aufreinigungen der Phosphonopyruvat-Decarboxylase und der Phosphoenolpyruvat-Phosphomutase mussten unspezifisch gebundene Proteine mit 2 Säulenvolumen 80mM-Imidazol-Puffer (Tabelle 8) von der Säule gespült werden. Die spezifisch gebundenen Histidin-Fusionsproteine wurden mit 3 Säulenvolumen 250mM-Imidazol-Puffer (Tabelle 8) von der Säule verdrängt und in 10 ml Fraktionen gesammelt.

Tabelle 8 Imidazol-haltige Puffer zur Aufreinigung der Histidin-Fusionsproteine mittels Ni²⁺-Affinitätschromatographie.

Ppd	20 mM	HEPES	pH 7,5
	300 mM	NaCl	
	20, 80, oder 250 mM	Imidazol	
	1 mM	ThDP	
	2 mM	MgCl ₂	
	1 mM	DTT	

Ppm	50 mM 20, 80 oder 250 mM 5 mM 1 mM	TEA Imidazol MgCl ₂ DTT	pH 7,5
Aept	10 mM 20 oder 250 mM 0,01 mM 1 mM	KH ₂ PO ₄ Imidazol PLP DTT	pH 7,5
Phtase	50 mM 20 oder 250 mM 10 mM 1 mM	HEPES Imidazol MgCl ₂ DTT	pH 7,5

Die Fusionsproteine wurden unmittelbar nach ihrer Aufreinigung mit Hilfe der Ultrafiltrationseinheiten Centriprep YM-30 (Millipore, Eschborn) umgepuffert (siehe 2.6.6). Die Zusammensetzung der verwendeten Aufbewahrungspuffer ist in Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9 Aufbewahrungspuffer der Histidin-Fusionsproteine.

Ppd	50 mM 300 mM 1 mM 1 mM 1 mM	HEPES NaCl ThDP MgCl ₂ DTT	pH 8,0
Ppm	50 mM 300 mM 10 mM 1 mM	TEA KCl MgCl ₂ DTT	pH 7,5
Aept	50 mM 0,1 mM 1 mM	TRICINE PLP DTT	pH 8,5
Phtase	50 mM 300 mM 10 mM 1 mM	HEPES NaCl MgCl ₂ DTT	pH 7,5

2.6.5.2 Gelpermeationschromatographie (Gelfiltration)

Bei der Gelpermeationschromatographie werden Proteine nach ihrer molekularen Masse getrennt. Je kleiner die Proteine sind, desto besser können sie in die Gelmatrix diffundieren und desto größer ist das Elutionsvolumen.

Material und Methoden

Zur Größenbestimmung des nativen Ppd-Fusionsproteins wurde die Säule „HiLoad 26/60 Superdex 200 prep grade“ (Amersham Biosciences, Freiburg) verwendet. Das gereinigte Fusionsprotein wurde mit einer konstanten Geschwindigkeit von 2,5 ml/min auf die mit Gelfiltrationspuffer äquilibrierte Säule aufgetragen und mit einem Säulenvolumen (ca. 320 ml) eluiert. Die Standardproteine des „Gel Filtration Molecular Weight Markers“ (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) wurden in den vom Hersteller angegebenen Konzentrationen verwendet. Das Probenauftragsvolumen der Standardproteine und des Ppd-Fusionsproteins war identisch.

Gelfiltrationspuffer:	20 mM	HEPES (pH 8,0)
	300 mM	NaCl
	1 mM	DTT

2.6.6 Ultrafiltration von Proteinen

Zum Pufferwechsel, zur Entsalzung und zur Konzentrierung von Proteinen wurden die Ultrafiltrationseinheiten Centriprep YM-30 (Millipore, Eschborn) verwendet. Zur Elimination von Proteinen wurden die Ultrafiltrationseinheiten Centricon YM-10 (Millipore, Eschborn) benutzt. Die Ultrafiltration wurde bei einer Temperatur von 4°C nach den Angaben des Herstellers durchgeführt (Zentrifuge: Beckman Coulter Allegra 6KR, GH-3.8 Horizontal Rotor).

2.6.7 Dialyse von Proteinen

Zur Charakterisierung der Protein/Cofaktor-Interaktionen auf biochemischer Ebene wurde cofaktorfrees Enzym (Apo-Enzym) benötigt. Apo-Ppd wurde durch die Dialyse gegen ThDP- und Mg(II)-freien Puffer gewonnen. Der verwendete Dialyseschlauch „SnakeSkin Pleated Dialysis Tubing“ (Pierce, Bonn) hatte eine Ausschlussgröße von 7.000 Da. Die Dialyse wurde bei einer Temperatur von 4°C durchgeführt. Zur Komplexierung der Mg²⁺-Ionen wurde die Ppd für zwei Stunden gegen 1 Liter EDTA-Dialysepuffer dialysiert. Die beiden nachfolgenden Schritte (2 Stunden gegen 1 Liter bzw. 15 Stunden gegen 5 Liter Dialysepuffer) dienten der restlosen Entfernung des EDTA, der komplexierten Mg²⁺-Ionen sowie des Thiamindiphosphats.

(EDTA-)Dialysepuffer:	50 mM	HEPES (pH 8,0)
	300 mM	NaCl
	(10 mM)	(EDTA)
	1 mM	DTT

2.7 Enzymaktivitätsbestimmungen

2.7.1 Photometrische Enzymtests

Die photometrischen Aktivitätstests mit bis zu sechs parallelen Messungen wurden in einem UV/Visible Spectrophotometer (Ultrospec 3000 pro, Amersham Biosciences) mit einem Reaktionsvolumen von 1 ml und bei einer Temperatur von 30°C durchgeführt. In Abhängigkeit vom verwendeten Enzym diente entweder der Ppm- oder der Ppd-Aufbewahrungspuffer (Tabelle 9) als Enzymtestpuffer. Bei allen Messungen wurde die NADH₂-Oxidation (0,3 mM Ausgangskonzentration) bei einer Wellenlänge von 340 nm verfolgt ($\epsilon_{340} = 6,3 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$). Die Steuerung des Photometers und die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der Software „SWIFT – Reaction Kinetics 1.09“.

2.7.1.1 Enzymatische Bestimmung der Phosphonopyruvat-Konzentration

Die Konzentration des synthetisierten Phosphonopyruvats wurde mit Hilfe der Enzyme **Phosphoenolpyruvat-Phosphomutase (Ppm)** aus *M. edulis*, **Pyruvat-Kinase** und **L-Lactat-Dehydrogenase (PK/LDH)** aus Kaninchenmuskel (Roche Diagnostics, Mannheim) ermittelt. Zur Kalibrierung wurde die PK/LDH-abhängige Umsetzung von Phosphoenolpyruvat (PEP) zu Lactat verwendet. Dabei wurden unterschiedliche PEP-Konzentrationen (0,1 – 5,0 mM) zusammen mit jeweils 6 mM NADH₂ und ADP sowie 4,5 U PK/LDH eingesetzt. Nach 60-minütiger Inkubation bei 25°C wurde die verbliebene NADH₂-Konzentration bei 340 nm bestimmt und in Korrelation zur eingesetzten PEP-Konzentration graphisch dargestellt.

Eine definierte Menge Phosphonopyruvat (10 mM) wurde zunächst durch die Ppm (20 µg) zu Phosphoenolpyruvat umgelagert. Nach 60-minütiger Inkubation bei 25°C wurde die Konzentration des gebildeten Phosphoenolpyruvats mit Hilfe des zuvor beschriebenen PK/LDH-Enzymtests bestimmt. Das nicht umgesetzte NADH₂ gab Aufschluss über die in den Chargen vorhandene Phosphonopyruvat-Konzentration.

2.7.1.2 Phatase/ADH- und Aept/LDH-Enzymtest

Die Ppd-Aktivität wurde aus der in einem bestimmten Zeitraum umgesetzten Menge Phosphonopyruvat mit einer definierten Enzymkonzentration ermittelt. Der entstandene Phosphonoacetaldehyd wurde mit Hilfe von zwei verschiedenen Enzymkombinationen umgesetzt und konnte somit nachgewiesen werden.

Im ersten Test wurde Phosphonoacetaldehyd in Abhängigkeit von den Hilfsenzymen **Phosphonoacetaldehyd-Hydrolase (Phtase)** aus *P. putida* KT2440 und **Alkohol-Dehydrogenase (ADH)** aus Hefe (Roche Diagnostics, Mannheim) zu Ethanol umgesetzt. Die Phtase-katalysierte hydrolytische Spaltung des Phosphonoacetaldehyds führte zur Bildung von anorganischem Phosphat und Acetaldehyd, der durch die nachfolgende ADH-katalysierte und NADH_2 -abhängige Reduktion zu Ethanol aufgrund der Extinktionsabnahme bei 340 nm nachgewiesen werden konnte. Dabei wurden 100 µg Phtase und 10 U ADH zusammen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Ppd-Fusionsprotein und Phosphonopyruvat, mit dessen Zugabe die Reaktion nach 5-minütiger Vorinkubation bei 30°C gestartet wurde, eingesetzt.

Mit den Enzymen **2-Aminoethylphosphonat-Transaminase (Aept)** aus *P. putida* KT2440 und **L-Lactat-Dehydrogenase (LDH)** aus Schweinemuskel (Roche Diagnostics, Mannheim) wurde Phosphonoacetaldehyd zusammen mit L-Alanin zu 2-Aminoethylphosphonat und L-Lactat umgesetzt. In der Aept-katalysierten Reaktion wurde die NH_3^+ -Gruppe des Alanins auf Phosphonoacetaldehyd übertragen. Neben 2-Aminoethylphosphonat entstand Pyruvat, das durch die LDH in Abhängigkeit von NADH_2 zu Lactat reduziert wurde, was als Extinktionsabnahme bei 340 nm nachgewiesen werden konnte. Es wurden 50 µg Aept und 11 U LDH zusammen mit unterschiedlichen Ppd- und Phosphonopyruvat-Konzentrationen eingesetzt. Die Reaktion wurde nach 5-minütiger Vorinkubation bei 30°C durch die Zugabe von Phosphonopyruvat gestartet.

2.7.1.3 Ppd/ADH-Enzymtest

Zur Untersuchung des Ppd-Substratspektrums wurde u. a. Pyruvat als nicht-physiologisches Substrat eingesetzt. Zusammen mit der **Alkohol-Dehydrogenase (ADH)** aus Hefe (Roche Diagnostics, Mannheim) sollte die Ppd-katalysierte Decarboxylierung von Pyruvat zum Acetaldehyd durch die nachfolgende NADH_2 -abhängige Reduktion zu Ethanol als Extinktionsabnahme bei 340 nm nachgewiesen werden. Es wurden ca. 80 µg Ppd und 20 U ADH zusammen mit 10 mM Pyruvat, mit dessen Zugabe die Reaktion nach 5 Minuten Vorinkubation bei 30°C gestartet wurde, eingesetzt und über einen Zeitraum von 3 Stunden vermessen.

2.7.2 HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

In Abhängigkeit von den zu bestimmenden Substanzen wurden unterschiedliche Auftrennungsprofile verwendet. Kalibrierungsmessungen ermöglichten die Identifizierung und Quantifizierung der eingesetzten Substrate. Sofern erhältlich, wurden die Produkte anhand von Referenz-Substanzen identifiziert und quantifiziert. Die verwendeten Enzyme wurden

mit Hilfe der Ultrafiltrationseinheiten Centricon YM-10 (Millipore, Eschborn) aus den Reaktionsansätzen entfernt (siehe 2.6.6). Die Filtrate wurden gegebenenfalls verdünnt und anschließend analysiert.

2.7.2.1 Synthese und Nachweis von Phosphonoacetaldehyd

Phosphonoacetaldehyd wurde in zwei unterschiedlichen Ansätzen enzymatisch synthetisiert. Die Decarboxylierung verschiedener Phosphonopyruvat-Konzentrationen (1 – 5 mM) wurde mit 50 mU Ppd katalysiert. In Gegenwart von Pyruvat (2 – 10 mM) wurden verschiedene Konzentrationen 2-Aminoethylphosphonat (2 – 10 mM) mit 50 mU Aept desaminiert. Alle Ansätze wurden in 20 mM K⁺HEPES-Puffer (pH 7,5) mit jeweils 0,1 mM ThDP und MgCl₂ für vier Stunden bei 25°C inkubiert. Die durch die Ultrafiltration erhaltenen Filtrate wurden in Anlehnung an eine in der Literatur beschriebene HPLC-Methode (Zhang *et al.*, 2003a) analysiert.

Stationäre Phase:	Vorsäule:	SecurityGuard Cartridge SAX (4,0 x 3,0 mm)
	Hauptsäule:	Phenosphere 5μ SAX 80A (250 x 4,6 mm)
Mobile Phase:	0,1 M KH ₂ PO ₄ (pH 5,0), 0,1 M KCl	
Flussrate:	0,7 ml/min	
Detektion:	spektrophotometrisch bei 210 nm	

Bei einer Temperatur von 25°C erfolgte unter Verwendung einer HPLC-Anlage von Hewlett Packard Series 1100 mit Hilfe der Anionenaustauschsäule „Phenosphere 5μ SAX 80A“ (Phenomenex, Aschaffenburg) die Auftrennung der einzelnen Substanzen. Die Software „HP ChemStation for LC“ von Hewlett Packard ermöglichte die Steuerung der Anlage und die Auswertung der Daten. Die 30-minütige Elution wurde mit einem kaliumphosphathaltigen Laufmittel bei einem Fluss von 0,7 ml/min durchgeführt.

Die enzymatische Phosphonoacetaldehyd-Synthese konnte durch das Auftreten eines neuen Produktpeaks und im Fall des Ppd-katalysierten Phosphonopyruvat-Umsatzes durch die Abnahme der Substratkonzentration verfolgt werden. Da für Phosphonoacetaldehyd kein chemisch synthetisierter Standard zur Verfügung stand, erfolgte seine Identifizierung durch die Fraktionierung (Fraction Collector FRAC-100, Amersham Biosciences) des HPLC-Eluats („präparative HPLC“). Die Enzymkombinationen Phtase/ADH und Aept/LDH ermöglichten die Überprüfung der für die Anwesenheit von Phosphonoacetaldehyd in Frage kommenden Fraktionen (siehe 2.7.1.2).

2.7.2.2 Untersuchung alternativer Ppd-Substrate

Zur Ermittlung alternativer Substrate wurde neben Pyruvat (siehe 2.7.1.3) eine mögliche Ppd-katalysierte Umsetzung von β -Hydroxypyruvat und β -Fluoropyruvat untersucht. Jeweils 10 mM nicht-physiologisches Substrat wurde mit ca. 80 μ g Ppd bei einer Temperatur von 25°C in Ppd-Aufbewahrungspuffer (Tabelle 9) inkubiert. Die mögliche Substratumsetzung wurde 1, 3 und 20 Stunden nach dem Reaktionsstart überprüft.

Stationäre Phase:	Vorsäule:	Cation H Refill Cartridge (30 x 4,6 mm)
	Hauptsäule:	Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm)
Mobile Phase:	6 mM H ₂ SO ₄	
Flussrate:	0,5 ml/min	
Detektion:	spektrophotometrisch bei 215 nm	

Die Auftrennung der einzelnen Substanzen wurde unter Verwendung einer HPLC-Anlage von Merck Hitachi (Interface D-7000, L-6200 Intelligent Pump, UV Detector L-7400, AS-2000 Autosampler, 655A-52 Column Oven) bei einer Temperatur von 60°C mit Hilfe der Ionenaustauschsäule „Aminex HPX-87H“ (Bio-Rad Laboratories, München) und 6 mM H₂SO₄ als Laufmittel durchgeführt. Zur Steuerung der Anlage sowie zur Datenaufzeichnung und Datenauswertung wurde die Software „HPLC-System Manager 4.1“ von Merck Hitachi benutzt. Bei einer Flussrate von 0,5 ml/min betrug die Auftrennungszeit 25 Minuten. Die Umsetzung der nicht-physiologischen Substrate konnte anhand einer verminderten Substratkonzentration und dem möglichen Auftreten eines neuen Produktpeaks beobachtet werden.

2.7.2.3 Synthese von 2-Aminoethylphosphonat

Die Synthese von 2-Aminoethylphosphonat (AEP) wurde sowohl *in vitro* (Reaktionspuffer: 20 mM HEPES (pH 8,0), 200 mM NaCl, 1 mM ThDP, 5 mM MgCl₂, 0,1 mM PLP und 1 mM DTT) als auch *in vivo* (in Tanaka-Minimalmedium) untersucht.

Bei der *in vitro* AEP-Synthese mit den gereinigten Histidin-Fusionsproteinen Ppm, Ppd und Aept wurden bei einer Temperatur von 25°C Substratkonzentrationen von 2 mM Phosphoenolpyruvat bzw. Phosphonopyruvat und 2 mM L-Alanin mit jeweils 25 μ g Enzym umgesetzt. Die Enzyme wurden nach 3-stündiger Inkubation entfernt.

Bei der *in vitro* AEP-Synthese mit den Rohextrakten der *E. coli*-Stämme BL21(DE3) [pETDuet-Ppm-Ppd] [pACYCDuet-Aept] und F41(DE3) [pETDuet-Ppm-Ppd] [pACYCDuet-Aept] wurden 10 mM Phosphoenolpyruvat bzw. 5 mM Phosphonopyruvat, 5 mM L-Alanin und ca. 0,6 mg des jeweiligen Rohextraktes eingesetzt. Zur Überprüfung der Aept-Aktivität wurden 5 mM AEP und 10 mM Pyruvat mit 0,6 mg Rohextrakt umgesetzt. Jeweils 250 μ l Probe wurden zu den Zeitpunkten 0,5, 1, 2, 3, 4 und 20 Stunden entnommen.

Die *in vivo* AEP-Synthese wurde in den *E. coli*-Stämmen BL21(DE3) [pETDuet-Ppm-Ppd] [pACYCDuet-Aept] und F41(DE3) [pETDuet-Ppm-Ppd] [pACYCDuet-Aept] überprüft; wobei die *E. coli*-Stämme mit den entsprechenden Leerplasmiden (pETDuet-1 und pACYCDuet-1) als Negativ-Kontrolle dienten. Zur Bestimmung der AEP-Konzentration im Kulturüberstand wurden zu den Zeitpunkten 0, 2, 4, 6 und 20 Stunden nach der IPTG-induzierten Genexpression Proben entnommen. Der Überstand wurde durch Zentrifugation (Sigma 2K 15, 12148 Rotor, 10 Minuten, 15.300 Upm, 4°C) von den Zellen abgetrennt, verdünnt und zur Analyse eingesetzt.

Stationäre Phase:	Vorsäule: LiChrospher 100 RP 18-5µ EC (40 x 4 mm) Hauptsäule: LiChrospher 100 RP 18-5µ EC (125 x 4 mm)
Mobile Phase:	0,1 M CH ₃ COONa (pH 7,2) 25 – 85% Methanol
Flussrate:	0,35 ml/min
Detektion:	spektrophotometrisch bei 230 nm

Die quantitative Bestimmung der AEP- und Alanin-Konzentration wurde mittels *reversed phase* HPLC nach Derivatisierung mit *o*-Phthalaldehyd (Lindroth und Mopper, 1979) unter Verwendung einer HPLC-Anlage von Hewlett Packard Series 1100 durchgeführt, wobei Anlagensteuerung und Datenauswertung durch die Software „HP ChemStation for LC“ ermöglicht wurde. In einer automatischen Vorsäulenderivatisierung (Jones und Gilligan, 1983) wurde 1 µl der zu analysierenden Probe mit 20 µl *o*-Phthalaldehyd-Fertigreagenz (Pierce, Bonn) gemischt und eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Die dabei entstandenen fluoreszierenden Derivate wurden anschließend über eine kombinierte Vor- und Hauptsäule (LiChrospher 100 RP 18-5µ EC, CS – Chromatographie Service) mittels Natriumacetat-Puffer mit einem zunehmenden Methanol-Gradienten (25 – 85%) aufgetrennt. Die 16-minütige Auftrennung wurde bei einer Flussrate von 0,35 ml/min durchgeführt.

2.7.2.4 Acyloin-Kondensation

Zur Untersuchung der Acyloin-Kondensation mit Phosphonoacetaldehyd als mögliches Donor- oder Akzeptorsubstrat wurde 10 mM Phosphonopyruvat kombiniert mit Acetaldehyd, Pyruvat (jeweils 40 und 85 mM) oder Benzaldehyd (30 mM) mit 0,4 mg Ppd und bzw. oder 0,2 mg *Z. mobilis* PDCW392M (Mesch, 1997) bei einer Temperatur von 25°C umgesetzt. Als Reaktionspuffer diente 20 mM K⁺HEPES (pH 6,5) versetzt mit 1 mM DTT. Die Umsetzung der einzelnen Substrate wurde 1, 3, 5 und 20 Stunden nach dem Reaktionsstart durch die Entnahme von jeweils 250 µl Probe überprüft.

Mit Hilfe der unter Punkt 2.7.2.1 beschriebenen HPLC-Methode konnte die Ppd- bzw. PDCW392M-katalysierte Umsetzung der Substrate Phosphonopyruvat und Pyruvat, die mögliche Benzaldehyd-Umsetzung und die Phosphonoacetaldehyd-Synthese sichtbar

Material und Methoden

gemacht werden. Des Weiteren konnte die Bildung möglicher Phosphonoacyloine anhand einer verminderten Phosphonoacetaldehyd-Konzentration sowie des möglichen Auftretens neuer Produktpeaks beobachtet werden.

Stationäre Phase:	Vorsäule: LiChrospher 100 RP 18-5 μ EC (20 x 3 mm)
	Hauptsäule: LiChrospher 100 RP 18-5 μ EC (250 x 3 mm)
Mobile Phase:	Wasser (zweifach destilliert)
	0 – 50% Acetonitril
Flussrate:	1,0 ml/min
Detektion:	spektrophotometrisch bei 260 nm

Der Nachweis der Acetoin-Bildung und die mögliche Phosphonoacyloin-Synthese wurde durch *reversed phase* HPLC an einer C18-Säule (LiChrospher 100 RP 18-5 μ EC, CS – Chromatographie Service) unter Verwendung einer HPLC-Anlage von Hewlett Packard Series 1100 erbracht. Anlagensteuerung sowie Datenaufzeichnung und -auswertung erfolgte mit Hilfe der Hewlett Packard-Software „HP ChemStation for LC“. Die 10-minütige Elution wurde mit einem Acetonitril-Gradienten bei einer Temperatur von 25°C und einem Fluss von 1,0 ml/min durchgeführt.

2.7.3 MS (Massenspektroskopie)

Zur Bestätigung der enzymatischen Phosphonoacetaldehyd-Synthese wurden Phosphonopyruvat-Proben vor bzw. nach der Ppd-katalysierten Umsetzung in Kooperation mit Dr. M. Oldiges und B. Luo (Institut für Biotechnologie 2, Forschungszentrum Jülich) mittels Massenspektroskopie (Applied Biosystems/MDS SCIEX Q TRAPTM linear ion trap mass spectrometer, Concord (Kanada)) unter Verwendung der Scan-Modi EMS (Enhanced Mass Spectroscopy for full scan) und EPI (Enhanced Product Ion for product ion scan) analysiert. Die dazugehörige „Analyst“-Software (Version 1.4) ermöglichte die Steuerung der Anlage und die Auswertung der Daten. Das Lösungsmittel zum Injizieren der Proben bestand zu jeweils 50% aus Methanol und Wasser (zweifach destilliert). Der nach der Ppd-Aufreinigung verwendete Aufbewahrungspuffer enthielt 20 mM HEPES (pH 8,0; mit NH₃ eingestellt), 20 mM NaCl und je 1 mM ThDP, MgCl₂ und DTT. Die Phosphonopyruvat-Umsetzung wurde in 50 mM Ammoniumacetat-Puffer (pH 8,0) durchgeführt.

3. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit sollten die biochemischen und strukturellen Eigenschaften der Phosphonopyruvat-Decarboxylase, ein für die Phosphonat-Biosynthese essentielles und zur Familie der Thiamindiphosphat- und Mg(II)-abhängigen α -Ketodecarboxylasen gehörendes Enzym, charakterisiert werden. Zu diesem Zweck wurde das *ppd*-Gen aus *Streptomyces viridochromogenes* Tü494 als Histidin-Fusionsprotein überexprimiert und ausgehend vom Rohextrakt eines rekombinanten *E. coli*-Stammes mittels Ni^{2+} -Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität des Ppd-Fusionsproteins wurde durch die beiden Hilfsenzymkombinationen Phosphonoacetaldehyd-Hydrolase und Alkohol-Dehydrogenase sowie 2-Aminoethylphosphonat-Transaminase und L-Lactat-Dehydrogenase ermöglicht.

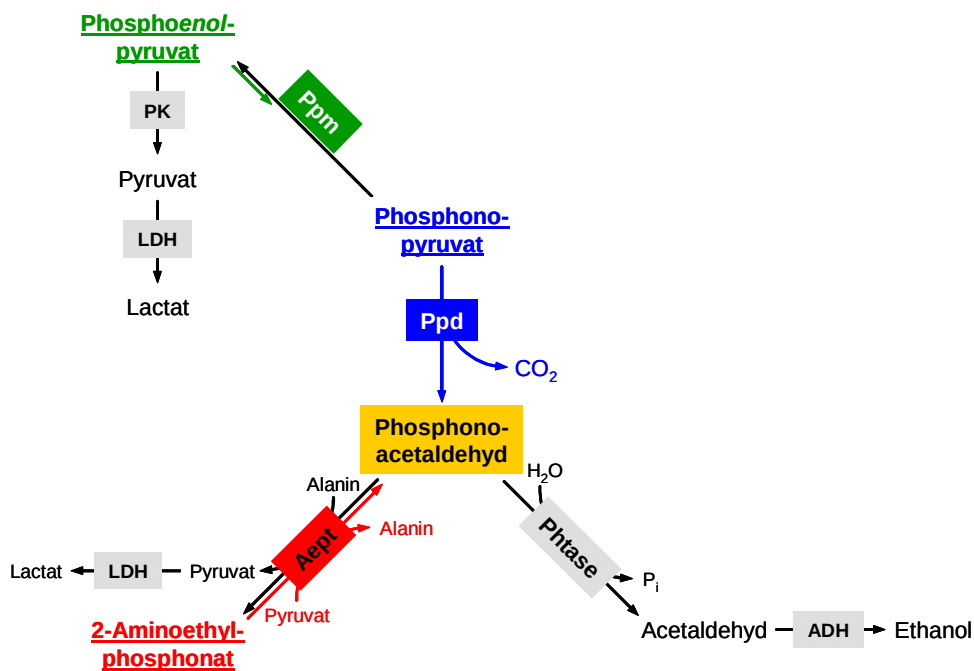


Abbildung 12 Zusammenhängende Darstellung aller für die Charakterisierung der Phosphonopyruvat-Decarboxylase verwendeten Enzyme. ADH, Alkohol-Dehydrogenase; Aept, 2-Aminoethylphosphonat-Transaminase; LDH, L-Lactat-Dehydrogenase; Phtase, Phosphonoacetaldehyd-Hydrolase; PK, Pyruvat-Kinase; Ppd, Phosphonopyruvat-Decarboxylase; Ppm, Phosphoenolpyruvat-Phosphomutase.

Ergebnisse

In Abbildung 12 sind die neben der Ppd verwendeten Enzyme mit den von ihnen katalysierten Reaktionen dargestellt. Die ebenfalls am Phosphonat-Stoffwechsel beteiligten Enzyme 2-Aminoethylphosphonat-Transaminase (Aept) und Phosphonoacetaldehyd-Hydrolase (Phtase) katalysieren die Aminierung bzw. die hydrolytische Spaltung von Phosphonoacetaldehyd (PnAA). Kombiniert mit den Hilfsenzymen L-Lactat-Dehydrogenase (LDH) bzw. Alkohol-Dehydrogenase (ADH) sollten sie für den enzymatischen Nachweis der Ppd-katalysierten Decarboxylierung von Phosphonopyruvat (PnPyr) verwendet werden. Die für den ersten Schritt der Phosphonat-Biosynthese verantwortliche Phosphonoalpyruvat-Phosphomutase (Ppm) sollte zusammen mit den Hilfsenzymen Pyruvat-Kinase (PK) und LDH zur Konzentrationsbestimmung des chemisch synthetisierten Phosphonopyruvats eingesetzt werden. Die Synthese von Phosphonoacetaldehyd sollte neben der Ppd-katalysierten PnPyr-Decarboxylierung auch durch die Aept-katalysierte Desaminierung von 2-Aminoethylphosphonat möglich sein.

Die Expression und Aufreinigung der Ppd und der für die Charakterisierung benötigten, nicht käuflich zu erwerbenden Hilfsenzyme Aept, Phtase und Ppm sollte unter Verwendung des His/Ni-NTA-Systems (Crowe *et al.*, 1994) erfolgen. Die jeweiligen Gene sollten als Fusionsproteine mit einem aminoterminalen 10-fachen Histidinschwanz exprimiert und in einem Schritt ausgehend vom Rohextrakt eines rekombinanten *E. coli*-Stammes mittels Ni^{2+} -Affinitätschromatographie aufgereinigt werden.

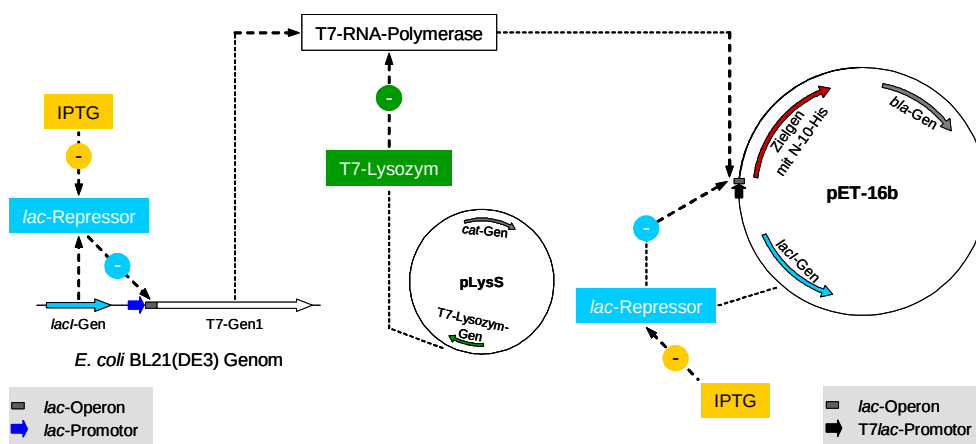


Abbildung 13 Schematische Darstellung des Expressionssystems *E. coli* BL21(DE3)pLysS [pET-16b] (verändert nach Mierendorf *et al.*, 1994). *bla*-Gen, Gen, das für die β -Lactamase kodiert (Ampicillin-Resistenz); *cat*-Gen, Gen, das für die Chloramphenicol-Acetyltransferase kodiert (Chloramphenicol-Resistenz); *lacI*-Gen, Regulationsgen, das für den *lac*-Repressor kodiert.

Zur Expression der Gene als Histidin-Fusionsproteine wurde der Vektor pET-16b zusammen mit dem Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3)pLysS (Novagen, Schwalbach) verwendet, wobei die zu exprimierenden Gene unter der Kontrolle des T7lac-Promotors stehen (Abbildung 13). Das pLysS-kodierte T7-Lysozym ist ein natürlicher Inhibitor der T7-RNA-Polymerase (Moffatt und Studier, 1987; Studier, 1991) und dient in λ DE3-lysogenen *E. coli*-Stämmen der Reduktion der basalen Proteinexpression. Ein weiterer Vorteil pLysS-enthaltender Expressionsstämme ist der nach dem Einfrier/Auftau-Mechanismus funktionierende Zellaufschluss, bei dem das T7-Lysozym durch das Auftauen ins Periplasma freigesetzt wird, was zur Lyse der *E. coli*-Zellen führt.

3.1 Enzyme

3.1.1 Phosphonopyruvat-Decarboxylase

3.1.1.1 Expression und Aufreinigung

Das für die Phosphonopyruvat-Decarboxylase kodierende *ppd*-Gen aus *Streptomyces viridochromogenes* Tü494 (Schwartz *et al.*, 1998) wurde unter Verwendung von sequenzspezifischen Primern mittels PCR aus der Plasmid-DNA pJF119ppdbgl amplifiziert. Mit Hilfe der Primer wurden an den Enden des PCR-Amplifikates die Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme *Nde*I und *Xho*I eingefügt, so dass das *Nde*I/*Xho*I-behandelte PCR-Produkt in den entsprechend geöffneten Vektor pET-16b kloniert werden konnte. Nachfolgend wurde durch mehrmaliges Sequenzieren die korrekte Fusion des *ppd*-Gens mit den Polyhistidinschwanz-Kodierungssequenzen sowie die Anwesenheit möglicher Polymerase-generierter Mutationen überprüft.

Bei den in der Nukleotidsequenz an den Positionen 279 und 837 auftretenden Basenaustauschen Glycin gegen Cytosin handelte es sich um stille Mutationen, die keinen Einfluss auf die Aminosäuresequenz hatten. Die an den Positionen 947 und 949 vorkommenden Nukleotide Cytosin bzw. Glycin, die die zweite bzw. erste Base der Alanin-Codons 316 und 317 darstellen, konnten nicht eindeutig identifiziert werden. Durch ortsgerichtete Mutagenese wurde eine mögliche Änderung der Aminosäuresequenz korrigiert und gleichzeitig die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *Pst*I eingeführt (Abbildung 14). Der Einsatz des resultierenden Vektors pET16ppdA337-339 ermöglichte die Expression der Ppd als Histidin-Fusionsprotein.

Ergebnisse

pET-16b	atggggccatc	atcatcatca	tcatcatcat	catcacagca	gcggccatat	cgaaggtcgt	
	M	G	H	H	H	H	H
ppd-Gen	catatgatcg	gcgcggccga	cctggtggcc	gggctcaccg	gcctcgggtg	gaccaccgtg	57
	H	M	I	G	A	A	D
	gcccggagtgc	cctgctccta	cctgaccccg	ttgatcaacc	gcgtcatcag	cgaccccgcc	117
	A	G	V	P	C	S	Y
	accgcgtacc	tcacggtcac	gcaggaggcg	gaggccgcgg	ccgtcgcggc	aggcgcttgg	177
	T	R	Y	L	T	V	T
	ctgggcgggc	gactgggctg	cgccatcacc	cagaactccg	gcctgggcaa	catgaccaac	237
	L	G	G	G	L	G	C
	ccgctcacct	ccctgctgca	ccccgcgcgc	atcccggccg	tcgtgatcac	cacctggcgg	297
	P	L	T	S	L	L	H
	ggcggcccg	gcgagaagga	cgagccccag	caccacctga	tgggcccggat	caccggggac	357
	G	R	P	G	E	K	D
	ctgctcgacc	tgtgcgacat	ggagtggctc	ctgatccccg	acacgacgga	cgaactgcac	417
	L	L	D	L	C	D	M
	accgcgttcg	ccgcctgcgc	cgctccctcg	gcacaccgtg	aactgcccta	cggtctcctg	477
	T	A	F	A	A	C	R
	ctccccagg	gagtcgctcg	cgacgagccc	ctgaacgaga	cggcaccacg	gtccgcgaca	537
	L	P	Q	G	V	V	A
	ggacaggctg	tacggtacgc	ccggccccgc	cgttccgcgg	cccggcccac	ccggatcgcc	597
	G	Q	V	V	R	Y	A
	gccctggagc	ggctgctggc	cgaactgcc	cgggacgcgg	cgggtggtgc	caccaccggc	657
	A	L	E	R	L	L	A
	aagtccagcc	gggagctgta	caccctcgac	gaccgcgacc	agcacttcta	catggtcggg	717
	K	S	S	R	E	L	Y
	gcggtgggct	cggccgccac	cgctggcctg	ggcgtcgcgc	tgacacacac	ccgcccggtc	777
	A	M	G	S	A	A	T
	gtggtcgtcg	acggcgacgg	ctcgtgtcgt	atgcggctgg	gcagcctcgc	caccgtcggc	837
	V	V	V	D	G	D	G
	gcccacgccc	ccggcaacct	ggtccacctg	gtcctcgaca	acggcggtcca	cgactccacc	897
	A	H	A	P	G	N	L
	ggcggccagc	gcaccctgtc	cagcgccgtc	gacctgccg	ccgtcgcctg	agcctgcggc	957
	G	G	Q	R	T	L	S
	taccgcgcgg	tgcacgcctg	cacctccctg	gacgatctgt	ccgacgccct	cgccaccgca	1017
	Y	R	A	V	H	A	C
	ctggccacgg	acgggcccac	cctggtgcac	ctggcgatcc	ggccgggata	cctggacggg	1077
	L	A	T	D	G	P	T
	ctgggcccgc	cgaaggtcac	ccccgccgaa	gtggcccgc	gcttccgggc	gttcgtcacc	1137
	L	G	R	P	K	V	T
	acggccgccc	ccggcaccgc	cacccgggtc	cacgcgggag	gggtgaccgc	acgatga	1194
	T	P	P	A	G	T	A
							-

Abbildung 14 Nukleotid- und Aminosäuresequenz des Ppd-Fusionsproteins. Die Sequenz resultiert aus der *NdeI/XhoI*-abhängigen Klonierung des mittels PCR amplifizierten *ppd*-Gens aus *Streptomyces viridochromogenes* Tü494 in den Vektor pET-16b und der nachfolgenden ortsgerichteten Mutagenese im Nukleotidbereich 945 – 948. Die vom Vektor stammende Sequenz des Ppd-Fusionsproteins, die die Kodierung des Polyhistidinschwanzes beinhaltet, ist grün gedruckt. Das gelb unterlegte Methionin-Codon kennzeichnet den Translationsstart. Die im Vergleich zur veröffentlichten *ppd*-Sequenz (GenBank Accession: Y14337, Region: 994..2187) veränderten Nukleotide sind rot gedruckt. Die nicht eindeutig identifizierten Nukleotide 947 und 949 sind blau gedruckt und die eingefügte Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *PstI* ist grau unterlegt.

Das anhand der Aminosäuresequenz ermittelte theoretische Molekulargewicht der His₁₀Ppd-Untereinheit beträgt 43.600. In einer SDS-PAGE war im Vergleich zum nicht-induzierten Expressionsstamm im Rohextrakt des induzierten *E. coli*-Stammes BL21(DE3)pLysS [pET16ppdA337-339] die Untereinheit des Ppd-Fusionsproteins als verstärkte Proteinbande mit einer ungefähren Größe von 44 kDa zu erkennen (Abbildung 15, A). Verschiedene Experimente ergaben, dass das Heruntersetzen der Expressionstemperatur von 37°C auf 30°C und die Verlängerung der Expressionszeit auf 5 Stunden zur Verbesserung der Ppd-Expression führt.

Das Ppd-Fusionsprotein konnte mittels Ni²⁺-Affinitätschromatographie aus dem Rohextrakt des induzierten Expressionsstammes aufgereinigt werden (Abbildung 15, B). Die zusätzlichen, unspezifisch bindenden Proteine wurden durch einen zweiten Waschschrift vom Ppd-Fusionsprotein abgetrennt (Abbildung 15, C), so dass die apparente Homogenität (>99%) des aufgereinigten Enzyms gewährleistet war.

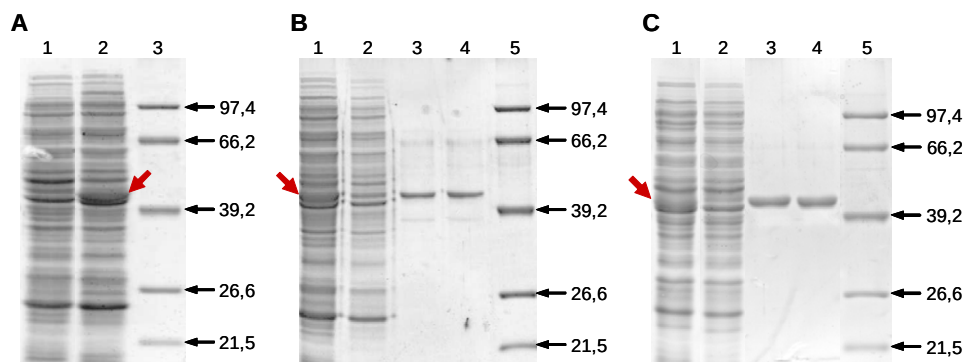


Abbildung 15 SDS-PAGE Analyse der Expression (A) und der mittels Ni²⁺-Affinitätschromatographie durchgeführten Aufreinigung des Ppd-Fusionsproteins (B, C) aus dem Rohextrakt (RE) des induzierten Expressionsstammes *E. coli* BL21(DE3)pLysS [pET16ppdA337-339]. **A:** Vergleich der RE des nicht-induzierten und des induzierten Expressionsstammes (*Spur 1:* 50 µg RE, nicht-induziert; *Spur 2:* 50 µg RE, induziert; *Spur 3:* Protein-Größenstandard [kDa]). **B:** Chromatographische Aufreinigung des Ppd-Fusionsproteins (*Spur 1:* 50 µg RE; *Spur 2:* 50 µg Durchfluss; *Spur 3 und 4:* 10 µg gereinigtes Ppd-Fusionsprotein mit zusätzlichen, unspezifisch bindenden Proteinen; *Spur 5:* Protein-Größenstandard [kDa]). **C:** Chromatographische Aufreinigung des Ppd-Fusionsproteins mit zusätzlichem Waschschrift (*Spur 1:* 50 µg RE; *Spur 2:* 50 µg Durchfluss; *Spur 3 und 4:* 10 µg gereinigtes Ppd-Fusionsprotein; *Spur 5:* Protein-Größenstandard [kDa]). Die roten Pfeile kennzeichnen die in den Rohextrakten der induzierten Expressionsstämme auftretenden Ppd-Banden.

Unter Verwendung des Expressionsstammes *E. coli* BL21(DE3)pLysS [pET16ppdA337-339] konnte für die Phosphonopyruvat-Decarboxylase aus *Streptomyces viridochromogenes* Tü494 ein effizientes Überexpressions- und Aufreinigungsprotokoll etabliert werden: Aus dem Rohextrakt wurde ca. 15 mg/l_{Expressionskultur} rekombinantes und bis zur apparenten Homogenität aufgereinigtes Ppd-Fusionsprotein in einem Schritt mittels Ni²⁺-Affinitätschromatographie gewonnen.

3.1.1.2 Nachweis der enzymatischen Aktivität

Der direkte Nachweis der Ppd-katalysierten Decarboxylierung des chemisch synthetisierten Phosphonopyruvats sollte durch HPLC und Massenspektroskopie (MS) erbracht werden.

Für den Nachweis der Phosphonoacetaldehyd-Synthese mittels HPLC-Analytik wurde eine von Zhang *et al.* (2003a) beschriebene Methode in modifizierter Form verwendet. Mit Hilfe dieser Methode konnte die Ppd-katalysierte PnAA-Bildung durch das Auftreten eines neuen Peaks (Retentionszeit: 8,3 Minuten) visualisiert werden (Abbildung 16), wobei das Verhältnis der Peak-Fläche zur umgesetzten Phosphonopyruvat-Konzentration annähernd linear war. Die eindeutige Identifizierung und Quantifizierung des neu auftretenden Peaks war vorerst nicht möglich, da ein Phosphonoacetaldehyd-Standard nicht verfügbar war. Stattdessen konnte der Nachweis durch die Enzymkombinationen Aept/LDH und Phtase/ADH erbracht werden (siehe 3.1.2.3).

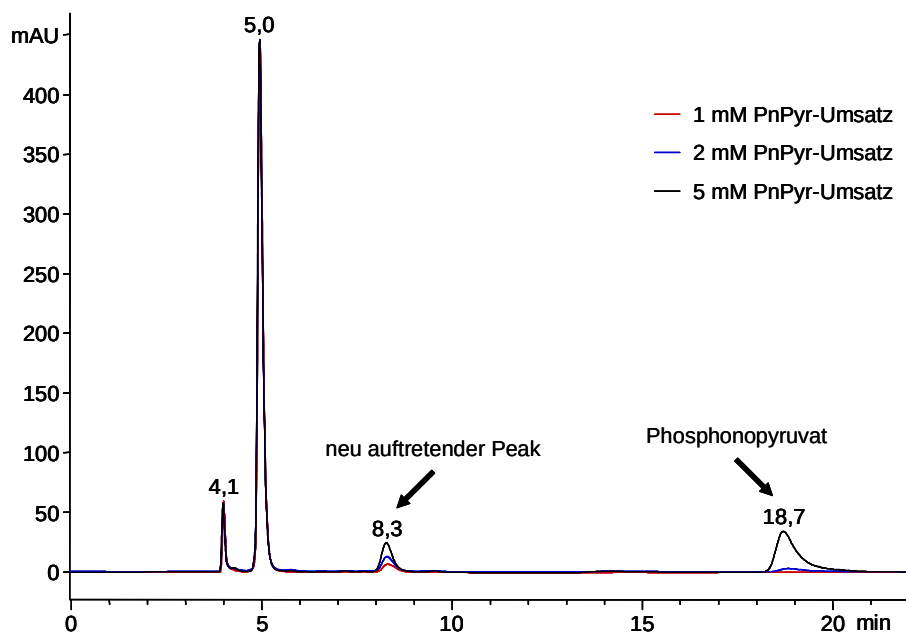


Abbildung 16 Anionenaustausch-HPLC-Analyse der Reaktionsansätze mit 1 mM (–), 2 mM (–) und 5 mM (–) Phosphonopyruvat (PnPyr) zur Ppd-katalysierten Synthese von Phosphonoacetaldehyd, aufgetragen als Absorptionseinheit [mAU] gegen die Zeit [min]. Die Peaks nach 4,1 und 5,0 Minuten stammten vom Puffer. Der im 5 mM-Ansatz nach 18,7 Minuten auftretende Peak kennzeichnete das nicht vollständig umgesetzte PnPyr (Endkonzentration: 0,97 mM). Die Flächen der bei 8,3 Minuten neu auftretenden Peaks waren annähernd linear zur jeweils umgesetzten PnPyr-Konzentration.

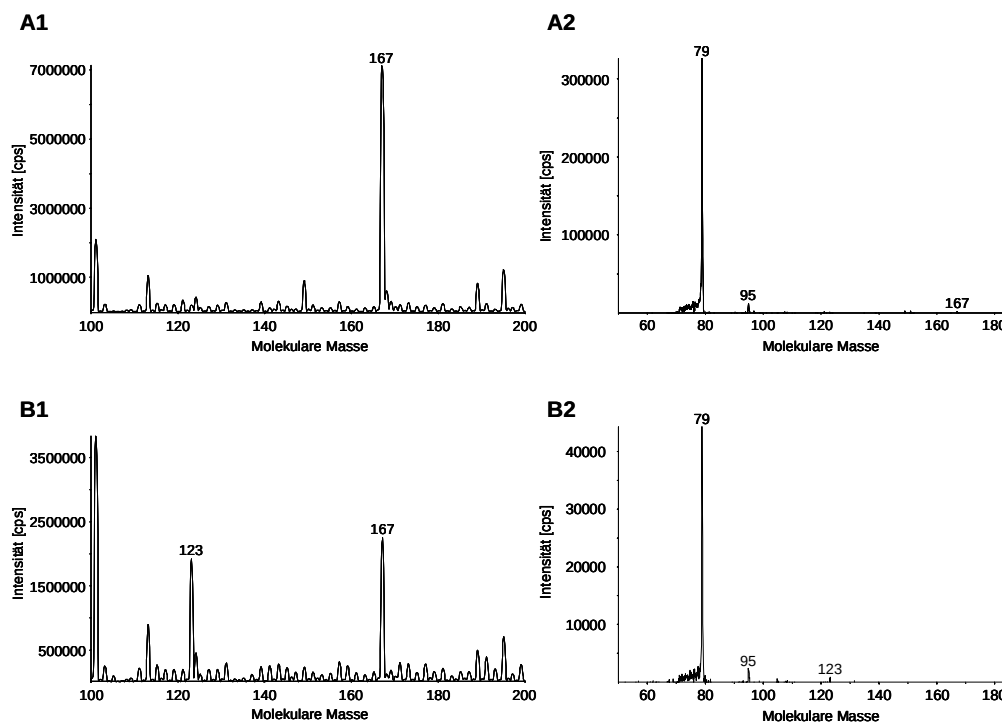


Abbildung 17 Identifizierung von Phosphonopyruvat und Phosphonoacetaldehyd mittels Massenspektroskopie (Applied Biosystems/MDS SCIEX Q TRAPTM linear ion trap mass spectrometer), aufgetragen als Intensität [cps] gegen die molekulare Masse. **A1:** Mit Hilfe des Scan-Modus EMS (Enhanced Mass Spectroscopy for full scan) durchgeführte Analyse des chemisch synthetisierten Phosphonopyruvats. **A2:** Anhand des Scan-Modus EPI (Enhanced Product Ion for product ion scan) vollzogene Ionisierung des Substratpeaks (molekulare Masse: 167). **B1:** Analyse nach der Ppd-katalysierten Umsetzung von Phosphonopyruvat zum Phosphonoacetaldehyd (Scan-Modus EMS). **B2:** Durch den Scan-Modus EPI ausgeführte Ionisierung des Produktpeaks (molekulare Masse: 123).

Proben des chemisch synthetisierten Phosphonopyruvats wurden vor und nach der Ppd-katalysierten Umsetzung mittels Massenspektroskopie (Applied Biosystems/MDS SCIEX Q TRAPTM linear ion trap mass spectrometer) untersucht. Die anhand des Scan-Modus EMS (Enhanced Mass Spectroscopy for full scan) ausgeführte massenspektroskopische Analyse des nicht-umgesetzten Phosphonopyruvats bestätigte dessen molekulare Masse von 167 (Abbildung 17, A1). Die Ionisierung des Substratpeaks, die durch den Scan-Modus EPI (Enhanced Product Ion for product ion scan) ermöglicht wurde, ergab ein Fragment, dessen molekulare Masse (79) mit der eines Phosphonsäurerestes (PO_3^{2-}) übereinstimmte (Abbildung 17, A2).

Die nach der Ppd-katalysierten Umsetzung vollzogene MS-Analyse bestätigte den Substratverbrauch sowie das Vorhandensein eines Produktes mit einer im Vergleich zum Phosphonopyruvat um 44 verringerten molekularen Masse von 123 (Abbildung 17, B1), was

Ergebnisse

der Decarboxylierung des Phosphonopyruvats zum Phosphonoacetaldehyd entsprach. Durch die Ionisierung des Produktpeaks konnte abermals ein Phosphonsäurerest identifiziert werden (Abbildung 17, B2).

Die massenspektroskopische Analyse der Ppd-katalysierten Reaktion war erst gegen Ende der Arbeit zugänglich. Die HPLC-Analytik zum Nachweis der Phosphonoacetaldehyd-Synthese konnte ebenfalls erst im letzten Drittel der Arbeit etabliert werden. Aus diesem Grund war zur Charakterisierung der Phosphonopyruvat-Decarboxylase die Etablierung eines anderen Nachweissystems erforderlich. Unter Zuhilfenahme der PnAA-umsetzenden Enzyme 2-Aminoethylphosphonat-Transaminase und Phosphonoacetaldehyd-Hydrolase (siehe 3.1.2) wurden zwei photometrische Enzymtests zur Bestimmung der Ppd-Aktivität entwickelt.

3.1.2 2-Aminoethylphosphonat-Transaminase und Phosphonoacetaldehyd-Hydrolase

3.1.2.1 Expression und Aufreinigung

Die Gene *phnW* und *phnX* kodieren für die am Phosphonat-Abbau beteiligten Enzyme 2-Aminoethylphosphonat-Transaminase (Aept) und Phosphonoacetaldehyd-Hydrolase (Phosphonatase; Phtase) (Jiang *et al.*, 1995). Mit Hilfe bereits beschriebener Sequenzen wurden auf dem komplementären DNA-Strang des Genoms von *Pseudomonas putida* KT2440 (GenBank Accession: NC_002947) im Nukleotidbereich 2.516.524 – 2.515.418 und 2.515.383 – 2.514.556 die Gene *phnW* und *phnX* identifiziert. Vergleiche auf Nukleotid- und Proteinebene ergaben eine ca. 80%-ige Ähnlichkeit zu den aus *Pseudomonas aeruginosa* PA01 (GenBank Accession: NC_002516) identifizierten Genen bzw. Proteinen. Die bereits charakterisierten Proteine aus *Salmonella typhimurium* LT2 (Baker *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2002) stimmten zu 42% bzw. 54% mit den *phnW*- bzw. *phnX*-kodierenden Proteinen aus *P. putida* KT2440 überein.

Unter Verwendung von sequenzspezifischen Primern wurden die Gene *phnW* und *phnX* mittels PCR aus dem Genom von *P. putida* KT2440 amplifiziert. Durch die Primer wurden an den Enden der PCR-Amplifikate die Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme *NdeI* und *XhoI* eingefügt, so dass die *NdeI*/*XhoI*-behandelten PCR-Produkte in den entsprechend geöffneten Vektor pET-16b kloniert werden konnten. Die korrekte Fusion der Gene mit den Polyhistidinschwanz-Kodierungssequenzen und die Abwesenheit möglicher Polymerase-generierter Mutationen wurden mittels DNA-Sequenzierung bestätigt. Die resultierenden Vektoren pET16aept und pET16phtase ermöglichten die Expression der Gene *phnW* und *phnX* als Histidin-Fusionsproteine.

Für die His₁₀-Untereinheiten der 2-Aminoethylphosphonat-Transaminase und der Phosphonoacetaldehyd-Hydrolase wurden theoretische Molekulargewichte von 42.200 bzw. 32.600 ermittelt. In einer SDS-PAGE konnten in den Rohextrakten der induzierten *E. coli*-Stämme BL21(DE3)pLysS [pET16aapt] und BL21(DE3)pLysS [pET16phtase] die Fusionsproteine Aept (Abbildung 18, A1) und Phtase (Abbildung 18, B1) als verstärkte Proteinbanden mit einer ungefähren Größe von 42 kDa bzw. 33 kDa identifiziert werden. Zur Expressionsoptimierung wurde die Expressionstemperatur auf 30°C herabgesetzt und die Expressionszeit auf 5 Stunden verlängert.

Das Aept- und das Phtase-Fusionsprotein konnte durch Ni²⁺-Affinitätschromatographie aus dem jeweiligen Rohextrakt bis zur apparenten Homogenität (>99%) aufgereinigt werden (Abbildung 18, A3-5 bzw. B3-5). Ein zusätzlicher Waschschrift zur Entfernung von unspezifisch bindenden Proteinen war nicht nötig.

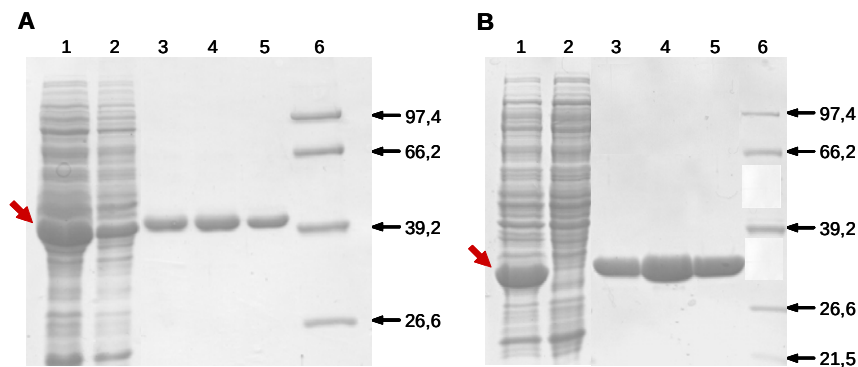


Abbildung 18 SDS-PAGE Analyse der mittels Ni²⁺-Affinitätschromatographie durchgeführten Aufreinigung des Aept- und des Phtase-Fusionsproteins aus dem jeweiligen Rohextrakt (RE) der induzierten Expressionsstämme *E. coli* BL21(DE3)pLysS [pET16aapt] bzw. BL21(DE3)pLysS [pET16phtase]. **A:** Chromatographische Aufreinigung des Aept-Fusionsproteins (Spur 1: 50 µg RE; Spur 2: 50 µg Durchfluss; Spur 3, 4 und 5: 10 µg gereinigtes Aept-Fusionsprotein; Spur 6: Protein-Größenstandard [kDa]). **B:** Chromatographische Aufreinigung des Phtase-Fusionsproteins (Spur 1: 50 µg RE; Spur 2: 50 µg Durchfluss; Spur 3, 4 und 5: 10 µg gereinigtes Phtase-Fusionsprotein; Spur 6: Protein-Größenstandard [kDa]). Die roten Pfeile kennzeichnen die in dem jeweiligen Rohextrakt der induzierten Expressionsstämme auftretende Aept- bzw. Phtase-Bande.

Für die 2-Aminoethylphosphonat-Transaminase und die Phosphonoacetaldehyd-Hydrolase aus *Pseudomonas putida* KT2440 war unter Verwendung der Expressionsstämme *E. coli* BL21(DE3)pLysS [pET16aapt] und *E. coli* BL21(DE3)pLysS [pET16phtase] die Etablierung ihrer Überexpression möglich: Ausgehend von den jeweiligen Rohextrakten konnte mittels Ni²⁺-Affinitätschromatographie ca. 30 bzw. 90 mg/l_{Expressionskultur} rekombinantes und bis zur apparenten Homogenität aufgereinigtes Aept- bzw. Phtase-Fusionsprotein in einem Schritt gewonnen werden.

3.1.2.2 Nachweis der enzymatischen Aktivität

Die Aktivität der 2-Aminoethylphosphonat-Transaminase wurde durch die Desaminierung von 2-Aminoethylphosphonat in Anwesenheit von Pyruvat nachgewiesen (Abbildung 19, grauer Kasten). Mittels *reversed phase* HPLC konnte die Abnahme der AEP-Konzentration und die Bildung von L-Alanin beobachtet werden (Abbildung 20). Bei der HPLC-Methode zum Nachweis der Phosphonoacetaldehyd-Synthese wurde das Auftreten eines neuen Peaks beobachtet (Abbildung 21); dessen Retentionszeit von 8,3 Minuten stimmt mit der des bei der Ppd-katalysierten PnAA-Bildung auftretenden Peaks (Abbildung 16) überein.

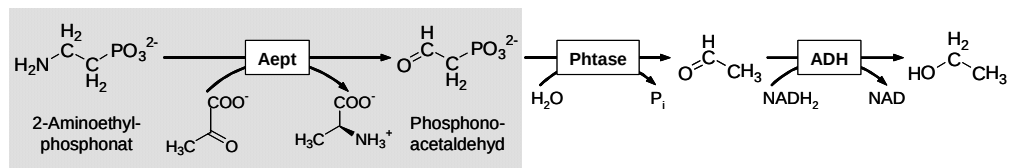


Abbildung 19 Enzymtest zum Aktivitätsnachweis der 2-Aminoethylphosphonat-Transaminase und der Phosphonoacetaldehyd-Hydrolase. ADH, Alkohol-Dehydrogenase; Aept, 2-Aminoethylphosphonat-Transaminase; Phtase, Phosphonoacetaldehyd-Hydrolase.

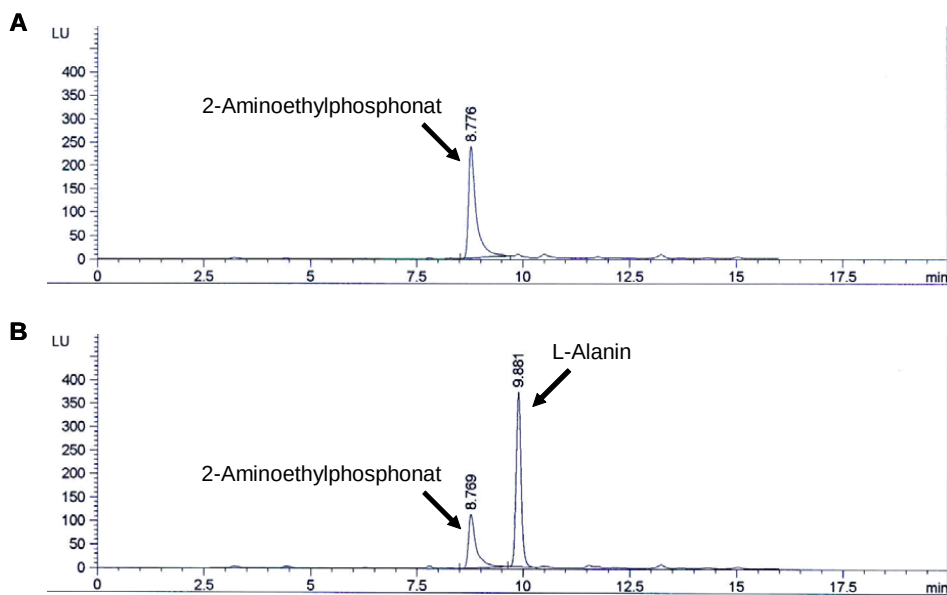


Abbildung 20 *Reversed phase* HPLC-Analyse des Reaktionsansatzes zur Aept-katalysierten Synthese von L-Alanin, aufgetragen als Lumineszenzeinheit [LU] gegen die Zeit [min]. **A:** Analyse vor der Aept-katalysierten Umsetzung von 2-Aminoethylphosphonat (Ausgangskonzentration: 0,2 mM; Retentionszeit: 8,8 Minuten). **B:** Analyse nach der Aept-katalysierten Umsetzung von 2-Aminoethylphosphonat (Endkonzentration: 0,1 mM) zu L-Alanin (Endkonzentration: 0,1 mM; Retentionszeit: 9,9 Minuten).

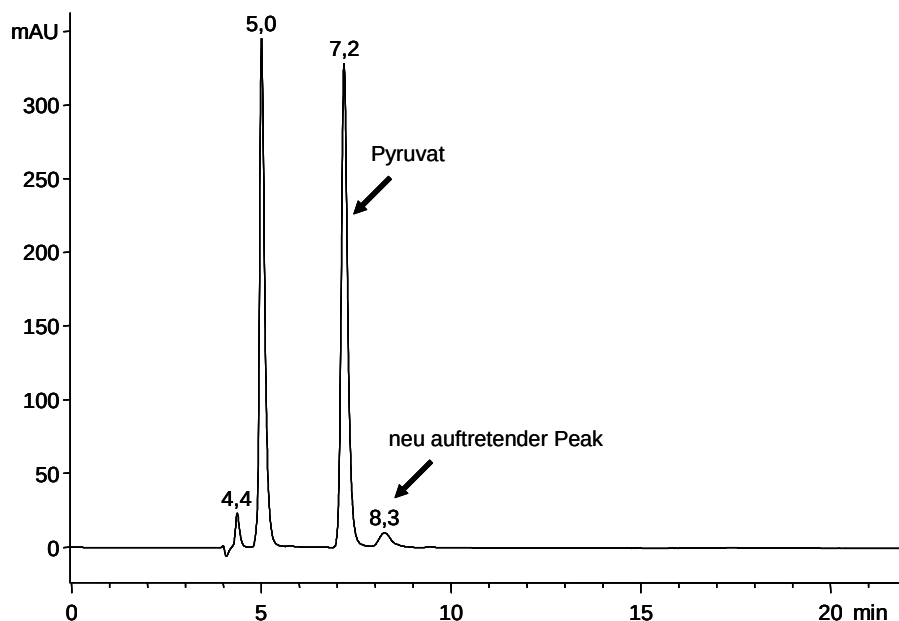


Abbildung 21 Anionenaustausch-HPLC-Analyse des Reaktionsansatzes zur Aept-katalysierten Synthese von Phosphonoacetaldehyd, aufgetragen als Absorptionseinheit [mAU] gegen die Zeit [min]. Die Peaks nach 4,4 und 5,0 Minuten stammten vom Puffer. Der nach 7,2 Minuten auftretende Peak kennzeichnete das nicht vollständig umgesetzte Pyruvat (Ausgangskonzentration: 4,0 mM; Endkonzentration: 2,73 mM). Die Retentionszeit des neu auftretenden Peaks betrug 8,3 Minuten und stimmte mit der bei der Ppd-katalysierten PnAA-Bildung auftretenden Peaks (Abbildung 16) überein.

Die Aktivität der Phosphonoacetaldehyd-Hydrolase konnte durch die hydrolytische Spaltung des bei der Aept-katalysierten Reaktion gebildeten Phosphonoacetaldehyds gekoppelt mit der ADH-abhängigen Reduktion des dabei entstehenden Acetaldehyds photometrisch nachgewiesen werden (Abbildung 19).

Ausgehend von den Substraten 2-Aminoethylphosphonat und Pyruvat wurde anhand der Phosphonoacetaldehyd- und L-Alanin-Synthese sowie der hydrolytischen PnAA-Spaltung mit nachfolgender Acetaldehyd-Reduktion nachgewiesen, dass die aus dem *P. putida*-Stamm KT2440 klonierten Gene *phnW* und *phnX* für die im Phosphonat-Stoffwechsel beteiligten Enzyme 2-Aminoethylphosphonat-Transaminase und Phosphonoacetaldehyd-Hydrolase kodieren.

3.1.2.3 *Aept- und Phtase-abhängiger Nachweis der Ppd-Aktivität*

Die Ppd-katalysierte Decarboxylierung von Phosphonopyruvat wurde durch zwei verschiedene gekoppelte Enzymtests nachgewiesen (Abbildung 22 und Abbildung 23). Die Umsetzung des Ppd-generierten Phosphonoacetaldehyds wurde durch die Histidin-Fusionsproteine 2-Aminoethylphosphonat-Transaminase und Phosphonoacetaldehyd-Hydrolase katalysiert. Die NADH₂-abhängige Reduktion der dabei entstandenen Produkte erfolgte mit Hilfe der Alkohol-Dehydrogenase (ADH) und der L-Lactat-Dehydrogenase (LDH).

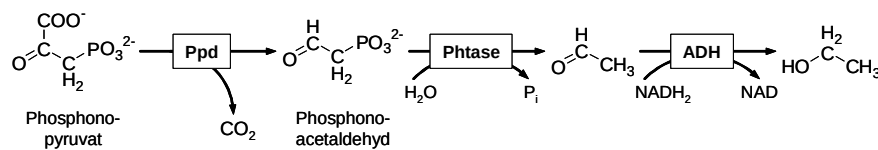


Abbildung 22 Bestimmung der Ppd-Aktivität durch die Hilfsenzyme Phosphonoacetaldehyd-Hydrolase (Phtase) und Alkohol-Dehydrogenase (ADH).

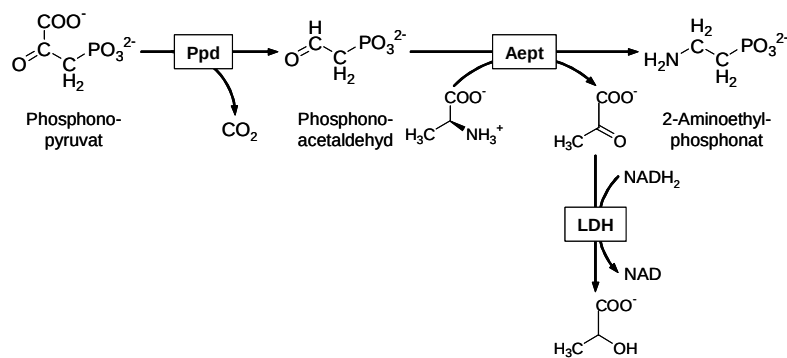


Abbildung 23 Bestimmung der Ppd-Aktivität durch die Hilfsenzyme 2-Aminoethylphosphonat-Transaminase (Aept) und L-Lactat-Dehydrogenase (LDH).

Die Ergebnisse zeigten, dass die Ppd in Kombination mit den Hilfsenzymen Phtase und ADH in der Lage war, Phosphonopyruvat zu Ethanol umzusetzen. Des Weiteren konnte die Ppd zusammen mit den Hilfsenzymen Aept und LDH in Anwesenheit von Alanin die Phosphonopyruvat-Umsetzung zu 2-Aminoethylphosphonat und Lactat katalysieren. Die für die Ppd ermittelte Aktivität lag in beiden Fällen bei ca. 0,9 U/mg.

Da uns kein PnAA-Standard zur Verfügung stand, war die eindeutige Bestimmung des bei der HPLC zum Nachweis der Phosphonoacetaldehyd-Synthese auftretenden Peaks bei 8,3 Minuten (Abbildung 16) nicht möglich. Zur Identifizierung des Peaks wurde die nach 8 – 10 Minuten eluierte Probe mittels präparativer HPLC (1 ml Fraktionen) vom restlichen HPLC-Eluat abgetrennt. Phosphonoacetaldehyd konnte in diesen Fraktionen sowohl

durch die Phtase/ADH-katalysierte als auch durch die Aept/LDH-katalysierte Umsetzung nachgewiesen werden.

3.1.3 Phosphoenolpyruvat-Phosphomutase

Die Aufgaben des Hilfsenzym Phosphoenolpyruvat-Phosphomutase (Ppm) bestanden darin, die Konzentrationsbestimmung des chemisch synthetisierten Phosphonopyruvats sowie die Phosphonat-Synthese ausgehend von Phosphoenolpyruvat zu ermöglichen.

3.1.3.1 Expression und Aufreinigung

Das von Jia *et al.* (1999) konstruierte und uns zur Verfügung gestellte Plasmid pYJ-102 beinhaltet das *ppm*-Gen aus *Mytilus edulis*, das über die Restriktionsschnittstellen *Nde*I und *Bam*HI in den Expressionsvektor pET-3c (Stratagene, Amsterdam) eingebracht worden war. Die *Nde*I/*Bam*HI-vermittelte Restriktion des Plasmids pYJ-102 ermöglichte die Klonierung des *ppm*-Gens in den entsprechend geöffneten Vektor pET-16b. Durch den entstandenen Vektor pET16ppm konnte das *ppm*-Gen als Histidin-Fusionsprotein überexprimiert werden. Das theoretische Molekulargewicht der His₁₀Ppm-Untereinheit beträgt 35.400. In einer SDS-PAGE war im Rohextrakt des induzierten *E. coli*-Stammes BL21(DE3)pLysS [pET16ppm] die Untereinheit des Ppm-Fusionsproteins als verstärkte Proteinbande mit einer Größe von ca. 35 kDa erkennbar (Abbildung 24, B1). Wie im Fall des Ppd-Fusionsproteins führte das Herabsetzen der Expressionstemperatur auf 30°C und die Verlängerung der Expressionszeit auf 5 Stunden zu einer gesteigerten Ppm-Expression.

Das Ppm-Fusionsprotein konnte durch Ni²⁺-Affinitätschromatographie aus dem Rohextrakt aufgereinigt werden (Abbildung 24, B), wobei die Abtrennung der zusätzlichen, unspezifisch bindenden Proteine (Abbildung 24, A) mit Hilfe eines zweiten Waschschrilles erfolgte, was die apparente Homogenität (>99%) des aufgereinigten Enzyms sicherstellte.

Mit Hilfe des Expressionsstammes *E. coli* BL21(DE3)pLysS [pET16ppm] konnte für die Phosphoenolpyruvat-Phosphomutase aus *Mytilus edulis* ein Überexpressions- und Reinigungsprotokoll etabliert werden: Mittels Ni²⁺-Affinitätschromatographie wurde in einem Ein-Schritt-Verfahren aus dem Rohextrakt ca. 5 mg/l_{Expressionskultur} rekombinantes und bis zur apparenten Homogenität aufgereinigtes Ppm-Fusionsprotein gewonnen.

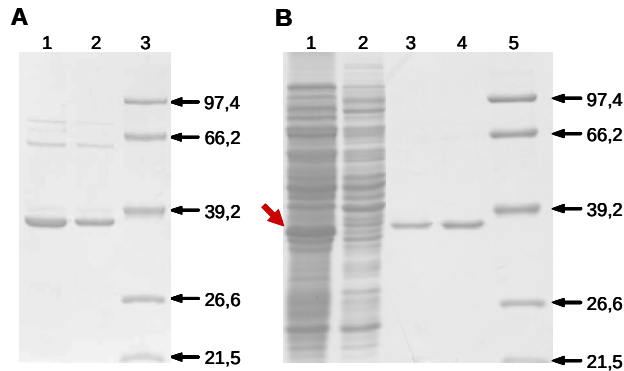


Abbildung 24 SDS-PAGE Analyse der mittels Ni^{2+} -Affinitätschromatographie durchgeführten Aufreinigung des Ppm-Fusionsproteins aus dem Rohextrakt (RE) des induzierten Expressionsstammes *E. coli* BL21(DE3)pLysS [pET16ppm]. **A:** Chromatographische Aufreinigung des Ppm-Fusionsproteins (*Spur 1 und 2:* 10 μg gereinigtes Ppm-Fusionsprotein mit zusätzlichen, unspezifisch bindenden Proteinen; *Spur 3:* Protein-Größenstandard [kDa]). **B:** Chromatographische Aufreinigung des Ppm-Fusionsproteins mit zusätzlichem Waschschrift (*Spur 1:* 50 μg RE; *Spur 2:* 50 μg Durchfluss; *Spur 3 und 4:* 10 μg gereinigtes Ppm-Fusionsprotein; *Spur 5:* Protein-Größenstandard [kDa]). Der rote Pfeil kennzeichnet die im Rohextrakt des induzierten Expressionsstammes auftretende Ppm-Bande.

3.1.3.2 Nachweis der enzymatischen Aktivität

Die Ppm-katalysierte Umlagerung ist eine Gleichgewichtsreaktion, bei der die Bildung des Phosphoenolpyruvats energetisch begünstigt ist (Bowman *et al.*, 1988). Ausgehend von Phosphonopyruvat konnte das nach der Umlagerung entstandene Phosphoenolpyruvat durch die PK/LDH-katalysierte Dephosphorylierung und Reduktion zu L-Lactat photometrisch nachgewiesen werden (Abbildung 25). Die anhand dieses Enzymtests ermittelte Ppm-Aktivität betrug 32 U/mg.

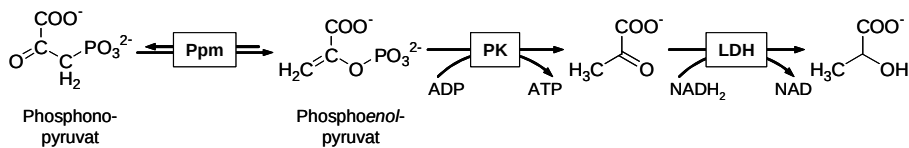


Abbildung 25 Bestimmung der Ppm-Aktivität durch die Hilfsenzyme Pyruvat-Kinase (PK) und L-Lactat-Dehydrogenase (LDH).

3.1.3.3 Ppm-abhängige Bestimmung der Phosphonopyruvat-Konzentration

Die Ppm-katalysierte und aufgrund des Reaktionsgleichgewichtes nahezu vollständige Umlagerung des Phosphonopyruvats zu Phosphoenolpyruvat (PEP) stellt in Kombination mit der PK/LDH-abhängigen PEP-Umsetzung zu Lactat (Abbildung 25) eine effektive Methode zur Konzentrationsbestimmung des chemisch synthetisierten Phosphonopyruvats dar. Der durch definierte PEP-Konzentrationen ermittelte Phosphonopyruvat-Gehalt der einzelnen Chargen lag zwischen 60% und 100%. Nachfolgend wurden nur diejenigen Chargen verwendet, die eine Phosphonopyruvat-Konzentration von mindestens 90% aufwiesen.

3.1.4 Synthese von 2-Aminoethylphosphonat

3.1.4.1 In vitro-Synthese mit gereinigten Enzymen

Der kombinierte Einsatz der gereinigten Histidin-Fusionsproteine Ppm aus *M. edulis*, Ppd aus *S. viridochromogenes* Tü494 und Aept aus *P. putida* KT2440 sollte die enzymatische Synthese der C-P-Verbindung 2-Aminoethylphosphonat ausgehend von Phosphoenolpyruvat bzw. Phosphonopyruvat in Anwesenheit von L-Alanin ermöglichen (Abbildung 26). Die Aept-katalysierte Bildung von 2-Aminoethylphosphonat (AEP) und die daraus resultierende Abnahme der L-Alanin-Konzentration wurden mittels *reversed phase* HPLC analysiert.

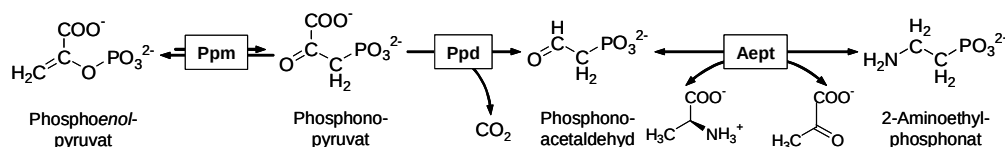


Abbildung 26 Schematische Darstellung der enzymatischen 2-Aminoethylphosphonat-Synthese, katalysiert durch die Phosphoenolpyruvat-Phosphomutase (Ppm), die Phosphonopyruvat-Decarboxylase (Ppd) und die 2-Aminoethylphosphonat-Transaminase (Aept).

Die für die AEP-Synthese benötigten Substrate Phosphoenolpyruvat bzw. Phosphonopyruvat und L-Alanin wurden in einer Konzentration von jeweils 2 mM eingesetzt. Bei den Negativ-Kontrollen, denen lediglich zwei der drei erforderlichen Enzyme zugesetzt wurden, blieb die L-Alanin-Konzentration unverändert (Abbildung 27, A). Im Gegensatz dazu wurde beim Einsatz der Enzymkombination Ppm, Ppd und Aept neben der Verringerung der L-Alanin-Konzentration die Bildung von 2-Aminoethylphosphonat beobachtet (Abbildung 27, B). Die bei diesen Ansätzen nach Abbruch der Enzymkatalyse ermittelte Endkonzentration der beiden Stickstoff-Verbindungen L-Alanin und 2-Aminoethylphosphonat betrug 1 mM. Dieses äquimolare Konzentrationsverhältnis war auf das Reaktionsgleichgewicht der Aept

Ergebnisse

zurückzuführen und bestätigte die vollständige Umsetzung der Ausgangssubstrate Phosphoenolpyruvat und Phosphonopyruvat.

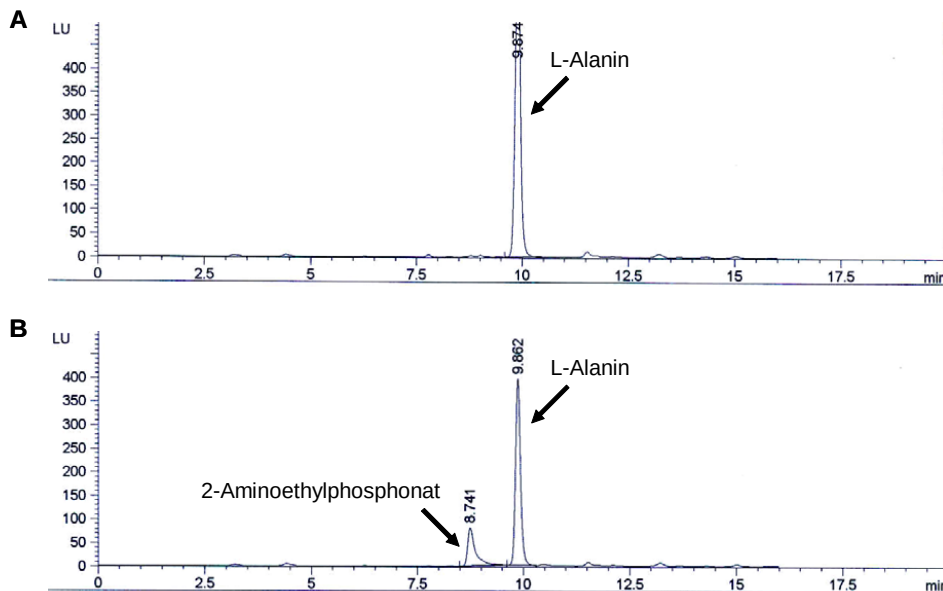


Abbildung 27 *Reversed phase HPLC-Analyse der Reaktionsansätze zur in vitro-Synthese von 2-Aminoethylphosphonat mit den als Histidin-Fusionsprotein aufgereinigten Enzymen Phosphoenolpyruvat-Phosphomutase (Ppm), Phosphonopyruvat-Decarboxylase (Ppd) und 2-Aminoethylphosphonat-Transaminase (Aept), aufgetragen als Lumineszenzeinheit [LU] gegen die Zeit [min]. A:* Analyse der Phosphoenolpyruvat- und L-Alanin-enhaltenden (Ausgangskonzentration: je 2 mM; 1:10 Verdünnung; Retentionszeit des L-Alanins: 9,9 Minuten) Negativ-Kontrolle, der nur die Enzyme Ppm und Ppd zugesetzt wurden. **B:** Analyse nach der Ppm-, Ppd- und Aept-katalysierten Umsetzung von Phosphoenolpyruvat und L-Alanin (Ausgangskonzentration: je 2 mM) zu 2-Aminoethylphosphonat (Endkonzentration: 1 mM; 1:10 Verdünnung; Retentionszeit: 8,7 Minuten). Das im Reaktionsansatz verbliebene L-Alanin (Endkonzentration: 1 mM; 1:10 Verdünnung) beruhte auf dem Reaktionsgleichgewicht der Aept und bestätigte den vollständigen Verbrauch des Phosphoenolpyruvats.

3.1.4.2 *In vivo-Synthese in E. coli*

Mit der *in vivo*-Synthese von 2-Aminoethylphosphonat sollte ein neuer Stoffwechselweg in *E. coli* etabliert werden (Abbildung 28), wobei so genannte Duet-Vektoren (Novagen, Schwalbach) die gleichzeitige Expression der dafür benötigten Gene *ppm* aus *M. edulis*, *ppd* aus *S. viridochromogenes* Tü494 und *phnW* aus *P. putida* KT2440 ermöglichen sollten. Als Expressionsstamm sollte einerseits der *E. coli*-Stamm BL21(DE3) (Novagen, Schwalbach) verwendet werden. Ferner sollten die Gene im *E. coli*-Stamm F41, der

Deletionen in den Genen für die Pyruvat-Kinasen (*pykA*, *pykF*) und die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (*ppc*) trägt, zur Expression gebracht werden. Die Pyruvat-Kinasen und die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase katalysieren PEP-verbrauchende Reaktionen (Abbildung 28), so dass aufgrund der Deletionen Phosphoenolpyruvat in erhöhtem Maße für die AEP-Produktion zur Verfügung stehen sollte. Bislang ist jedoch nicht bekannt, ob die *E. coli*-Mutante F41 tatsächlich eine erhöhte PEP-Konzentration aufweist.

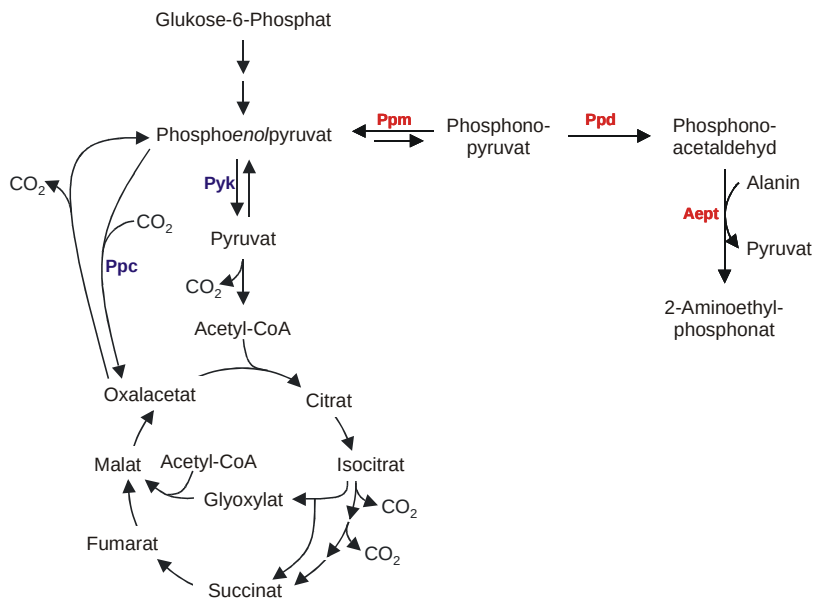


Abbildung 28 Schematische Darstellung der 2-Aminoethylphosphonat-Synthese in *E. coli* mit heterologer Phosphoenolpyruvat-Phosphomutase (Ppm), Phosphonopyruvat-Decarboxylase (Ppd) und 2-Aminoethylphosphonat-Transaminase (Aept). Im *E. coli*-Stoffwechsel werden Phosphoenolpyruvat-verbrauchende Reaktionen u. a. durch die Pyruvat-Kinasen (Pyk) und die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (Ppc) katalysiert.

Die Vektoren pETDuet-1 und pACYCDuet-1 ermöglichen aufgrund ihrer unterschiedlichen Replikons und Resistenzmarker die gleichzeitige Expression von bis zu vier Genen in einer Zelle. Die Gene *ppm* und *ppd* wurden in den Vektor pETDuet-1 kloniert und für die Klonierung des *phnW*-Gens wurde der Vektor pACYCDuet-1 verwendet.

Bei dem für die Expression der Phosphonopyruvat-Decarboxylase konstruierten Plasmid war das *ppd*-Gen über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *XhoI* in den Vektor pET-16b eingebracht worden (siehe 3.1.1.1). Von diesem Expressionsplasmid ausgehend wurde das *ppd*-Gen durch *NdeI/XhoI*-vermittelte Restriktion in den entsprechend geöffneten Vektor pETDuet-1 kloniert. Vor der Klonierung des *ppm*-Gens musste eine im *ppd*-Gen an der Position 1063 – 1068 existierende *BamHI*-Erkennungssequenz (vgl. Abbildung 14) mittels ortsgerichteter Mutagenese entfernt werden. Ausgehend vom Expressionsvektor pET16ppm (siehe 3.1.3.1) erfolgte anhand der Restriktionsschnittstellen *NcoI* und *BamHI* die Klonierung

Ergebnisse

des *ppm*-Gens in den adäquat geöffneten Vektor pETDuet-Ppd-BamHI. Die angewandte Klonierungsstrategie hatte zur Folge, dass mit Hilfe des Plasmids pETDuet-Ppm-Ppd das *ppd*-Gen als unfusioniertes Protein exprimiert wurde, wohingegen das *ppm*-Gen als Fusionsprotein mit einem aminoterminalen 10-fachen Histidinschwanz exprimiert wurde.

Analog zur Klonierung des *ppd*-Gens konnte das Gen für die 2-Aminoethylphosphonat-Transaminase (*phnW*) ausgehend vom Expressionsplasmid pET16aapt (siehe 3.1.2.1) durch die *Nde*I/*Xho*I-vermittelte Restriktion in den Vektor pACYCDuet-1 eingebracht werden. Entsprechend der Ppd-Expression wurde das *phnW*-Gen mit Hilfe des Plasmids pACYCDuet-Aept als unfusioniertes Protein exprimiert.

Die in die pETDuet-1 und pACYCDuet-1 klonierten Gene *ppm*, *ppd* und *phnW* stehen unter der Kontrolle des T7/*lac*-Promotors, d.h., ihre Expression wird durch die T7-RNA-Polymerase katalysiert. Um die Genexpression im *E. coli*-Stamm F41 zu ermöglichen, wurde das Gen für die T7-RNA-Polymerase mit Hilfe des „ λ DE3 Lysogenization Kit“ (Novagen, Schwalbach) in das Genom des Bakterienstammes eingebracht. Der kombinierte Einsatz eines Helfer- und eines Selektionsphagen ermöglichte neben der ortspezifischen Integration des λ DE3 Prophagen die Selektion positiver Klone. Die Anwesenheit des Phagen im Bakteriengenom wurde anhand eines Testerphagen überprüft. Die Expressionsrate des konstruierten Stammes *E. coli* F41(DE3) wurde mit der des Expressionsstammes *E. coli* BL21(DE3) verglichen.

Die theoretischen Molekulargewichte der unfusionierten Ppd- und Aept-Untereinheiten liegen bei 41.100 bzw. 39.700. Die Molekulargewichtsberechnung der His₁₀Ppm-Untereinheit ergab einen theoretischen Wert von 35.400. In einer SDS-Page wurde im Rohextrakt des induzierten Expressionsstammes *E. coli* BL21(DE3) [pETDuet-Ppm-Ppd] [pACYCDuet-Aept] die gleichzeitige Expression der Proteine Ppm (✱), Ppd (✱) und Aept (✱) durch das Auftreten von drei verstärkten Proteinbanden mit ungefähren Größen von 36 kDa, 39 kDa und 41 kDa nachgewiesen (Abbildung 29, A). Im Gegensatz dazu war beim induzierten Expressionsstamm *E. coli* F41(DE3) [pETDuet-Ppm-Ppd] [pACYCDuet-Aept] die Co-Expression der Gene *ppm*, *ppd* und *phnW* weniger deutlich ausgeprägt (Abbildung 29, B).

Zum Nachweis der Ausscheidung bzw. Bildung von 2-Aminoethylphosphonat wurden die Überstände der Expressionskulturen *E. coli* BL21(DE3) [pETDuet-Ppm-Ppd] [pACYCDuet-Aept] und *E. coli* F41(DE3) [pETDuet-Ppm-Ppd] [pACYCDuet-Aept] mittels *reversed phase* HPLC analysiert; aber 2-Aminoethylphosphonat konnte in keinem der untersuchten Kulturüberstände nachgewiesen werden. Infolgedessen wurde die enzymatische Aktivität der Ppm, der Ppd und der Aept in den Rohextrakten der jeweiligen Expressionsstämme überprüft. Auch hier konnte, entgegen der *in vitro*-Synthese mit den gereinigten Fusionsproteinen Ppm, Ppd und Aept (siehe 3.1.4.1), die Bildung von 2-Aminoethylphosphonat ausgehend von Phosphoenolpyruvat bzw. Phosphonopyruvat und L-Alanin nicht beobachtet werden; jedoch wurde in beiden Rohextrakten die enzymatische Aktivität der Ppm anhand der Umlagerung des eingesetzten Phosphonopyruvats zu Phosphoenolpyruvat nachgewiesen. Des Weiteren konnte in beiden Rohextrakten die

Aept-Aktivität durch die Bildung von L-Alanin ausgehend von 2-Aminoethylphosphonat und Pyruvat aufgezeigt werden. Der separate Nachweis der Ppd-Aktivität war aufgrund der ebenfalls existierenden Enzymaktivitäten von Ppm und Aept nicht möglich.

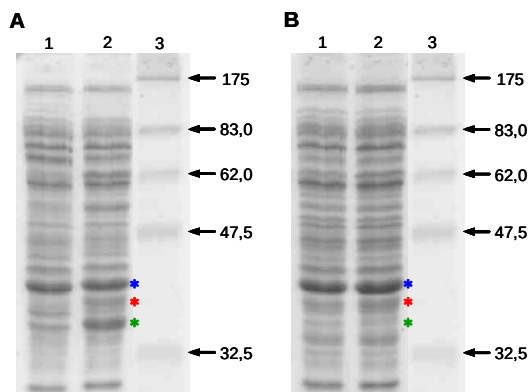


Abbildung 29 SDS-PAGE Analyse der gleichzeitigen Expression der Gene *ppm* (*), *ppd* (*) und *phnW* (*) in den induzierten *E. coli*-Stämmen BL21(DE3) und F41(DE3). **A:** Spur 1: 50 µg RE *E. coli* BL21(DE3) [pETDuet-1] [pACYCDuet-1]; Spur 2: 50 µg RE *E. coli* BL21(DE3) [pETDuet-Ppm-Ppd] [pACYCDuet-Aept]; Spur 3: Protein-Größenstandard [kDa]. **B:** Spur 1: 50 µg RE *E. coli* F41(DE3) [pETDuet-1] [pACYCDuet-1]; Spur 2: 50 µg RE *E. coli* F41(DE3) [pETDuet-Ppm-Ppd] [pACYCDuet-Aept]; Spur 3: Protein-Größenstandard [kDa].

3.1.5 Zusammenfassung

Die Phosphonopyruvat-Decarboxylase (Ppd) aus *Streptomyces viridochromogenes* Tü494, ein für die Phosphonat-Biosynthese essentielles Enzym, wurde mittels des His/Ni-NTA-Systems exprimiert und aufgereinigt. Die Ppd-katalysierte Decarboxylierung des chemisch synthetisierten Phosphonopyruvats zum Phosphonoacetaldehyd wurde anhand von HPLC sowie Massenspektroskopie bestätigt.

Durch die am Phosphonat-Stoffwechsel beteiligten Enzyme 2-Aminoethylphosphonat-Transaminase (Aept) und Phosphonoacetaldehyd-Hydrolase (Phtase), die die Aminierung bzw. die Hydrolyse des Ppd-generierten Phosphonoacetaldehyds katalysieren, konnten zwei weitere Nachweismöglichkeiten etabliert werden. Die aus *Pseudomonas putida* KT2440 stammenden Gene *phnW* und *phnX* wurden, wie im Fall des *ppd*-Gens, mit Hilfe des His/Ni-NTA-Systems exprimiert und aufgereinigt. Die Aktivität dieser bislang noch nicht charakterisierten Enzyme wurde durch den Abbau von 2-Aminoethylphosphonat aufgezeigt. Der kombinierte Einsatz der Aept mit der L-Lactat-Dehydrogenase bzw. der Phtase mit der Alkohol-Dehydrogenase ermöglichte den photometrischen Nachweis der Ppd-Aktivität, der für die Charakterisierung der Phosphonopyruvat-Decarboxylase verwendet wurde.

Die Phosphoenolpyruvat-Phosphomutase ist das Enzym, das für die Ausgangsreaktion der Phosphonat-Biosynthese verantwortlich ist. Die Expression und Aufreinigung des aus *Mytilus edulis* stammenden *ppm*-Gens erfolgte ebenfalls nach der His/Ni-NTA-Methode. Das Enzym ermöglichte einerseits den Einsatz von Phosphoenolpyruvat als Ausgangssubstrat der Phosphonat-Biosynthese. Zum anderen wurde es in Kombination mit den Enzymen Pyruvat-Kinase und L-Lactat-Dehydrogenase zur Quantifizierung des chemisch synthetisierten Phosphonopyruvats eingesetzt.

Der kombinierte Einsatz der Histidin-Fusionsproteine Ppm, Ppd und Aept ermöglichte die *in vitro*-Synthese der C-P-Verbindung 2-Aminoethylphosphonat. Beim Versuch der *in vivo*-Synthese in *E. coli* wurde zwar die gleichzeitige Expression der Gene *ppm*, *ppd* und *phnW* anhand einer SDS-PAGE dokumentiert; jedoch konnte 2-Aminoethylphosphonat weder im Kulturüberstand noch bei der ausgehend von den Rohextrakten der Expressionskulturen durchgeführten *in vitro*-Synthese nachgewiesen werden.

3.2 Biochemische Charakterisierung der Ppd

3.2.1 Einfluss von pH-Wert und Temperatur auf die Enzymaktivität und die Enzymstabilität

Für die Anwendung eines Enzyms als Biokatalysator in Synthesereaktionen ist dessen Toleranz gegenüber den verschiedenen Reaktionsparametern von großer Bedeutung. Kenntnisse über die Enzymstabilität und -aktivität gegenüber dem pH-Wert, dem verwendeten Puffersystem und der Reaktionstemperatur geben Aufschluss über ein Enzym und ermöglichen eine Optimierung der Reaktionsführung. Die Untersuchungen zum Einfluss der Reaktionsparameter pH-Wert, Puffersystem und Temperatur auf die Aktivität und Stabilität der Ppd erfolgten in Kombination mit den Hilfsenzymen Phtase und ADH sowie Aept und LDH und wurden jeweils in zwei- bzw. dreifacher Ausführung durchgeführt. Die nachfolgend aufgeführten Daten wurden anhand der Mittelwerte, die sich aus den einzelnen Messungen ergaben, bestimmt.

Die Enzymaktivität in Abhängigkeit vom pH-Wert wurde im Bereich pH 5,5 – 11,0 unter Verwendung der Puffersysteme MES, MOPS, HEPES, TRIS, BICINE, GLYGLY, CHES und CAPS analysiert. Das pH-Profil verlief glockenförmig und Ppd-Aktivität konnte im pH-Bereich 5,5 bis 10,0 nachgewiesen werden (Abbildung 30). In Kombination mit den Hilfsenzymen Phtase und ADH lag das Optimum der Ppd-Aktivität mit 90 – 100% zwischen pH 7,0 und 8,5. In den Bereichen pH 6,5 und pH 9,0 – 9,5 wies die Ppd noch 70 – 80% der maximalen Aktivität auf. Bei pH-Werten unter 6,5 bzw. über 9,5 sank die enzymatische Aktivität rasch ab. Unter Verwendung der Enzymkombination Aept/LDH war die Ppd-Aktivität zwischen pH 7,5 und 8,5 mit 90 – 100% am höchsten; unterhalb und oberhalb dieses pH-Bereiches wurde ein rapider Aktivitätsverlust beobachtet. Die in Abhängigkeit vom

pH-Wert verwendeten Puffersysteme hatten sowohl beim Phtase/ADH- als auch beim Aept/LDH-Enzymtest keinen Einfluss auf die enzymatische Aktivität.

Da bei beiden Enzymtests die Ppd-Aktivität unabhängig vom Puffersystem im pH-Bereich 7,5 bis 8,5 am höchsten war, wurden die Ppd-katalysierten Umsetzungen unter Verwendung des HEPES-Puffersystems bei pH 8,0 durchgeführt.

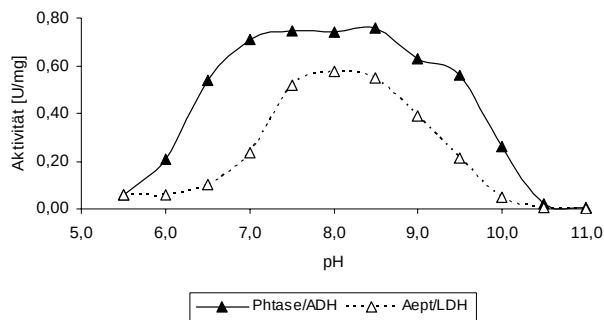


Abbildung 30 pH-Profil der Ppd-Aktivität, dargestellt als direkte Auftragung der Enzymaktivität [U/mg] gegen den pH-Wert. Die spezifische Aktivität der Ppd wurde durch die Hilfsenzyme Phosphonoacetaldehyd-Hydrolase (Phtase) und Alkohol-Dehydrogenase (ADH) bzw. 2-Aminoethylphosphonat-Transaminase (Aept) und L-Lactat-Dehydrogenase (LDH) ermittelt. Aufgeführt sind die Mittelwerte aus zweifach durchgeführten Messungen in je 50 mM MES (pH 5,5 – 6,5), MOPS (pH 6,5 – 7,5), HEPES (pH 7,0 – 8,0), TRIS (pH 7,0 – 9,0), BICINE (pH 8,0 – 9,0), GLYGLY (pH 7,5 – 9,5), CHES (pH 9,0 – 10,0) und CAPS (pH 10,5 – 11,5).

Wie der pH-Wert hatten auch die Reaktions- und die Lagerungstemperatur einen Einfluss auf die Ppd-Aktivität. Die Untersuchungen zum Einfluss der Reaktionstemperatur erfolgten in einem Bereich von 20°C – 49°C (Abbildung 31, A). Dabei konnte gezeigt werden, dass die Erhöhung der Temperatur mit einer Erhöhung der enzymatischen Aktivität einherging und dass das Temperaturmaximum der Ppd oberhalb von 49°C lag. Innerhalb des untersuchten Bereiches stieg die Ppd-Aktivität mit einem Q_{10} von durchschnittlich 1,8 an; ein Temperatur-Verhalten, welches charakteristisch für *in vitro* untersuchte Enzyme mesophiler Organismen ist (Bisswanger, 2000).

In der Arrhenius-Darstellung zeigte die Ppd-Aktivität in Abhängigkeit von der Temperatur ein lineares Verhalten (Abbildung 31, B). Die für die Ppd anhand der Steigung der Regressionsgeraden ermittelte Aktivierungsenergie von 45,4 kJ/mol liegt im Bereich typischer Enzym-Aktivierungsenergien (Bisswanger, 2000).

Ergebnisse

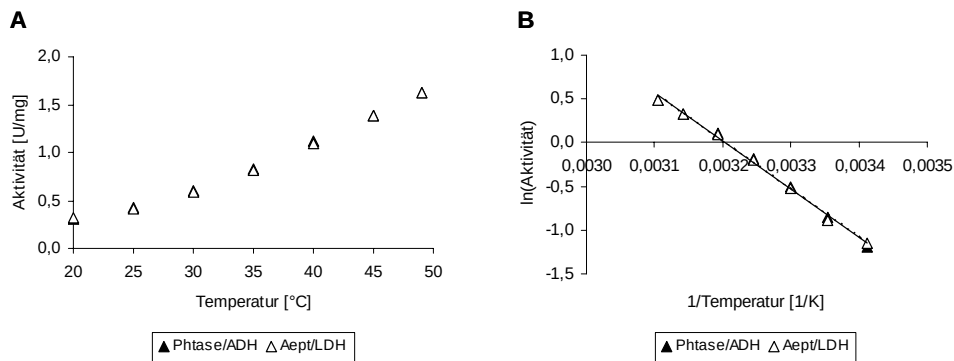


Abbildung 31 Einfluss der Reaktionstemperatur auf die Ppd-Aktivität. Die spezifische Aktivität der Ppd wurde mit Hilfe der Enzymkombinationen Phosphonoacetaldehyd-Hydrolase (Phtase) und Alkohol-Dehydrogenase (ADH) sowie 2-Aminoethylphosphonat-Transaminase (Aept) und L-Lactat-Dehydrogenase (LDH) ermittelt. Aufgeführt sind die Mittelwerte aus dreifach durchgeführten Messungen. **A:** Direkte Auftragung der Enzymaktivität [U/mg] gegen die Reaktionstemperatur [°C]. **B:** Arrhenius-Darstellung, aufgetragen als natürlicher Logarithmus der Enzymaktivität gegen die reziproke Temperatur [1/K].

Die Halbwertszeiten als Maß der Ppd-Stabilität, die abhängig von den jeweiligen Lagerungstemperaturen waren, wurden durch Inkubation des in Ppd-Aufbewahrungspuffer gelagerten Enzyms bei verschiedenen Temperaturen und Ermittlung der Enzymaktivität in regelmäßigen Abständen bestimmt.

Die Halbwertszeiten, die bei der Aufbewahrung der Ppd bei -20°C und 4°C ermittelt wurden, waren mit ca. 50 Tagen annähernd identisch. Bei einer Lagerungstemperatur von 25°C wies die Ppd eine Halbwertszeit von 9 Tagen auf. Eine Erhöhung der Temperatur auf 30°C oder 37°C führte zur Reduktion der Halbwertszeit auf 6 bzw. 3,5 Tage. Die Halbwertszeiten bei 45°C und 50°C betrugen nur noch 13 bzw. 2,5 Stunden, während die Aktivität oberhalb von 50°C bereits nach 18 Minuten auf die Hälfte der Ausgangsaktivität zurückging (Tabelle 10).

Tabelle 10 Halbwertszeiten der Ppd bei unterschiedlichen Lagerungstemperaturen. Die spezifischen Aktivitäten des in Ppd-Aufbewahrungspuffer gelagerten Enzyms wurden über einen Zeitraum von bis zu 60 Tagen durch die Enzymkombinationen Phtase/ADH und Aept/LDH ermittelt.

Temperatur	-20°C	4°C	25°C	30°C	37°C	45°C	50°C	55°C
Halbwertszeit	52 d	50 d	9 d	6 d	3,5 d	13 h	2,5 h	0,3 h

Da bei Temperaturen $\geq 37^\circ\text{C}$ der Aktivitätsverlust bereits nach kurzer Zeit relativ hoch ist, wurden die Ppd-katalysierten Umsetzungen bei einer Temperatur von 30°C durchgeführt.

3.2.2 Enzymkinetik in Abhängigkeit von dem physiologischen Substrat Phosphonopyruvat

Die von der Phosphonopyruvat-Decarboxylase katalysierte Umsetzung des Phosphonopyruvats zum Phosphonoacetaldehyd und Kohlendioxid gewährleistet die Etablierung der zuvor gebildeten Kohlenstoff-Phosphor-Bindung.

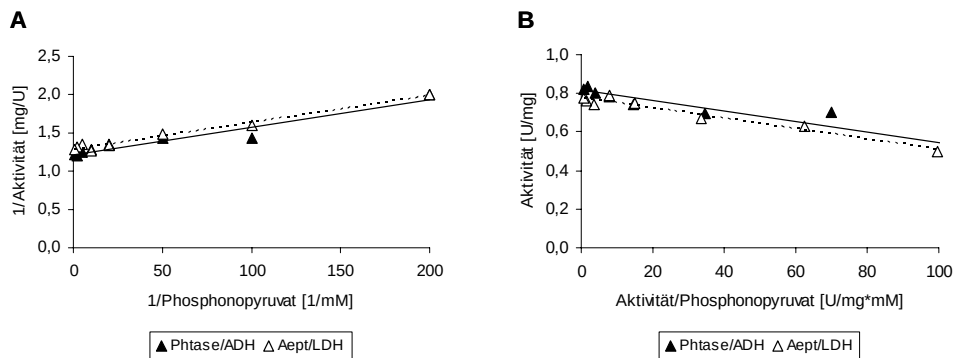


Abbildung 32 Bestimmung der kinetischen Parameter der Ppd für das physiologische Substrat Phosphonopyruvat. Die spezifische Aktivität der Ppd wurde durch die Hilfsenzyme Phosphonoacetaldehyd-Hydrolase (Phtase) und Alkohol-Dehydrogenase (ADH) bzw. 2-Aminoethylphosphonat-Transaminase (Aept) und L-Lactat-Dehydrogenase (LDH) ermittelt. Aufgeführt sind die Mittelwerte aus zweifach durchgeführten Messungen. **A:** Lineweaver-Burk-Darstellung, aufgetragen als reziproke Enzymaktivität [mg/U] gegen die reziproke Phosphonopyruvat-Konzentration [1/mM]. **B:** Eadie-Hofstee-Darstellung, aufgetragen als Enzymaktivität [U/mg] gegen den aus Enzymaktivität und Phosphonopyruvat-Konzentration gebildeten Quotienten [U/mg*mM].

Die Michaelis-Konstante (K_m), das Maß für die Affinität eines Enzyms gegenüber einem Substrat, und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (v_{max}) der Ppd für das physiologische Substrat Phosphonopyruvat wurden mit gereinigtem Fusionsprotein unter Verwendung der Hilfsenzyme Phtase und ADH bzw. Aept und LDH bei einer Reaktionstemperatur von 30°C und einem pH-Wert von 8,0 (HEPES-Puffersystem) bestimmt (Abbildung 32).

Der mit $3,16 \pm 0,35 \mu\text{M}$ ermittelte K_m -Wert entsprach in etwa dem Wert, der für die Phosphonopyruvat-Decarboxylase aus *Bacteroides fragilis* beschrieben worden war (Zhang *et al.*, 2003b). Der für v_{max} ermittelte Wert lag bei $0,81 \pm 0,01 \text{ U/mg}$. Für k_{cat} und k_{cat}/K_m wurden folgende Werte errechnet: $k_{cat} = 1,18 \pm 0,02 \text{ s}^{-1}$ und $k_{cat}/K_m = 3,78 \times 10^5 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$.

3.2.3 Affinität zu den Cofaktoren Thiamindiphosphat und zweiwertigen Metall-Ionen

Die Phosphonopyruvat-Decarboxylase gehört zur Familie der α -Ketodecarboxylasen (Zhang *et al.*, 2003b), deren enzymatische Aktivität von der Anwesenheit der Cofaktoren Thiamindiphosphat (ThDP) und zweiwertigen Metall-Ionen abhängig ist. In ThDP-abhängigen Enzymen (z.B. Pyruvat-Decarboxylase) wird der Diphosphat-Rest des Thiamindiphosphats einerseits über Wasserstoffbrückenbindungen mit verschiedenen Aminosäureresten des Enzyms fixiert und andererseits über ein bivalentes Metall-Ion (Mg^{2+}) verankert (Dobritzsch *et al.*, 1998).

Zur Charakterisierung der Protein/Cofaktor-Interaktionen der Ppd auf biochemischer Ebene wurde cofaktorfreie Apo-Ppd benötigt. Diese konnte durch mehrmalige Dialyse des Holo-Enzyms gegen cofaktorfreien Puffer gewonnen werden, wobei das im ersten Dialyse-Schritt zugesetzte EDTA der Komplexbildung der Mg^{2+} -Ionen diente. Die Affinität der Ppd zu ihren Cofaktoren wurde in Kombination mit den Enzymen Aapt und LDH untersucht. Der Phtase/ADH-Enzymtest konnte für diese Versuchsreihen nicht verwendet werden, da die Aktivität der Phosphonoacetaldehyd-Hydrolase von Mg^{2+} -Ionen abhängig ist.

Ohne Zusatz von ThDP und Mg^{2+} -Ionen lag die Aktivität der Apo-Ppd bei 0,01 U/mg. Die Zugabe von jeweils 1 mM ThDP und Mg^{2+} -Ionen führte zu einer partiellen Rekonstitution bis zu 45% der Ausgangsaktivität. Die alleinige Zugabe von 1 mM ThDP bewirkte eine partielle Wiederherstellung von 7% der Ausgangsaktivität, wohingegen die alleinige Zugabe von 1 mM Mg^{2+} -Ionen keine rekonstituierende Wirkung auf die Aktivität der Apo-Ppd hatte. Diese Ergebnisse deuteten auf einen geringen Restgehalt an zweiwertigen Magnesium-Ionen im Apo-Enzym (bzw. im ThDP) hin und unterstrichen, dass die Verankerung des Thiamindiphosphats von Mg^{2+} -Ionen abhängig ist.

Neben zweiwertigen Magnesium-Ionen war die Rekonstitution der Apo-Ppd auch mit zweiwertigen Calcium- und Mangan-Ionen, jedoch nicht mit zweiwertigen Kobalt-, Nickel- oder Zink-Ionen möglich. Die Mg^{2+} -, Ca^{2+} - und Mn^{2+} -abhängige Rekonstitution stimmte mit der Charakterisierung der Phosphonopyruvat-Decarboxylase aus *Bacteroides fragilis* überein (Zhang *et al.*, 2003b).

Die Kinetik der ThDP-Aktivierung wurde durch die Bestimmung der Ppd-Aktivität nach der Rekonstitution mit variablen ThDP-Konzentrationen in Anwesenheit von 1 mM Mg^{2+} -Ionen ermittelt. Zur Bestimmung der Kinetik in Abhängigkeit von der Me^{2+} -Konzentration wurde die Rekonstitution der Apo-Ppd mit variablen Me^{2+} -Konzentrationen in Gegenwart von 1 mM ThDP durchgeführt.

Die K_m -Werte für ThDP, Mg^{2+} - und Ca^{2+} -Ionen lagen bei ungefähr 40 μM und waren damit um das 13-fache höher als der K_m -Wert, der für Mn^{2+} -Ionen ermittelt wurde (Tabelle 11). Die maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten für ThDP und Mg^{2+} -Ionen waren mit 0,38 U/mg bzw. 0,35 U/mg annähernd gleich. Die für Ca^{2+} - und Mn^{2+} -Ionen bestimmten v_{max} -Werte waren, bezogen auf den für Mg^{2+} -Ionen ermittelten Wert, um 29% bzw. 66% erhöht.

Tabelle 11 Kinetische Parameter der Rekonstitution der Apo-Ppd mit Thiamindiphosphat bzw. zweiwertigen Magnesium-, Calcium- und Mangan-Ionen. Die Affinität der Ppd zu ihren Cofaktoren wurde mit Hilfe der Enzymkombination Aep/LDH untersucht. Bei der ThDP-Aktivierung bzw. Mg^{2+} -Aktivierung wurde die Apo-Ppd mit variablen ThDP-Konzentrationen bzw. Mg^{2+} -Konzentrationen und 1 mM Mg^{2+} -Ionen bzw. ThDP vorinkubiert. Die Aktivitätstests wurden durch die Zugabe von je 0,5 mM Phosphonopyruvat gestartet. Die aufgelisteten Daten resultieren aus Mittelwerten, die aus zwei parallel durchgeführten Messreihen gebildet wurden.

	K_m [μM]	$v_{\max}$ [U/mg]	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_m [$\text{s}^{-1}\text{M}^{-1}$]
ThDP	$39,05 \pm 2,64$	$0,38 \pm 0,002$	$0,55 \pm 0,003$	$1,42 \times 10^4$
Mg^{2+}	$38,91 \pm 1,46$	$0,35 \pm 0,006$	$0,52 \pm 0,008$	$1,34 \times 10^4$
Ca^{2+}	$36,57 \pm 4,47$	$0,45 \pm 0,009$	$0,66 \pm 0,014$	$1,82 \times 10^4$
Mn^{2+}	$2,88 \pm 0,27$	$0,58 \pm 0,008$	$0,85 \pm 0,012$	$2,98 \times 10^5$

3.2.4 Untersuchungen zum Substratspektrum

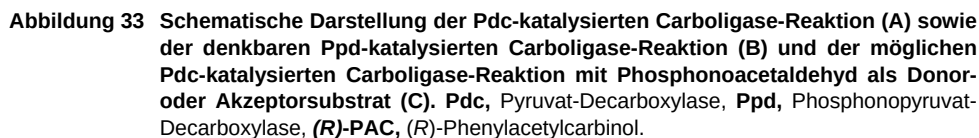
Neben dem physiologischen Substrat Phosphonopyruvat wurde die Ppd-katalysierte Umsetzung der strukturverwandten Substanzen Pyruvat, β -Hydroxypyruvat und β -Fluoropyruvat untersucht. Der nach der CO_2 -Abspaltung des Pyruvats entstehende Acetaldehyd sollte durch die ADH-katalysierte Reduktion zu Ethanol photometrisch nachgewiesen werden. Im Fall der Decarboxylierung von β -Hydroxypyruvat und β -Fluoropyruvat sollte die Abnahme der Substratkonzentration und das mögliche Auftreten eines neuen Produktpeaks mittels HPLC analysiert werden.

Die Ergebnisse zeigten, dass weder Pyruvat, noch β -Hydroxypyruvat oder β -Fluoropyruvat von der Phosphonopyruvat-Decarboxylase zum entsprechenden Aldehyd umgesetzt werden konnte (Daten nicht gezeigt).

3.2.5 Untersuchungen zur Synthese von Phosphonoacyloinen

Die Pyruvat-Decarboxylase, ein ebenfalls zur Familie der α -Ketodecarboxylasen gehörendes Enzym, besitzt neben ihrer Funktion als Decarboxylase eine Carboligase-Aktivität, bei der die Kondensation des ThDP-gebundenen „aktiven Acetaldehyds“ mit einem weiteren Aldehyd zur Bildung von Acyloinen führt (Abbildung 33, A).

Zur möglichen Phosphonoacyloin-Synthese wurden zwei Fragestellungen untersucht: Besitzt die Phosphonopyruvat-Decarboxylase eine Carboligase-Aktivität (Abbildung 33, B) und bzw. oder wird der Ppd-generierte Phosphonoacetaldehyd von der Pyruvat-Decarboxylase als Substrat akzeptiert (Abbildung 33, C)?



68

Für die mit der Pyruvat-Decarboxylase durchgeführten Carboligase-Experimente wurde das von Mesch (1997) konstruierte Mutein PDCW392M aus *Zymomonas mobilis* verwendet, das uns von PD Dr. M. Pohl (Institut für Molekulare Enzymtechnologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) zur Verfügung gestellt wurde. Der an der Position 392 befindliche Aminosäure-Rest ist in dem zum aktiven Zentrum hinführenden Kanal lokalisiert (Bruhn *et al.*, 1995). Der Austausch des sperrigen Tryptophan-Restes gegen Methionin hatte die Carboligase-Aktivität der *Z. mobilis* Pdc gegenüber Benzaldehyd um den Faktor 2,5 (Pohl, 1997) erhöht. Da, analog zum Benzaldehyd, der Umfang des Phosphonoacetaldehyd-Moleküls größer als der des Acetaldehyd-Moleküls ist, wurde für die Untersuchung der Acyloin-Kondensation nicht das wt-Enzym, sondern das Mutein PDCW392M eingesetzt.

In Gegenwart der Ppd und bzw. oder der PDCW392M wurde Phosphonopyruvat (PnPyr) sowohl separat als auch in Kombination mit Pyruvat (Pyr), Acetaldehyd (AA) oder Benzaldehyd (BA) umgesetzt (Tabelle 12). Der pH-Wert des Reaktionssystems wurde auf 6,5 eingestellt, da das Optimum der PDCW392M-katalysierten Carboligase-Reaktion in diesem pH-Bereich liegt (Goetz *et al.*, 2001). Weil im Überschuss vorhandener Acetaldehyd die Acyloin-Kondensation gewährleistet hatte (Goetz *et al.*, 2001), war die Konzentration des eingesetzten Pyruvats bzw. Acetaldehyds ≥ 40 mM. Die eingesetzte Benzaldehyd-Konzentration lag bei 30 mM, da steigende Konzentrationen die PDCW392M-katalysierte Carboligation inhibiert hatten (Goetz *et al.*, 2001).

Die mögliche Phosphonoacyloin-Synthese sollte mit Hilfe zweier verschiedener HPLC-Methoden (Anionenaustausch- bzw. *reversed phase* HPLC) durch das Auftreten neuer Produktpeaks und bzw. oder anhand von Unterschieden in der Acetoin- und bzw. oder Phosphonoacetaldehyd-Konzentration überprüft werden.

Tabelle 12 Zusammensetzung der Ansätze zur Untersuchung der Ppd- und bzw. oder PDCW392M-katalysierten Carboligation mit Phosphonoacetaldehyd als möglichem Donor- oder Akzeptorsubstrat. AA, Acetaldehyd; BA, Benzaldehyd; PDCW392M, Pyruvat-Decarboxylase-Mutein W392M, PnPyr, Phosphonopyruvat; Ppd, Phosphonopyruvat-Decarboxylase, Pyr, Pyruvat.

	[mM]	Ppd + PDCW392M						Ppd						PDCW392M					
PnPyr	10	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Pyr	40		x						x						x				
	85			x						x						x			
AA	40				x						x						x		
	85					x						x						x	
BA	30						x						x						x

In allen Ppd-enthaltenden Ansätzen wurde Phosphonopyruvat vollständig zum Phosphonoacetaldehyd (PnAA) umgesetzt, d.h., die Substanzen Pyruvat, Acetaldehyd und Benzaldehyd hatten in den eingesetzten Konzentrationen keinen Einfluss auf die PnAA-Bildung. Das Mutein PDCW392M war nicht in der Lage, die Phosphonopyruvat-Umsetzung zu katalysieren. In den Ansätzen, die das Pdc-Mutein W392M beinhalten, konnte die Acetoin-Bildung ausgehend von Pyruvat bzw. Acetaldehyd nachgewiesen werden, und

Ergebnisse

zwar unabhängig von dem im Reaktionsansatz vorhandenen Phosphonopyruvat bzw. Phosphonoacetaldehyd (Abbildung 34, A). Die Untersuchung der Ansätze, denen nur die Phosphonopyruvat-Decarboxylase zugesetzt wurde, zeigte, dass die Ppd-katalysierte Acetoin-Synthese nicht möglich war (Abbildung 34, B); die massenspektroskopische Analyse der nach 1,8 und 2,0 Minuten auftretenden Peaks (Abbildung 34, B) hatte nichts ergeben (Agilent, Waldbronn/Karlsruhe; persönliche Mitteilung). Eine Konzentrationsverringering des Ppd-generierten Phosphonoacetaldehyds konnte während der 20-stündigen Inkubation nicht beobachtet werden; ebenso blieb die Konzentration des von dem Pdc-Mutein *W392M* gebildeten Acetoins unverändert und in keinem der in Tabelle 12 aufgeführten Ansätze wurde das Entstehen neuer Produktpeaks registriert.

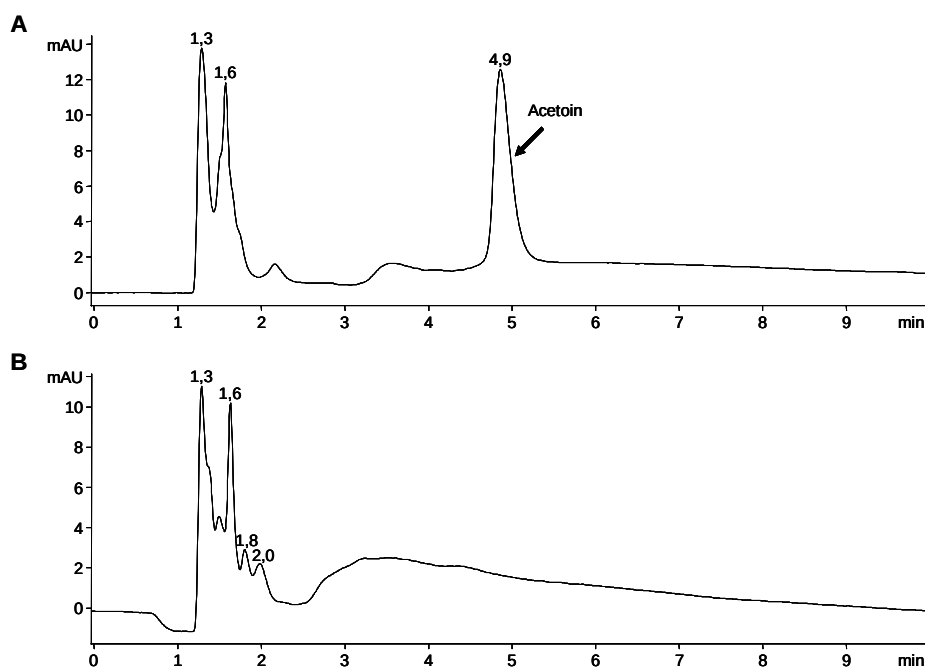


Abbildung 34 *Reversed phase HPLC-Analyse zweier Reaktionsansätze zur Untersuchung der Acyloin-Bildung mit Acetaldehyd und Phosphonoacetaldehyd als möglichem Donor- oder Akzeptorsubstrat, aufgetragen als Absorptionseinheit [mAU] gegen die Zeit [min]. A:* Ansatz mit Phosphonopyruvat (Ausgangskonzentration: 10 mM) und Acetaldehyd (Ausgangskonzentration: 40 mM), der die Enzyme Ppd und PDCW392M beinhaltet. Die nach 1,3 und 1,6 Minuten auftretenden Peaks stammten vom Puffer. Die Konzentration des gebildeten Acetoins (Retentionszeit: 4,9 Minuten) betrug 13,6 mM. **B:** Ansatz mit Phosphonopyruvat (Ausgangskonzentration: 10 mM) und Acetaldehyd (Ausgangskonzentration: 40 mM), dem nur die Ppd zugesetzt wurde. Die nach 1,3 und 1,6 Minuten auftretenden Peaks stammten vom Puffer; die massenspektroskopische Analyse der nach 1,8 und 2,0 Minuten auftretenden Peaks hatte nichts ergeben (Agilent, Waldbronn/Karlsruhe; persönliche Mitteilung).

3.2.6 Zusammenfassung

Die Untersuchungen zum Einfluss der verschiedenen Reaktionsparameter ergaben, dass das pH-Optimum der Ppd-katalysierten Reaktion zwischen 7,5 und 8,5 lag, dass bei einer Temperatur von 49°C das Temperaturmaximum noch nicht erreicht war (Das genaue Ppd-Temperaturmaximum konnte nicht ermittelt werden, da bei dem in dieser Arbeit verwendeten Spektralphotometer mit 49°C die maximal einstellbare Temperatur erreicht war.) und dass die in Abhängigkeit von der Reaktionstemperatur ermittelte Aktivierungsenergie 45,4 kJ/mol betrug. Die Lagerung der Ppd bei 4°C resultierte in einer Halbwertszeit von 50 Tagen.

Bei einem pH-Wert von 8,0 (HEPES-Puffersystem) und einer Reaktionstemperatur von 30°C wurden für die Ppd-katalysierte Reaktion folgende K_m -Werte ermittelt: $3,16 \pm 0,35 \mu\text{M}$ in Bezug auf das physiologische Substrat Phosphonopyruvat und $39,05 \pm 2,64 \mu\text{M}$ bzw. $38,91 \pm 1,46 \mu\text{M}$ in Abhängigkeit von den Cofaktoren Thiamindiphosphat und Mg^{2+} -Ionen. Neben Mg^{2+} -Ionen war die Rekonstitution der Apo-Ppd auch mit zweiwertigen Calcium- und Mangan-Ionen möglich.

Die Überprüfung des Substratspektrums ergab, dass die Ppd-katalysierte Decarboxylierung der strukturverwandten Substanzen Pyruvat, β -Hydroxypyruvat und β -Fluoropyruvat nicht möglich war.

Bei Untersuchungen zur Phosphonoacetyl-Synthese konnte die in Bezug auf die Pyruvat-Decarboxylase vermutete Carboligase-Aktivität der Ppd bislang noch nicht nachgewiesen werden. Außerdem ließen die durchgeführten Carboligase-Experimente vermuten, dass der Ppd-generierte Phosphonoacetaldehyd vom *Z. mobilis*-Mutein PDCW392M als Substrat nicht akzeptiert wird. Allerdings konnte gezeigt werden, dass sowohl Phosphonopyruvat als auch Phosphonoacetaldehyd keinen Einfluss auf die PDCW392M-katalysierte Pyruvat-Decarboxylierung bzw. Acetoin-Synthese hatten.

3.3 Struktur-Funktionsbeziehungen der Ppd

3.3.1 Identifizierung des Oligomerisierungszustands

Der Oligomerisierungszustand der Ppd wurde mittels Gelpermeationschromatographie (Gelfiltration) bestimmt. Bei der Chromatographie an einer Superdex200pg(HiLoad26/60)-Säule eluierte das Ppd-Fusionsproteins in einem einzigen Peak. Unter Verwendung von Standardproteinen verschiedener Größe wurde anhand der daraus abgeleiteten Kalibrierungsgeraden für das native Fusionsprotein eine molekulare Masse von 72.100 ± 220 ermittelt (Abbildung 35); jedoch stand das mit Hilfe der Geradengleichung errechnete Molekulargewicht im drastischen Gegensatz zur Größe des Standardproteins Albumin (66 kDa), das laut Diagramm sogar größer als die Ppd war (Abbildung 35). Erklärungen für diese Diskrepanz waren die Tatsache, dass die proteinspezifischen Elutionsvolumina

Ergebnisse

separat ermittelt wurden und die Tatsache, dass die Gelfiltration keine geeignete Methode zur exakten Molekulargewichtsbestimmung darstellt.

Obwohl die Differenz zum kalkulierten Molekulargewicht eines Dimers aus zwei identischen Untereinheiten (87.200) verhältnismäßig groß war, ließ das Ergebnis der Gelpermeationschromatographie vermuten, dass die Ppd aus *S. viridochromogenes* Tü494 im nativen Zustand als Dimer vorliegt. Der native Zustand eines Trimers, der für die Phosphonopyruvat-Decarboxylase aus *Bacteroides fragilis* beschrieben worden war (Zhang *et al.*, 2003b), konnte ausgeschlossen werden.

Der mit Hilfe der Gelfiltration ermittelte Oligomerisierungszustand der Phosphonopyruvat-Decarboxylase könnte durch „Dynamische Lichtstreuungs“-Messungen bestätigt werden. Bei dieser Methode wird die in einer Messzelle befindliche Enzymlösung einem Laserstrahl ausgesetzt. Der hydrodynamische Radius des zu analysierenden Enzyms und das daraus abzuleitende Molekulargewicht kann anhand der Streuung des Laserstrahls durch die Probe ermittelt werden.

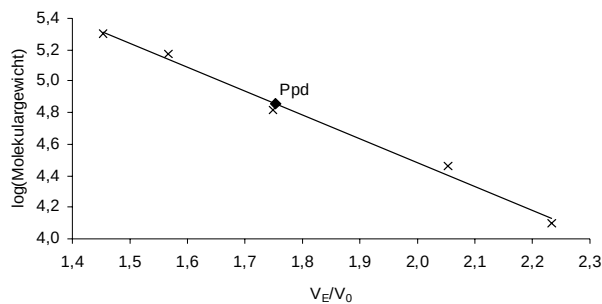


Abbildung 35 Bestimmung der molekularen Masse des nativen Ppd-Fusionsproteins (♦) durch Gelpermeationschromatographie an einer Superdex200pg(HiLoad26/60)-Säule. Logarithmische Auftragung des Molekulargewichtes gegen den Quotienten V_E/V_0 , wobei V_E dem Elutionsvolumen des jeweiligen Proteins und V_0 dem anhand von Blue Dextran ermittelten Säulenleervolumen entsprach. Folgende Proteine mit den entsprechenden molekularen Massen wurden zur Erstellung der Kalibrierungsgeraden verwendet (von links nach rechts): β -Amylase (200.000), Alkohol-Dehydrogenase (150.000), Albumin (66.000), Carboanhydrase (29.000) und Cytochrom C (12.400).

3.3.2 Ortsgerichtete Mutagenese

Da bislang keine dreidimensionale Struktur einer Phosphonopyruvat-Decarboxylase bekannt ist, sind diesbezügliche Hinweise auf Aminosäurereste, die bedeutsam für die katalytische Aktivität und die Bindung der Cofaktoren sind, nicht vorhanden. Zur Identifizierung der zumeist konservierten Aminosäurereste wurden die Sequenzen der Phosphonopyruvat-Decarboxylasen aus *Streptomyces viridochromogenes* Tü494 (GenBank Accession: CAA74722), *Streptomyces hygroscopicus* (GenBank Accession: BAA07055), *Streptomyces*

wedmorensis (GenBank Accession: BAA32496) und *Bacteroides fragilis* (GenBank Accession: AAG26466) mit der Aminosäuresequenz der Pyruvat-Decarboxylase (Pdc) aus *Zymomonas mobilis* (GenBank Accession: CAA42157), ein ebenfalls zur Familie der α -Ketodecarboxylasen gehörendes und bereits sehr gut charakterisiertes Enzym (Abbildung 36), verglichen (Abbildung 37).

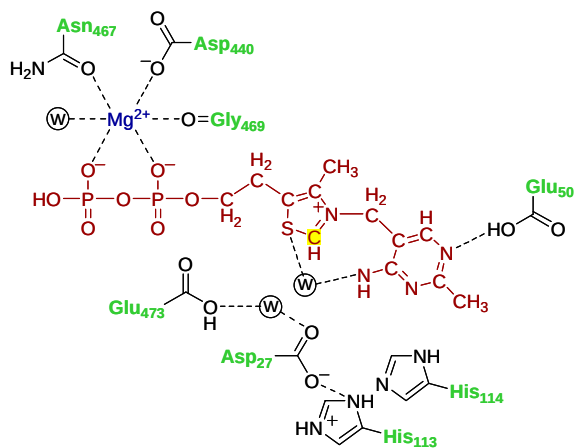


Abbildung 36 Schematische Darstellung des aktiven Zentrums der Pyruvat-Decarboxylase aus *Z. mobilis* (verändert nach Chang *et al.*, 1999). Wechselwirkungen der essentiellen Aminosäuren (Bezeichnung in grün) mit den Cofaktoren Thiamindiphosphat (rot) und Mg^{2+} (blau) sind als unterbrochene Linien dargestellt. Das reaktive C2-Atom im Thiazoliumring des Thiamindiphosphats ist gelb unterlegt. Die beiden Wassermoleküle (W) in der Nähe des C2-Atoms kennzeichnen die Substratbindestelle.

In den Ppd-Sequenzen konnte anhand des Sequenz-Alignments der in der Pdc für die Thiamindiphosphat-Aktivierung verantwortliche Aminosäurerest Glutamat-50 (Nummerierung entsprechend der *Z. mobilis* Pdc) (Candy *et al.*, 1996) gefunden werden. Ebenso wurden die von Schenk *et al.* (1997) beschriebenen Histidin-Reste 113 und 114 sowie die für die Cofaktor-Bindung essentiellen Aminosäuren Aspartat-440 und Asparagin-467 identifiziert (Diefenbach *et al.*, 1992; Candy und Duggleby, 1994). Anstelle der Aminosäurereste Aspartat-27 und Glutamat-473, die für die katalytische Aktivität der Pdc von entscheidender Bedeutung sind (Chang *et al.*, 1999), wurden in allen Ppd-Sequenzen ein Serin-Rest und im Fall der *Streptomyces* Ppd-Sequenzen ein Aspartat-Rest gefunden (Abbildung 37).

Bei der Charakterisierung der Ppd aus *B. fragilis* hatten Zhang *et al.* (2003b) zwölf polare Aminosäurereste identifiziert, die nur in den Sequenzen von Phosphonopyruvat- und Sulfopyruvat-Decarboxylasen vorzufinden sind. Analog zu den von Zhang *et al.* (2003b) untersuchten Aminosäureresten Glutamat-213 und Aspartat-258 sollte die Funktion der korrespondierenden Aminosäuren der Ppd aus *S. viridochromogenes* Tü494 (Abbildung 37) analysiert werden.

Ergebnisse

Zmob_Pdc	MSYTVGTYLAERLVQIGLKHFFAVAGDYNVLVDNLLLNKNME--QVYCCNELNCGFSAEGYARAKG-AA	67
Svir_Ppd	--MIGAADLVAGLTGLGVTTVAGVPCSYLTPLINRVISDPATR--YLTVTQEGEAAVAAGAWLGGG-LG	65
Shyg_Ppd	--MISASDMLAGLTGLGVTTVAGVPCSYLTPLINRVISDRATR--YLTVTQEGEAAVAAGSWLGGG-LG	65
Swed_Ppd	--MIRPDVLAGHLAAEGVSLYCGVPDSLK-EFNAYVGDGASGVDHVIAANEENAVGLAVGHYLRGTGSPA	67
Bfra_Ppd	--MVSVEKIYDTFLHHGVDFFTGVPDSLK-NICAYITDHAPRGKHIIAANESAVGIACGYMASGNVP	67
Zmob_Pdc	AAVVTYSVGALSAFDAIGGAYAEN--LPVILIS--GAPNNNDHAAGHVLHHALGKTDYHYQLEMAKNIT	132
Svir_Ppd	CAITQNSGLGNMTNPLTSLHLPAR--IPAVVITTWRGRPGKDE---PQHLMGRITG--DL-----	120
Shyg_Ppd	CAITQNSGLGNMTNPLTSLHLPAR--IPAVVISTWRGRPGKDE---PQHLMGRVTG--DL-----	120
Swed_Ppd	VVYLQNSGIGNAVNPLTSLADPEVYGIPMILLIGWRGQPGVPDE---PQHRKQGRIMP--AL-----	124
Bfra_Ppd	LVYMQNSGLGNTVNPLLSLADEKVYSPLLLLVGWRGEPGKDE---PQHKKQGEVTL--DL-----	124
Zmob_Pdc	AAAEIYTPPEEAPAKIDHVIKTALREKKPVYLEIACNIASMPCAAPGPASALFNDEASDEASLNAAVEET	202
Svir_Ppd	----LDLCDEWLSLIPD--TTDELH-TAFAACRASLAHRELPGFLLP----QGVVADE-PLN----ET	173
Shyg_Ppd	----FGLCDMEWLSLIPD--TPDALR-GEFDVCREALARRELPYGFLP----QGVVADE-PLD----EE	173
Swed_Ppd	----LDLELPWSVLPA--DEEEAG-AAVRKAVAHSVATRTPYAFLVE---KGTFAFA-GVPAAV--	178
Bfra_Ppd	----LKAMKIPFIILDT--DEDEAL-AQIHDAVVSAKSRSRIPHAIVIR---KDTFG-K-----YK--	173
Zmob_Pdc	LKFIANRDKVAVLVGSKLRAAGAEAAVKFADALGGAVATMAAAKSFFPEENPHYIGTSWGEVSYPGVEK	272
Svir_Ppd	A---PRSATGQVVRYPAR-----GRSAARPTRIAL-----ER	203
Shyg_Ppd	A---PRSRAGRLVRHART-----GPSDAAPTRVAAL-----ER	203
Swed_Ppd	----PATAP-----ESGPPTREEALGA-----	196
Bfra_Ppd	L---RQEAL-----NDYPLSREEALMQ-----	192
Zmob_Pdc	TMKEADAVIALAPVFNDYSTTGWDIPDPKKLVLAEPSSVVVNGIRFSPVHLKDYLTRLAQVKVSKKTGAL	342
Svir_Ppd	--LLAELPRDAAVV---STTG-----KSSRELY-----TLDDRD-----QHF-----	235
Shyg_Ppd	--LLAELPPAAVV---STTG-----KTSRELY-----TLDDRD-----QHF-----	235
Swed_Ppd	--LIAEIGGGQVVV---STTG-----MLSRLEY-----EHRVRAGAEAEIDF-----	233
Bfra_Ppd	--VVDHLGDNDIVV---STTG-----KLSRELF-----EYRESKGQGHARDF-----	229
Zmob_Pdc	DFFKSLNAGELKKAAPADPSAPLVNAEIAARQEALLTPNTTVIAETGDSWFNAQRMKLPNGARVEYEMQW	412
Svir_Ppd	-----Y--MV	238
Shyg_Ppd	-----Y--MV	238
Swed_Ppd	-----LTV	236
Bfra_Ppd	-----LTV	232
Zmob_Pdc	GHIGWSVPAAFGYAVGAPERINILMVGDGSFQLTAQEVAQMVRLLKLPVIIFLINNYGTYIEVMIHDGPYN	482
Svir_Ppd	GAMGSAATVGLGVALHTP-RPVVVVDGDSVLMRLGSLATVGAHAPGNLVHLVLDNG-----VHDS-TG	300
Shyg_Ppd	GAMGSAATVGLGVALHTP-RPVVVVDGDSALMRLGSLATVAHAPGNLVHLILDNG-----VHDS-TG	300
Swed_Ppd	GGMGHASSIALGIALREDEREVWCLDGDGALLMHLGALPVIAGHGPPSSYEHVVFNNG-----VHDS-VG	299
Bfra_Ppd	GSMGHSSSIALGIALEKPDRRVYCLDGDGAFIMHMGAVSNIGDLSPKNYRHVLFNNG-----AHES-VG	295
Zmob_Pdc	NIKNWDYAGLMEVFNNGGYSYGAGKGLKAKTGGELAEAIKVALANTDGPITLIECFI-----GREDC	544
Svir_Ppd	GQRTLSSAVDLPAVAAACGYRAVH---ACTSLDDLSDALATALA-TDGPTLVHLAIRPGSLDGLGRPKV	365
Shyg_Ppd	GQRTLSSAVDLPAVAAACGYRAVH---ACGSLDDLTTALAGALA-TDGPTLIHLPIRPGSLAALGRPKV	365
Swed_Ppd	GQPTSIDRVDPALARNSGYRHAA---TLSSLEDLPGELARLRE-TGGPALLELRVPRGSGDLGRPAV	364
Bfra_Ppd	GQPTLGFRLDIASIAKGCGYAHVL---TASDKELGSCALEKLSG-LSGPVLLIEIKVRIDSRDDLGRPTT	360
Zmob_Pdc	TEELVKWGRVAAANS---RKPVNKLL-----568	
Svir_Ppd	TPAEVARRFRAVTTTP---PAGTATPVHAGGVTAAR	397
Shyg_Ppd	QPHEVARRREFATEPWPASAVGSGTRAAGSAGDR	401
Swed_Ppd	TPAESGAAVLRALTGRVTPS-----384	
Bfra_Ppd	TPVENKEHFMAFLKDTHS-----378	

Abbildung 37 ClustalW Sequenz-Alignment der Pyruvat-Decarboxylase (Pdc) aus *Zymomonas mobilis* und den verschiedenen Phosphonopyruvat-Decarboxylasen (Ppd). Konservierte Ppd-Aminosäurereste, die anhand der Pdc-Sequenz (grün gedruckt und grau unterlegt) identifiziert wurden, sind blau gedruckt und grau unterlegt. Die rot gedruckten und grau unterlegten Aminosäurereste Serin (S), Glutamat (E) und Aspartat (D) sind konservierte Ppd-Aminosäurereste, die in der Pdc-Sequenz nicht vorzufinden sind. Das Thiamindiphosphat-Sequenzmotiv ist gelb unterlegt. **Zmob_Pdc**, *Z. mobilis* Pyruvat-Decarboxylase (GenBank Accession: CAA42157); **Svir_Ppd**, *Streptomyces viridochromogenes* Phosphonopyruvat-Decarboxylase (GenBank Accession: CAA74722); **Shyg_Ppd**, *S. hygroscopicus* Phosphonopyruvat-Decarboxylase (GenBank Accession: BAA07055); **Swed_Ppd**, *S. wedmorensis* Phosphonopyruvat-Decarboxylase (GenBank Accession: BAA32496); **Bfra_Ppd**, *Bacteroides fragilis* Phosphonopyruvat-Decarboxylase (GenBank Accession: AAG26466).

Die anhand des Sequenz-Alignments identifizierten Aminosäurereste Serin-25, Glutamat-48, Histidin-110, Histidin-111, Glutamat-224, Aspartat-263, Aspartat-265, Asparagin-293, Glycin-294 und Aspartat-297 wurden mittels ortsgerichteter Mutagenese ausgetauscht (Tabelle 13). Ihre Funktion sollte durch die Charakterisierung der resultierenden Muteine aufgeklärt werden.

Tabelle 13 Übersicht über die durchgeführten ortsgerichteten Mutagenesen der Phosphonopyruvat-Decarboxylase (Ppd) aus *Streptomyces viridochromogenes* Tü494. In der ersten Tabellenspalte sind die konservierten Ppd-Aminosäurereste, die durch Sequenzvergleiche mit der Pyruvat-Decarboxylase (Pdc) aus *Zymomonas mobilis* und der Phosphonopyruvat-Decarboxylase (Ppd) aus *Bacteroides fragilis* identifiziert wurden (Abbildung 37), aufgelistet. In der zweiten Tabellenspalte sind die jeweiligen Aminosäureaustausche und die Bezeichnung (Einbuchstaben-Code) der daraus resultierenden Ppd-Muteine aufgelistet. Die korrespondierenden Aminosäurereste der *Z. mobilis* Pdc bzw. der *B. fragilis* Ppd sowie die für diese Aminosäurereste beschriebenen Funktionen sind in der dritten und vierten Tabellenspalte aufgeführt.

<i>Streptomyces viridochromogenes</i> Ppd		<i>Zymomonas mobilis</i> Pdc	
Position	Austausch gegen	Position	Funktion
Serin-25	Asparagin (S25N), Aspartat (S25D)	Aspartat-27	katalytische Aktivität
Glutamat-48	Glutamin (E48Q)	Glutamat-50	ThDP-Aktivierung
Histidin-110	Alanin (H110A)	Histidin-113	katalytische Aktivität
Histidin-111	Alanin (H111A)	Histidin-114	
Aspartat-265	Alanin (D265A)	Aspartat-440	Cofaktor-Bindung
Asparagin-293	Alanin (N293A)	Asparagin-467	Cofaktor-Bindung
Glycin-294	Alanin (G294A)	Glycin-469	Cofaktor-Bindung
Aspartat-297	Asparagin (D297N), Glutamat (D297E)	Glutamat-473	katalytische Aktivität
<i>Streptomyces viridochromogenes</i> Ppd		<i>Bacteroides fragilis</i> Ppd	
Position	Austausch gegen	Position	Funktion
Glutamat-224	Alanin (E224A)	Glutamat-213	
Aspartat-263	Alanin (D263A)	Aspartat-258	Substrat-Bindung

Die Ppd-Muteine (In der vorliegenden Arbeit werden durch den Begriff „Mutein“ diverse Enzyme gekennzeichnet, deren Aminosäuresequenzen durch gezielte Abänderungen von der Original-Sequenz des wt-Enzyms abweichen.) wurden ausgehend von dem im Vektor pET-16b befindlichen *ppd*-Gen mit Hilfe des „QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit“ (Stratagene, Amsterdam) erzeugt. Aufgrund der verwendeten Matrizen-DNA konnten alle Ppd-Muteine analog zum wt-Enzym als Fusionsproteine mit einem aminoterminalen 10-fachen Histidinschwanz in *E. coli* BL21(DE3)pLysS überexprimiert und in einem Schritt ausgehend vom jeweiligen Rohextrakt mittels Ni^{2+} -Affinitätschromatographie bis zur apparenten Homogenität (mit Ausnahme des Ppd-Muteins D263A; Abbildung 39, C4) aufgereinigt werden (Abbildung 38 und Abbildung 39).

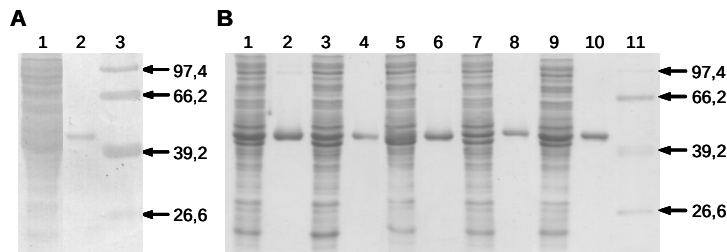


Abbildung 38 SDS-PAGE Analyse der mittels Ni^{2+} -Affinitätschromatographie durchgeführten Aufreinigung der Ppd-Mutene E48Q, S25D, S25N, D297N, D297E und S25D/D297E aus dem Rohextrakt des jeweiligen induzierten Expressionsstammes *E. coli* BL21(DE3)pLysS. **A:** Chromatographische Aufreinigung des Ppd-Mutens E48Q (Spur 1: 50 μg RE [pET16ppdE48Q]; Spur 2: 10 μg gereinigtes Ppd-Mut E48Q; Spur 3: Protein-Größenstandard [kDa]). **B:** Chromatographische Aufreinigung der Ppd-Mutene S25D, S25N, D297N, D297E und S25D/D297E (Spur 1: 50 μg RE [pET16ppdS25D]; Spur 2: 10 μg gereinigtes Ppd-Mut S25D; Spur 3: 50 μg RE [pET16ppdS25N]; Spur 4: 10 μg gereinigtes Ppd-Mut S25N; Spur 5: 50 μg RE [pET16ppdD297N]; Spur 6: 10 μg gereinigtes Ppd-Mut D297N; Spur 7: 50 μg RE [pET16ppdD297E]; Spur 8: 10 μg gereinigtes Ppd-Mut D297E; Spur 9: 50 μg RE [pET16ppdS25D/D297E]; Spur 10: 10 μg gereinigtes Ppd-Mut S25D/D297E; Spur 11: Protein-Größenstandard [kDa]).

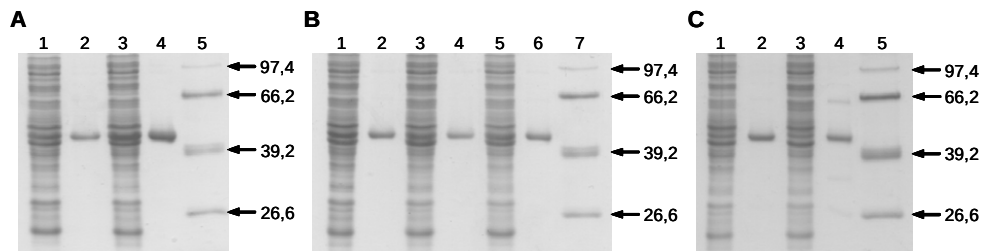


Abbildung 39 SDS-PAGE Analyse der mittels Ni^{2+} -Affinitätschromatographie durchgeführten Aufreinigung der Ppd-Mutene H110A, H111A, D265A, N293A, G294A, E224A und D263A aus dem Rohextrakt des jeweiligen induzierten Expressionsstammes *E. coli* BL21(DE3)pLysS. **A:** Chromatographische Aufreinigung der Ppd-Mutene H110A und H111A (Spur 1: 50 μg RE [pET16ppdH110A]; Spur 2: 10 μg gereinigtes Ppd-Mut H110A; Spur 3: 50 μg RE [pET16ppdH111A]; Spur 4: 10 μg gereinigtes Ppd-Mut H111A; Spur 5: Protein-Größenstandard [kDa]). **B:** Chromatographische Aufreinigung der Ppd-Mutene D265A, N293A und G294A (Spur 1: 50 μg RE [pET16ppdD265A]; Spur 2: 10 μg gereinigtes Ppd-Mut D265A; Spur 3: 50 μg RE [pET16ppdN293A]; Spur 4: 10 μg gereinigtes Ppd-Mut N293A; Spur 5: 50 μg RE [pET16ppdG294A]; Spur 6: 10 μg gereinigtes Ppd-Mut G294A; Spur 7: Protein-Größenstandard [kDa]). **C:** Chromatographische Aufreinigung der Ppd-Mutene E224A und D263A (Spur 1: 50 μg RE [pET16ppdE224A]; Spur 2: 10 μg gereinigtes Ppd-Mut E224A; Spur 3: 50 μg RE [pET16ppdD263A]; Spur 4: 10 μg gereinigtes Ppd-Mut D263A; Spur 5: Protein-Größenstandard [kDa]).

Die Expressionsraten der Ppd-Muteine lagen zwischen 10 und 15 mg/l_{Expressionskultur} und waren mit der Proteinausbeute des wt-Enzyms vergleichbar (siehe 3.1.1.1). In Anbetracht der Expressionsraten und der SDS-PAGE Analyse (Abbildung 38 und Abbildung 39) der aufgereinigten Ppd-Muteine schienen die durchgeführten Mutationen keinen Einfluss auf die Proteinstabilität zu haben.

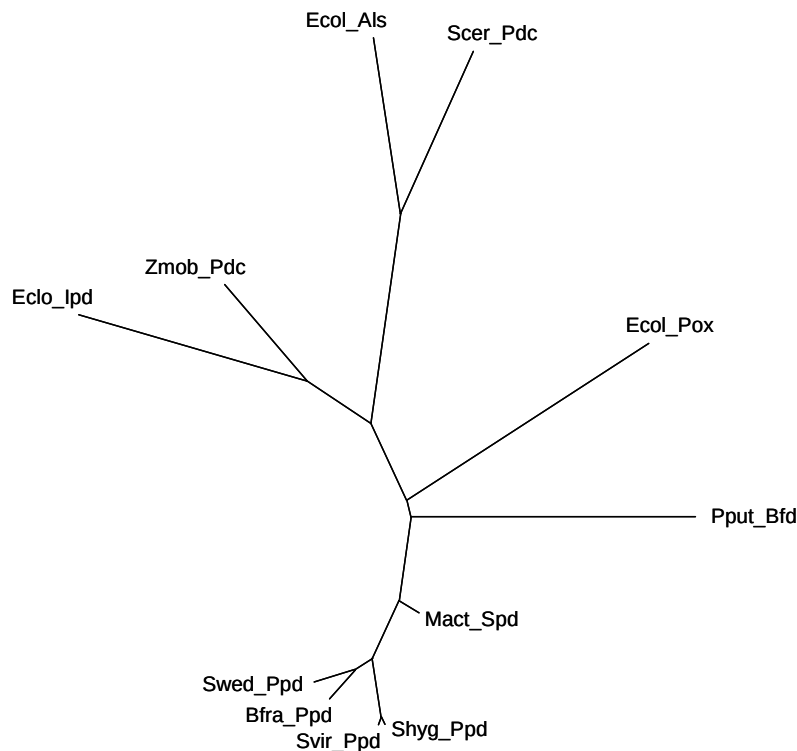


Abbildung 40 Hypothetischer Stammbaum verschiedener Enzyme, die alle zur Familie der ThDP- und Mg(II)-abhängigen Decarboxylasen gehören (Zhang *et al.*, 2003b) und die Decarboxylierung eines α -Ketocarboxylates in Abhängigkeit vom Cofaktor Thiamindiphosphat katalysieren. **Bfra_Ppd**, *Bacteroides fragilis* Phosphonopyruvat-Decarboxylase (GenBank Accession: AAG26466); **Eclo_Ipd**, *Enterobacter cloacae* Indolpyruvat-Decarboxylase (GenBank Accession: P23234); **Ecol_Als**, *Escherichia coli* Acetolactat-Synthase Isozym I (GenBank Accession: NP_756456); **Ecol_Pox**, *Escherichia coli* Pyruvat-Oxidase (GenBank Accession: NP_286643); **Mact_Spd**, *Methanosarcina acetivorans* C2A Sulfopyruvat-Decarboxylase (GenBank Accession: NP_618188); **Pput_Bfd**, *Pseudomonas putida* Benzoylformiat-Decarboxylase (GenBank Accession: P20906); **Scer_Pdc**, *Saccharomyces cerevisiae* Pyruvat-Decarboxylase Isozym 2 (GenBank Accession: P16467); **Shyg_Ppd**, *Streptomyces hygroscopicus* Phosphonopyruvat-Decarboxylase (GenBank Accession: BAA07055); **Svir_Ppd**, *Streptomyces viridochromogenes* Phosphonopyruvat-Decarboxylase (GenBank Accession: CAA74722); **Swed_Ppd**, *Streptomyces wedmorensis* Phosphonopyruvat-Decarboxylase (GenBank Accession: BAA32496); **Zmob_Pdc**, *Zymomonas mobilis* Pyruvat-Decarboxylase (GenBank Accession: CAA42157).

3.3.2.1 Funktion der Aminosäure Glutamat-48

Die Phosphonopyruvat-Decarboxylase ist ein weiter entferntes Mitglied einer Familie von ThDP- und Mg(II)-abhängigen Decarboxylasen (Zhang *et al.*, 2003b) (Abbildung 40). Die Gemeinsamkeit der zu dieser Familie gehörenden Enzyme besteht in der Decarboxylierung eines α -Ketocarboxylates in Abhängigkeit vom Cofaktor Thiamindiphosphat.

Thiamindiphosphat besitzt in seinem Thiazoliumring ein reaktives Kohlenstoffatom (C2) (Breslow, 1958), das mittels Deprotonierung aktiviert wird (Kern *et al.*, 1997) und in Folge dessen als Nukleophil den Carbonyl-Kohlenstoff der verschiedenen Substrate angreifen kann. Mit Hilfe kristallographischer Studien (Arjunan *et al.*, 1996; Dobritzsch *et al.*, 1998; Schütz *et al.*, 2003) sowie ortsgerichteter Mutagenesen (Candy *et al.*, 1996; Killenberg-Jabs *et al.*, 1997) verschiedener ThDP-abhängiger Enzyme wurde ein im aktiven Zentrum befindlicher, konservierter Glutamat-Rest identifiziert, der aufgrund der Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung mit dem N1'-Atom des Pyrimidinrings für die Deprotonierung des C2-Atoms verantwortlich ist (Abbildung 36).

Zur Überprüfung, ob der in der *S. viridochromogenes* Ppd durch das Alignment identifizierte Glutamat-Rest 48 für die Aktivierung des Thiamindiphosphats verantwortlich ist, wurde das Ppd-Mutein E48Q konstruiert. Der Austausch führte zu einem Mutein, das keine Restaktivität mehr aufwies. Zusammen mit der Positionierung des Glutamats deutete dieses Ergebnis darauf hin, dass der Aminosäurerest Glutamat-48 für die Aktivierung des Thiamindiphosphats und somit für die Deprotonierung des C2-Atoms verantwortlich ist.

3.3.2.2 Funktion der Aminosäuren Serin-25 und Aspartat-297

Kristallographische Studien der Pyruvat-Decarboxylase aus *Z. mobilis* (Dobritzsch *et al.*, 1998) hatten ergeben, dass die beiden negativ polaren Aminosäurereste Aspartat-27 und Glutamat-297 innerhalb des aktiven Zentrums in unmittelbarer Nähe zum Cofaktor Thiamindiphosphat positioniert sind (Abbildung 36). Anhand der Pdc-Muteine D27E, D27N, E473D und E473Q war gezeigt worden, dass sowohl Aspartat-27 als auch Glutamat-473 die spezifische Enzymaktivität beeinflussen. Demgegenüber waren die K_m -Werte der Muteine für das physiologische Substrat Pyruvat nur geringfügig erhöht (Chang *et al.*, 1999).

Im Fall des Aspartat-Restes konnte bei allen aufgelisteten Ppd-Sequenzen kein negativ polarer Aminosäurerest in der unmittelbaren Umgebung identifiziert werden; stattdessen wurde ein konservierter Serin-Rest entdeckt, eine im Gegensatz zu Aspartat ungeladene Aminosäure. In Bezug auf den Glutamat-Rest 473 wurde in den *Streptomyces* Ppd-Sequenzen die ebenfalls negativ polare Aminosäure Aspartat gefunden.

In Anlehnung an die Pdc-Sequenz wurden der Serin-Rest 25 gegen Aspartat und bzw. oder der Aspartat-Rest 297 gegen Glutamat ausgetauscht. Zum anderen wurde sowohl der Serin- als auch der Aspartat-Rest durch die ungeladen polare Aminosäure Asparagin ersetzt.

Das Ersetzen des Serin-Restes gegen die negativ geladene Aminosäure Aspartat (S25D) führte zu einer verringerten Enzymaktivität von ca. 25% des $v_{\max}$ -Wertes und zu einem K_m -Wert, der im Vergleich zur wt-Ppd um das 450-fache erhöht war. Im Gegensatz dazu waren beim Austausch des Serin-Restes gegen die ebenfalls ungeladen polare Aminosäure Asparagin (S25N) lediglich ein 35%-iger Aktivitätsverlust sowie eine 80-fache Erhöhung des K_m -Wertes zu beobachten (Tabelle 14). Die Aminosäureaustausche zeigten, dass im Fall der Ppd die ungeladen polare Aminosäure Serin bedeutsam für die Enzymkinetik ist; jedoch war, entgegen den Ergebnissen der Pyruvat-Decarboxylase (Chang *et al.*, 1999), die Substrataffinität stärker beeinträchtigt als die spezifische Enzymaktivität.

Parallel zum Mutein S25N hatte der Austausch des Aspartat-Restes gegen die ebenfalls negativ geladene Aminosäure Glutamat (D297E) einen 35%-igen Aktivitätsverlust zur Folge; der K_m -Wert des Muteins war gegenüber dem wt-Enzym um das 15-fache erhöht. Das Ersetzen gegen die korrespondierende ungeladene Aminosäure Asparagin (D297N) führte zu einer Verringerung der Enzymaktivität auf 0,37 U/mg, was ca. 46% des $v_{\max}$ -Wertes entsprach; der K_m -Wert war im Vergleich zur wt-Ppd um das 950-fache erhöht (Tabelle 14). Wie im Fall des Serin-Restes konnte anhand der Austausche gezeigt werden, dass die negativ geladene Aminosäure Aspartat-297 die Kinetik der Ppd beeinflusst. Analog zu den Ergebnissen der Serin-Muteine waren bei den Aspartat-Austauschen die spezifischen Enzymaktivitäten wesentlich geringer beeinträchtigt als bei den entsprechenden Glutamat-Muteinen der Pyruvat-Decarboxylase (Chang *et al.*, 1999).

Tabelle 14 Kinetische Parameter der Ppd-Muteine S25D, S25N, D297E, D297N und S25D/D297E für das physiologische Substrat Phosphonopyruvat im Vergleich zu den kinetischen Parametern der wt-Ppd. Die K_m - und $v_{\max}$ -Werte und die daraus abgeleiteten k_{cat} - und k_{cat}/K_m -Werte wurden mit Hilfe des Phtase/ADH- und des Aep/LDH-Enzymtests ermittelt. Die aufgelisteten Daten resultieren aus Mittelwerten, die aus jeweils zwei parallel durchgeführten Messreihen gebildet wurden.

	K_m [mM]	$v_{\max}$ [U/mg]	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_m [$\text{s}^{-1}\text{M}^{-1}$]
wt-Ppd	0,0032	$0,81 \pm 0,01$	$1,18 \pm 0,02$	$3,78 \times 10^5$
S25D	$1,47 \pm 0,18$	$0,21 \pm 0,01$	$0,31 \pm 0,01$	$1,47 \times 10^3$
S25N	$0,25 \pm 0,02$	$0,53 \pm 0,01$	$0,78 \pm 0,01$	$3,17 \times 10^3$
D297E	$0,04 \pm 0,01$	$0,52 \pm 0,01$	$0,76 \pm 0,01$	$1,76 \times 10^4$
D297N	$3,02 \pm 0,11$	$0,37 \pm 0,01$	$0,55 \pm 0,02$	$1,82 \times 10^2$
S25D/D297E	$3,78 \pm 0,40$	$0,14 \pm 0,01$	$0,20 \pm 0,01$	53,64

Anhand der Muteine S25D und D297E sowie dem Doppelmutein S25D/D297E wurde untersucht, ob die Austausche gegen die in der Pyruvat-Decarboxylase vorkommenden Aminosäurereste Aspartat und Glutamat die Ppd-katalysierte Decarboxylierung von Pyruvat ermöglichen. Der dabei entstehende Acetaldehyd sollte mit Hilfe der Alkohol-Dehydrogenase durch die NADH_2 -abhängige Reduktion zu Ethanol photometrisch nachgewiesen werden. Allerdings waren weder die Ppd-Muteine S25D, D297E und S25D/D297E noch die Ppd-Muteine S25N und D297N in der Lage, Pyruvat zum Acetaldehyd umzusetzen (Daten nicht gezeigt).

Ergebnisse

Das Ppd-Doppelmutein wies gegenüber dem physiologischen Substrat Phosphonopyruvat einen 1200-fach erhöhten K_m -Wert und eine drastische Verringerung der Enzymaktivität (17% Restaktivität) auf (Tabelle 14), was abermals den Einfluss der beiden Aminosäuren Serin-25 und Aspartat-297 auf die Kinetik der Phosphonopyruvat-Decarboxylase hervorhob.

Das Protokoll zur Herstellung der Apo-Muteine stimmte mit dem Protokoll, das zur Gewinnung der Apo-Ppd verwendet wurde, exakt überein; demzufolge war ein Vergleich der Rekonstitution der Apo-Muteine mit Thiamindiphosphat und zweiwertigen Magnesium-, Calcium- und Mangan-Ionen mit den entsprechenden Daten der Apo-Ppd zulässig. Da die Aktivität des Hilfsenzym Phosphonoacetaldehyd-Hydrolase von Mg^{2+} -Ionen abhängig ist, konnten die Untersuchungen zur Cofaktor-Affinität lediglich mit der Enzymkombination 2-Aminoethylphosphonat-Transaminase/L-Lactat-Dehydrogenase durchgeführt werden.

Das Apo-Ppd-Mutein S25N wies in Abwesenheit von ThDP und Mg^{2+} -Ionen eine Aktivität von 0,07 U/mg auf. Dieser Wert entsprach 13% der Ausgangsaktivität und verdeutlichte, dass die Cofaktoren durch die Dialyse nicht vollständig entfernt werden konnten. Die Zugabe von je 1 mM ThDP und Mg^{2+} -Ionen resultierte in einer Aktivitätssteigerung auf 0,2 U/mg. Die K_m -Werte für ThDP und Mg^{2+} -Ionen lagen bei 22 μM , was in etwa der Hälfte der für das wt-Enzym ermittelten Werte entsprach. Der für Ca^{2+} -Ionen bestimmte K_m -Wert war im Vergleich zur wt-Ppd um 75% reduziert, wohingegen die für Mn^{2+} -Ionen ermittelten Michaelis-Konstanten annähernd identisch waren (Tabelle 15). Die maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten aller Cofaktoren lagen im Bereich von 0,18 bis 0,26 U/mg und waren gegenüber den Werten des wt-Enzyms um 45 – 58% verringert (Tabelle 15).

Tabelle 15 Kinetische Parameter der Rekonstitution der Apo-Ppd-Muteine S25N und D297E mit Thiamindiphosphat bzw. zweiwertigen Magnesium-, Calcium- und Mangan-Ionen im Vergleich zu den kinetischen Parametern der wt-Ppd. Die Affinität der Enzyme zu ihren Cofaktoren wurde mit Hilfe der Enzymkombination Aep/LDH untersucht. Bei der ThDP-Aktivierung bzw. Me^{2+} -Aktivierung wurden die Apo-Enzyme mit variablen ThDP-Konzentrationen bzw. Me^{2+} -Konzentrationen und 1 mM Mg^{2+} -Ionen bzw. ThDP vorinkubiert. Die Aktivitätstests wurden durch die Zugabe von je 0,5 mM Phosphonopyruvat gestartet. Die aufgelisteten Daten resultieren aus Mittelwerten, die aus zwei parallel durchgeführten Messreihen gebildet wurden.

wt-Ppd	K_m [μM]	v_{max} [U/mg]	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_m [$s^{-1}M^{-1}$]
ThDP	$39,05 \pm 2,64$	$0,38 \pm 0,002$	$0,55 \pm 0,003$	$1,42 \times 10^4$
Mg^{2+}	$38,91 \pm 1,46$	$0,35 \pm 0,006$	$0,52 \pm 0,008$	$1,34 \times 10^4$
Ca^{2+}	$36,57 \pm 4,47$	$0,45 \pm 0,009$	$0,66 \pm 0,014$	$1,82 \times 10^4$
Mn^{2+}	$2,88 \pm 0,27$	$0,58 \pm 0,008$	$0,85 \pm 0,012$	$2,98 \times 10^5$
S25N	K_m [μM]	v_{max} [U/mg]	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_m [$s^{-1}M^{-1}$]
ThDP	$22,10 \pm 0,71$	$0,21 \pm 0,002$	$0,31 \pm 0,003$	$1,42 \times 10^4$
Mg^{2+}	$22,54 \pm 1,07$	$0,18 \pm 0,003$	$0,27 \pm 0,004$	$1,19 \times 10^4$
Ca^{2+}	$9,35 \pm 0,36$	$0,19 \pm 0,001$	$0,27 \pm 0,002$	$2,92 \times 10^4$
Mn^{2+}	$2,25 \pm 0,07$	$0,26 \pm 0,000$	$0,39 \pm 0,001$	$1,72 \times 10^5$

D297E	K_m [μ M]	v_{max} [U/mg]	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_m [$s^{-1}M^{-1}$]
ThDP	$38,74 \pm 1,05$	$0,31 \pm 0,002$	$0,46 \pm 0,003$	$1,18 \times 10^4$
Mg ²⁺	$36,30 \pm 0,56$	$0,27 \pm 0,002$	$0,39 \pm 0,003$	$1,08 \times 10^4$
Ca ²⁺	$15,13 \pm 1,92$	$0,27 \pm 0,012$	$0,40 \pm 0,017$	$2,65 \times 10^4$
Mn ²⁺	$5,62 \pm 0,03$	$0,41 \pm 0,001$	$0,60 \pm 0,001$	$1,06 \times 10^5$

Beim Apo-Ppd-Mutein D297E lag die Aktivität ohne ThDP- und Mg²⁺-Zusatz bei 0,01 U/mg. Sowohl die alleinige Zugabe von 1 mM ThDP als auch die alleinige Zugabe von 1 mM Mg²⁺-Ionen hatte keine wiederherstellende Wirkung auf die Enzymaktivität, wohingegen die Anwesenheit beider Cofaktoren eine partielle Rekonstitution von 50% der Ausgangsaktivität bewirkte. Die für ThDP und Mg²⁺-Ionen ermittelten K_m -Werte befanden sich in derselben Größenordnung wie die des wt-Enzyms. Verglichen mit der wt-Ppd war die für Ca²⁺-Ionen berechnete Michaelis-Konstante um 50% reduziert; demgegenüber war der für Mn²⁺-Ionen ermittelte Wert um 50% erhöht (Tabelle 15). Die Reaktionsgeschwindigkeiten waren, mit Ausnahme des Wertes für Mn²⁺-Ionen, annähernd identisch und bezogen auf die v_{max} -Werte des wt-Enzyms um 18 – 40% reduziert (Tabelle 15).

3.3.2.3 Funktion der Aminosäuren Histidin-110 und Histidin-111

Schenk *et al.* (1997) hatten anhand von Sequenzvergleichen verschiedener Pyruvat-Decarboxylasen zwei konservierte Histidin-Reste identifiziert, die sich kristallographischen Studien zufolge (Arjunan *et al.*, 1996; Dobritsch *et al.*, 1998) in der Nähe des aktiven Zentrums befinden (Abbildung 36). Aufgrund von ortsgerichteten Mutagenesen waren für die in der *Z. mobilis* Pdc vorkommenden Histidin-Reste 113 und 114 folgende Reaktionsmechanismen postuliert worden: Die katalytische Aktivität des Enzyms ist von einer positiven Ladung des Histidin-113, die durch Wechselwirkungen der beiden Stickstoffatome des Imidazolrings mit Aspartat-Resten stabilisiert wird, und der daraus resultierenden ungeladenen Form des Histidin-114 abhängig. Der Wegfall dieser positiven Ladung würde der Deprotonierung des C2-Atoms und damit der Aktivierung des Thiamindiphosphats entgegenwirken (Schenk *et al.*, 1997; Dobritsch *et al.*, 1998). Die Aminosäure Histidin-114 ist nicht an der Cofaktor- und Substrat-Bindung beteiligt, sondern möglicherweise für die Orientierung der katalytischen Intermediate mitverantwortlich (Schenk *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 2001). Mit Hilfe des Sequenz-Alignments konnten in der Ppd aus *S. viridochromogenes* Tü494 die beiden positiv polaren Histidin-Reste 110 und 111 identifiziert werden (Abbildung 37), die jeweils gegen die unpolare Aminosäure Alanin ersetzt wurden.

Der Austausch des Aminosäurerestes Histidin-110 führte zu einem Mutein, das keine Restaktivität mehr aufwies. Analog zum Histidin-Rest 113 der *Z. mobilis* Pdc deutete der Aktivitätsverlust darauf hin, dass die katalytische Aktivität der Ppd von der positiven Ladung der Aminosäure Histidin-110 abhängig ist.

Ergebnisse

Im Gegensatz zum inaktiven Mutein H110A hatte beim Ppd-Mutein H111A das Ersetzen des Histidin-Restes gegen Alanin keine negativen Auswirkungen auf die enzymatische Aktivität; ferner war der K_m -Wert im Vergleich zur wt-Ppd nur geringfügig erhöht (Tabelle 16). Da die Eigenschaften des Ppd-Muteins H111A mit dem inaktiven *Z. mobilis* Pdc-Mutein H114A (Candy und Duggleby, 1998; Huang *et al.*, 2001) nicht konform waren, ist in der Phosphonopyruvat-Decarboxylase die für diese Aminosäure postulierte Funktion der Ausrichtung der katalytischen Zwischenprodukte fraglich.

Tabelle 16 Kinetische Parameter des Ppd-Muteins H111A für das physiologische Substrat Phosphonopyruvat im Vergleich zu den kinetischen Parametern der wt-Ppd. Die K_m - und v_{max} -Werte und die daraus abgeleiteten k_{cat} - und k_{cat}/K_m -Werte wurden mit Hilfe des Phtase/ADH- und des Aept/LDH-Enzymtests ermittelt. Die aufgelisteten Daten resultieren aus Mittelwerten, die aus jeweils zwei parallel durchgeführten Messungen gebildet wurden.

	K_m [mM]	v_{max} [U/mg]	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_m [$s^{-1}M^{-1}$]
wt-Ppd	0,0032	0,81 ± 0,01	1,18 ± 0,02	3,78 × 10 ⁵
H111A	0,013 ± 0,006	0,85 ± 0,06	1,24 ± 0,09	1,16 × 10 ⁵

Tabelle 17 Kinetische Parameter der Rekonstitution des Apo-Ppd-Muteins H111A mit Thiamindiphosphat bzw. zweiwertigen Magnesium-, Calcium- und Mangan-Ionen im Vergleich zu den kinetischen Parametern der wt-Ppd. Die Affinität der Enzyme zu ihren Cofaktoren wurde mit Hilfe der Enzymkombination Aept/LDH untersucht. Bei der ThDP-Aktivierung bzw. Me^{2+} -Aktivierung wurden die Apo-Enzyme mit variablen ThDP-Konzentrationen bzw. Me^{2+} -Konzentrationen und 1 mM Mg^{2+} -Ionen bzw. ThDP vorinkubiert. Die Aktivitätstests wurden durch die Zugabe von je 0,5 mM Phosphonopyruvat gestartet. Die aufgelisteten Daten resultieren aus Mittelwerten, die aus zwei parallel durchgeführten Messreihen gebildet wurden.

wt-Ppd	K_m [μM]	v_{max} [U/mg]	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_m [$s^{-1}M^{-1}$]
ThDP	39,05 ± 2,64	0,38 ± 0,002	0,55 ± 0,003	1,42 × 10 ⁴
Mg^{2+}	38,91 ± 1,46	0,35 ± 0,006	0,52 ± 0,008	1,34 × 10 ⁴
Ca^{2+}	36,57 ± 4,47	0,45 ± 0,009	0,66 ± 0,014	1,82 × 10 ⁴
Mn^{2+}	2,88 ± 0,27	0,58 ± 0,008	0,85 ± 0,012	2,98 × 10 ⁵
H111A	K_m [μM]	v_{max} [U/mg]	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_m [$s^{-1}M^{-1}$]
ThDP	33,93 ± 0,25	0,42 ± 0,001	0,61 ± 0,001	1,79 × 10 ⁴
Mg^{2+}	26,81 ± 1,54	0,33 ± 0,006	0,49 ± 0,009	1,83 × 10 ⁴
Ca^{2+}	12,24 ± 0,46	0,37 ± 0,003	0,54 ± 0,004	4,38 × 10 ⁴
Mn^{2+}	2,47 ± 0,03	0,54 ± 0,001	0,80 ± 0,001	3,23 × 10 ⁵

Das Apo-Ppd-Mutein H111A wies eine Restaktivität von 0,07 U/mg auf, was ca. 8% der Ausgangsaktivität entsprach, d.h., wie im Fall des Ppd-Muteins S25N war eine vollständige Entfernung der Cofaktoren mittels Dialyse nicht möglich (siehe 3.3.2.2). Die Zugabe von je 1 mM ThDP und Mg^{2+} -Ionen resultierte in einer partiellen Wiederherstellung von ca. 41% der ursprünglichen Aktivität. Die K_m -Werte für ThDP, Mg^{2+} - und Ca^{2+} -Ionen waren im Vergleich zum wt-Enzym um 13%, 31% bzw. 67% reduziert, wohingegen die für Mn^{2+} -Ionen

ermittelte Michaelis-Konstante in derselben Größenordnung lag (Tabelle 17). Die $v_{\max}$ -Werte waren, verglichen mit den Reaktionsgeschwindigkeiten der wt-Ppd, nur geringfügig erhöht bzw. vermindert (Tabelle 17).

3.3.2.4 Funktion der Aminosäuren Aspartat-265, Asparagin-293 und Glycin-294

Hawkins *et al.* (1989) hatten ein Sequenzmotiv identifiziert (siehe auch Reynen und Sahm, 1988), das für ThDP-abhängige Enzyme charakteristisch ist. Die Hauptmerkmale des Motivs sind eine Glycin-Aspartat-Glycin- (GDG-) Sequenz und zwei Asparagin-Reste (NN), die durch ca. 25 Aminosäuren voneinander getrennt sind. Innerhalb des Motivs existieren weitere, weniger konservierte Reste. Ein Beispiel hierfür ist ein Prolin-Rest, der sich sieben Reste vor der NN-Sequenz befindet.

Für die Pyruvat-Decarboxylase aus *Z. mobilis* sind die oben aufgeführten Kriterien zutreffend (Tabelle 18). Ortsgerichtete Mutagenesen hatten ergeben, dass die Aminosäuren Aspartat-440 und Asparagin-467 einen großen Einfluss auf die Bindung der Cofaktoren ThDP und Mg^{2+} haben, ohne die Affinität des physiologischen Substrats Pyruvat zu beeinflussen. Demgegenüber hatten Austausch des Prolin-Restes keine gravierenden Auswirkungen auf die Cofaktor-Bindung bzw. die Substrataffinität gehabt (Diefenbach *et al.*, 1992; Candy und Duggleby, 1994). Die im Jahr 1998 veröffentlichte Kristallstruktur der *Z. mobilis* Pdc hatte veranschaulicht, dass durch das zweiwertige Magnesium-Ion der Diphosphat-Rest des Thiamindiphosphats im Protein verankert wird. Ausgehend vom Mg^{2+} -Ion kommt es zusammen mit zwei Sauerstoffatomen des Diphosphat-Restes, den beiden Seitenketten-Sauerstoffatomen der Aminosäuren Aspartat-440 und Asparagin-467, dem Hauptketten-Sauerstoffatom des Glycin-Restes 469 sowie einem Wassermolekül zur Ausbildung eines Oktaeders (Dobritzsch *et al.*, 1998) (Abbildung 36).

Tabelle 18 Thiamindiphosphat-Sequenzmotive der Pyruvat-Decarboxylase aus *Zymomonas mobilis* sowie der Phosphonopyruvat-Decarboxylasen aus *Streptomyces viridochromogenes* Tü494, *S. hygroscopicus*, *S. wedmorensis* und *Bacteroides fragilis*. Pdc, Pyruvat-Decarboxylase; Ppd, Phosphonopyruvat-Decarboxylase.

Enzym	Organismus	ThDP-Sequenzmotiv
Pdc	<i>Z. mobilis</i>	⁴³⁹ GDGSFQLTAQEVAQMVRKLPVLIIFLINNYG ⁴⁶⁹
Ppd	<i>S. viridochromogenes</i> Tü494	²⁶⁴ GDGSVLMRLGSLATVGAHAPGNLVHLVLDNG ²⁹⁴
Ppd	<i>S. hygroscopicus</i>	²⁶⁴ GDGSALMRLGSLATVAAHAPGNLVHLILDNG ²⁹⁴
Ppd	<i>S. wedmorensis</i>	²⁹³ GDGALLMHLGALPVIAGHGPSSYFHVVFNN ²⁹³
Ppd	<i>B. fragilis</i>	²⁵⁹ GDGAFIMHMAVSNI ²⁸⁹ DLSPKNYRHVLFNN ²⁸⁹

Die für das ThDP-Sequenzmotiv charakteristische Abfolge Glycin-Aspartat-Glycin wurde in allen der in Tabelle 18 aufgeführten Ppd-Sequenzen identifiziert. Die beiden aufeinander folgenden Asparagin-Reste wurden nur in den Sequenzen der *S. wedmorensis* Ppd und der *B. fragilis* Ppd entdeckt. Ein Vergleich der Ppd-Sequenzen untereinander ergab, dass das in

Ergebnisse

den Sequenzen der *S. viridochromogenes* Ppd und der *S. hygroscopicus* Ppd nur einfach auftretende Asparagin den zweiten und somit den für die Cofaktor-Bindung essentiellen Rest darstellt (Tabelle 18). Im Gegensatz zur *Z. mobilis* Pdc ist der Prolin-Rest in allen aufgelisteten Ppd-Sequenzen um zwei Positionen nach links verschoben. Außerdem ist bei den Phosphonopyruvat-Decarboxylasen das an der Oktaeder-Bildung beteiligte Glycin direkt neben dem Asparagin-Rest positioniert (Tabelle 18).

Zur Untersuchung ihrer Funktion wurden die anhand des ThDP-Sequenzmotivs identifizierten Aminosäurereste Aspartat-265, Asparagin-293 und Glycin-294 der Ppd aus *S. viridochromogenes* Tü494 jeweils gegen Alanin ausgetauscht.

In Gegenwart von Mg^{2+} -Ionen führte sowohl der Austausch der negativ polaren Aminosäure Aspartat-265 als auch das Ersetzen des ungeladen polaren Aminosäurerestes Asparagin-293 gegen die unpolare Aminosäure Alanin zu Muteinen ohne Restaktivität. Die Aktivitätsverluste der Ppd-Muteine D265A und N293A veranschaulichten, dass die Aminosäuren Aspartat-265 und Asparagin-293 für die enzymatische Aktivität der Ppd von Bedeutung sind. Im Gegensatz zu Mg^{2+} -Ionen wies das Ppd-Mutein D265A in Anwesenheit von Mn^{2+} -Ionen eine Aktivität von 0,24 U/mg auf; ein Phänomen, das beim Ppd-Mutein N293A allerdings nicht beobachtet werden konnte.

Der Aktivitätsverlust des Ppd-Muteins D265A in Abhängigkeit von zweiwertigen Magnesium-Ionen war mit den Eigenschaften der korrespondierenden Pdc-Muteine D440N, D440T und D440G aus *Zymomonas mobilis* konform und war im Fall der Pyruvat-Decarboxylase durch die Unfähigkeit, Thiamindiphosphat zu binden, erklärt worden (Diefenbach *et al.*, 1992). Candy und Duggleby (1994) hatten anhand von Vergleichen mit dem *Z. mobilis* Pdc-Mutein Asp440Glu gezeigt, dass die enzymatische Aktivität von der negativen Ladung der Aminosäure-440 abhängig ist. Entsprechend dem Ppd-Mutein N293A hatte der Austausch des korrespondierenden Asparagin-Restes der *Z. mobilis* Pdc gegen Glutamin (Asn467Gln) zum Verlust der enzymatischen Aktivität geführt, wofür die im Vergleich zum Asparagin um eine CH_2 -Gruppe größere Glutamin-Seitenkette verantwortlich gemacht worden war (Candy und Duggleby, 1994).

Im Gegensatz zu den inaktiven Ppd-Muteinen D265A und N293A wurde beim Austausch des Aminosäurerestes Glycin-294 gegen Alanin eine Verringerung der enzymatischen Aktivität auf 0,2 U/mg, was ca. 25% des $wt-v_{max}$ -Wertes entsprach, festgestellt. Bezüglich der Substrataffinität konnte kein Unterschied zum *wt*-Enzym festgestellt werden (Tabelle 19).

Tabelle 19 Kinetische Parameter des Ppd-Muteins G294A für das physiologische Substrat Phosphonopyruvat im Vergleich zu den kinetischen Parametern der *wt*-Ppd. Die K_m - und v_{max} -Werte und die daraus abgeleiteten k_{cat} - und k_{cat}/K_m -Werte wurden mit Hilfe des Phtase/ADH- und des Aep/LDH-Enzymtests ermittelt. Die aufgelisteten Daten resultieren aus Mittelwerten, die aus jeweils zwei parallel durchgeführten Messungen gebildet wurden.

	K_m [μM]	v_{max} [U/mg]	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_m [$s^{-1}M^{-1}$]
wt-Ppd	$3,2 \pm 0,35$	$0,81 \pm 0,01$	$1,18 \pm 0,02$	$3,78 \times 10^5$
G294A	$6,2 \pm 2,35$	$0,20 \pm 0,01$	$0,29 \pm 0,01$	$5,13 \times 10^4$

Beim Apo-Ppd-Mutein G294A lag die Aktivität in Abwesenheit von ThDP und Mg^{2+} bei 0,01 U/mg, was ca. 5% der Ausgangsaktivität entsprach. Der alleinige Zusatz von je 1 mM ThDP, Mg^{2+} - oder Ca^{2+} -Ionen hatte keine wiederherstellende Wirkung auf die Enzymaktivität. Gegensätzlich dazu wurde durch die alleinige Zugabe von 1 mM Mn^{2+} -Ionen eine Aktivität von 0,05 U/mg erreicht, was verdeutlichte, dass mittels Dialyse die vollständige Elimination des Thiamindiphosphats nicht möglich war. Die Anwesenheit von jeweils 1 mM ThDP und Mg^{2+} -Ionen bewirkte eine partielle Rekonstitution von 30% der Ausgangsaktivität. Verglichen mit der wt-Ppd waren die für ThDP, Mg^{2+} - und Ca^{2+} -Ionen ermittelten K_m -Werte um 19%, 34% bzw. 58% verringert; dagegen war die Michaelis-Konstante für Mn^{2+} -Ionen um das 5-fache erhöht (Tabelle 20). Die v_{max} -Werte für ThDP, Mg^{2+} - und Ca^{2+} -Ionen lagen im Bereich von 0,07 – 0,09 U/mg und waren gegenüber dem wt-Enzym um ca. 80% reduziert. Die für Mn^{2+} -Ionen ermittelte Reaktionsgeschwindigkeit betrug 0,25 U/mg, was ca. 43% des entsprechenden wt- v_{max} -Wertes entsprach (Tabelle 20).

Tabelle 20 Kinetische Parameter der Rekonstitution des Apo-Ppd-Muteins G294A mit Thiamindiphosphat bzw. zweiwertigen Magnesium-, Calcium- und Mangan-Ionen im Vergleich zu den kinetischen Parametern der wt-Ppd. Die Affinität der Enzyme zu ihren Cofaktoren wurde mit Hilfe der Enzymkombination Aep/LDH untersucht. Bei der ThDP-Aktivierung bzw. Me^{2+} -Aktivierung wurden die Apo-Enzyme mit variablen ThDP-Konzentrationen bzw. Me^{2+} -Konzentrationen und 1 mM Mg^{2+} -Ionen bzw. ThDP vorinkubiert. Die Aktivitätstests wurden durch die Zugabe von je 0,5 mM Phosphonopyruvat gestartet. Die aufgelisteten Daten resultieren aus Mittelwerten, die aus zwei parallel durchgeführten Messreihen gebildet wurden.

wt-Ppd	K_m [μM]	v_{max} [U/mg]	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_m [$s^{-1}M^{-1}$]
ThDP	$39,05 \pm 2,64$	$0,38 \pm 0,002$	$0,55 \pm 0,003$	$1,42 \times 10^4$
Mg^{2+}	$38,91 \pm 1,46$	$0,35 \pm 0,006$	$0,52 \pm 0,008$	$1,34 \times 10^4$
Ca^{2+}	$36,57 \pm 4,47$	$0,45 \pm 0,009$	$0,66 \pm 0,014$	$1,82 \times 10^4$
Mn^{2+}	$2,88 \pm 0,27$	$0,58 \pm 0,008$	$0,85 \pm 0,012$	$2,98 \times 10^5$
G294A	K_m [μM]	v_{max} [U/mg]	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_m [$s^{-1}M^{-1}$]
ThDP	$31,56 \pm 0,14$	$0,07 \pm 0,000$	$0,10 \pm 0,000$	$3,12 \times 10^3$
Mg^{2+}	$25,79 \pm 4,81$	$0,07 \pm 0,006$	$0,10 \pm 0,009$	$3,85 \times 10^3$
Ca^{2+}	$15,18 \pm 2,81$	$0,09 \pm 0,007$	$0,14 \pm 0,011$	$9,09 \times 10^3$
Mn^{2+}	$14,76 \pm 0,21$	$0,25 \pm 0,003$	$0,36 \pm 0,004$	$2,44 \times 10^4$

3.3.2.5 Funktion der Aminosäuren Glutamat-224 und Aspartat-263

Ein im Jahr 2003 veröffentlichter Artikel (Zhang *et al.*, 2003b) hatte sich mit der Charakterisierung der Phosphonopyruvat-Decarboxylase aus dem für Menschen pathogenen Organismus *Bacteroides fragilis* beschäftigt. Das *ppd*-Gen gehört zum Biosyntheseweg von 2-Aminoethylphosphonat, einem Bestandteil des Kapsel-Polysaccharidkomplexes, der den wichtigsten Virulenzfaktor darstellt.

Anhand der paarweise durchgeführten Sequenz-Alignments der *B. fragilis* Ppd mit den jeweiligen Aminosäuresequenzen der Sekundärmetabolit-produzierenden Stämme

S. wedmorensis, *S. hygroscopicus* und *S. viridochromogenes* Tü494 waren Kongruenzen von 50%, 34% bzw. 32% aufgedeckt worden. Durch einen Vergleich aller bis zu diesem Zeitpunkt veröffentlichten Ppd-Sequenzen waren 61 streng konservierte Aminosäurereste identifiziert worden, unter denen sich 26 Aminosäuren befanden, die aufgrund ihrer Polarität potenzielle Kandidaten für katalytisch wichtige Reste und für Substrat- oder Cofaktor-bindende Reste waren (Zhang *et al.*, 2003b).

Die Charakterisierung der *B. fragilis* Ppd hatte ergeben, dass die PnPyr-strukturverwandte Substanz Sulfofpyruvat einerseits ein kompetitiver Inhibitor des Enzyms war und auf der anderen Seite ein Substrat für das Enzym darstellte. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde nach Übereinstimmungen zwischen den Aminosäuresequenzen der Phosphonopyruvat- und der Sulfofpyruvat-Decarboxylasen gesucht. Dabei hatten Zhang *et al.* (2003b) zwölf polare Aminosäurereste identifiziert, die nur in den Sequenzen der Phosphonopyruvat- und Sulfofpyruvat-Decarboxylasen auftraten. Mit Hilfe der ortsgerichteten Mutagenese war die Funktion der zu dieser Gruppe gehörenden Aminosäuren Glutamat-213 und Aspartat-258 (Nummerierung entsprechend der *B. fragilis* Ppd) analysiert worden. Zhang *et al.* (2003b) hatten herausgefunden, dass der Aminosäurerest Aspartat-258 wichtig für die Substrat-Bindung ist, weil der K_m -Wert des Muteins D258A im Vergleich zum wt-Enzym um das 1000-fache erhöht war. Demgegenüber schien der Glutamat-Rest 213, aufgrund der nur geringfügig verminderten Enzymaktivität des Muteins E213A, weniger bedeutend für die katalytische Aktivität zu sein.

Analog zu den Austauschungen der *B. fragilis* Ppd wurden die korrespondierenden Aminosäuren der *S. viridochromogenes* Ppd (Glutamat-224 und Aspartat-263) (Abbildung 37) jeweils gegen die unpolare Aminosäure Alanin ersetzt.

Sowohl beim Ppd-Mutein E224A als auch beim Ppd-Mutein D263A führte der Aminosäureaustausch in Gegenwart von zweiwertigen Magnesium-Ionen zum vollständigen Verlust der enzymatischen Aktivität. Analog zum Ppd-Mutein D265A wurde beim Ppd-Mutein D263A in Anwesenheit von Mn^{2+} -Ionen eine Aktivitätssteigerung auf 0,15 U/mg beobachtet. Zusammen mit der Positionierung in der Nähe des Aspartat-Restes 265 ließ dieses Ergebnis vermuten, dass die Aminosäure Aspartat-263 die Cofaktor-Bindung beeinflusst. Im Fall des Ppd-Muteins E224A wurde auch in Gegenwart von zweiwertigen Mangan-Ionen keine Aktivitätszunahme festgestellt.

Der in Abhängigkeit von zweiwertigen Magnesium-Ionen beobachtete Aktivitätsverlust der Ppd-Muteine E224A und D263A widersprach den Eigenschaften der korrespondierenden *B. fragilis* Ppd-Muteine E213A und D258A.

3.3.3 Zusammenfassung

Die Bestimmung des Oligomerisierungszustands ergab, dass das Ppd-Fusionsprotein im nativen Zustand als Dimer vorliegt. Die mit Hilfe der Gelpermeationschromatographie durchgeführte Größenbestimmung ergab eine molekulare Masse von 72.100 ± 220 .

Da die Kristallstruktur der Phosphonopyruvat-Decarboxylase bislang nicht bekannt ist, wurde mit Hilfe von verschiedenen Sequenz-Alignments nach potenziell essentiellen Aminosäuren gesucht, wobei die möglichen Aufgaben der identifizierten Aminosäuren durch ortsgerichtete Mutagenese analysiert wurden.

Der Vergleich mit der bereits sehr gut charakterisierten und ebenfalls zur Familie der α -Ketodecarboxylasen gehörenden Pyruvat-Decarboxylase aus *Z. mobilis* ermöglichte die Identifizierung von acht verschiedenen Aminosäureresten: Für die Thiamindiphosphat-Aktivierung, die für die enzymatische Aktivität aller ThDP-abhängigen Enzyme essentiell ist, ist vermutlich der Glutamat-Rest 48 verantwortlich. Der Austausch der Aminosäuren Serin-25 und Aspartat-297 hatte einen negativen Einfluss auf die Kinetik der Phosphonopyruvat-Decarboxylase. Die katalytische Aktivität der Ppd ist wahrscheinlich von der positiven Ladung des Histidin-Restes 110 abhängig. Beim Austausch des benachbarten Histidin-111 wurde keine negative Auswirkung auf die enzymatische Aktivität beobachtet. Die konservierten Aminosäurereste Aspartat-265 und Asparagin-293, die charakteristisch für das ThDP-Sequenzmotiv sind, sowie die an den Asparagin-Rest angrenzende Aminosäure Glycin-294 scheinen für die Mg^{2+} -abhängige Verankerung des Thiamindiphosphats im aktiven Zentrum der Ppd verantwortlich zu sein.

Die Austausche der Aminosäurereste Glutamat-224 und Aspartat-263, zwei von zwölf polaren Aminosäuren, die unter den Sequenzen der Phosphonopyruvat- und Sulfopyruvat-Decarboxylasen konserviert sind, gegen Alanin resultierten in Muteinen ohne Restaktivität. Sowohl beim Ppd-Mutein D265A, dessen Inaktivität möglicherweise durch die Unfähigkeit, ThDP zu binden, erklärt werden kann, als auch beim inaktiven Ppd-Mutein D263A wurde in Gegenwart von zweiwertigen Mangan-Ionen eine Erhöhung der enzymatischen Aktivität festgestellt.

4. Diskussion

Die Phosphonopyruvat-Decarboxylase (Ppd) aus *Streptomyces viridochromogenes* Tü494 katalysiert die Decarboxylierung von Phosphonopyruvat zum Phosphonoacetaldehyd (Nakashita *et al.*, 1997), dem Ausgangspunkt zahlreicher C-P-Verbindungen. Die CO₂-Abspaltung ist die Folgereaktion der Phosphoenolpyruvat-Phosphomutase (Ppm), die mit der Isomerisierung von Phosphoenolpyruvat zu Phosphonopyruvat die Biosynthese verschiedener Phosphonate (Bsp.: 2-Aminoethylphosphonat, Bialaphos, Fosfomycin und Fosmidomycin) einleitet. Das thermodynamische Gleichgewicht der Ppm-katalysierten Umlagerung liegt im Verhältnis $\geq 500:1$ aufseiten der C-O-P-Bindung (Bowman *et al.*, 1988). Die enzymatische Aktivität der Ppd bewirkt die Elimination des gebildeten Phosphonopyruvats aus der Ppm-katalysierten Gleichgewichtsreaktion und somit die Etablierung der C-P-Bindung. Die meisten Phosphonat-Biosynthesen werden ausgehend von Phosphoenolpyruvat durch die Enzymkombination Phosphoenolpyruvat-Phosphomutase und Phosphonopyruvat-Decarboxylase eingeleitet.

Die enzymatische Aktivität der Phosphonopyruvat-Decarboxylase ist von den Cofaktoren Thiamindiphosphat (ThDP) und zweiwertigen Metall-Ionen abhängig (Nakashita *et al.*, 1997). Von den ebenfalls ThDP-abhängigen Enzymen Acetohydroxysäure-Synthase, Benzaldehyd-Lyase, Benzoylformiat-Decarboxylase, 1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat-Synthase, Pyruvat-Decarboxylase und Transketolase ist bekannt, dass die von ihnen katalysierte, enantioselektive C-C-Bindungsknüpfung die Synthese einer großen Bandbreite von α -Hydroxyketonen ermöglicht (zitiert in: Iding *et al.*, 1998; Schörken und Sprenger, 1998; Sprenger und Pohl, 1999; Pohl *et al.*, 2002; Pohl *et al.*, 2004).

Ein Ziel der Arbeit lag darin, Einblicke in die biochemischen Eigenschaften und die Struktur-Funktionsbeziehungen der Phosphonopyruvat-Decarboxylase aus *S. viridochromogenes* Tü494 zu erlangen. Da die dreidimensionale Struktur der Phosphonopyruvat-Decarboxylase nicht bekannt war, wurde unter Zuhilfenahme der bereits sehr gut charakterisierten Pyruvat-Decarboxylase aus *Zymomonas mobilis* nach essentiellen Aminosäureresten gesucht. Die identifizierten Reste wurden mittels ortsgerichteter Mutagenese ausgetauscht. Anhand der erzeugten Ppd-Muteine sollte die Funktion des jeweils ausgetauschten Aminosäurerestes aufgeklärt werden.

Ein weiteres Ziel der Arbeit war die Synthese von (neuartigen) C-P-Verbindungen. Dabei wurden drei Fragestellungen untersucht: 1. Ist es möglich, den Biosyntheseweg der C-P-Verbindung 2-Aminoethylphosphonat (AEP) in *E. coli* zu etablieren, d.h. AEP *in vivo* in *E. coli* zu synthetisieren? 2. Besitzt die ThDP-abhängige Phosphonopyruvat-Decarboxylase eine Nebenaktivität als Carboligase? 3. Wird der Ppd-generierte Phosphonoacetaldehyd von der Pyruvat-Decarboxylase als Substrat akzeptiert?

Eine erste Voraussetzung für die Charakterisierung der Phosphonopyruvat-Decarboxylase war ein fortwährender Zugang zum physiologischen Substrat Phosphonopyruvat, dessen chemische Synthese gemäß den Angaben von Coutrot und Savignac (1978) sowie Freeman

et al. (1991) durchgeführt wurde. Des Weiteren wurden verschiedene Hilfsenzyme benötigt: Die Phosphonoacetaldehyd-umsetzenden Enzyme 2-Aminoethylphosphonat-Transaminase (Aept) und Phosphonoacetaldehyd-Hydrolase (Phtase) ermöglichten in Kombination mit der L-Lactat-Dehydrogenase (LDH) und der Alkohol-Dehydrogenase (ADH) die Bestimmung der Ppd-Aktivität. Die enzymatische Aktivität der Phosphoenolpyruvat-Phosphomutase (Ppm) diente der Konzentrationsbestimmung des chemisch synthetisierten Phosphonopyruvats. Sowohl die Ppd als auch die Hilfsenzyme Aept, Phtase und Ppm wurden als Histidin-Fusionsproteine exprimiert und aufgereinigt, da die Ni^{2+} -Affinitätschromatographie eine schnelle und effiziente Präparation von gereinigtem Enzym in ausreichender Konzentration sicherstellte.

4.1 Enzyme

4.1.1 Genexpression und Proteinaufreinigung

Das für die Phosphonopyruvat-Decarboxylase kodierende *ppd*-Gen aus *Streptomyces viridochromogenes* Tü494, die für die 2-Aminoethylphosphonat-Transaminase und die Phosphonoacetaldehyd-Hydrolase kodierenden Gene *phnW* und *phnX* aus *Pseudomonas putida* KT2440 und das für die Phosphoenolpyruvat-Phosphomutase kodierende *ppm*-Gen aus *Mytilus edulis* wurden allesamt in *E. coli* zur Expression gebracht. Die Vorteile von *E. coli* sind dessen unkomplizierte mikrobiologische Handhabung und die Existenz von sehr gut etablierten Expressionssystemen.

Durch den für die Klonierung verwendeten Vektor pET-16b wurden die Gene als Fusionsproteine mit einem aminoterminalen 10-fachen Histidinschwanz exprimiert; gleichzeitig wurden eine strikte Kontrolle der Genexpression und eine hohe Expressionsrate sichergestellt. Der Einsatz des Expressionsstammes *E. coli* BL21(DE3)pLysS erhöhte abermals die Stringenz der basalen Genexpression, da das pLysS-kodierte T7-Lysozym ein natürlicher Inhibitor der T7-RNA-Polymerase ist (Moffatt und Studier, 1987; Studier, 1991). Ferner wurde durch den Gebrauch des pLysS-enthaltenden *E. coli*-Stammes ein Zellaufschluss ohne harsche mechanische Kräfte gewährleistet. Ausgehend von den Rohextrakten der rekombinanten *E. coli*-Stämme erfolgte mit Hilfe der Ni^{2+} -Affinitätschromatographie die Aufreinigung der Histidin-Fusionsproteine.

Anhand des oben beschriebenen His/Ni-NTA-Systems wurden die Enzyme Ppd, Aept, Phtase und Ppm als Histidin-Fusionsproteine in reproduzierbaren Ausbeuten (Tabelle 21) bis zur apparenten Homogenität (>99%) aufgereinigt. Bei der Phosphonopyruvat-Decarboxylase und der Phosphoenolpyruvat-Phosphomutase wurde die apparente Homogenität durch einen zusätzlichen Waschschrift, der unspezifisch gebundene Proteine vor der Elution der Histidin-Fusionsproteine von der Ni-NTA-Matrix verdrängte, sichergestellt.

Diskussion

Tabelle 21 Ausbeuten der Histidin-Fusionsproteine [$\text{mg/l}_{\text{Expressionskultur}}$], die mit Hilfe der Ni^{2+} -Affinitätschromatographie aus den Rohextrakten der rekombinanten *E. coli*-Stämme aufgereinigt wurden. **Aept**, 2-Aminoethylphosphonat-Transaminase; **Phtase**, Phosphonoacetaldehyd-Hydrolase; **Ppd**, Phosphonopyruvat-Decarboxylase; **Ppm**, Phosphoenolpyruvat-Phosphomutase.

gereinigtes Histidin-Fusionsprotein	Ppd	Aept	Phtase	Ppm
Konzentration [$\text{mg/l}_{\text{Expressionskultur}}$]	15	30	90	5

Die Phosphonopyruvat-Decarboxylase aus dem Antibiotika-Produzenten *Streptomyces hygroscopicus* war durch vier verschiedene, hintereinander geschaltete Chromatographie-Schritte ausgehend von zellfreien Rohextrakten aufgereinigt worden (Nakashita *et al.*, 1997). Sechs Jahre später war die Ppd-Aufreinigung aus dem humanpathogenen Bakterium *Bacteroides fragilis* gelungen; die Expression des für die Phosphonopyruvat-Decarboxylase kodierenden *aepY*-Gens war in *E. coli* durchgeführt worden und die Proteinaufreinigung war über ein vier Schritte umfassendes Protokoll erfolgt (Zhang *et al.*, 2003b).

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig die Aufreinigung der Phosphonopyruvat-Decarboxylase als Fusionsprotein mit einem aminoterminalen Polyhistidinschwanz beschrieben. Entgegen den zuvor veröffentlichten Ppd-Aufreinigungen (Nakashita *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2003b) wurde das Reinigungsprotokoll des Ppd-Fusionsproteins auf einen Schritt reduziert. Die Menge an gereinigtem Ppd-Fusionsprotein (Tabelle 21) entsprach ca. 3% der Proteinkonzentration des Rohextraktes; verglichen mit der Ppd-Aufreinigung nach Zhang *et al.* (2003b) wurde die Proteinausbeute um das dreifache gesteigert.

Eine denkbare Limitation der heterologen Genexpression ist das verstärkte Vorkommen der beiden Basen Guanin (G) und Cytosin (C) im zu exprimierenden Gen: Der GC-Gehalt des *ppd*-Gens aus *S. viridochromogenes* Tü494 beträgt 73,7% und ist gegenüber dem durchschnittlichen GC-Gehalt des *E. coli*-Genoms um ca. 20% erhöht. Veränderungen im GC-Gehalt führen zu Abweichungen in der Codon-Nutzung und können in einem gesteigerten Vorhandensein von Aminosäurecodons, die von *E. coli* nur selten verwendet werden (Kane, 1995; Kurland und Galant, 1996), resultieren (Sanli *et al.*, 2001). Dass der vermehrte Bedarf an seltenen tRNA-Molekülen eine drastische Herabsetzung der Expressionsrate bewirken kann, war in diversen Artikeln veröffentlicht worden (Brinkmann *et al.*, 1989; Seidel *et al.*, 1992; Rosenberg *et al.*, 1993; Del Tito *et al.*, 1995).

Beispiele für selten genutzte Aminosäurecodons sind die Arginin-kodierenden Codons AGA, AGG, CGA und CGG, das Glycin-kodierende Codon GGA, das Isoleucin-kodierende Codon AUA und das Prolin-kodierende Codon CCC. Vier der aufgeführten Aminosäurecodons (CGA, CGG, GGA und CCC) kommen insgesamt 40x im *ppd*-Gen aus *S. viridochromogenes* Tü494 vor, was einer Frequenz von 10,1% entspricht. Die Nukleotidsequenzen der für die 2-Aminoethylphosphonat-Transaminase und die Phosphonoacetaldehyd-Hydrolase kodierenden Gene *phnW* und *phnX* aus *P. putida* KT2440 weisen einen GC-Gehalt von 64,2% bzw. 62,9% auf; der Prozentsatz der oben aufgelisteten Arginin-, Glycin-, und Prolin-kodierenden Codons liegt bei 2,9% (*phnW*-Gen) bzw. 2,6% (*phnX*-Gen). Bei dem

für die Phosphoenolpyruvat-Phosphomutase kodierenden *ppm*-Gen aus *M. edulis*, das einen GC-Gehalt von 40% aufweist, kommen die selten genutzten Aminosäurecodons AGA, AGG, CGA, GGA und AUA mit einer Frequenz von 9,1% vor. Der Bedarf an seltenen tRNA-Molekülen, der im Fall des *ppd*- und des *ppm*-Gens höher ist als bei den Genen *phnW* und *phnX*, korrelierte mit den bei der chromatographischen Aufreinigung erzielten Proteinausbeuten (Tabelle 21).

Die aufgestellte Hypothese, dass das verstärkte Vorkommen von selten genutzten Aminosäurecodons die Proteinausbeute der Phosphonopyruvat-Decarboxylase aus *S. viridochromogenes* Tü494 und der Phosphoenolpyruvat-Phosphomutase aus *M. edulis* negativ beeinflusst, hätte mit Hilfe eines *E. coli* Rosetta-Expressionsstammes (Novagen, Schwalbach) bestätigt werden können. Rosetta-Stämme stellen zusätzliche tRNA-Moleküle für die Aminosäurecodons AGA und AGG (Arginin-kodierende Codons), AUA (Isoleucin-kodierendes Codon), CCC (Prolin-kodierendes Codon), CUA (Leucin-kodierendes Codon) sowie GGA (Glycin-kodierendes Codon) zur Verfügung und sorgen für eine erhöhte Genexpression, die durch das gängige Codon-Vorkommen in *E. coli* limitiert wäre (Novy *et al.*, 2001).

Baker *et al.* (1998) und Kim *et al.* (2002) hatten die Aufreinigung der für den AEP-Katabolismus verantwortlichen Enzyme 2-Aminoethylphosphonat-Transaminase und Phosphonoacetaldehyd-Hydrolase aus *Salmonella typhimurium* LT2 veranschaulicht. In beiden Fällen war die Genexpression in *E. coli* durchgeführt worden; das Protokoll der Proteinaufreinigung war aus mehreren Schritten zusammengesetzt.

In der vorliegenden Arbeit gelang erstmalig die Aufreinigung der *phnW*- und *phnX*-kodierenden Proteine aus *P. putida* KT2440. Deren Aminosäuresequenzen stimmten zu 42% bzw. 54% mit den Sequenzen der bereits charakterisierten Proteine aus *S. typhimurium* LT2 überein. Analog zur Ppd bestand das Reinigungsprotokoll der als Histidin-Fusionsprotein aufgereinigten Enzyme aus nur einem Schritt. Beim AepT-Fusionsprotein entsprach die Menge an gereinigtem Enzym (Tabelle 21) ca. 14% der Proteinkonzentration des Rohextraktes; das gereinigte Phtase-Fusionsprotein (Tabelle 21) machte ca. 22% der Gesamtproteinkonzentration aus.

Bowman *et al.* (1988) war mit der Isolierung der Phosphoenolpyruvat-Phosphomutase aus *Tetrahymena pyriformis* erstmals die Identifizierung des Enzyms, das für die einleitende Reaktion der Phosphonat-Biosynthese verantwortlich ist, gelungen. Jia *et al.* (1999) hatten durch die Konstruktion des Vektors pYJ-102 die Expression des *ppm*-Gens aus *Mytilus edulis* in *E. coli* ermöglicht. Sowohl bei der Ppm aus *T. pyriformis* als auch bei der in *E. coli* zur Expression gebrachten Ppm aus *M. edulis* hatte das Aufreinigungsprotokoll aus drei hintereinander geschalteten Chromatographie-Schritten bestanden.

In der vorliegenden Arbeit wurde das *ppm*-Gen aus *Mytilus edulis* ausgehend vom Plasmid pYJ-102 in den Vektor pET-16b kloniert, exprimiert und in einem Ein-Schritt-Verfahren als Histidin-Fusionsprotein, dessen Menge (Tabelle 21) ca. 1,6% der Rohextrakt-Proteinkonzentration entsprach, aufgereinigt.

4.1.2 Enzymatische Aktivität der Histidin-Fusionsproteine

Durch die schnelle und effiziente Reinigung der Histidin-Fusionsproteine Ppd, Aept, Phtase und Ppm wurde in Kombination mit den Enzymen L-Lactat-Dehydrogenase, Alkohol-Dehydrogenase und Pyruvat-Kinase die Etablierung einer Vielzahl von enzymatischen Nachweisreaktionen ermöglicht (Abbildung 41).

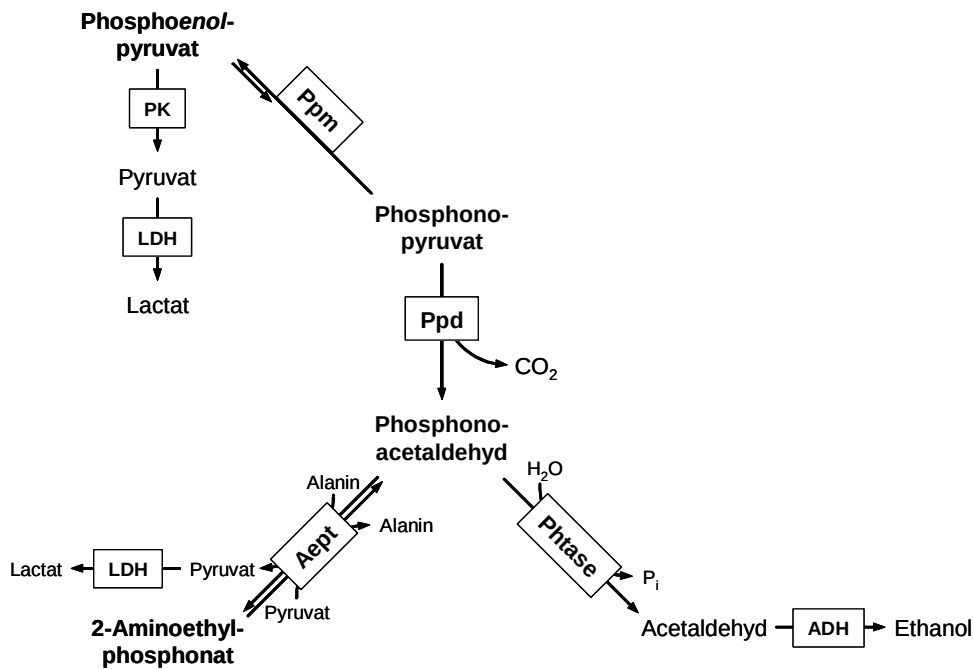


Abbildung 41 Zusammenhängende Darstellung aller für die Charakterisierung der Phosphonopyruvat-Decarboxylase verwendeten Enzyme. ADH, Alkohol-Dehydrogenase; Aept, 2-Aminoethylphosphonat-Transaminase; LDH, L-Lactat-Dehydrogenase; Phtase, Phosphonoacetaldehyd-Hydrolase; PK, Pyruvat-Kinase; Ppd, Phosphonopyruvat-Decarboxylase; Ppm, Phosphoenolpyruvat-Phosphomutase.

Zum direkten Nachweis der Ppd-Aktivität wurde die Umsetzung von Phosphonopyruvat zum Phosphonoacetaldehyd mittels HPLC und Massenspektroskopie untersucht. Zhang *et al.* (2003a) hatten eine HPLC-Methode zum Nachweis von radioaktiv markiertem Phosphonoacetaldehyd veröffentlicht. Unter Verwendung dieser nach dem Trennprinzip des Anionenaustausches funktionierenden Methode in modifizierter Form konnte die Ppd-katalysierte Phosphonoacetaldehyd-Bildung durch das Auftreten eines neuen Peaks visualisiert werden. Da ein Phosphonoacetaldehyd-Standard nicht verfügbar war, wurde die zum Zeitpunkt des neu auftretenden Peaks eluierte Probe vom restlichen Eluat abgetrennt. In der isolierten Fraktion konnte Phosphonoacetaldehyd durch den kombinierten Einsatz von

Phtase und ADH bzw. Aept und LDH enzymatisch nachgewiesen werden. Die Untersuchung mittels Massenspektroskopie erfolgte vor und nach der Ppd-katalysierten Umsetzung von Phosphonopyruvat. Die massenspektroskopische Analyse bestätigte die molekularen Massen von Phosphonopyruvat und Phosphonoacetaldehyd. Durch die Ionisierung des Substrat- und des Produktpeaks wurde der für diese Verbindungen charakteristische Phosphonsäurerest identifiziert.

Da sowohl die HPLC-Analytik als auch die massenspektroskopische Analyse zum Nachweis der Phosphonoacetaldehyd-Synthese erst im letzten Drittel der Arbeit etabliert werden konnten, wurden zur Ppd-Charakterisierung auf biochemischer und struktureller Ebene zwei verschiedenartige enzymatische Nachweissysteme etabliert. Diese photometrischen Tests wurden durch die Phosphonoacetaldehyd-umsetzenden Enzyme Phosphonoacetaldehyd-Hydrolase und 2-Aminoethylphosphonat-Transaminase eingeleitet. Die nachfolgende ADH- bzw. LDH-katalysierte Reduktion der dabei entstandenen Produkte Acetaldehyd und Pyruvat wurde bei einer Wellenlänge von 340 nm analysiert. Der Ppd-Aktivitätstest mit den Hilfsenzymen Phtase aus *Bacillus cereus* und ADH ist mittlerweile von Zhang *et al.* (2003b) beschrieben worden.

Die Frage, ob die enzymatischen Aktivitäten der *phnW*- und *phnX*-kodierenden Proteine aus *P. putida* KT2440 den Aept- bzw. Phtase-katalysierten Umsetzungen gleichkommen, wurde durch den zweistufigen Abbau von 2-Aminoethylphosphonat (AEP) geklärt. Der Nachweis der Aept-Aktivität erfolgte mit Hilfe zweier verschiedener HPLC-Methoden: 1. Die Abnahme der AEP-Konzentration und die Bildung von L-Alanin wurden durch *reversed phase* HPLC erfasst. 2. Mittels Anionenaustausch-HPLC wurden die Phosphonoacetaldehyd-Synthese und der Pyruvat-Verbrauch beobachtet. Die verwendete HPLC-Analytik ermöglichte eine von Hilfsenzymen unabhängige Untersuchung der Aept-Aktivität. Die Enzymaktivität der Aept aus *Salmonella enterica* Serovar *typhimurium* war mit Hilfe der LDH und durch die Enzymkombination Phtase und ADH dokumentiert worden (Kim *et al.*, 2002). Analog zur Charakterisierung der Phosphonoacetaldehyd-Hydrolase aus *Bacillus cereus* (La Nauze *et al.*, 1970) und *Pseudomonas aeruginosa* A237 (Dumora *et al.*, 1989) wurde die Phtase-katalysierte Hydrolyse von Phosphonoacetaldehyd durch die ADH-katalysierte Reduktion des entstandenen Acetaldehyds enzymatisch nachgewiesen. Die Übertragung der NH_3^+ -Gruppe von 2-Aminoethylphosphonat auf Pyruvat und die hydrolytische Spaltung des bei der AEP-Desaminierung entstehenden Phosphonoacetaldehyds bestätigten, dass die in dem Stamm *Pseudomonas putida* KT2440 (GenBank Accession: NC_002947) existierenden Gene *phnW* und *phnX* für die Proteine 2-Aminoethylphosphonat-Transaminase und Phosphonoacetaldehyd-Hydrolase kodieren.

Das Hilfsenzym Phosphoenolpyruvat-Phosphomutase erfüllte zwei Aufgaben: 1. Durch die Isomerisierung, deren Gleichgewicht aufseiten des Phosphatesters liegt, wurde die Konzentration des chemisch synthetisierten Phosphonopyruvats bestimmt. 2. Phosphoenolpyruvat konnte als Ausgangssubstrat für die enzymatische Synthese von Phosphonaten eingesetzt werden. Die enzymatische Aktivität der nativen Ppm aus *M. edulis*, die ausgehend von Phosphonopyruvat durch die Hilfsenzyme Pyruvat-Kinase und L-Lactat-Dehydrogenase bestimmt worden war, hatte 65,5 U/mg betragen (Jia *et al.*,

1999). Für das in dieser Arbeit konstruierte Histidin-Fusionsprotein wurde mit Hilfe des von Jia *et al.* (1999) beschriebenen Enzymtests eine Aktivität ermittelt, die lediglich halb so hoch war. Ein Vergleich der Enzymaktivitäten ließ die Vermutung zu, dass der aminoterminal Polyhistidinschwanz die Aktivität der Ppm negativ beeinflusst. Abgesehen von der Ppm-Aktivitätsbestimmung diente der kombinierte Einsatz der Enzyme Ppm, PK und LDH der Konzentrationsermittlung des chemisch synthetisierten Phosphonopyruvats, das nach den Angaben von Coutrot und Savignac (1978) sowie Freeman *et al.* (1991) hergestellt wurde. Die Ausbeute der chemischen Synthese lag im Bereich von 100 – 500 mg und der Phosphonopyruvat-Gehalt der einzelnen Chargen variierte zwischen 60 und 100%. Da nur die Chargen mit einer Phosphonopyruvat-Konzentration von mindestens 90% verwertet wurden, stellte der stetige Zugang zu ausreichenden Mengen Phosphonopyruvat eine Limitation der Arbeit dar.

Die Hilfsenzyme 2-Aminoethylphosphonat-Transaminase, Phosphonoacetaldehyd-Hydrolase aus *P. putida* KT2440 und Phosphoenolpyruvat-Phosphomutase aus *M. edulis*, die als Histidin-Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert wurden, um einen schnellen und beständigen Zugang zu gewährleisten, waren enzymatisch aktiv und konnten somit zur Untersuchung des ebenfalls aktiven Ppd-Fusionsproteins aus *S. viridochromogenes* Tü494 eingesetzt werden.

Neben der Charakterisierung des Ppd-Fusionsproteins wurde durch den kombinierten Einsatz der Histidin-Fusionsproteine Ppm, Ppd und Aept die *in vitro*-Synthese der C-P-Verbindung 2-Aminoethylphosphonat ermöglicht. Ausgehend von einer definierten Konzentration an Phosphoenolpyruvat bzw. Phosphonopyruvat wurde die enzymatische AEP-Synthese beobachtet, wobei die Konzentration der gebildeten C-P-Verbindung 50% des Ausgangssubstrats betrug. Die Produktausbeute bestätigte das Reaktionsgleichgewicht der Aept-Katalyse und den vollständigen Umsatz der Ausgangssubstrate. Das Zusetzen der Pyruvat-Decarboxylase, die das durch die Alanin-Desaminierung entstehende Pyruvat aus dem Reaktionsgleichgewicht entfernen würde, könnte die Aept-katalysierte Reaktion gänzlich auf die Seite der AEP-Gewinnung ziehen.

Der Biosyntheseweg von 2-Aminoethylphosphonat, der sich aus den drei Enzymen Ppm, Ppd und Aept zusammensetzt, war als erstes in dem Einzeller *Tetrahymena pyriformis* identifiziert worden (Barry *et al.*, 1988). Die Existenz der für die AEP-Biosynthese erforderlichen Gene in dem humanpathogenen Bakterium *Bacteroides fragilis* war im Jahr 2000 dokumentiert worden (Coyne *et al.*, 2000); der Literatur zufolge ist es der erste und bislang einzig beschriebene AEP-Biosyntheseweg in einem Bakterium.

In der vorliegenden Arbeit sollte unter Zuhilfenahme der Duet-Vektoren, die in Gegenwart der T7-RNA-Polymerase die gleichzeitige Expression der Gene *ppm* aus *M. edulis*, *ppd* aus *S. viridochromogenes* Tü494 und *phnW* aus *P. putida* KT2440 ermöglichten, der AEP-Stoffwechselweg in *E. coli* etabliert werden. Entsprechend dem für die Expression der Histidin-Fusionsproteine verwendeten Plasmid pET-16b gehören die Duet-Vektoren zu den von der Firma Novagen etablierten *E. coli*-Expressionssystemen, was die Konstruktion der Duet-Expressionsvektoren vereinfachte: Ausgehend von den pET16-Expressionsplasmiden wurden die Gene *ppm*, *ppd* und *phnW* mittels Restriktion in die entsprechend geöffneten

Duet-Vektoren kloniert. Als Expressionsstämme wurden der *E. coli*-Stamm BL21(DE3) und der in dieser Arbeit konstruierte Stamm *E. coli* F41(DE3) verwendet.

Beim Stamm *E. coli* BL21(DE3) war die Expression der für die AEP-Synthese notwendigen Gene eindeutig zu erkennen. Eine Erklärung für die im Vergleich zur Ppm-Proteinbande schwächer ausgeprägte Aept-Proteinbande war die reduzierte Kopienzahl des Aept-Expressionsplasmids (Novy *et al.*, 2002).

Im Gegensatz zu dem für die Expression optimierten Stamm *E. coli* BL21(DE3) war die Expression der Gene *ppm*, *ppd* und *phnW* beim *E. coli*-Stamm F41(DE3) anhand einer SDS-PAGE kaum feststellbar. Ausgehend von *E. coli* F41 war das Gen für die T7-RNA-Polymerase mit Hilfe des „λDE3 Lysogenization Kit“ in das Genom des Stammes integriert worden. Die geringe Kolonienausbeute sowie die Existenz von Mischkolonien erschwerte das Auffinden positiver Klone.

Trotz der deutlichen Überexpression im Fall des *E. coli*-Stammes BL21(DE3) und obwohl Phosphoenolpyruvat beim *E. coli*-Stamm F41(DE3) in erhöhtem Maße für die AEP-Produktion zur Verfügung stehen sollte, konnte bei keinem der beiden Expressionssysteme 2-Aminoethylphosphonat im Kulturüberstand nachgewiesen werden; ebenso wurde mit den Rohextrakten der Expressionsstämme keine AEP-Synthese beobachtet. Das Ausbleiben der AEP-Produktion ließ folgende Vermutungen zu: 1. Im Gegensatz zur Ppm und zur Aept, deren enzymatische Aktivität einzeln dokumentiert werden konnte, war die enzymatische Aktivität der Ppd nicht existent. 2. Verglichen mit der Menge an exprimierter Ppm reichte die Ppd-Konzentration nicht aus, um Phosphonopyruvat aus der Ppm-katalysierten Gleichgewichtsreaktion zu eliminieren und somit die C-P-Bindung zu etablieren. 3. Andere, um Phosphoenolpyruvat konkurrierende Reaktionen könnten Phosphoenolpyruvat umgesetzt haben. Beispiele hierfür sind das Phosphotransferasesystem, das Glukose phosphoryliert und über die Membran transloziert (zitiert in: Postma *et al.*, 1996), und der für die Aromatenbiosynthese verantwortliche Shikimisäure-Weg (zitiert in: Pittard, 1996).

4.2 Biochemische Charakterisierung der Ppd

Mit Ausnahme des Molekulargewichtes und der Tatsache, dass die Phosphonopyruvat-Decarboxylase zur Gruppe der ThDP-abhängigen Enzyme gehört, (Nakashita *et al.*, 1997; Schwartz *et al.*, 1998; Nakashita *et al.*, 2000) war zu Beginn der Arbeit über die biochemischen Eigenschaften des Enzyms nichts bekannt. Da die Ppd aus dem Einzeller *Tetrahymena pyriformis* als membrangebundenes Enzym vorlag, hatte sich deren Isolierung zwecks Charakterisierung als schwierig erwiesen (zitiert in: Zhang *et al.*, 2003b). Die Aufreinigung der Ppd aus dem zellfreien Rohextrakt des Antibiotika-Produzenten *Streptomyces hygroscopicus* war erstmals von Nakashita *et al.* (1997) beschrieben worden. Im darauf folgenden Jahr bzw. drei Jahre später waren die Identifizierung und Charakterisierung der für die Phosphonopyruvat-Decarboxylase kodierenden Gene *ppd* aus *S. viridochromogenes* Tü494 und *bcpC* aus *S. hygroscopicus* veröffentlicht worden

(Schwartz *et al.*, 1998; Nakashita *et al.*, 2000). Mit dem Artikel von Zhang *et al.* (2003b) war kürzlich erstmals die biochemische Charakterisierung einer Ppd publiziert worden.

Zur Ermittlung der optimalen *in vitro*-Reaktionsbedingungen wurde zunächst der Einfluss des pH-Wertes und der Temperatur auf die Enzymaktivität und -stabilität untersucht. Da die biochemischen Eigenschaften der Phosphonopyruvat-Decarboxylase anhand gekoppelter Enzymtests analysiert wurden, bestand die Möglichkeit, dass die Reaktionsbedingungen die Hilfsenzymaktivitäten ebenfalls beeinflussten. Deswegen wurde die enzymatische Aktivität der Ppd in parallel durchgeführten Messungen sowohl mit dem Phtase/ADH-Enzymtest als auch mit Hilfe des Aept/LDH-Enzymtests bestimmt.

In Abhängigkeit vom pH-Wert zeigte die Ppd-Aktivität einen glockenförmigen Kurvenverlauf. Bei beiden Hilfsenzymkombinationen befand sich das Optimum der Ppd-Aktivität im Bereich von pH 8,0. Für die Ppd aus *Bacteroides fragilis*, deren Aktivität mit der Enzymkombination Phtase/ADH nachgewiesen worden war, war ein pH-Optimum von 7,0 – 7,5 ermittelt worden (Zhang *et al.*, 2003b). Entgegen dem pH-Profil, das mit Hilfe des Aept/LDH-Enzymtests bestimmt wurde, verlief die Glockenkurve des Phtase/ADH-Enzymtests ausgedehnter. Diese Unterschiede im Kurvenverlauf ließen die Vermutung zu, dass die Hilfsenzyme Phtase und ADH ein breiteres pH-Spektrum tolerierten als die Aept und bzw. oder die LDH. Bei der Phtase aus *Bacillus cereus* hatte die maximale Enzymaktivität im pH-Bereich 8,0 – 9,0 gelegen (La Nauze *et al.*, 1970). Für die Aept aus *Salmonella enterica* Serovar *typhimurium* war ein pH-Optimum von 8,5 ermittelt worden (Kim *et al.*, 2002). Ein Aktivitätsverlust in Gegenwart der Puffersubstanz TRIS, wie er z. B. für die aus *E. coli* stammenden Enzyme Transaldolase B (Sprenger *et al.*, 1995a) und 1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat-Synthase (Schürmann, 2001) beschrieben worden war, wurde im Fall der Phosphonopyruvat-Decarboxylase nicht beobachtet.

In Abhängigkeit von der Reaktionstemperatur zeigte die Ppd ein für eine Vielzahl von Enzymen repräsentatives Verhalten: Der Q_{10} (1,8) entsprach den Werten von *in vitro* untersuchten Proteinen mesophiler Organismen und die Aktivierungsenergie von 45,4 kJ/mol war ein für viele Enzyme charakteristischer Wert (Bisswanger, 2000). Da die Halbwertszeit bei 4°C ca. 50 Tage betrug, konnte die Ppd nach der Aufreinigung problemlos mehrere Tage gekühlt aufbewahrt werden. Demgegenüber wies die Ppd bei höheren Lagerungstemperaturen eine gering ausgeprägte Stabilität auf, was auf eine *in vitro*-Thermolabilität des Enzyms hindeutete. Für die Denaturierungs- und Aggregationsrate von Enzymen war u. a. der Anteil an hydrophoben Aminosäuren verantwortlich gemacht worden (zitiert in: Mitraki und King, 1989; Seckler und Jaenicke, 1992). Die hydrophoben Aminosäuren Isoleucin, Leucin, Methionin und Valin machten 24,3% der Aminosäuresequenz des Ppd-Fusionsproteins aus. Die Proteinsequenz der ebenfalls ThDP-abhängigen 1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat-Synthase (DXS) aus *E. coli* bestand zu 26,6% aus den oben genannten hydrophoben Aminosäuren. Im Vergleich zum Ppd-Fusionsprotein wies die DXS eine niedrigere Temperaturstabilität auf (Schürmann, 2001), was mit den Unterschieden in den Aminosäurezusammensetzungen übereinstimmte.

Der Bestimmung der optimalen *in vitro*-Reaktionsbedingungen entsprechend wurden zur Ermittlung der kinetischen Parameter der Ppd die beiden Enzymkombinationen Phosphonoacetaldehyd-Hydrolase/Alkohol-Dehydrogenase und 2-Aminoethylphosphonat-Transaminase/L-Lactat-Dehydrogenase eingesetzt. Anhand der Untersuchungen zum pH- und Temperatur-Optimum wurden folgende Parameter eingestellt: Die Reaktionstemperatur betrug 30°C, als Puffersystem wurde HEPES verwendet und der pH-Wert lag bei 8,0.

Unter Berücksichtigung der zuvor aufgelisteten Reaktionsparameter katalysierte die Phosphonopyruvat-Decarboxylase die Decarboxylierung von Phosphonopyruvat mit einer spezifischen Aktivität von $0,81 \pm 0,01$ U/mg; die Affinität der Ppd gegenüber dem physiologischen Substrat Phosphonopyruvat lag bei $3,16 \pm 0,35$ μ M (Tabelle 22). Drei unabhängig voneinander durchgeführte Messreihen sowie die Tatsache, dass die Ergebnisse des Phtase/ADH-Enzymtests mit den Ergebnissen des Aept/LDH-Enzymtests übereinstimmten, verdeutlichten die Reproduzierbarkeit der oben aufgeführten Werte. Verglichen mit der zur gleichen Enzymfamilie gehörenden Pyruvat-Decarboxylase, deren enzymatische Aktivität im Bereich von 45 – 55 U/mg (Pdc aus *Saccharomyces cerevisiae*) bzw. 120 – 180 U/mg (Pdc aus *Zymomonas mobilis*) liegt (zitiert in: Pohl, 1997), gehört die Phosphonopyruvat-Decarboxylase zu den eher wenig aktiven Enzymen.

Wie bereits erwähnt, war zu Beginn der Arbeit über die Kinetik einer aufgereinigten Phosphonopyruvat-Decarboxylase nichts bekannt; kinetische Parameter wurden erstmals mit der Charakterisierung der Ppd aus *Bacteroides fragilis* veröffentlicht (Zhang *et al.*, 2003b). Der K_m -Wert der *B. fragilis* Ppd, der durch die Enzymkombination Phtase/ADH ermittelt worden war, stimmte mit dem K_m -Wert der Ppd aus *S. viridochromogenes* Tü494 überein (Tabelle 22), wohingegen der k_{cat} -Wert der aufgereinigten Ppd aus *B. fragilis* gegenüber dem Ppd-Fusionsprotein um den Faktor 9 erhöht war (Tabelle 22). Dieser erhöhte k_{cat} -Wert resultierte aus einer größeren maximalen Reaktionsgeschwindigkeit, die wiederum durch das Vorhandensein von zweiwertigen Mangan-Ionen im Reaktionsansatz der Ppd aus *B. fragilis* erklärt werden konnte (Zhang *et al.*, 2003b).

Daneben könnte die Anwesenheit des Polyhistidinschwanzes die enzymatische Aktivität der *S. viridochromogenes* Tü494 Ppd negativ beeinflussen; eine Hypothese, die aufgrund fehlender Vergleichswerte nicht bestätigt werden konnte. Überdies stellte die durch den Polyhistidinschwanz ermöglichte Ein-Schritt-Aufreinigung einen Vorteil gegenüber dem komplexen Reinigungsprotokoll der Ppd aus *B. fragilis* dar (Zhang *et al.*, 2003b).

Tabelle 22 Kinetische Parameter der Phosphonopyruvat-Decarboxylase aus *Bacteroides fragilis* (Zhang *et al.*, 2003b) für das physiologische Substrat Phosphonopyruvat und in Abhängigkeit von den Cofaktoren Thiamindiphosphat und zweiwertigen Magnesium-, Calcium- und Mangan-Ionen im Vergleich zu den in der vorliegenden Arbeit ermittelten kinetischen Daten der Phosphonopyruvat-Decarboxylase aus *Streptomyces viridochromogenes* Tü494.

	Phosphonopyruvat-Decarboxylase aus <i>S. viridochromogenes</i> Tü494		Phosphonopyruvat-Decarboxylase aus <i>B. fragilis</i>	
	K_m [μ M]	k_{cat} [s^{-1}]	K_m [μ M]	k_{cat} [s^{-1}]
Phosphono- pyruvat	$3,16 \pm 0,35$	$1,18 \pm 0,02$	$3,2 \pm 0,2$	$10,2 \pm 0,3$

Diskussion

	Phosphonopyruvat-Decarboxylase aus <i>S. viridochromogenes</i> Tü494		Phosphonopyruvat-Decarboxylase aus <i>B. fragilis</i>	
	K_m [μ M]	k_{cat} [s^{-1}]	K_m [μ M]	k_{cat} [s^{-1}]
ThDP	$39,05 \pm 2,64$	$0,55 \pm 0,003$	13 ± 2	$9,7 \pm 0,3$
Mg ²⁺	$38,91 \pm 1,46$	$0,52 \pm 0,008$	82 ± 8	$8,7 \pm 0,2$
Ca ²⁺	$36,57 \pm 4,47$	$0,66 \pm 0,014$	78 ± 6	$9,3 \pm 0,2$
Mn ²⁺	$2,88 \pm 0,27$	$0,85 \pm 0,012$	13 ± 1	$10,2 \pm 0,3$

Die enzymatische Aktivität der Phosphonopyruvat-Decarboxylase war von der Anwesenheit der Cofaktoren Thiamindiphosphat und Magnesium-Ionen abhängig (Nakashita *et al.*, 1997). Mit Hilfe einer mehrstufigen Dialyse konnten die Cofaktoren entfernt werden, was in der Gewinnung von inaktiver Apo-Ppd resultierte; durch das Hinzufügen beider Cofaktoren wurde deren enzymatische Aktivität partiell rekonstituiert. Da die Aktivität des Hilfsenzym Phosphonoacetaldehyd-Hydrolase ebenfalls von zweiwertigen Metall-Ionen abhängig war, konnte für die biochemische Charakterisierung der Ppd/Cofaktor-Interaktionen lediglich die Enzymkombination Aep/LDH eingesetzt werden.

Die Rekonstitution des Apo-Enzyms war neben den zweiwertigen Magnesium-Ionen auch mit zweiwertigen Calcium- und Mangan-Ionen möglich (Tabelle 22); demgegenüber trugen zweiwertige Nickel-, Kobalt- und Zink-Ionen nicht zur Wiederherstellung der Ppd-Aktivität bei. Für die enzymatische Aktivität der Ppd aus *B. fragilis* war dieselbe Metall-Ionen-Abhängigkeit festgestellt worden (Tabelle 22) (Zhang *et al.*, 2003b). Die Reihenfolge der Ppd-Reaktivierungsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von den zweiwertigen Metall-Ionen lautete: Mn²⁺ > Ca²⁺ > Mg²⁺. Dieser Reihenfolge entsprechend war die maximale Reaktionsgeschwindigkeit für zweiwertige Mangan-Ionen am größten (gefolgt von den v_{max} -Werten für zweiwertige Calcium- und Magnesium-Ionen), was bedeutet, dass die optimale Ppd-katalysierte Umsetzung des Phosphonopyruvats zum Phosphonoacetaldehyd durch den Zusatz von Mn(II)-Ionen gewährleistet wird.

Da die Affinitäten des Ppd-Fusionsproteins gegenüber Thiamindiphosphat und zweiwertigen Magnesium-, Calcium- und Mangan-Ionen in enzymkinetischen Messungen mit Apo-Enzym untersucht wurden, waren die ermittelten Michaelis-Konstanten als apparente K_m -Werte (Tabelle 22) anzusehen. Die Ppd wies gegenüber dem Cofaktor ThDP eine Affinität von ca. 40 μ M auf, ein K_m -Wert, der im Vergleich zur Ppd aus *B. fragilis* um das 3-fache erhöht war (Tabelle 22 und Tabelle 23). Allerdings hatte dieser Vergleich lediglich eine geringe Aussagekraft, da die Affinitätsbestimmung der *B. fragilis* Ppd in Gegenwart von zweiwertigen Mangan-Ionen durchgeführt worden war.

Im Gegensatz zur ThDP-abhängigen Pyruvat-Decarboxylase aus *Zymomonas mobilis*, zur ThDP-abhängigen Indolpyruvat-Decarboxylase aus *Enterobacter cloacae*, zu den ThDP-abhängigen Enzymen Acetohydroxysäure-Synthase Isozym II, 1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat-Synthase und Transketolase A aus *E. coli* sowie zur menschlichen Pyruvat-Dehydrogenase E1 war die Michaelis-Konstante des Ppd-Fusionsproteins ungleich größer (Tabelle 23), was einer geringeren Affinität der Phosphonopyruvat-Decarboxylase gegenüber dem Cofaktor Thiamindiphosphat entsprach.

Tabelle 23 Michaelis-Konstanten (K_m -Werte) verschiedener ThDP-abhängiger Enzyme für den Cofaktor Thiamindiphosphat (ThDP) in Gegenwart von verschiedenen Konzentrationen an zweiwertigen Magnesium- und bzw. oder Mangan-Ionen. **AHAS II**, Acetohydroxysäure-Synthase Isozym II; **DXS**, 1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat-Synthase; **IPDC**, Indolpyruvat-Decarboxylase; **Pdc**, Pyruvat-Decarboxylase; **PDH E1**, Pyruvat-Dehydrogenase E1; **Ppd**, Phosphonopyruvat-Decarboxylase; **TKT A**, Transketolase A.

Enzym	Organismus	Metall-Ionen	K_m (ThDP) [μ M]	Referenz
Ppd	<i>Streptomyces viridochromogenes</i> Tü494	1 mM Mg(II)	$39,05 \pm 2,64$	diese Arbeit
Ppd	<i>Bacteroides fragilis</i>	5 mM Mg(II) 1 mM Mn(II)	13 ± 2	Zhang <i>et al.</i> (2003b)
Pdc	<i>Zymomonas mobilis</i>	20 mM Mg(II)	1,28	Bringer-Meyer <i>et al.</i> (1986)
IPDC	<i>Enterobacter cloacae</i>	5 mM Mg(II)	0,6	Koga <i>et al.</i> (1992)
AHAS II	<i>Escherichia coli</i>	10 mM Mg(II)	0,6	Ibdah <i>et al.</i> (1996)
DXS	<i>Escherichia coli</i>	1 mM Mg(II)	$0,30 \pm 0,04$	Schürmann (2001)
PDH E1	<i>Homo sapiens</i>	2 mM Mg(II)	$0,15 \pm 0,02$	Fang <i>et al.</i> (1998)
TKT A	<i>Escherichia coli</i> K12	0,1 mM Mg(II)	8	Sprenger <i>et al.</i> (1995b)

Der voluminöse Phosphonsäurerest des Phosphonopyruvats wurde bei den strukturverwandten Substanzen Pyruvat, β -Fluoropyruvat und β -Hydroxypyruvat durch ein vom Ausmaß her kleineres Wasserstoff- oder Fluoratom bzw. durch eine weniger umfangreiche Hydroxylgruppe ersetzt; jedoch konnte, abgesehen vom physiologischen Substrat Phosphonopyruvat, keine der drei oben aufgeführten Substanzen vom Ppd-Fusionsprotein zum entsprechenden Aldehyd umgesetzt werden. Diese Ergebnisse führten zu der Annahme, dass der am C3-Atom befindliche Phosphonsäurerest und demzufolge die Molekülgröße für die Ppd-katalysierte Substratumsetzung essentiell ist. Diese Hypothese könnte beispielsweise durch die Verwendung der strukturverwandten Substanz Sulfopyruvat [$\text{HOOC-CO-CH}_2\text{-SO}_3\text{H}$], die statt des Phosphonsäurerestes den etwa gleich voluminösen Sulfonsäurerest aufweist, überprüft werden. Da, analog zum Phosphonopyruvat, Sulfopyruvat nicht im Handel erhältlich war und sich dessen chemische Synthese als schwierig erwies, blieb die Bestätigung der Theorie in dieser Arbeit aus.

Die im Jahr 2003 veröffentlichte Charakterisierung der Ppd aus *B. fragilis* hatte ergeben, dass das Enzym in der Lage war, Pyruvat zum Acetaldehyd umzusetzen und dass Sulfopyruvat sowohl ein Substrat als auch einen kompetitiven Inhibitor der Ppd darstellte (Zhang *et al.*, 2003b). Analog zu der von uns aufgestellten Hypothese waren die Autoren zu der Schlussfolgerung gekommen, dass nicht der Carboxylgruppe, sondern dem Phosphonsäurerest die Hauptfunktion der Substratbindung zukommt.

Die Phosphonopyruvat-Decarboxylase gehört zur großen Familie der ThDP-abhängigen Enzyme, deren katalytische Aktivität neben Thiamindiphosphat auch von zweiwertigen Metall-Ionen abhängig ist. Die Hauptaufgabe der ebenfalls zu dieser Enzymfamilie gehörenden Pyruvat-Decarboxylase (Pdc) ist die nicht-oxidative Decarboxylierung von Pyruvat zum Acetaldehyd; ferner besitzt die Pdc eine Nebenaktivität als Carboligase, die das Enzym zur Bildung von α -Hydroxyketonen befähigt. Das wohl bekannteste Beispiel der Pdc-katalysierten Carboligation ist die Synthese von (*R*)-Phenylacetylcarbinol, die Vorstufe des Anti-Asthmatikums L-Ephedrin (Hildebrandt und Klavehn, 1932).

Neben der Pyruvat-Decarboxylase existieren weitere ThDP-abhängige Enzyme, die aufgrund ihrer enantioselektiven C-C-Bindungsknüpfung die Synthese von verschiedenen chiralen α -Hydroxyketonen ermöglichen. Beispiele hierfür sind die Acetohydroxysäure-Synthase (Engel *et al.*, 2003), die Benzaldehyd-Lyase (Demir *et al.*, 2002; Dünkermann *et al.*, 2002; Demir *et al.*, 2003; Lingen *et al.*, 2004), die Benzoylformiat-Decarboxylase (Iding *et al.*, 2000; Dünkermann *et al.*, 2002; Lingen *et al.*, 2004), die 1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat-Synthase (Schürmann *et al.*, 2002) sowie die Transketolase (zitiert in: Sprenger und Pohl, 1999; Sevostyanova *et al.*, 2004). Darüber hinaus war die Bindungsbildung zwischen einem Kohlenstoff- und einem Heteroatom (Sauerstoff-, Schwefel-, oder Stickstoffatom) beschrieben worden (zitiert in: Pohl *et al.*, 2002; Müller und Sprenger, 2004; Pohl *et al.*, 2004).

In Anbetracht des Synthesepotentials der aufgelisteten ThDP-abhängigen Enzyme sollten Substanzen mit einer enantioselektiven Kohlenstoff-Phosphor-Bindung synthetisiert werden. Derartige Verbindungen würden die Substanzklasse der Phosphonate erweitern und könnten, in Anlehnung an bereits charakterisierte Phosphonate, bezüglich ihres Vermögens als Enzyminhibitoren zwecks Strukturaufklärung (vgl.: Herzberg *et al.*, 2002; Roussel *et al.*, 2002; Silvaggi *et al.*, 2003) oder thermodynamischer Analysen (vgl.: Nagarajan und Pratt, 2004) und bzw. oder als Xenobiotika (vgl.: Gobec *et al.*, 2004) untersucht werden. Anhand der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Reaktionsansätze sollte geklärt werden, ob die Phosphonopyruvat-Decarboxylase eine Nebenaktivität als Carboligase besitzt und bzw. oder ob der Ppd-generierte Phosphonoacetaldehyd von der Pyruvat-Decarboxylase als Substrat akzeptiert wird.

Analog zum Phosphonoacetaldehyd standen für die nachzuweisenden Verbindungen 1,4-Diphosphonoacetoin, Phosphonoacetoin und Phosphonophenylacetylcarbinol keine chemisch synthetisierten Standards zur Verfügung, was die Suche nach einem geeigneten Analyseverfahren erschwerte. Durch die im letzten Jahr der Arbeit etablierte HPLC-Methode konnte zumindest die Existenz der C-P-Verbindungen Phosphonoacetaldehyd und Phosphonopyruvat chromatographisch bestätigt werden (siehe 4.1.2). Infolgedessen wurde diese Methode auch für die Überprüfung einer möglichen Synthese von neuartigen Phosphonaten verwendet. Darüber hinaus kam eine zweite, für den Nachweis von Acetoin etablierte HPLC-Methode zum Einsatz. Aufgrund der fehlenden Standards würde bei beiden Verfahren die potenzielle C-P-Bindungsknüpfung lediglich durch das Auftreten neuer Produktpeaks und bzw. oder durch die Abnahme der Phosphonoacetaldehyd-Konzentration visualisiert werden können.

Allerdings wurde weder das eine noch das andere Attribut in einem der insgesamt achtzehn Reaktionsansätze beobachtet; was jedoch nicht bedeutete, dass die Ppd- und bzw. oder Pdc-katalysierte Carboligase zur Synthese von Phosphonoacyloinen generell nicht möglich ist. Eine Erklärung für das Ausbleiben der C-P-Bindungsknüpfung war die Wahl falscher Reaktionsparameter. So entsprach beispielsweise der pH-Wert des Reaktionssystems nicht dem pH-Optimum der Phosphonopyruvat-Decarboxylase, da er den optimalen Reaktionsbedingungen des Muteins PdcW392M (Goetz *et al.*, 2001) angepasst wurde. Außerdem konnte wegen der nicht-vorhandenen Standards kein adäquates Analyseverfahren ermittelt werden; demzufolge bleibt offen, ob mit den ausgewählten HPLC-Methoden die Phosphonoacyloin-Bildung überhaupt sichtbar gemacht werden könnte.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Carboligase-Experimente stellten den Ausgangspunkt der bis dato nicht beschriebenen Untersuchung zur enzymatischen Phosphonoacyloin-Synthese dar. Neben den verwendeten Enzymen Phosphonopyruvat-Decarboxylase und Pyruvat-Decarboxylase stehen mit der Benzaldehyd-Lyase, der Benzoylformiat-Decarboxylase, der 1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat-Synthase und der Transketolase weitere C-C-bindungsknüpfende Enzyme zur Verfügung, die bezüglich ihres Vermögens zur Bildung von Phosphonoacyloinen überprüft werden können. Analog zur Pyruvat-Decarboxylase aus *Zymomonas mobilis* (Bruhn *et al.*, 1995) kann, sobald die dreidimensionale Struktur der Phosphonopyruvat-Decarboxylase aus *Streptomyces viridochromogenes* Tü494 bekannt ist, gezielt nach Aminosäureresten gesucht werden, die die potenzielle Carboligase-Aktivität der Ppd negativ beeinflussen.

4.3 Struktur-Funktionsbeziehungen der Ppd

Die Proteinsequenz der Phosphonopyruvat-Decarboxylase aus *Streptomyces viridochromogenes* Tü494 (GenBank Accession: CAA74722) umfasst 397 Aminosäuren. Zu den Ppd-Sequenzen der zur gleichen Gattung gehörenden Stämme *S. hygroscopicus* (GenBank Accession: BAA07055) und *S. wedmorensis* (GenBank Accession: BAA32496) liegt eine Identität von 74% bzw. 39% vor. Die Ppd-Sequenz des humanpathogenen Bakteriums *Bacteroides fragilis* (GenBank Accession: AAG26466) stimmt zu 33% mit der Proteinsequenz aus *S. viridochromogenes* Tü494 überein.

Unter Berücksichtigung der durch die Klonierung hinzugekommenen Aminosäuren des aminoterminalen Polyhistidinschwanzes wurde für die Untereinheit des Ppd-Fusionsproteins ein theoretisches Molekulargewicht von 43.600 ermittelt, welches mit Hilfe einer SDS-PAGE bestätigt werden konnte. Trotz der Ungereimtheiten, die bei der mittels Gelpermeationschromatographie (Gelfiltration) durchgeführten Größenbestimmung des nativen Enzyms auftraten, war davon auszugehen, dass die Phosphonopyruvat-Decarboxylase aus *S. viridochromogenes* Tü494 eine dimere Quartärstruktur besitzt; ein höherer Oligomerisierungszustand konnte aufgrund der errechneten molekularen Masse von 72.100 ± 220 ausgeschlossen werden. Die anhand der Gelfiltration gezogene

Schlussfolgerung über die Ppd-Quartärstruktur könnte beispielsweise durch die Methode der „Dynamischen Lichtstreuung“ überprüft werden.

Das in dieser Arbeit ermittelte Ergebnis stand im Widerspruch zu den von Nakashita *et al.* (1997) und Zhang *et al.* (2003b) durchgeführten Größenbestimmungen: Bei der Entdeckung der Phosphonopyruvat-Decarboxylase aus *S. hygroscopicus* war für das native Protein eine Größe von 135 kDa und für die Proteinuntereinheit ein Molekulargewicht von 36.000 ermittelt worden (Nakashita *et al.*, 1997); jedoch konnte über den Oligomerisierungszustand des Enzyms anhand dieser Werte keine eindeutige Aussage getroffen werden. Die theoretische Größenbestimmung war durch die Identifizierung des für die Phosphonopyruvat-Decarboxylase kodierenden *bcpC*-Gens aus *S. hygroscopicus* ermöglicht worden (Nakashita *et al.*, 2000): Das anhand der Aminosäuresequenz errechnete Molekulargewicht von 41.600 deutete auf eine trimere Quartärstruktur der Ppd aus *S. hygroscopicus* hin. Gleichmaßen hatten die von Zhang *et al.* (2003b) durchgeführten Größenbestimmungen zu dem Ergebnis geführt, dass die Phosphonopyruvat-Decarboxylase aus *B. fragilis* im nativen Zustand als Trimer vorliegt. Parallel durchgeführte Messungen könnten klären, ob der Oligomerisierungszustand der Phosphonopyruvat-Decarboxylasen aus *S. hygroscopicus* und *B. fragilis* von der Quartärstruktur des Ppd-Fusionsproteins aus *S. viridochromogenes* Tü494 abweicht.

Andererseits ließ ein Vergleich des von Nakashita *et al.* (1997) bestimmten Molekulargewichtes der Ppd aus *S. hygroscopicus* (135.000) mit der in der vorliegenden Arbeit ermittelten Größe des Ppd-Fusionsproteins aus *S. viridochromogenes* Tü494 (72.100 ± 220 Da) die Vermutung zu, dass die native Phosphonopyruvat-Decarboxylase ein Tetramer ist und dass die Ppd in der Version des Histidin-Fusionsproteins als Dimer vorliegt. Zur Klärung der Frage, ob die zehn, am aminoterminalen Ende angehängten Histidin-Reste die Quartärstruktur der Phosphonopyruvat-Decarboxylase aus *S. viridochromogenes* Tü494 beeinflussen, müsste der Oligomerisierungszustand des nativen Enzyms ohne Polyhistidinschwanz ermittelt werden.

Den biochemischen Eigenschaften entsprechend war über die dreidimensionale Struktur der Phosphonopyruvat-Decarboxylase aus *S. viridochromogenes* Tü494 zu Beginn der Arbeit nichts bekannt. Kristallisationsexperimente zur Züchtung von geeigneten Kristallen des Ppd-Fusionsproteins, die während der beiden letzten Jahre in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. G. Schneider (Department of Medical Biochemistry and Biophysics, Karolinska Institutet, Stockholm, Schweden) durchgeführt wurden, blieben bislang leider erfolglos.

Nakashita *et al.* (1997) hatten gezeigt, dass die Aktivität des Enzyms, das die Decarboxylierung von Phosphonopyruvat katalysiert, vom Cofaktor Thiamindiphosphat abhängig ist. Schwartz *et al.* (1998) und Nakashita *et al.* (2000) hatten die für die Phosphonopyruvat-Decarboxylase kodierenden Gene *ppd* aus *S. viridochromogenes* Tü494 bzw. *bcpC* aus *S. hygroscopicus* charakterisiert und anhand der abgeleiteten Aminosäuresequenz das für ThDP-abhängige Enzyme charakteristische Sequenzmotiv identifizieren können. Aufgrund der von ihr katalysierten Reaktion sowie der Tatsache, dass ihre enzymatische Aktivität vom Cofaktor Thiamindiphosphat abhängig ist, gehört die Phosphonopyruvat-Decarboxylase zur Enzymfamilie der α -Ketodecarboxylasen (Zhang *et al.*, 2003b).

Um trotz der bislang fehlenden dreidimensionalen Struktur einer Phosphonopyruvat-Decarboxylase Aussagen über essentielle Aminosäurereste treffen zu können, wurden die Proteinsequenzen der bis dato isolierten und charakterisierten Gene aus *S. viridochromogenes* Tü494 (GenBank Accession: CAA74722), *S. hygroscopicus* (GenBank Accession: BAA07055), *S. wedmorensis* (GenBank Accession: BAA32496) und *B. fragilis* (GenBank Accession: AAG26466) mit der Aminosäuresequenz der bereits sehr gut charakterisierten und ebenfalls zur Familie der α -Ketodecarboxylasen gehörenden Pyruvat-Decarboxylase aus *Zymomonas mobilis* (GenBank Accession: CAA42157) verglichen. Für das computergenerierte Alignment mussten die Proteinsequenzen in drei Abschnitte unterteilt werden, da wegen der umfangreicheren Pdc-Sequenz ein kompletter Sequenzvergleich nicht möglich war.

Mit Hilfe des Sequenz-Alignments wurden in der Proteinsequenz der Phosphonopyruvat-Decarboxylase aus *S. viridochromogenes* Tü494 die nachfolgenden Aminosäurereste, deren Relevanz für die Pyruvat-Decarboxylase aus *Z. mobilis* bereits beschrieben worden waren, identifiziert: Serin-25, Glutamat-48, Histidin-110, Histidin-111, Aspartat-265, Asparagin-293, Glycin-294 und Aspartat-297. Bei den beiden Aminosäuren Glutamat-224 und Aspartat-263 handelte es sich um die zur Ppd aus *B. fragilis* korrespondierenden Reste, die von Zhang *et al.* (2003b) als konservierte Aminosäurereste der Phosphonopyruvat- und Sulfopyruvat-Decarboxylasen beschrieben und charakterisiert worden waren.

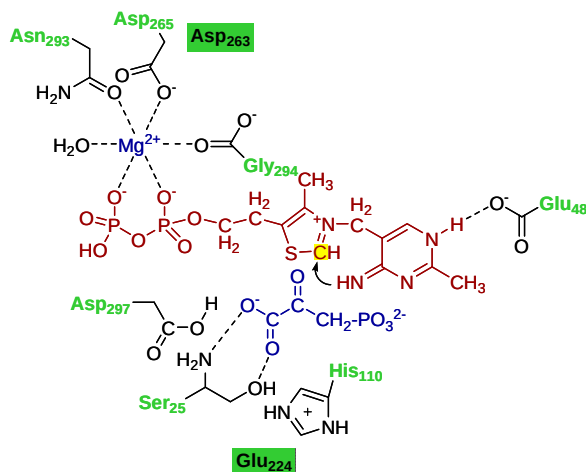


Abbildung 42 Postuliertes Modell des aktiven Zentrums der Phosphonopyruvat-Decarboxylase aus *S. viridochromogenes* Tü494 (in Anlehnung an Candy und Duggleby, 1994; Polovnikova *et al.*, 2003; Tittmann *et al.*, 2003). Dargestellt ist der Ausgangspunkt der katalytischen Reaktion, die durch die Deprotonierung des reaktiven C2-Atoms (gelb unterlegt) im Thiazoliumring des Thiamindiphosphats (rot) eingeleitet wird. Die mutmaßlichen Wechselwirkungen der essentiellen Aminosäuren (Bezeichnung in grün) mit den Cofaktoren Thiamindiphosphat und Mg^{2+} (blau) sowie dem Substratmolekül Phosphonopyruvat (blau) sind als unterbrochene Linien dargestellt. Die möglichen Positionen der für die Proteinsequenzen der Phosphonopyruvat- und Sulfopyruvat-Decarboxylasen konservierten Aminosäuren Glutamat-224 und Aspartat-263 sind grün unterlegt.

Diskussion

Die Funktionen der zuvor aufgelisteten Aminosäurereste wurden mit Hilfe der enzymkinetischen Charakterisierung entsprechender Ppd-Muteine, die mittels ortsgerichteter Mutagenese erzeugt worden waren, untersucht. In Anlehnung an die Illustrationen der aktiven Zentren der Pyruvat-Decarboxylase aus *Z. mobilis* (Abbildung 43, A und B) und der Benzoylformiat-Decarboxylase aus *P. putida* (Abbildung 44) wurde durch die enzymkinetischen Untersuchungen der diversen Ppd-Muteine für das aktive Zentrum der Phosphonopyruvat-Decarboxylase aus *S. viridochromogenes* Tü494 das in der Abbildung 42 dargestellte Strukturmodell postuliert.

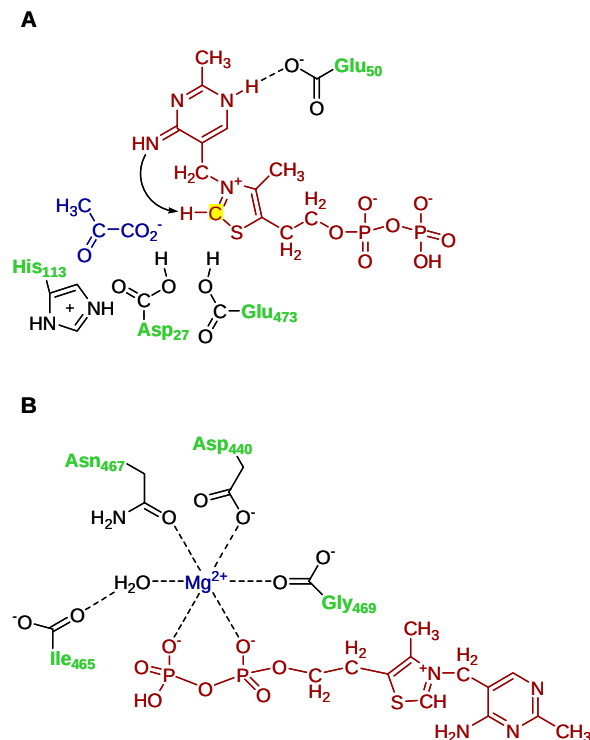


Abbildung 43 Schematische Darstellungen des aktiven Zentrums (A, verändert nach Tittmann *et al.*, 2003) und der Bindestelle des zweiwertigen Magnesium-Ions (B, verändert nach Candy und Duggleby, 1994) der Pyruvat-Decarboxylase aus *Z. mobilis*. **A:** Dargestellt ist der Ausgangspunkt der katalytischen Reaktion, die durch die Deprotonierung des reaktiven C2-Atoms (gelb unterlegt) im Thiazoliumring des Thiamindiphosphats (rot) eingeleitet wird. Die für die Katalyse essentiellen Aminosäuren sind grün gekennzeichnet. Das Substratmolekül (Pyruvat) ist blau gedruckt. **B:** Die Wechselwirkungen des zweiwertigen Magnesium-Ions (blau) mit den essentiellen Aminosäuren (Bezeichnung in grün) und dem Cofaktor Thiamindiphosphat (rot) sind als unterbrochene Linien dargestellt.

4.3.1 Aktivierung des Cofaktors Thiamindiphosphat

Essentielle Voraussetzung für die von ThDP-abhängigen Enzymen katalysierte Reaktion ist die Aktivierung des Cofaktors Thiamindiphosphat. Im aktivierten Zustand ist das reaktive C2-Atom, das im Thiazoliumring des Thiamindiphosphats lokalisiert ist (Breslow, 1958), in der Lage, als Nukleophil den Carbonyl-Kohlenstoff der verschiedenen Substrate anzugreifen. Für diese Aktivierung ist ein Glutamat-Rest verantwortlich, der durch die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung mit dem N1'-Atom des Pyrimidinrings die Deprotonierung des C2-Atoms bewirkt (Kern *et al.*, 1997).

Arjunan *et al.* (1996) und Dobritzsch *et al.* (1998) hatten anhand der Kristallstrukturen aufgezeigt, dass bei den Pyruvat-Decarboxylasen aus *Z. mobilis* und *S. cerevisiae* der Glutamat-Rest 50 (Abbildung 43, A) bzw. 51 für die ThDP-Aktivierung verantwortlich ist. Die Ergebnisse der kristallographischen Studien waren durch die drastisch reduzierten Enzymaktivitäten der Pdc-Mutante E50D und E50Q aus *Z. mobilis* bzw. E51A und E51Q aus *S. cerevisiae* bestätigt worden (Candy *et al.*, 1996; Killenberg-Jabs *et al.*, 1997). Bei der menschlichen Pyruvat-Dehydrogenase E1 war durch die enzymkinetische Charakterisierung der PDH E1-Mutante E89A, E89D und E89Q die Aminosäure Glutamat-89 als der für die ThDP-Aktivierung verantwortliche Glutamat-Rest identifiziert worden (Fang *et al.*, 1998). Der Austausch der den zuvor aufgelisteten Glutamat-Resten entsprechenden Aminosäure Glutamat-48 der Ppd aus *S. viridochromogenes* Tü494 gegen Glutamin resultierte in einem Mutein ohne nachweisbare Restaktivität. Hinsichtlich des deutlichen Aktivitätsverlustes des Ppd-Muteins E48Q und der Positionierung dieses Aminosäurerestes besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass der Glutamat-Rest 48 in der Ppd aus *S. viridochromogenes* Tü494 für die Aktivierung des Thiamindiphosphats verantwortlich ist (Abbildung 42).

4.3.2 Konsensussequenz der ThDP-abhängigen Enzyme

Auf eine für ThDP-abhängige Enzyme charakteristische, konservierte Sequenz war bereits von Reynen und Sahm (1988) hingewiesen worden; Hawkins *et al.* (1989) hatten aus weiteren Sequenzvergleichen ein Sequenzmotiv für ThDP-abhängige Enzyme abgeleitet. Die Hauptbestandteile der „Hawkins“-Konsensussequenz sind die Aminosäurenabfolge Glycin-Aspartat-Glycin (GDG) und in der Regel zwei Asparagin-Reste, die durch ca. 25 Aminosäuren voneinander getrennt sind. Die allgemeingültigen Funktionen der einzelnen Elemente dieser Konsensussequenz waren erstmals durch den Kristallstrukturenvergleich der ThDP-abhängigen Enzyme Transketolase aus *Saccharomyces cerevisiae*, Pyruvat-Oxidase aus *Lactobacillus plantarum* und Pyruvat-Decarboxylase aus *Saccharomyces uvarum* aufgezeigt worden (Muller *et al.*, 1993). Durch die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur der Pyruvat-Decarboxylase aus *Z. mobilis* (Dobritzsch *et al.*, 1998) war dargelegt worden, dass für dieses Enzym die zum ThDP-Sequenzmotiv gehörenden Aminosäuren Aspartat-440, Asparagin-467 und Glycin-469 für die Bindung des

Diskussion

zweiwertigen Magnesium-Ions verantwortlich sind, was wiederum die Verankerung des Diphosphat-Restes des Thiamindiphosphats im Protein gewährleistet (Abbildung 43, B).

Mittels ortsgerichteter Mutagenese war gezeigt worden, dass bei der *Z. mobilis* Pdc der Austausch des konservierten Aspartat-Restes 440 gegen die ungeladenen Aminosäurereste Asparagin, Glycin oder Threonin zum vollständigen Verlust der Enzymaktivität führte, weil die resultierenden Muteine nicht in der Lage waren, ThDP zu binden (Diefenbach *et al.*, 1992). Durch den Austausch des Aspartat-Restes 440 gegen die ebenfalls negativ geladene Aminosäure Glutamat war bestätigt worden, dass die negative Ladung der an der Position 440 befindlichen Aminosäure für die Bindung des Mg^{2+} -Ions essentiell ist (Candy und Duggleby, 1994). Das Ersetzen der dem Aspartat-Rest 440 entsprechenden Aminosäure Aspartat-265 der Ppd aus *S. viridochromogenes* Tü494 gegen den ungeladenen Aminosäurerest Alanin resultierte in einem Mutein ohne nachweisbare Restaktivität. Durch den Aktivitätsverlust des Ppd-Muteins D265A war die Schlussfolgerung, dass der im ThDP-Sequenzmotiv existente Aminosäurerest Aspartat-265 zur Bindestelle des zweiwertigen Magnesium-Ions gehört, zulässig (Abbildung 42).

Auch der Ersatz der dem Asparagin-Rest 467 entsprechenden Aminosäure Asparagin-293 gegen Alanin führte zum Verlust der enzymatischen Aktivität. Die von Candy und Duggleby (1994) durchgeführten Mutagenese-Studien hatten ergeben, dass bei der Pdc aus *Z. mobilis* der Austausch des konservierten Asparagin-Restes 467 gegen Glutamin den Verlust der Enzymaktivität zur Folge hat, da das resultierende Mutein, analog zu den Pdc-Muteinen D440N, D440G und D440T, Thiamindiphosphat nicht binden konnte. Demgegenüber konnte bei dem durch den Austausch gegen die negativ geladene Aminosäure Aspartat entstandenen Mutein Asn467Asp enzymatische Aktivität nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse waren auf eine verminderte Strukturflexibilität zurückgeführt worden: An der Position 467 führt eine in der Größe veränderte Seitenkette zum Verlust der Enzymaktivität (Candy und Duggleby, 1994). Der Aktivitätsverlust des Ppd-Muteins N293A, der vermutlich auf das in der Seitenkette fehlende Sauerstoffatom zurückzuführen war, ließ vermuten, dass die innerhalb des ThDP-Sequenzmotivs vorkommende Aminosäure Asparagin-293 ebenfalls zur Metallbindestelle gehört (Abbildung 42).

Neben dem nur einfach vorkommenden Asparagin-Rest 293 stellte der direkt daneben positionierte Glycin-Rest 294 einen weiteren Unterschied zwischen den Konsensussequenzen der Ppd aus *S. viridochromogenes* Tü494 und der Pdc aus *Z. mobilis* dar. Entgegen den Muteinen D265A und N293A konnte bei dem durch den Aminosäureaustausch Glycin-294 gegen Alanin erzeugten Ppd-Mutein G294A enzymatische Aktivität nachgewiesen werden. Dass das Mutein G294A im Gegensatz zu den Ppd-Muteinen D265A und N293A enzymatisch aktiv war, ließ sich wie folgt erklären: Aus der dreidimensionalen Struktur der *Z. mobilis* Pdc (Dobritzsch *et al.*, 1998) ging hervor, dass beim Glycin-Rest 469, anders als bei den Aminosäureresten Aspartat-440 und Asparagin-467, das Hauptketten-Sauerstoffatom an der Verankerung des zweiwertigen Metall-Ions beteiligt ist (Abbildung 43, B). Eine mögliche Erklärung für die verminderte Enzymaktivität des Ppd-Muteins G294A ist der im Vergleich zur Glycin-Seitenkette voluminösere Methylrest des Alanins, was zu einer sterischen Behinderung führen könnte. Die Tatsache, dass die

Substrataffinität durch den Aminosäureaustausch Glycin gegen Alanin nicht beeinträchtigt wurde, bestätigte die Annahme, dass der Glycin-Rest 294 neben den Aminosäuren Aspartat-265 und Asparagin-293 eine weitere Komponente der Metallbindestelle der Ppd aus *S. viridochromogenes* Tü494 darstellt (Abbildung 42).

4.3.3 Substratbindung und katalytische Aktivität

Anhand der dreidimensionalen Struktur der Pyruvat-Decarboxylase aus *Zymomonas mobilis* war gezeigt worden, dass die Atome des an den Cofaktor Thiamindiphosphat gebundenen Substratmoleküls (α -Lactyl-ThDP) bzw. Produktmoleküls (2-Hydroxyethyl-ThDP) u. a. von den Seitenketten der größtenteils konservierten Aminosäurereste Aspartat-27, Histidin-113, Histidin-114 und Glutamat-473 umgeben sind (Dobritzsch *et al.*, 1998). Die korrespondierenden Aminosäuren der Pdc aus *Saccharomyces uvarum* (Aspartat-28, Histidin-114, Histidin-115 und Glutamat-477) waren fünf Jahre zuvor mittels kristallographischer Studien identifiziert worden (Dyda *et al.*, 1993).

Chang *et al.* (1999) hatten anhand von ortsgerichteter Mutagenese aufgezeigt, dass die negativ geladenen Aminosäuren Aspartat-27 und Glutamat-473 (Abbildung 43, A) die katalytische Aktivität der Pdc aus *Z. mobilis* beeinflussen. Mutagenese-Studien der *Z. mobilis* Pdc hatten ergeben, dass der Aminosäurerest Histidin-114 augenscheinlich keinen großen Einfluss auf die Substratbindung hat, sondern möglicherweise die Orientierung eines während der Katalyse gebildeten Zwischenproduktes bewirkt (Schenk *et al.*, 1997; Candy und Duggleby, 1998). Dagegen waren für den Histidin-Rest 113 (Abbildung 43, A) mehrere Funktionen postuliert worden: Beteiligung an der Protonenabspaltung des ThDP-C2-Atoms, an der Bildung des α -Lactyl-ThDP oder am Decarboxylierungsschritt (Schenk *et al.*, 1997).

Tittmann *et al.* (2003) war mit Hilfe der ^1H NMR-Spektroskopie die direkte Identifizierung der ThDP-gebundenen Zwischenprodukte gelungen. Der anhand dieser NMR-Studien postulierte Pdc-Reaktionsmechanismus besagte, dass, entgegen den von Schenk *et al.* (1997) interpretierten Ergebnissen, die Aminosäuren Aspartat-27 und Histidin-113 die Freisetzung des Acetaldehyds aus 2-Hydroxyethyl-ThDP beeinflussen. Dagegen kamen dem Aminosäurerest Glutamat-473 zwei Aufgaben zu: Glutamat-473 ist zum einem beim nukleophilen Angriff des aktivierten ThDP-C2-Atoms an der Substratorientierung beteiligt und andererseits für die stereochemische Kontrolle der nachfolgenden Decarboxylierung des α -Lactyl-ThDP von entscheidender Bedeutung (Tittmann *et al.*, 2003).

Der anstelle des in der Pdc-Sequenz existenten Aspartat-Restes (D27; Nummerierung entsprechend der *Z. mobilis* Pdc) vorkommende Serin-Rest (S25; Nummerierung entsprechend der Ppd aus *S. viridochromogenes* Tü494) ist eine für die bis dato veröffentlichten Ppd-Sequenzen konservierte Aminosäure. Die enzymkinetische Charakterisierung der durch den Austausch des ungeladenen Serin-Restes entstandenen

Diskussion

Ppd-Mutante S25D und S25N ergab, dass die an der Position 25 vorkommende Aminosäure Serin bedeutsam für die katalytische Aktivität der Phosphonopyruvat-Decarboxylase ist. Der im Gegensatz zum Aspartat-Rest identifizierte Serin-Rest ist ebenfalls in der Aminosäuresequenz der zur Gruppe der ThDP-abhängigen Enzyme gehörenden Benzoylformiat-Decarboxylase (BFD) aus *Pseudomonas putida* vorzufinden. Hasson *et al.* (1998) hatten anhand der dreidimensionalen Struktur der Benzoylformiat-Decarboxylase die Hypothese aufgestellt, dass dem in der BFD-Sequenz existierenden Serin-Rest die gleiche Aufgabe zukommt wie dem in der Pdc-Sequenz existierenden Aspartat-Rest.

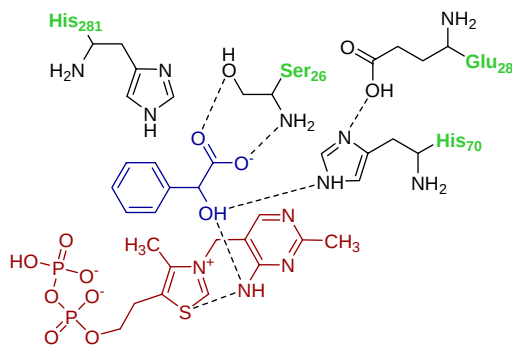


Abbildung 44 Schematische Darstellung des aktiven Zentrums der Benzoylformiat-Decarboxylase aus *Pseudomonas putida* mit den zwischen dem Inhibitor (R)-Mandelsäure und dem Enzym ausgebildeten Wasserstoffbrückenbindungen (verändert nach Polovnikova *et al.*, 2003). Die zwischen (R)-Mandelsäure (blau) und den essentiellen Aminosäuren (Bezeichnung in grün) bzw. dem Cofaktor Thiamindiphosphat (rot) ausgebildeten Wasserstoffbrückenbindungen sind als unterbrochene Linien dargestellt.

Mit Hilfe der (R)-Mandelsäure, einem Hemmstoff der Benzoylformiat-Decarboxylase (Weiss *et al.*, 1988), war Polovnikova *et al.* (2003) die Strukturaufklärung eines Enzym-Inhibitor-Komplexes gelungen. Anhand dieser Struktur war gezeigt worden, dass zwischen der Seitenketten-Hydroxylgruppe bzw. dem Hauptketten-Amidstickstoff des Serin-Restes 26 und der Carboxylgruppe der (R)-Mandelsäure zwei Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet werden (Abbildung 44), was vermuten ließ, dass der Aminosäurerest Serin-26 bei der Bindung des Substrats Benzoylformiat die gleiche Rolle übernimmt. Diese Annahme war durch die enzymkinetische Charakterisierung des BFD-Mutante S26A bestätigt worden (Polovnikova *et al.*, 2003). Der hierbei ermittelte, drastisch erhöhte K_m -Wert des BFD-Mutante S26A stimmte mit den kinetischen Daten der Ppd-Mutante S25D und S25N überein. Ferner hatten Polovnikova *et al.* (2003) anhand der von ihnen durchgeführten Experimente die Vermutung aufgestellt, dass der Serin-Rest 26 neben der Substrat-Bindung und der Decarboxylierungsreaktion auch für die Enamin-Protonierung und die Freisetzung des Benzaldehyds wichtig ist.

Generell sind der in der Pdc-Sequenz vorkommende Aspartat-Rest und der in der BFD-Sequenz vorkommende Serin-Rest für die katalytische Aktivität von entscheidender

Bedeutung; gleichwohl ihnen unterschiedliche Funktionen zukommen (Polovnikova *et al.*, 2003; Tittmann *et al.*, 2003). Der enzymkinetischen Charakterisierung der Ppd-Muteine S25D und S25N zufolge übernimmt der in den Ppd-Sequenzen existierende Serin-Rest die gleiche Aufgabe wie der in der BFD-Sequenz vorkommende Serin-Rest (Abbildung 42); jedoch sind detaillierte Aussagen erst mit der Identifizierung der Ppd-Kristallstruktur bzw. der Strukturaufklärung eines Ppd-Inhibitor-Komplexes möglich.

Der in den *Streptomyces* Ppd-Sequenzen existente Aspartat-Rest (D297; Nummerierung entsprechend der Ppd aus *S. viridochromogenes* Tü494) besitzt, ebenso wie der in der Pdc-Sequenz vorkommende Glutamat-Rest (E473; Nummerierung entsprechend der *Z. mobilis* Pdc), eine negativ geladene Seitenkette. Analog zu den Proteinsequenzen der Pyruvat-Decarboxylasen ist dieser Aspartat-Rest unmittelbar hinter dem von Hawkins *et al.* (1989) identifizierten ThDP-Sequenzmotiv positioniert.

Wie im Fall des Aminosäurerestes Serin-25 ergab die enzymkinetische Charakterisierung des durch den Austausch des Aspartat-Restes entstandenen Ppd-Muteins D297N, dass die an der Position 297 vorkommende Aminosäure Aspartat bedeutsam für die katalytische Aktivität der Phosphonopyruvat-Decarboxylase ist. Parallel zu den kinetischen Daten der Ppd-Muteine S25D und S25N war die Substrataffinität des Ppd-Muteins D297N wesentlich stärker beeinflusst als der K_m -Wert des entsprechenden *Z. mobilis* Pdc-Muteins E473Q (Chang *et al.*, 1999).

Der bedeutend erhöhte K_m -Wert des Ppd-Muteins D297N, die im Vergleich hierzu nur geringfügig veränderte Kinetik des Ppd-Muteins D297E und die Position dieser Aminosäure ließen die Vermutung zu, dass die negativ geladene Seitenkette des Aspartat-Restes 297 die katalytische Aktivität der Phosphonopyruvat-Decarboxylase aus *S. viridochromogenes* Tü494 beeinflusst (Abbildung 42). Die Frage, ob diesem Aspartat-Rest die gleichen Aufgaben zukommen wie dem Glutamat-Rest 473 der *Z. mobilis* Pdc (Tittmann *et al.*, 2003), kann ohne grundlegende Kenntnisse über die Ppd-Kristallstruktur nicht beantwortet werden. Des Weiteren bedarf es zur Beantwortung dieser Frage der Synthese der während der katalytischen Reaktion entstehenden ThDP-gebundenen Intermediate sowie der Etablierung eines geeigneten Nachweissystems.

Die im Vergleich zu den Ppd-Muteinen S25D, S25N, D297E und D297N abermals reduzierte Enzymaktivität bzw. erhöhte Michaelis-Konstante des Ppd-Doppelmuteins S25D/D297E verdeutlichte noch einmal die Bedeutsamkeit der Aminosäurereste Serin-25 und Aspartat-297 für die von der Ppd katalysierte Reaktion. Die Tatsache, dass das Ppd-Doppelmutein trotz des Austausches gegen die in der Pyruvat-Decarboxylase existenten Aminosäuren Aspartat und Glutamat nicht in der Lage war, die Pyruvat-Umsetzung zum Acetaldehyd zu katalysieren, ließ vermuten, dass zwischen den aktiven Zentren der Pyruvat- und Phosphonopyruvat-Decarboxylasen umfangreichere Abweichungen bestehen.

Bezogen auf die Funktion des Histidin-Restes 113 der Pyruvat-Decarboxylase aus *Z. mobilis* hatte der von Tittmann *et al.* (2003) postulierte Pdc-Reaktionsmechanismus den von Schenk

et al. (1997) veröffentlichten Ergebnissen widersprochen. Schenk *et al.* (1997) hatten angenommen, dass der erste der beiden aufeinander folgenden, konservierten Histidin-Reste (Histidin-113) hauptsächlich die vor der Decarboxylierung stattfindenden Reaktionsschritte beeinflusst und in den Decarboxylierungsschritt eingebunden ist. Demgegenüber waren Tittmann *et al.* (2003) zu dem Ergebnis gekommen, dass die nach der Decarboxylierung stattfindende Acetaldehyd-Freisetzung von der aus den Aminosäuren Histidin-113 und Aspartat-27 gebildeten Dyade kontrolliert wird. Dem in der *Z. mobilis* Pdc-Sequenz an den Histidin-Rest 113 anknüpfenden Histidin-Rest 114 war die Orientierung eines während der Katalyse gebildeten Zwischenproduktes zugesprochen worden (Schenk *et al.*, 1997; Candy und Duggleby, 1998; Huang *et al.*, 2001).

Das für die Pyruvat-Decarboxylasen charakteristische Histidin-Duplett ist auch in den Ppd-Sequenzen der *Streptomyces*-Stämme *viridochromogenes* Tü494 und *hygroscopicus* existent. Die Vermutung, dass bei den Phosphonopyruvat-Decarboxylasen ebenfalls zwei für die Katalyse benötigte Histidin-Reste direkt nebeneinander positioniert sind, konnte wegen der in den Ppd-Sequenzen der Stämme *S. wedmorensis* und *B. fragilis* anstelle des zweiten Histidin-Restes vorkommenden Aminosäure Arginin bzw. Lysin, die allerdings auch eine positiv geladene Seitenkette besitzen, nicht bestätigt werden.

Der Austausch der dem ersten der beiden Histidin-Reste entsprechenden Aminosäure Histidin-110 der Ppd aus *S. viridochromogenes* Tü494 gegen Alanin resultierte in einem Mutein ohne nachweisbare Restaktivität, was die Hypothese, dass, analog zur *Z. mobilis* Pdc, die positiv geladene Histidin-Seitenkette für die katalytische Aktivität der Ppd von entscheidender Bedeutung ist, bekräftigte (Abbildung 42).

Entgegen diesen Resultaten schien der dem Histidin-Rest 110 nachfolgende Histidin-Rest 111 keinen Einfluss auf die Enzymkatalyse zu haben, da die Kinetik des Ppd-Muteins H111A mit der kinetischen Charakterisierung des wt-Enzyms übereinstimmte. Dieses Ergebnis widersprach den von Candy und Duggleby (1998) und Huang *et al.* (2001) veröffentlichten Daten, die besagten, dass der Austausch des dem Histidin-111 entsprechenden Histidin-Restes 114 der *Z. mobilis* Pdc gegen Alanin zum Verlust der enzymatischen Aktivität führte.

Die im Vergleich zum wt-Enzym unveränderte Enzymkinetik des Ppd-Muteins H111A sowie die Tatsache, dass das Histidin-Duplett für die Phosphonopyruvat-Decarboxylasen nicht konserviert ist, führte zu der Annahme, dass neben dem Histidin-110 ein an anderer Stelle positionierter Histidin-Rest die Ppd-Katalyse beeinträchtigt; ein bereits für die ebenfalls ThDP-abhängigen Enzyme Transketolase (Wikner *et al.*, 1997), 1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat-Synthase (Schürmann, 2001) und Benzoylformiat-Decarboxylase (Polovnikova *et al.*, 2003) beschriebenes Charakteristikum. Analog zu den Aminosäuren Serin-25 und Aspartat-297 sind explizite Aussagen über die potenzielle Funktion des Histidin-Restes 110 und die mögliche Positionierung weiterer Histidin-Reste innerhalb des aktiven Zentrums erst mit der Aufklärung der Ppd-Kristallstruktur möglich.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Mutagenese-Studien hatten gezeigt, dass trotz einer relativ geringen Sequenzähnlichkeit der Vergleich der Phosphonopyruvat-Decarboxylase aus *S. viridochromogenes* Tü494 mit der zur gleichen Enzymfamilie gehörenden Pyruvat-Decarboxylase aus *Z. mobilis* zur Identifizierung von essentiellen Aminosäuren herangezogen werden kann. Ob die ihnen zugewiesenen Aufgaben mit den bereits charakterisierten Funktionen der korrespondierenden Pdc-Aminosäurereste übereinstimmen, kann, wie bereits mehrfach erwähnt, erst durch die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur der Phosphonopyruvat-Decarboxylase beantwortet werden.

4.3.4 Konservierte Aminosäuren der Phosphonopyruvat- und Sulfopyruvat-Decarboxylasen

Im Jahr 2003 war erstmals ein Artikel veröffentlicht worden, der sich mit der eingehenden Charakterisierung der Phosphonopyruvat-Decarboxylase aus dem für den Menschen pathogenen Organismus *Bacteroides fragilis* beschäftigte (Zhang *et al.*, 2003b). Vorab zu dieser Thematik publizierte Veröffentlichungen hatten sich vornehmlich mit der Entdeckung der Enzymaktivität (Nakashita *et al.*, 1997) sowie der Identifizierung und Charakterisierung der für die Ppd kodierenden Gene befasst (Schwartz *et al.*, 1998; Nakashita *et al.*, 2000). Zhang *et al.* (2003b) hatten durch den Vergleich aller bis dato publizierten Ppd-Sequenzen zuzüglich eines Sequenzabgleichs mit der zur gleichen Enzymfamilie gehörenden Sulfopyruvat-Decarboxylase zwölf polare Aminosäuren identifiziert, die für die Proteinsequenzen der Phosphonopyruvat- und Sulfopyruvat-Decarboxylasen konserviert sind. Die möglichen Funktionen der zu dieser Gruppe gehörenden Aminosäuren Glutamat-213 und Aspartat-258 waren mittels ortsgerichteter Mutagenese näher untersucht worden (Zhang *et al.*, 2003b). Die Enzymkinetik der *B. fragilis* Ppd-Muteine E213A und D258A hatte ergeben, dass der Glutamat-Rest 213 weniger bedeutsam für die katalytische Aktivität des Enzyms ist, wohingegen dem Aminosäurerest Aspartat-258 eine wichtige Rolle während der Substratbindung zukommt (Zhang *et al.*, 2003b).

Bei den korrespondierenden Muteinen E224A und D263A der Ppd aus *S. viridochromogenes* Tü494 führte der Aminosäureaustausch in Gegenwart von zweiwertigen Magnesium-Ionen zum gänzlichen Verlust der enzymatischen Aktivität. Bemerkenswert war, dass im Fall des Ppd-Muteins D263A die Anwesenheit von zweiwertigen Mangan-Ionen eine Aktivitätssteigerung auf ca. 20% des wt- $v_{\max}$ -Wertes bewirkte; ein Phänomen, das ebenfalls in etwas größerem Ausmaß (ca. 30% des wt- $v_{\max}$ -Wertes) beim Ppd-Mutein D265A beobachtet wurde. Der Aspartat-Rest 263 befindet sich unmittelbar vor der Aminosäurenabfolge Glycin-Aspartat-Glycin, die den Beginn des ThDP-Sequenzmotivs darstellt (Reynen und Sahm, 1988; Hawkins *et al.*, 1989). Wegen der Positionierung innerhalb der Ppd-Sequenz und dem übereinstimmenden Verhalten der Ppd-Muteine D263A und D265A gegenüber zweiwertigen Mangan-Ionen, war die Theorie, dass der Aspartat-Rest 263 in der

Diskussion

Nähe der Metallbindestelle lokalisiert ist und somit die Bindung des zweiwertigen Metall-Ions beeinflusst, gerechtfertigt (Abbildung 42).

Dieses Fazit stimmte mit der von Zhang *et al.* (2003b) postulierten Schlussfolgerung über die Funktion des korrespondierenden Aminosäurerestes Aspartat-258 der *B. fragilis* Ppd nicht überein. Allerdings muss erwähnt werden, dass dem bei den Untersuchungen der *B. fragilis* Ppd-Muteine verwendeten Puffersystem zweiwertige Mangan-Ionen in einer Endkonzentration von 1 mM zugesetzt worden waren (Zhang *et al.*, 2003), was, die Enzymaktivitäten der Ppd-Muteine D263A und D265A aus *S. viridochromogenes* Tü494 betrachtend, zu einer erhöhten Enzymaktivität führte.

Entgegen den Ergebnissen der Ppd-Muteine D263A und D265A wurde beim Ppd-Mutein E224A trotz der Gegenwart von zweiwertigen Mangan-Ionen keine Aktivitätszunahme festgestellt, ein Effekt, der wiederum mit den Ergebnissen von Zhang *et al.* (2003b) nicht konform war. Falls der Glutamat-Rest 224 innerhalb des aktiven Zentrums bzw. in der Nähe der Substratbindestelle lokalisiert sein sollte, ist er unter Umständen ein für die katalytische Aktivität essentieller Aminosäurerest (Abbildung 42).

Im Fall der Aminosäurereste Glutamat-224 und Aspartat-263 ist neben der Ermittlung ihrer Funktionen eine definitive Aussage über ihre exakte Lokalisation erst mit der Aufklärung der dreidimensionalen Struktur der Phosphonopyruvat-Decarboxylase aus *S. viridochromogenes* Tü494 möglich. Die Frage, warum die aufgrund der enzymkinetischen Untersuchungen postulierten Aufgaben des Glutamat-Restes 224 und des Aspartat-Restes 263 trotz des übereinstimmenden Aminosäureaustausches von den erachteten Funktionen der korrespondierenden Aminosäuren Glutamat-213 und Aspartat-258 der *B. fragilis* Ppd abwichen, kann erst durch den Vergleich der beiden dreidimensionalen Strukturen beantwortet werden. Die unterschiedlichen Oligomerisierungszustände haben bereits einen ersten Hinweis darauf gegeben, dass die beiden Ppd-Kristallstrukturen möglicherweise voneinander abweichen.

5. Zusammenfassung

Phosphonopyruvat ist das physiologische Substrat der Phosphonopyruvat-Decarboxylase (Ppd) und gehört zur Stoffklasse der Phosphonate, die sich durch eine stabile, kovalente Kohlenstoff-Phosphor-Bindung (C-P-Bindung) auszeichnen und infolgedessen resistent gegenüber chemischer Hydrolyse, thermischer Zersetzung und Photolyse sind. Phosphonate werden u. a. als Antibiotika oder Herbizide kommerziell genutzt, sind ökonomisch vielseitig einsetzbar und finden Verwendung als Antimetabolite oder als Inhibitoren bei der Strukturaufklärung von Enzymen. Sie kommen in der Natur mehrfach vor und sind unter den chemisch synthetisierten Derivaten weit verbreitet. Zu den natürlich vorkommenden C-P-Verbindungen gehört die unter den niederen Organismen weit verbreitete Substanz 2-Aminoethylphosphonat (AEP) sowie diverse Antibiotika, die von *Streptomyces*-Stämmen als Sekundärmetabolite gebildet werden.

Die meisten Phosphonat-Biosynthesen werden ausgehend von Phosphoenolpyruvat durch die Enzymkombination Phosphoenolpyruvat-Phosphomutase (Ppm) und Phosphonopyruvat-Decarboxylase eingeleitet. Bei der Ppm-katalysierten Isomerisierung von Phosphoenolpyruvat und Phosphonopyruvat liegt das Gleichgewicht aufseiten des Phosphatesters. Die Phosphonopyruvat-Decarboxylase, die die Decarboxylierung von Phosphonopyruvat zum Phosphonoacetaldehyd katalysiert, bewirkt die Elimination des gebildeten Phosphonopyruvats aus der Ppm-Gleichgewichtsreaktion und somit die Etablierung der C-P-Bindung.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der biochemischen Eigenschaften sowie der Zusammenhänge zwischen Struktur und Funktion der Phosphonopyruvat-Decarboxylase aus *Streptomyces viridochromogenes* Tü494, deren enzymatische Aktivität von den Cofaktoren Thiamindiphosphat und zweiwertigen Metall-Ionen abhängig ist. Dies bedurfte zunächst der Etablierung geeigneter Nachweissysteme. Weiterhin sollte die Möglichkeit der chemo-enzymatischen Synthese neuartiger Kohlenstoff-Phosphor-Verbindungen, die beispielsweise als Inhibitoren zur Aufklärung von Enzymstrukturen oder als Antimetabolite eingesetzt werden könnten, untersucht werden.

1. Das *ppd*-Gen aus *S. viridochromogenes* Tü494 wurde kloniert und als Fusionsprotein mit einem aminoterminalen 10-fachen Histidinschwanz überexprimiert. Ausgehend vom Rohextrakt eines rekombinanten *E. coli*-Stammes wurde das Enzym mit einer Ausbeute von 15 mg/l in einem Schritt mittels Ni^{2+} -Affinitätschromatographie bis zur apparenten Homogenität aufgereinigt. Zum Nachweis von Phosphonoacetaldehyd wurden, neben der HPLC und der Massenspektroskopie, zwei unterschiedliche enzymatische Nachweissysteme etabliert. Die für die Hilfsenzyme 2-Aminoethylphosphonat-Transaminase (Aept) und Phosphonoacetaldehyd-Hydrolase (Phtase) kodierenden Gene *phnW* und *phnX* aus *Pseudomonas putida* KT2440 und das für die Phosphoenolpyruvat-Phosphomutase (Ppm) kodierende *ppm*-Gen aus *Mytilus edulis* wurden kloniert, als Fusionsproteine mit einem aminoterminalen Polyhistidinschwanz exprimiert und in einem Schritt bis zur apparenten Homogenität aufgereinigt. In Kombination mit den Hilfsenzymen Alkohol-

Zusammenfassung

Dehydrogenase (ADH), L-Lactat-Dehydrogenase (LDH) und Pyruvat-Kinase wurden vier verschiedene enzymatische Nachweisreaktionen etabliert. Der kombinierte Einsatz der Histidin-Fusionsproteine Ppm, Ppd und Aept ermöglichte die *in vitro*-AEP-Synthese.

2. Die Ppd weist ein breites pH-Spektrum mit einem Optimum zwischen pH 7,5 und 8,5 auf. Bei einer Lagerungstemperatur von -20°C bzw. 4°C betrug die Halbwertszeit des Enzyms ca. 50 Tage. Die Ppd hat eine hohe Affinität zu ihren Cofaktoren ThDP und Mg(II)-Ionen ($K_m \sim 40 \mu\text{M}$). Die Rekonstitution des Apo-Enzyms war neben Mg(II)-Ionen auch mit Ca(II)- und Mn(II)-Ionen möglich, wobei mit Mn(II)-Ionen die mit Abstand besten Werte erzielt wurden. Unter Verwendung der Hilfsenzymkombinationen Phtase und ADH sowie Aept und LDH wurde bei einem pH-Wert von 8,0 (HEPES-Puffersystem) und einer Reaktionstemperatur von 30°C das physiologische Substrat Phosphonopyruvat von der Ppd mit einer maximalen Reaktionsgeschwindigkeit von $0,81 \pm 0,01 \text{ U/mg}$ und einer Michaelis-Konstante von $3,16 \pm 0,35 \mu\text{M}$ umgesetzt. Die dem Phosphonopyruvat strukturverwandten Substanzen Pyruvat, β -Hydroxypyruvat und β -Fluoropyruvat wurden von der Ppd nicht umgesetzt. Bei den Untersuchungen zur Phosphonoacyloin-Synthese konnte die in Bezug auf die Pyruvat-Decarboxylase vermutete Carboligase-Aktivität der Ppd nicht nachgewiesen werden.
3. Mittels Gelfiltration wurde für die Ppd ein Molekulargewicht von 72.100 ± 220 bestimmt. Dies deutet, bei einer Größe der Untereinheit von ca. 44 kDa, auf eine dimere Quartärstruktur hin. Durch den Sequenzvergleich mit der zur gleichen Enzymfamilie gehörenden Pyruvat-Decarboxylase aus *Zymomonas mobilis* war die Identifizierung solcher Aminosäurereste möglich, deren potenzielle Funktionen anschließend mittels ortsgerichteter Mutagenesen untersucht wurden. Anhand der enzymkinetischen Daten dieser Ppd-Mutantenproteine (Ppd-Muteine) konnte, unter Zuhilfenahme der Kristallstrukturen der ThDP-abhängigen Enzyme Pyruvat-Decarboxylase und Benzoylformiat-Decarboxylase ein Modell des aktiven Zentrums der Phosphonopyruvat-Decarboxylase erstellt werden. Demnach bewirkt die Aminosäure Glutamat-48 die Aktivierung des Thiamindiphosphats. Die Aminosäuren Serin-25, Histidin-110 und Aspartat-297 beeinflussen die katalytische Aktivität der Ppd und sind wahrscheinlich in unmittelbarer Nähe der Substratbindestelle lokalisiert. Die innerhalb der ThDP-Konsensussequenz vorkommenden Aminosäurereste Aspartat-265, Asparagin-293 und Glycin-294 kennzeichnen die Bindestelle des zweiwertigen Metall-Ions, das für die ThDP-Verankerung verantwortlich ist. Auch der für die Proteinsequenzen der Phosphonopyruvat- und Sulfopyruvat-Decarboxylasen konservierte Aspartat-Rest 263 zählt möglicherweise zu den für die Bindung des zweiwertigen Metall-Ions benötigten Aminosäuren. Ein weiterer, für die Proteinsequenzen der Phosphonopyruvat- und Sulfopyruvat-Decarboxylasen konservierter Aminosäurerest ist Glutamat-224, der unter Umständen eine für die katalytische Aktivität essentielle Aminosäure darstellt. Die für Glutamat-224 und Aspartat-263 postulierten Funktionen widersprachen den Ergebnissen, die für die entsprechenden Aminosäurereste der Phosphonopyruvat-Decarboxylase aus *Bacteroides fragilis* beschrieben worden waren (Zhang, G. et al. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**: 41302-41308).

6. Literatur

- ABU-QARE, A.W., and ABOU-DONIA, M.B. (2002). Sarin: health effects, metabolism, and methods of analysis. *Food Chem. Toxicol.* **40**: 1327-1333.
- ARJUNAN, P., NEMERIA, N., BRUNSKILL, A., CHANDRASEKHAR, K., SAX, M., YAN, Y., JORDAN, F., GUEST, J.R., and FUREY, W. (2002). Structure of the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex E1 component from *Escherichia coli* at 1.85 Å resolution. *Biochemistry* **41**: 5213-5221.
- ARJUNAN, P., UMLAND, T., DYDA, F., SWAMINATHAN, S., FUREY, W., SAX, M., FARRENKOPF, B., GAO, Y., ZHANG, D., and JORDAN, F. (1996). Crystal structure of the thiamin diphosphate-dependent enzyme pyruvate decarboxylase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* at 2.3 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **256**: 590-600.
- BAER, E., and STANACEY, N.Z. (1964). Phosphonolipids. I. Synthesis of a phosphonic acid analogue of cephalin. *J. Biol. Chem.* **239**: 3209-3214.
- BAKER, A.S., CIOCCI, M.J., METCALF, W.W., KIM, J., BABBITT, P.C., WANNER, B.L., MARTIN, B.M., and DUNAWAY-MARIANO, D. (1998). Insights into the mechanism of catalysis by the P-C bond-cleaving enzyme phosphonoacetaldehyde hydrolase derived from gene sequence analysis and mutagenesis. *Biochemistry* **37**: 9305-9315.
- BARRY, R.J., BOWMAN, E., MCQUENEY, M., and DUNAWAY-MARIANO, D. (1988). Elucidation of the 2-aminoethylphosphonate biosynthetic pathway in *Tetrahymena pyriformis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **153**: 177-182.
- BAYER, E., GUGEL, K.H., HÄGELE, K., HAGENMAIER, H., JESSIPOW, S., KÖNIG, W.A. und ZÄHNER, H. (1972). 25. Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. 98. Phosphinothricin und Phosphinothricyl-Alanyl-Alanin. *Helv. Chim. Acta* **55**: 224-239.
- BISSWANGER, H. (2000). Enzymkinetik: Theorie und Methoden. (Wiley-VCH, Weinheim).
- BOWMAN, E., MCQUENEY, M., BARRY, R.J., and DUNAWAY-MARIANO, D. (1988). Catalysis and thermodynamics of the phosphoenolpyruvate/phosphonopyruvate rearrangement. Entry into the phosphonate class of naturally occurring organophosphorus compounds. *J. Am. Chem. Soc.* **110**: 5575-5576.
- BRADFORD, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- BRESLOW, R. (1958). On the mechanism of thiamine action. IV. Evidence from studies on model systems. *J. Am. Chem. Soc.* **80**: 3719-3726.
- BRINGER-MEYER, S., and SAHM, H. (1988). Acetoin and phenylacetylcarbinol formation by the pyruvate decarboxylases of *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces carlsbergensis*. *Biocatalysis* **1**: 321-331.

- BRINGER-MEYER, S., SCHIMZ, K.-L., and SAHM, H.** (1986). Pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis*. Isolation and partial characterization. *Arch. Microbiol.* **146**: 105-110.
- BRINKMANN, U., MATTES, R.E., and BUCKEL, P.** (1989). High-level expression of recombinant genes in *Escherichia coli* is dependent on the availability of the *dnaY* gene product. *Gene* **85**: 109-114.
- BRUHN, H., POHL, M., GRÖTZINGER, J., and KULA, M.R.** (1995). The replacement of Trp392 by alanine influences the decarboxylase/carboligase activity and stability of pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis*. *Eur. J. Biochem.* **234**: 650-655.
- CANDY, J.M., and DUGGLEBY, R.G.** (1994). Investigation of the cofactor-binding site of *Zymomonas mobilis* pyruvate decarboxylase by site-directed mutagenesis. *Biochem. J.* **300**: 7-13.
- CANDY, J.M., and DUGGLEBY, R.G.** (1998). Structure and properties of pyruvate decarboxylase and site-directed mutagenesis of the *Zymomonas mobilis* enzyme. *Biochim. Biophys. Acta* **1385**: 323-338.
- CANDY, J.M., KOGA, J., NIXON, P.F., and DUGGLEBY, R.G.** (1996). The role of residues glutamate-50 and phenylalanine-496 in *Zymomonas mobilis* pyruvate decarboxylase. *Biochem. J.* **315**: 745-751.
- CHABRIERE, E., VERNEDE, X., GUIGLIARELLI, B., CHARON, M.H., HATCHIKIAN, E.C., and FONTECILLA-CAMPS, J.C.** (2001). Crystal structure of the free radical intermediate of pyruvate:ferredoxin oxidoreductase. *Science* **294**: 2559-2563.
- CHANG, A.K., and DUGGLEBY, R.G.** (1997). Expression, purification and characterization of *Arabidopsis thaliana* acetohydroxyacid synthase. *Biochem. J.* **327**: 161-169.
- CHANG, A.K., NIXON, P.F., and DUGGLEBY, R.G.** (1999). Aspartate-27 and glutamate-473 are involved in catalysis by *Zymomonas mobilis* pyruvate decarboxylase. *Biochem. J.* **339**: 255-260.
- CHEN, G.C., and JORDAN, F.** (1984). Brewers' yeast pyruvate decarboxylase produces acetoin from acetaldehyde: a novel tool to study the mechanism of steps subsequent to carbon dioxide loss. *Biochemistry* **23**: 3576-3582.
- COOPER, G.W., ONWO, W.M., and CRONIN, J.R.** (1992). Alkyl phosphonic acids and sulfonic acids in the Murchison meteorite. *Geochim. Cosmochim. Acta* **56**: 4109-4115.
- COUTROT, P., and SAVIGNAC, P.** (1978). α -Cuprophosphonates; III. Synthesis of ethyl dialkyl-phosphonopyruvates. *Synthesis* 36-38.
- COYNE, M.J., KALKA-MOLL, W., TZIANABOS, A.O., KASPER, D.L., and COMSTOCK, L.E.** (2000). *Bacteroides fragilis* NCTC9343 produces at least three distinct capsular polysaccharides: cloning, characterization, and reassignment of polysaccharide B and C biosynthesis loci. *Infect. Immun.* **68**: 6176-6181.

- CROUT, D.H.G., DALTON, H., HUTCHINSON, D.W., and MIYAGOSHI, M. (1991). Studies on pyruvate decarboxylase: acyloin formation from aliphatic, aromatic and heterocyclic aldehydes. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 1329-1334.
- CROWE, J., DÖBELI, H., GENTZ, R., HOCHULI, E., STÜBER, D., and HENCO, K. (1994). 6xHis-Ni-NTA chromatography as a superior technique in recombinant protein expression/purification. *Methods Mol. Biol.* **31**: 371-387.
- DE GRAAF, R.M., VISSCHER, J., and SCHWARTZ, A.W. (1995). A plausibly prebiotic synthesis of phosphonic acids. *Nature* **378**: 474-477.
- DEL TITO, B.J., WARD, J.M., HODGSON, J., GERSHATER, C.J.L., EDWARDS, H., WYSOCKI, L.A., WATSON, F.A., SATHE, G., and KANE, J.F. (1995). Effects of a minor isoleucyl tRNA on heterologous protein translation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **177**: 7086-7091.
- DEMIR, A.S., POHL, M., JANZEN, E., and MÜLLER, M. (2001). Enantioselective synthesis of hydroxy ketones through cleavage and formation of acyloin linkage. Enzymatic kinetic resolution via C-C bond cleavage. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 633-635.
- DEMIR, A.S., SESENOGLU, Ö., DÜNKELMANN, P., and MÜLLER, M. (2003). Benzaldehyde lyase-catalyzed enantioselective carbonylation of aromatic aldehydes with mono- and dimethoxy acetaldehyde. *Org. Lett.* **5**: 2047-2050.
- DEMIR, A.S., SESENOGLU, Ö., EREN, E., HOSRIK, B., POHL, M., JANZEN, E., KOLTER, D., FELDMANN, R., DÜNKELMANN, P., and MÜLLER, M. (2002). Enantioselective synthesis of α -hydroxy ketones via benzaldehyde lyase-catalyzed C-C bond formation reaction. *Adv. Synth. Catal.* **344**: 96-103.
- DIEFENBACH, R.J., CANDY, J.M., MATTICK, J.S., and DUGGLEBY, R.G. (1992). Effects of substitution of aspartate-440 and tryptophan-487 in the thiamin diphosphate binding region of pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis*. *FEBS Lett.* **296**: 95-98.
- DOBRITZSCH, D., KÖNIG, S., SCHNEIDER, G., and 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.
- DUMORA, C., LACOSTE, A.M., and CASSAIGNE, A. (1983). Purification and properties of 2-aminoethylphosphonate:pyruvate aminotransferase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur. J. Biochem.* **133**: 119-125.
- DUMORA, C., LACOSTE, A.M., and CASSAIGNE, A. (1989). Phosphonoacetaldehyde hydrolase from *Pseudomonas aeruginosa*: purification properties and comparison with *Bacillus cereus* enzyme. *Biochim. Biophys. Acta* **997**: 193-198.
- DÜNKELMANN, P., KOLTER-JUNG, D., NITSCHKE, A., DEMIR, A.S., SIEGERT, P., LINGEN, B., BAUMANN, M., POHL, M., and MÜLLER, M. (2002). Development of a donor-acceptor concept for enzymatic cross-coupling reactions of aldehydes: the first asymmetric cross-benzoin condensation. *J. Am. Chem. Soc.* **124**: 12084-12085.

- DYDA, F., FUREY, W., SWAMINATHAN, S., SAX, M., FARRENKOPF, B., and JORDAN, F. (1993). Catalytic centers in the thiamin diphosphate dependent enzyme pyruvate decarboxylase at 2.4-Å resolution. *Biochemistry* **32**: 6165-6170.
- ENGEL, S., VYAZMENSKY, M., GERESH, S., BARAK, Z., and CHIPMAN, D.M. (2003). Acetohydroxyacid synthase: a new enzyme for chiral synthesis of *R*-phenylacetylcarbinol. *Biotechnol. Bioeng.* **83**: 833-840.
- FANG, R., NIXON, P.F., and DUGGLEBY, R.G. (1998). Identification of the catalytic glutamate in the E1 component of human pyruvate dehydrogenase. *FEBS Lett.* **437**: 273-277.
- FREEMAN, S., IRWIN, W.J., and SCHWALBE, C.H. (1991). Synthesis and hydrolysis studies of phosphonopyruvate. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* 263-267.
- FROST, J.W., LOO, S., CORDEIRO, M.L., and LI, D. (1987). Radical-based dephosphorylation and organophosphonate biodegradation. *J. Am. Chem. Soc.* **109**: 2166-2171.
- GOBEC, S., PLANTAN, I., MRAVLJAK, J., WILSON, R.A., BESRA, G.S., and KIKELJ, D. (2004). Phosphonate inhibitors of antigen 85C, a crucial enzyme involved in the biosynthesis of the *Mycobacterium tuberculosis* cell wall. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **14**: 3559-3562.
- GOETZ, G., IWAN, P., HAUER, B., BREUER, M., and POHL, M. (2001). Continuous production of (*R*)-phenylacetylcarbinol in an enzyme-membrane reactor using a potent mutant of pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol. Bioeng.* **74**: 317-325.
- GONZALEZ, B., and VICUNA, R. (1989). Benzaldehyde lyase, a novel thiamine PP_i-requiring enzyme, from *Pseudomonas fluorescens* biovar I. *J. Bacteriol.* **171**: 2401-2405.
- GRUYS, K.J., WALKER, M.C., and SIKORSKI, J.A. (1992). Substrate synergism and the steady-state kinetic reaction mechanism for EPSP synthase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **31**: 5534-5544.
- GUNETILEKE, K.G., and ANWAR, R.A. (1968). Biosynthesis of uridine diphospho-*N*-acetylmuramic acid. II. Purification and properties of pyruvate-uridine diphospho-*N*-acetylglucosamine transferase and characterization of uridine diphospho-*N*-acetylenolpyruvylglucosamine. *J. Biol. Chem.* **243**: 5770-5778.
- HANAHAN, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580.
- HASSON, M.S., MUSCATE, A., MCLEISH, M.J., POLOVNIKOVA, L.S., GERLT, J.A., KENYON, G.L., PETSKE, G.A., and 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.
- HAWKINS, C.F., BORGES, A., and PERHAM, R.N. (1989). A common structural motif in thiamin pyrophosphate-binding enzymes. *FEBS Lett.* **255**: 77-82.

- HENDLIN, D., STAPLEY, E.O., JACKSON, M., WALLICK, H., MILLER, A.K., WOLF, F.J., MILLER, T.W., CHAIET, L., KAHAN, F.M., FOLTZ, E.L., and WOODRUFF, H.B. (1969). Phosphonomycin, a new antibiotic produced by strains of *Streptomyces*. *Science* **166**: 122-123.
- HERZBERG, O., CHEN, C.C., LIU, S., TEMPCZYK, A., HOWARD, A., WEI, M., YE, D., and DUNAWAY-MARIANO, D. (2002). Pyruvate site of pyruvate phosphate dikinase: crystal structure of the enzyme-phosphonopyruvate complex, and mutant analysis. *Biochemistry* **41**: 780-787.
- HIDAKA, T., GODA, M., KUZUYAMA, T., TAKEI, N., HIDAKA, M., and SETO, H. (1995). Cloning and nucleotide sequence of fosfomycin biosynthetic genes of *Streptomyces wedmorensis*. *Mol. Gen. Genet.* **249**: 274-280.
- HIDAKA, T., IMAI, S., HARA, O., ANZAI, H., MURAKAMI, T., NAGAOKA, K., and SETO, H. (1990). Carboxyphosphoenolpyruvate phosphonmutase, a novel enzyme catalyzing C-P bond formation. *J. Bacteriol.* **172**: 3066-3072.
- HILDEBRANDT, G. und KLAVEHN, W. (1932). Deutsches Patent Nr. 548 459.
- HILL, C.M., PANG, S.S., and DUGGLEBY, R.G. (1997). Purification of *Escherichia coli* acetohydroxyacid synthase isoenzyme II and reconstitution of active enzyme from its individual pure subunits. *Biochem. J.* **327**: 891-898.
- HINRICHSSEN, P., GOMEZ, I., and VICUNA, R. (1994). Cloning and sequencing of the gene encoding benzaldehyde lyase from *Pseudomonas fluorescens* biovar I. *Gene* **144**: 137-138.
- HORIGUCHI, M., and KANDATSU, M. (1959). Isolation of 2-aminoethane phosphonic acid from rumen protozoa. *Nature* **184**: 901-902.
- HUANG, C.Y., CHANG, A.K., NIXON, P.F., and DUGGLEBY, R.G. (2001). Site-directed mutagenesis of the ionizable groups in the active site of *Zymomonas mobilis* pyruvate decarboxylase. Effect on activity and pH dependence. *Eur. J. Biochem.* **268**: 3558-3565.
- IBDAH, M., BAR-ILAN, A., LIVNAH, O., SCHLOSS, J.V., BARAK, Z., and CHIPMAN, D.M. (1996). Homology modeling of the structure of bacterial acetohydroxy acid synthase and examination of the active site by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* **35**: 16282-16291.
- IDING, H., DÜNNWALD, T., GREINER, L., LIESE, A., MÜLLER, M., SIEGERT, P., GRÖTZINGER, J., DEMIR, A.S., and POHL, M. (2000). Benzoylformate decarboxylase from *Pseudomonas putida* as stable catalyst for the synthesis of chiral 2-hydroxy ketones. *Chem. Eur. J.* **6**: 1483-1495.
- IDING, H., SIEGERT, P., MESCH, K., and POHL, M. (1998). Application of α -keto acid decarboxylases in biotransformations. *Biochim. Biophys. Acta* **1385**: 307-322.
- ITOH, N., KUSAKA, M., HIROTA, T., and NOMURA, A. (1995). Microbial production of antibiotic fosfomycin by a stereoselective epoxidation and its formation mechanism. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**: 394-401.

- JIA, Y., LU, Z., HUANG, K., HERZBERG, O., and DUNAWAY-MARIANO, D. (1999). Insight into the mechanism of phosphoenolpyruvate mutase catalysis derived from site-directed mutagenesis studies of active site residues. *Biochemistry* **38**: 14165-14173.
- JIANG, W., METCALF, W.W., LEE, K.S., and WANNER, B.L. (1995). Molecular cloning, mapping, and regulation of Pho regulon genes for phosphonate breakdown by the phosphonatase pathway of *Salmonella typhimurium* LT2. *J. Bacteriol.* **177**: 6411-6421.
- JOMAA, H., WIESNER, J., SANDERBRAND, S., ALTINCICEK, B., WEIDEMEYER, C., HINTZ, M., TÜRBACHOVA, I., EBERL, M., ZEIDLER, J., LICHTENTHALER, H.K., SOLDATI, D., and BECK, E. (1999). Inhibitors of the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis as antimalarial drugs. *Science* **285**: 1573-1576.
- JONES, B.N., and GILLIGAN, J.P. (1983). *o*-Phthaldialdehyde precolumn derivatization and reversed-phase high-performance liquid chromatography of polypeptide hydrolysates and physiological fluids. *J. Chromatogr.* **266**: 471-482.
- KAHAN, F.M., KAHAN, J.S., CASSIDY, P.J., and KROPP, H. (1974). The mechanism of action of fosfomycin (phosphonomycin). *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **235**: 364-386.
- KANE, J.F. (1995). Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* **6**: 494-500.
- KERN, D., KERN, G., NEEF, H., TITTMANN, K., KILLENBERG-JABS, M., WIKNER, C., SCHNEIDER, G., and HÜBNER, G. (1997). How thiamine diphosphate is activated in enzymes. *Science* **275**: 67-70.
- KILLENBERG-JABS, M., KÖNIG, S., EBERHARDT, I., HOHMANN, S., and HÜBNER, G. (1997). Role of Glu51 for cofactor binding and catalytic activity in pyruvate decarboxylase from yeast studied by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* **36**: 1900-1905.
- KIM, A., KIM, J., MARTIN, B.M., and DUNAWAY-MARIANO, D. (1998). Isolation and characterization of the carbon-phosphorus bond-forming enzyme phosphoenolpyruvate mutase from the mollusk *Mytilus edulis*. *J. Biol. Chem.* **273**: 4443-4448.
- KIM, A.D., BAKER, A.S., DUNAWAY-MARIANO, D., METCALF, W.W., WANNER, B.L., and MARTIN, B.M. (2002). The 2-aminoethylphosphonate-specific transaminase of the 2-aminoethylphosphonate degradation pathway. *J. Bacteriol.* **184**: 4134-4140.
- KITTREDGE, J.S., and HUGHES, R.R. (1964). The occurrence of α -amino- β -phosphonopropionic acid in the zoanthid, *Zoanthus sociatus*, and the ciliate, *Tetrahymena pyriformis*. *Biochemistry* **3**: 991-996.
- KITTREDGE, J.S., and ROBERTS, E. (1969). A carbon-phosphorus bond in nature. *Science* **164**: 37-42.
- KOBAYASHI, S., KUZUYAMA, T., and SETO, H. (2000). Characterization of the *fomA* and *fomB* gene products from *Streptomyces wedmorensis*, which confer fosfomycin resistance on *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**: 647-650.

- KOGA, J. (1995). Structure and function of indolepyruvate decarboxylase, a key enzyme in indole-3-acetic acid biosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* **1249**: 1-13.
- KOGA, J., ADACHI, T., and HIDAKA, H. (1992). Purification and characterization of indolepyruvate decarboxylase. A novel enzyme for indole-3-acetic acid biosynthesis in *Enterobacter cloacae*. *J. Biol. Chem.* **267**: 15823-15828.
- KONONOVA, S.V., and NESMEYANOVA, M.A. (2002). Phosphonates and their degradation by microorganisms. *Biochemistry (Moscow)* **67**: 184-195.
- KORN, E.D., DEARBORN, D.G., FALES, H.M., and SOKOLOSKI, E.A. (1973). Phosphonoglycan. A major polysaccharide constituent of the amoeba plasma membrane contains 2-aminoethylphosphonic acid and 1-hydroxy-2-aminoethylphosphonic acid. *J. Biol. Chem.* **248**: 2257-2259.
- KULAKOVA, A.N., WISDOM, G.B., KULAKOV, L.A., and QUINN, J.P. (2003). The purification and characterization of phosphonopyruvate hydrolase, a novel carbon-phosphorus bond cleavage enzyme from *Variovorax* sp. Pal2. *J. Biol. Chem.* **278**: 23426-23431.
- KURLAND, C., and GALLANT, J. (1996). Errors of heterologous protein expression. *Curr. Opin. Biotechnol.* **7**: 489-493.
- KUZUYAMA, T., SHIMIZU, T., TAKAHASHI, S., and SETO, H. (1998). Fosmidomycin, a specific inhibitor of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase in the nonmevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. *Tetrahedron Lett.* **39**: 7913-7916.
- LA NAUZE, J.M., and ROSENBERG, H. (1968). The identification of 2-phosphonoacetaldehyde as an intermediate in the degradation of 2-aminoethylphosphonate by *Bacillus cereus*. *Biochim. Biophys. Acta* **165**: 438-447.
- LA NAUZE, J.M., ROSENBERG, H., and SHAW, D.C. (1970). The enzymic cleavage of the carbon-phosphorus bond: purification and properties of phosphonate. *Biochim. Biophys. Acta* **212**: 332-350.
- LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- LINDQVIST, Y., SCHNEIDER, G., ERMILER, U., and SUNDSTRÖM, M. (1992). Three-dimensional structure of transketolase, a thiamine diphosphate dependent enzyme, at 2.5 Å resolution. *EMBO J.* **11**: 2373-2379.
- LINDROTH, P., and MOPPER, K. (1979). High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatization with *o*-phthalaldehyde. *Anal. Chem.* **51**: 1667-1674.
- LINGEN, B., POHL, M., DEMIR, A.S., LIESE, A., and MÜLLER, M. (2004). Enantioselective syntheses of hydroxy ketones via benzoylformate decarboxylase- and benzaldehyde lyase-catalyzed C-C bond formation. In *Thiamine: Catalytic Mechanisms in Normal and Disease States*. F. Jordan and M.S. Patel, eds. (Marcel Dekker, Inc., New York) 113-129.

- LIU, S., LU, Z., JIA, Y., DUNAWAY-MARIANO, D., and HERZBERG, O. (2002). Dissociative phosphoryl transfer in PEP mutase catalysis: structure of the enzyme/sulfolpyruvate complex and kinetic properties of mutants. *Biochemistry* **41**: 10270-10276.
- MARQUARDT, J.L., SIEGELE, D.A., KOLTER, R., and WALSH, C.T. (1992). Cloning and sequencing of *Escherichia coli* *murZ* and purification of its product, a UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase. *J. Bacteriol.* **174**: 5748-5752.
- MCGRATH, J.W., WISDOM, G.B., MCMULLAN, G., LARKIN, M.J., and QUINN, J.P. (1995). The purification and properties of phosphonoacetate hydrolase, a novel carbon-phosphorus bond-cleavage enzyme from *Pseudomonas fluorescens* 23F. *Eur. J. Biochem.* **234**: 225-230.
- MCMULLAN, G., HARRINGTON, F., and QUINN, J.P. (1992). Metabolism of phosphonoacetate as the sole carbon and phosphorus source by an environmental bacterial isolate. *Appl. Environ. Microb.* **58**: 1364-1366.
- MESCH, K. (1997). Rationales Protein-Design an der Pyruvatdecarboxylase aus *Zymomonas mobilis*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- METCALF, W.W., and WANNER, B.L. (1993a). Evidence for a fourteen-gene, *phnC* to *phnP* locus for phosphonate metabolism in *Escherichia coli*. *Gene* **129**: 27-32.
- METCALF, W.W., and WANNER, B.L. (1993b). Mutational analysis of an *Escherichia coli* fourteen-gene operon for phosphonate degradation, using *TnphoA'* elements. *J. Bacteriol.* **175**: 3430-3442.
- MIERENDORF, R., YEAGER, K., and NOVY, R. (1994). The pET system: your choice for expression. *in* *Novations* **1**: 1-3.
- MISSINOU, M.A., BORRMANN, S., SCHINDLER, A., ISSIFOU, S., ADEGNIKA, A.A., MATSIEGUI, P.B., BINDER, R., LELL, B., WIESNER, J., BARANEK, T., JOMAA, H., and KREMSNER, P.G. (2002). Fosmidomycin for malaria. *The Lancet* **360**: 1941-1942.
- MITRAKI, A., and KING, J. (1989). Protein folding intermediates and inclusion body formation. *Bio/Technology* **7**: 690-697.
- MOFFATT, B.A., and STUDIER, F.W. (1987). T7 lysozyme inhibits transcription by T7 RNA polymerase. *Cell* **49**: 221-227.
- MONSCHAU, N. (1998). Untersuchungen zur Biosynthese von Glycin als Vorstufe von Riboflavin in *Ashbya gossypii*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Jül-3519.
- MORAIS, M.C., ZHANG, W., BAKER, A.S., ZHANG, G., DUNAWAY-MARIANO, D., and ALLEN, K.N. (2000). The crystal structure of *Bacillus cereus* phosphonoacetaldehyde hydrolase: insight into catalysis of phosphorus bond cleavage and catalytic diversification within the HAD enzyme superfamily. *Biochemistry* **39**: 10385-10396.

- MÜLLER, M., and SPRENGER, G.A. (2004). Thiamine-dependent enzymes as catalysts of C-C bond-forming reactions: the role of "orphan" enzymes. In *Thiamine: Catalytic Mechanisms in Normal and Disease States*. F. Jordan and M.S. Patel, eds. (Marcel Dekker, Inc., New York) 77-91.
- MULLER, Y.A., and SCHULZ, G.E. (1993). Structure of the thiamine- and flavin-dependent enzyme pyruvate oxidase. *Science* **259**: 965-967.
- MULLER, Y.A., LINDQVIST, Y., FUREY, W., SCHULZ, G.E., JORDAN, F., and SCHNEIDER, G. (1993). A thiamin diphosphate binding fold revealed by comparison of the crystal structures of transketolase, pyruvate oxidase and pyruvate decarboxylase. *Structure* **1**: 95-103.
- MULLIS, K.B., and FALOONA, F.A. (1987). [21] Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**: 335-350.
- NAGARAJAN, R., and PRATT, R.F. (2004). Thermodynamic evaluation of a covalently bonded transition state analogue inhibitor: inhibition of β -lactamases by phosphonates. *Biochemistry* **43**: 9664-9673.
- NAKASHITA, H., KOZUKA, K., HIDAKA, T., HARA, O., and SETO, H. (2000). Identification and expression of the gene encoding phosphonopyruvate decarboxylase of *Streptomyces hygrosopicus*. *Biochim. Biophys. Acta* **1490**: 159-162.
- NAKASHITA, H., WATANABE, K., HARA, O., HIDAKA, T., and SETO, H. (1997). Studies on the biosynthesis of bialaphos. Biochemical mechanism of C-P bond formation: discovery of phosphonopyruvate decarboxylase which catalyzes the formation of phosphonoacetaldehyde from phosphonopyruvate. *J. Antibiotics* **50**: 212-219.
- NELSON, K.E., WEINEL, C., PAULSEN, I.T., DODSON, R.J., HILBERT, H., MARTINS DOS SANTOS, V.A., FOUTS, D.E., GILL, S.R., POP, M., HOLMES, M., BRINKAC, L., BEANAN, M., DEBOY, R.T., DAUGHERTY, S., KOLONAY, J., MADUPU, R., NELSON, W., WHITE, O., PETERSON, J., KHOURI, H., HANCE, I., CHRIS LEE, P., HOLTZAPPLE, E., SCANLAN, D., TRAN, K., MOAZZEZ, A., UTTERBACK, T., RIZZO, M., LEE, K., KOSACK, D., MOESTL, D., WEDLER, H., LAUBER, J., STJEPANDIC, D., HOHEISEL, J., STRAETZ, M., HEIM, S., KIEWITZ, C., EISEN, J., TIMMIS, K.N., DÜSTERHÖFT, A., TÜMLER, B., and FRASER, C.M. (2002). Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol.* **4**: 799-808.
- NEUBERG, C. und HIRSCH, J. (1921). Über ein Kohlenstoffketten knüpfendes Ferment (Carbolygase). *Biochemische Zeitschrift* **115**: 282-311.
- NEUBERG, C. und KARCZAG, L. (1911a). Über zuckerfreie Hefegärungen. IV. Carboxylase, ein neues Enzym der Hefe. *Biochemische Zeitschrift* **36**: 68-75.
- NEUBERG, C. und KARCZAG, L. (1911b). Über zuckerfreie Hefegärungen. V. Zur Kenntnis der Carboxylase. *Biochemische Zeitschrift* **36**: 76-81.
- NEUBERG, C. und ROSENTHAL, P. (1913). Über zuckerfreie Hefegärungen. XI. Weiteres zur Kenntnis der Carboxylase. *Biochemische Zeitschrift* **51**: 128-142.

- NOSAKA, K., KANEKO, Y., NISHIMURA, H., and IWASHIMA, A. (1993). Isolation and characterization of a thiamin pyrophosphokinase gene, *THI80*, from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **268**: 17440-17447.
- NOVY, R., DROTT, D., YAEGER, K., and MIERENDORF, R. (2001). Overcoming the codon bias of *E. coli* for enhanced protein expression. *in* *Novations* **12**: 1-3.
- NOVY, R., YAEGER, K., HELD, D., and MIERENDORF, R. (2002). Coexpression of multiple target proteins in *E. coli*. *in* *Novations* **15**: 2-6.
- OLSEN, D.B., HEPBURN, T.W., MOOS, M., MARIANO, P.S., and DUNAWAY-MARIANO, D. (1988). Investigation of the *Bacillus cereus* phosphonoacetaldehyde hydrolase. Evidence for a Schiff base mechanism and sequence analysis of an active-site peptide containing the catalytic lysine residue. *Biochemistry* **27**: 2229-2234.
- PANG, S.S., DUGGLEBY, R.G., and GUDDAT, L.W. (2002). Crystal structure of yeast acetohydroxyacid synthase: a target for herbicidal inhibitors. *J. Mol. Biol.* **317**: 249-262.
- PANG, S.S., DUGGLEBY, R.G., SCHOWEN, R.L., and GUDDAT, L.W. (2004). The crystal structures of *Klebsiella pneumoniae* acetolactate synthase with enzyme-bound cofactor and with an unusual intermediate. *J. Biol. Chem.* **279**: 2242-2253.
- PATEL, S.S., BALFOUR, J.A., and BRYSON, H.M. (1997). Fosfomycin tromethamine. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy as a single-dose oral treatment for acute uncomplicated lower urinary tract infections. *Drugs* **53**: 637-656.
- PITTARD, A.J. (1996). Biosynthesis of the aromatic amino acids. In *Escherichia coli and Salmonella. Cellular and molecular biology*. F.C. Neidhardt, ed. (ASM Press, Washington, D.C.) 458-484.
- PLETCHER, J., and SAX, M. (1972). Crystal and molecular structure of thiamine pyrophosphate hydrochloride. *J. Am. Chem. Soc.* **94**: 3998-4005.
- POHL, M. (1997). Protein design on pyruvate decarboxylase (PDC) by site-directed mutagenesis. Application to mechanistical investigations, and tailoring PDC for the use in organic synthesis. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **58**: 15-43.
- POHL, M., LINGEN, B., and MÜLLER, M. (2002). Thiamin-diphosphate-dependent enzymes: new aspects of asymmetric C-C bond formation. *Chem. Eur. J.* **8**: 5288-5295.
- POHL, M., SPRENGER, G.A., and MÜLLER, M. (2004). A new perspective on thiamine catalysis. *Curr. Opin. Biotechnol.* **15**: 335-342.
- POLLACK, S.J., FREEMAN, S., POMPLIANO, D.L., and KNOWLES, J.R. (1992). Cloning, overexpression and mechanistic studies of carboxyphosphonoenolpyruvate mutase from *Streptomyces hygroscopicus*. *Eur. J. Biochem.* **209**: 735-743.

- POLOVNIKOVA, E.S., MCLEISH, M.J., SERGIENKO, E.A., BURGNER, J.T., ANDERSON, N.L., BERA, A.K., JORDAN, F., KENYON, G.L., and HASSON, M.S. (2003). Structural and kinetic analysis of catalysis by a thiamin diphosphate-dependent enzyme, benzoylformate decarboxylase. *Biochemistry* **42**: 1820-1830.
- POSTMA, P.W., LENGELER, J.W., and JACOBSON, G.R. (1996). Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems. In *Escherichia coli and Salmonella. Cellular and Molecular Biology*. F.C. Neidhardt, ed. (ASM Press, Washington, D.C.) 1149-1174.
- REYNEN, M., and SAHM, H. (1988). Comparison of the structural genes for pyruvate decarboxylase in different *Zymomonas mobilis* strains. *J. Bacteriol.* **170**: 3310-3313.
- RODRIGUEZ-QUINONES, F., and BENEDI, V.J. (1993). *Escherichia coli* strain DH5 α is a suitable host for the study of *phoA* insertions. *Focus* **15**: 110-112.
- ROSCHKE, B., BREUER, M., HAUER, B., and ROGERS, P.L. (2004). Biphasic aqueous/organic biotransformation of acetaldehyde and benzaldehyde by *Zymomonas mobilis* pyruvate decarboxylase. *Biotechnol. Bioeng.* **86**: 788-794.
- ROSENBERG, A.H., GOLDMAN, E., DUNN, J.J., STUDIER, F.W., and ZUBAY, G. (1993). Effects of consecutive AGG codons on translation in *Escherichia coli*, demonstrated with a versatile codon test system. *J. Bacteriol.* **175**: 716-722.
- ROUSSEL, A., MILED, N., BERTI-DUPUIS, L., RIVIERE, M., SPINELLI, S., BERNA, P., GRUBER, V., VERGER, R., and CAMBILLAU, C. (2002). Crystal structure of the open form of dog gastric lipase in complex with a phosphonate inhibitor. *J. Biol. Chem.* **277**: 2266-2274.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., and MANIATIS, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold-Spring-Harbor, New York).
- SANGER, F., NICKLEN, S., and COULSON, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.
- SANLI, G., BLABER, S.I., and BLABER, M. (2001). Reduction of wobble-position GC bases in *Corynebacteria* genes and enhancement of PCR and heterologous expression. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **3**: 123-126.
- SARKAR, M., HAMILTON, C.J., and FAIRLAMB, A.H. (2003). Properties of phosphoenolpyruvate mutase, the first enzyme in the aminoethylphosphonate biosynthetic pathway in *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.* **278**: 22703-22708.
- SHELLENBERGER, A. (1967). Struktur und Wirkungsweise des aktiven Zentrums der Hefe-Pyruvat-Decarboxylase. *Angew. Chem.* **79**: 1050-1061.
- SCHENK, G., LEEPER, F.J., ENGLAND, R., NIXON, P.F., and DUGGLEBY, R.G. (1997). The role of His113 and His114 in pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis*. *Eur. J. Biochem.* **248**: 63-71.
- SCHMID, J., and AMRHEIN, N. (1995). Molecular organization of the shikimate pathway in higher plants. *Phytochemistry* **39**: 737-749.

- SCHÖRKEN, U., and SPRENGER, G.A.** (1998). Thiamin-dependent enzymes as catalysts in chemoenzymatic syntheses. *Biochim. Biophys. Acta* **1385**: 229-243.
- SCHÜRMANN, M.** (2001). 1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat Synthase von *Escherichia coli*: Biochemische Charakterisierung und Struktur-Funktionsbeziehungen. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Jül-3904.
- SCHÜRMANN, M., SCHÜRMANN, M., and SPRENGER, G.A.** (2002). Fructose 6-phosphate aldolase and 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase from *Escherichia coli* as tools in enzymatic synthesis of 1-deoxysugars. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **19-20**: 247-252.
- SCHÜTZ, A., SANDALOVA, T., RICAGNO, S., HÜBNER, G., KÖNIG, S., and SCHNEIDER, G.** (2003). Crystal structure of thiamindiphosphate-dependent indolepyruvate decarboxylase from *Enterobacter cloacae*, an enzyme involved in the biosynthesis of the plant hormone indole-3-acetic acid. *Eur. J. Biochem.* **270**: 2312-2321.
- SCHWARTZ, D., BERGER, S., HEINZELMANN, E., MUSCHKO, K., WELZEL, K., and WOHLLEBEN, W.** (2004). Biosynthetic gene cluster of the herbicide phosphinothricin tripeptide from *Streptomyces viridochromogenes* Tü494. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 7093-7102.
- SCHWARTZ, D., RECKTENWALD, J., PELZER, S., and WOHLLEBEN, W.** (1998). Isolation and characterization of the PEP-phosphomutase and the phosphonopyruvate decarboxylase genes from the phosphinothricin tripeptide producer *Streptomyces viridochromogenes* Tü494. *FEMS Microbiol. Lett.* **163**: 149-157.
- SCHWENDER, J., MÜLLER, C., ZEIDLER, J., and LICHTENTHALER, H.K.** (1999). Cloning and heterologous expression of a cDNA encoding 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* **455**: 140-144.
- SECKLER, R., and JAENICKE, R.** (1992). Protein folding and protein refolding. *The FASEB Journal* **6**: 2545-2552.
- SEDEWITZ, B., SCHLEIFER, K.H., and GÖTZ, F.** (1984a). Physiological role of pyruvate oxidase in the aerobic metabolism of *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.* **160**: 462-465.
- SEDEWITZ, B., SCHLEIFER, K.H., and GÖTZ, F.** (1984b). Purification and biochemical characterization of pyruvate oxidase from *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.* **160**: 273-278.
- SEIDEL, H.M., POMPLIANO, D.L., and KNOWLES, J.R.** (1992). Phosphonate biosynthesis: molecular cloning of the gene for phosphoenolpyruvate mutase from *Tetrahymena pyriformis* and overexpression of the gene product in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **31**: 2598-2608.
- SETO, H., and KUZUYAMA, T.** (1999). Bioactive natural products with carbon-phosphorus bonds and their biosynthesis. *Nat. Prod. Rep.* **16**: 589-596.
- SEVOSTYANOVA, I.A., SOLOVJEVA, O.N., and KOCHETOV, G.A.** (2004). A hitherto unknown transketolase-catalyzed reaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **313**: 771-774.

- SILVAGGI, N.R., ANDERSON, J.W., BRINSMADE, S.R., PRATT, R.F., and KELLY, J.A. (2003). The crystal structure of phosphonate-inhibited D-Ala-D-Ala peptidase reveals an analogue of a tetrahedral transition state. *Biochemistry* **42**: 1199-1208.
- SPRENGER, G.A., and POHL, M. (1999). Synthetic potential of thiamin diphosphate-dependent enzymes. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **6**: 145-159.
- SPRENGER, G.A., SCHÖRKEN, U., SPRENGER, G., and SAHM, H. (1995a). Transaldolase B of *Escherichia coli* K-12: cloning of its gene, *talB*, and characterization of the enzyme from recombinant strains. *J. Bacteriol.* **177**: 5930-5936.
- SPRENGER, G.A., SCHÖRKEN, U., SPRENGER, G., and SAHM, H. (1995b). Transketolase A of *Escherichia coli* K12. Purification and properties of the enzyme from recombinant strains. *Eur. J. Biochem.* **230**: 525-532.
- SPRENGER, G.A., SCHÖRKEN, U., WIEGERT, T., GROLLE, S., DE GRAAF, A.A., TAYLOR, S.V., BEGLEY, T.P., BRINGER-MEYER, S., and SAHM, H. (1997). Identification of a thiamin-dependent synthase in *Escherichia coli* required for the formation of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate precursor to isoprenoids, thiamin, and pyridoxol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 12857-12862.
- STEPHENS, P.E., DARLISON, M.G., LEWIS, H.M., and GUEST, J.R. (1983). The pyruvate dehydrogenase complex of *Escherichia coli* K12. Nucleotide sequence encoding the pyruvate dehydrogenase component. *Eur. J. Biochem.* **133**: 155-162.
- STUDIER, F.W. (1991). Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *J. Mol. Biol.* **219**: 37-44.
- STUDIER, F.W., and MOFFATT, B.A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**: 113-130.
- TAKAHASHI, S., KUZUYAMA, T., WATANABE, H., and SETO, H. (1998). A 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase catalyzing the formation of 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate in an alternative nonmevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 9879-9884.
- TANAKA, S., LERNER, S.A., and LIN, E.C. (1967). Replacement of a phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase by a nicotinamide adenine dinucleotide-linked dehydrogenase for the utilization of mannitol. *J. Bacteriol.* **93**: 642-648.
- TERNAN, N.G., and QUINN, J.P. (1998). *In vitro* cleavage of the carbon-phosphorus bond of phosphonopyruvate by cell extracts of an environmental *Burkholderia cepacia* isolate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **248**: 378-381.
- TERNAN, N.G., MCGRATH, J.W., and QUINN, J.P. (1998). Phosphoenolpyruvate phosphomutase activity in an L-phosphonoalanine-mineralizing strain of *Burkholderia cepacia*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 2291-2294.
- TITTMANN, K., GOLBIK, R., GHISLA, S., and HÜBNER, G. (2000). Mechanism of elementary catalytic steps of pyruvate oxidase from *Lactobacillus plantarum*. *Biochemistry* **39**: 10747-10754.

- TITTMANN, K., GOLBIK, R., UHLEMANN, K., KHAILOVA, L., SCHNEIDER, G., PATEL, M., JORDAN, F., CHIPMAN, D.M., DUGGLEBY, R.G., and HÜBNER, G. (2003). NMR analysis of covalent intermediates in thiamin diphosphate enzymes. *Biochemistry* **42**: 7885-7891.
- WACKETT, L.P., SHAMES, S.L., VENDITTI, C.P., and WALSH, C.T. (1987a). Bacterial carbon-phosphorus lyase: products, rates, and regulation of phosphonic and phosphinic acid metabolism. *J. Bacteriol.* **169**: 710-717.
- WACKETT, L.P., WANNER, B.L., VENDITTI, C.P., and WALSH, C.T. (1987b). Involvement of the phosphate regulon and the *psiD* locus in carbon-phosphorus lyase activity of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **169**: 1753-1756.
- WANKE, C., FALCHETTO, R., and AMRHEIN, N. (1992). The UDP-*N*-acetylglucosamine 1-carboxyvinyl-transferase of *Enterobacter cloacae*. Molecular cloning, sequencing of the gene and overexpression of the enzyme. *FEBS Lett.* **301**: 271-276.
- WEISS, P.M., GARCIA, G.A., KENYON, G.L., CLELAND, W.W., and COOK, P.F. (1988). Kinetics and mechanism of benzoylformate decarboxylase using ^{13}C and solvent deuterium isotope effects on benzoylformate and benzoylformate analogues. *Biochemistry* **27**: 2197-2205.
- WIKNER, C., NILSSON, U., MESHALKINA, L., UDEKWU, C., LINDQVIST, Y., and SCHNEIDER, G. (1997). Identification of catalytically important residues in yeast transketolase. *Biochemistry* **36**: 15643-15649.
- ZHANG, G., ALLEN, K.N., and DUNAWAY-MARIANO, D. (2003a). Enzymatic synthesis of radiolabeled phosphonoacetaldehyde. *Anal. Biochem.* **322**: 233-237.
- ZHANG, G., DAI, J., LU, Z., and DUNAWAY-MARIANO, D. (2003b). The phosphonopyruvate decarboxylase from *Bacteroides fragilis*. *J. Biol. Chem.* **278**: 41302-41308.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biotechnologie 1 des Forschungszentrums Jülich angefertigt.

Zuallererst danke ich Herrn Prof. Dr. G. A. Sprenger für die Überlassung des Themas, für seine stetige Diskussionsbereitschaft sowie für die wertvollen Ratschläge und Anregungen, die maßgeblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. K.-E. Jaeger danke ich für die freundliche Übernahme des 1. Korreferates.

Herrn Prof. Dr. H. Sahm danke ich für die freundliche Übernahme des 2. Korreferates, für die sehr guten Arbeitsbedingungen und für sein Interesse am Fortgang der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Michael Müller und Frau PD Dr. Martina Pohl danke ich für die vielen aufschlussreichen Gespräche, Anregungen und Ratschläge.

Außerdem danke ich Prof. Dr. Michael Müller sowie Lydia Walter und Dr. Anabel Cosp für die fortwährende Phosphonopyruvat-Synthese und PD Dr. Martina Pohl für die Bereitstellung des Muteins PDCW392M aus *Zymomonas mobilis*.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. W. Wohlleben und Frau Prof. Dr. D. Dunaway-Mariano für die Überlassung der klonierten Gene der Phosphonopyruvat-Decarboxylase aus *Streptomyces viridochromogenes* Tü494 und der Phosphoenolpyruvat-Phosphomutase aus *Mytilus edulis*, Herrn Prof. Dr. K.-E. Jaeger für die Bereitstellung des *Pseudomonas putida*-Stammes KT2440 und Herrn Prof. Dr. G. Schneider für die durchgeführten Kristallisationsexperimente.

Mein herzlicher Dank gilt meinen Labornachbar(inne)n Britta Anderlei, Natascha Blaudeck, Peter Kreutzenbeck und Marcel Merfort für die sehr gute und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und die immer große Hilfsbereitschaft.

Des Weiteren möchte ich mich bei Mauro Blanco, Ulli Degner, Sonja Hartmann, Tomoyuki Inoue, Stefan Kozak, Martin und Melanie Schürmann aus der ehemaligen Arbeitsgruppe Sprenger sowie Christoph Bremus, Ute Herrmann, Mark Fellmann, Tobias Georgi, Verena Werner, Michael Caspers und Daniel Meissner für die ständige Hilfsbereitschaft und die sehr gute Arbeitsatmosphäre im Labor- und Büroalltag bedanken.

Allen Mitarbeitern der Institute für Biotechnologie 1 und 2, insbesondere Silke Bode, Anabel Cosp, Pascal Dünkemann, Simon Esser, Petra Geilenkirchen, Christoph Grondal, Wolfgang Hüttel, Loni Kraus, Volker Lorbach, Marc Reimann, Lydia Walter und Klaus Wertz aus der ehemaligen Arbeitsgruppe Müller, danke ich für die ständige Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Mann Christoph, der mir mit viel Verständnis, großer Geduld und Unterstützung immer zur Seite gestanden hat.

Ebenso herzlich danke ich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, die mich während meiner Ausbildung in jeglicher Hinsicht unterstützt haben.

Diese Arbeit wurde durch Mittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft im Rahmen des Sonderforschungsbereiches 380 (Asymmetrische Synthesen mit chemischen und biologischen Methoden) gefördert.

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Jülich, März 2005

1. **Toxizitätsprüfungen in Zellkulturen für eine Vorhersage der akuten Toxizität (LD50) zur Einsparung von Tierversuchen**
von W. Halle (1998), 92 Seiten
ISBN: 3-89336-221-5
2. **Die Rolle der Reaktionstechnik in der mikrobiellen Verfahrensentwicklung**
von D. Weuster-Botz (1999), II, 320 Seiten
ISBN: 3-89336-245-2
3. **Cell Culture Models as Alternatives to Animal Experimentation for the Testing of Neuroprotective Compounds in Stroke Research**
Practical Handbook of Methods
edited by A. J. Carter, H. Kettenmann (1999), 144 pages
ISBN: 3-89336-250-9
4. **Action and Visuo-Spatial Attention**
Neurobiological Bases and Disorders
Book of Abstracts
collected by P. H. Weiss (2000), XIV, 56 pages
ISBN: 3-89336-272-X
5. **Genomweite Genexpressionsanalysen mit DNA-Chips zur Charakterisierung des Glucose-Überflussmetabolismus von *Escherichia coli***
von T. Polen (2003), 100 Seiten
ISBN: 3-89336-337-8
6. **Auslegung des Detektorsystems für einen hochauflösenden Positronen-Emissions-Tomographen mit hoher Sensitivität**
von U. Heinrichs (2003), IV, 238 Seiten
ISBN: 3-89336-340-8
7. **Biological Principles Applied to Technical Asymmetric Catalysis**
by A. Liese (2003), VI, 206 pages
ISBN: 3-89336-344-0
8. **Designstudie eines μ CT-Zusatzes für einen hochauflösenden Positronen-Emissions-Tomographen: Beispiel für ein multimodales bildgebendes System**
von M. Khodaverdi (2004), III, 162 Seiten
ISBN: 3-89336-360-2
9. **Bioprocess Development for the Generation of Monocyte-Derived Dendritic Cells: Applicability in Breast Cancer Immunotherapy**
by H.R. Bohnenkamp (2004), XLII, 128 pages
ISBN: 3-89336-364-5

10. **Regulation der *clp*-Genexpression durch ClgR und Definition des ClgR-Regulons aus *Corynebacterium glutamicum***
by S. Engels (2004), V, 125 pages
ISBN: 3-89336-379-3
11. **Metabolomanalyse zur Untersuchung der Dynamik im Aromatenbiosyntheseweg in L-Phenylalanin Produzenten von *Escherichia coli***
by M. Oldiges (2005), XVI, 181 pages
ISBN: 3-89336-380-7
12. **Identifizierung und Charakterisierung eines Transkriptionsregulators der Aconitase von *Corynebacterium glutamicum***
by A. Krug (2005), VI, 122 pages
ISBN: 3-89336-382-3
13. **Prozessentwicklung der elektroenzymatischen Sulfoxidation mit Chloroperoxidase**
by S. Lütz (2005), XIV, 178 pages
ISBN: 3-89336-387-4
14. **Export von Proteinen mit Zwillingsarginin-Signalsequenzen über den Tat-Weg in *Escherichia coli***
by P. J. Kreutzenbeck (2005), 118 pages
ISBN: 3-89336-388-2
15. **Untersuchungen zur Fettsäure- und Zellwandsynthese sowie zur Glutamatbildung mit *Corynebacterium glutamicum***
by E. Radmacher (2005), 130 pages
ISBN: 3-89336-389-0
16. **Monomodale und multimodale Registrierung von autoradiographischen und histologischen Bilddaten**
by A. Vieten (2005), 116 pages
ISBN: 3-89336-390-4
17. **Biosynthese von Phosphonaten: Charakterisierung des rekombinanten Enzyms Phosphonopyruvat-Decarboxylase aus *Streptomyces viridochromogenes* Tü494**
von S. Johnen (2005), ca. 140 Seiten
ISBN: 3-89336-400-5

Forschungszentrum Jülich
in der Helmholtz-Gemeinschaft



Band / Volume 17
ISBN 3-89336-400-5

Lebenswissenschaften
Life Sciences