

ENZYM-SUBSTRATKOMPLEXE DER QUINAT-DEHYDROGENASE
AUS *CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM*
—
STRUKTUREN, KATALYSE UND SPEZIFITÄTEN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Astrid Höppner
aus Bergisch Gladbach

Köln 2008

Berichtersteller:

Prof. Dr. Dietmar Schomburg

Prof. Dr. Günter Schwarz

Tag der letzten mündlichen Prüfung:

26. Juni 2008

Abkürzungsverzeichnis	1
I. Einleitung	3
I.1. <i>Corynebacterium glutamicum</i>	3
I.2. Der Shikimat-Stoffwechsel	4
I.2.1. Enzyme und Reaktionen des Shikimatstoffwechsels	4
I.2.2. Verbreitung und Bedeutung des Shikimat-Stoffwechsels	10
I.3. Synthesewege ausgehend von Chorismat	11
I.4. Verzweigungen des Shikimat-Stoffwechsels	12
I.4.1. Der Quinat-Stoffwechsel	13
I.4.2. Gene und Regulation des Quinat-Stoffwechsels	16
I.5. Übersicht der Shikimat-Dehydrogenasen	19
I.6. Übersicht der Quinat-Dehydrogenasen	22
I.7. Zielsetzung der Arbeit	25
II. Material und Methoden	26
II.1. Chemikalien, Materialien und Geräte mit Bezugsquellen	26
II.1.1. Chemikalien	26
II.1.2. Molekulargewichtsstandards	27
II.1.3. Plasmide	27
II.1.4. <i>E. coli</i> -Stämme	27
II.1.5. Enzyme	27
II.1.6. Membranen, Filter, Säulen, Kits, sonstige Materialien	27
II.1.7. Geräte und EDV-Systeme	28
II.1.8. Computerprogramme	29
II.2. Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen mit RbCl	29
II.3. Präparation von DNA	30

II.3.1. Transformation der Plasmid-DNA in <i>E. coli</i> -DH5 α - bzw. BL21(DE3)-Zellen	30
II.3.2. Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> -DH5 α -Zellen	30
II.3.3. DNA-Sequenzierung	30
II.4. Protein-Präparation	31
II.4.1. Proteinexpression	31
II.4.2. Reinigung der Quinat-Dehydrogenase	31
II.4.3. Konzentrierung und Umpufferung der Quinat-Dehydrogenase	32
II.4.4. Abspaltung des N-terminalen His ₆ -tags	32
II.4.5. Proteinanalytik	32
II.4.5.1. Proteinbestimmung nach Bradford	32
II.4.5.2. Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	32
II.4.5.3. Berechnung der Molekulargewichte	33
II.4.6. ESI-Massenspektrometrie	33
II.5. Enzymkinetik	33
II.5.1. Standardbedingungen	33
II.5.2. Bestimmung des pH-Optimums	35
II.5.3. Bestimmung der kinetischen Parameter	35
II.5.3.1. Kinetischen Parameter der Substrate Quinat und Shikimat	35
II.5.3.2. Kinetischen Parameter der Cosubstrate NAD ⁺ und NADP ⁺	36
II.6. Kristallisation	36
II.6.1. Cokristallisation der Quinat-Dehydrogenase mit NAD ⁺	36
II.6.2. Cokristallisation der Quinat-Dehydrogenase mit Quinat und NADH	37
II.6.3. Cokristallisation der Quinat-Dehydrogenase mit Shikimat und NADH	37
II.7. Röntgendiffraktometrie	38
II.7.1. Kristallvorbereitung und –montage	38
II.7.2. Diffraktionsexperimente	38
II.7.2.1. Komplexkristalle der Quinat-Dehydrogenase mit NAD ⁺	39
II.7.2.2. Komplexkristalle der Quinat-Dehydrogenase mit Quinat und NADH	39
II.7.2.3. Komplexkristalle der Quinat-Dehydrogenase mit Shikimat und NADH	40

II.8. Datenreduktion	41
II.9. Strukturlösung, Modellbau und Verfeinerung der QDH-Komplexe	41
II.9.1. Quinat-Dehydrogenase mit NAD ⁺	41
II.9.2. Quinat-Dehydrogenase mit Quinat und NADH	42
II.9.3. Quinat-Dehydrogenase mit Shikimat und NADH	42
II.10. Analyse der Strukturmodelle	43
II.11. Abbildungen der Strukturmodelle	43
III. Ergebnisse	44
III.1. Expression und Reinigung der Quinat-Dehydrogenase aus <i>Corynebacterium glutamicum</i>	44
III.2. Entfernung des N-terminalen His ₆ -tags der Quinat-Dehydrogenase	45
III.3. Enzymkinetik	46
III.3.1. pH-Optimum der Quinat-Dehydrogenase	47
III.3.2. Kinetische Parameter der Quinat-Dehydrogenase	47
III.4. Kristallisation der Quinat-Dehydrogenase	51
III.4.1. Cokristallisation der Quinat-Dehydrogenase mit NAD ⁺	52
III.4.2. Cokristallisation der Quinat-Dehydrogenase mit Quinat und NADH sowie mit Shikimat und NADH	52
III.5. Diffraktionsmessungen	53
III.5.1. Diffraktionsmessung der QDH im Komplex mit NAD ⁺	53
III.5.2. Diffraktionsmessung der QDH im Komplex mit Quinat und NADH	55
III.5.3. Diffraktionsmessung der QDH im Komplex mit Shikimat und NADH	56
III.6. Kristallpackung	58
III.7. Strukturlösung und Verfeinerung	58
III.8. Qualität der Strukturmodelle	59
III.9. Tertiärstruktur der QDH	65
III.10. Konformationsänderungen der tertiären Struktur nach Cofaktor und Substrat-Bindung	67
III.10.1. Cofaktor-Bindung	67
III.10.2. Substrat-Bindung	69

III.11. Das aktive Zentrum	72
III.11.1. Bindung des Cofaktors NAD ⁺	72
III.11.2. Bindung des Substrats Quinat	74
III.11.3. Bindung des Substrats Shikimat	77
III.11.4. Unterschiedliche Bindung der Substrate Quinat und Shikimat	78
IV. Diskussion	80
IV.1. Enzymkinetische Charakterisierung der Quinat-Dehydrogenase aus <i>Corynebacterium glutamicum</i>	80
IV.1.1. Substrat- und Cosubstratverwendung	80
IV.1.2. Vergleich der QDH aus <i>C. glutamicum</i> mit QDHs und SDHs aus anderen Organismen	82
IV.1.3. Klassifizierung der QDH	84
IV.2. Tertiär- und Quartärstruktur der QDH im Vergleich mit verwandten Enzymen	84
IV.2.1. Offene oder geschlossenen Konformation?	88
IV.3. Das katalytische Zentrum	99
IV.3.1. Die Substrat- und Cofaktor-Bindung und -Spezifität	102
IV.3.2. Postulierter Katalysemechanismus	110
IV.4. Zusammenfassung	114
V. Literaturverzeichnis	116
VI. Anhang	130
VI.1. Kurzzusammenfassung	130
VI.2. Abstract	131
VI.3. Abbildungsverzeichnis	132
VI.4. Tabellenverzeichnis	137
VI.5. Lebenslauf	138
VI.6. Erklärung	139
VI.7. Danksagung	140

α , β , γ : Winkel zwischen den Gitterachsen	M: Mol, molar
$\sigma(I)$: Standardabweichung der Intensität	mA: Milliampere
λ : Wellenlänge	MG: Molekulargewicht
Å: Ångström	min: Minute
a, b, c: Gittervektoren im realen Raum	mRNA: messenger Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
Abb.: Abbildung	NAD ⁺ : Nicotinsäureamid-Adenin- Dinukleotid, oxidierte Form
AHBA: 3-Amino-5-hydroxybenzoesäure	NADH: Nicotinsäureamid-Adenin- Dinukleotid, reduzierte Form
AS: Aminosäure(n)	NADP ⁺ : Nicotinsäureamid-Adenin-Di- nukleotid-Phosphat, oxidierte Form
ATCC: American Type Culture Collection	NADPH: Nicotinsäureamid-Adenin- Dinukleotid-Phosphat, reduzierte Form
AU: asymmetrische Einheit der Elementar- zelle eines Kristalls	Ni ²⁺ -NTA: Nickel-Nitrilotriacetylsäure
Bp: Basenpaare	nm: Nanometer
BSA: bovine serum albumin, Rinder- serumalbumin	OD ₆₀₀ : optische Dichte bei 600 nm
°C: Grad Celsius	PAGE: Polyacrylamidgelelektrophorese
DAHP: 3-Deoxy-D- <i>arabino</i> -heptulosonat-7- phosphat	pdb: Proteindatenbank
DESY: Deutsches Elektronensynchrotron	PEP: Phosphoenolpyruvat
DHQ: 3-Dehydroquinat	pH: <i>pondus Hydrogenii</i>
DHS: 3-Dehydroshikimat	PQQ: Pyrroloquinolin-Quinon
DNA: Desoxyribonukleinsäure (Deoxyrib- nucleic acid)	R _{free} : freier R-Wert
E4P: Erythrose-4-phosphat	R _{sym} : linearer R-Wert
Eppi: Eppendorf-Reaktionsgefäß	R _{work} : R-Wert des Arbeitsdatensatzes
EMBL: European Molecular Laboratory	RMSD: mittlere quadratische Abweichung (root-mean-square-deviation)
EPSP: 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat	rpm: Umdrehungen pro Minute
et al.: et alii (und Weitere)	RT: Raumtemperatur (20 °C)
F _c : berechnete Strukturfaktoramplituden	[S]: Substratkonzentration
F _o : gemessene Strukturfaktoramplituden	S3P: Shikimat-3-phosphat
g: Gramm	SDS: Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulphate)
× g: mal Erdbeschleunigung	sec: Sekunde
h: Stunde	Tab.: Tabelle
H ₂ O _{bidest} : zweifach destilliertes Wasser	Tris: Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
H ₂ O _{dest} : destilliertes Wasser	ü.N.: über Nacht
His ₆ -tag: Hexahistidin-tag	V: Volt
I: Intensität	Vol.: Volumen
IPTG: Isopropyl-β-D-thiogalactosid	% (v/v): Volumenprozent (volume/volume)
K: Kelvin	% (w/v): volumenbezogenes Gewichtsprozent (weight/volume)
kb: Kilobasenpaare	
kDa: Kilodalton	
K _M : Michaelis-Konstante	
l: Liter	
LB: Luria-Bertani-Medium	

Organismen:

A. calcoaceticus: *Acinetobacter calcoaceticus*
A. aerogenes: *Aerobacter aerogenes*
A. aeolicus: *Aquifex aeolicus*
A. thaliana: *Arabidopsis thaliana*
A. nidulans: *Aspergillus nidulans*
A. niger: *Aspergillus niger*
C. diphtheriae: *Corynebacterium diphtheriae*
C. glutamicum: *Corynebacterium glutamicum*
C. fascians: *Corynebacterium fascians*
C. michiganese: *Corynebacterium michiganese*
C. poinsettiae: *Corynebacterium poinsettiae*
C. fascians: *Corynebacterium fascians*
E. coli: *Escherichia coli*
H. pylori: *Helicobacter pylori*
L. plantarum: *Lactobacillus plantarum*
M. tuberculosis: *Mycobacterium tuberculosis*
N. crassa: *Neurospora crassa*
P. aureus: *Phaseolus aureus*
P. mungo: *Phaseolus mungo*
P. sativum: *Pisum sativum*
P. aeruginosa: *Pseudomonas aeruginosa*
R. rhodochrous: *Rhodococcus rhodochrous*
S. cerevisiae: *Saccharomyces cerevisiae*
S. typhi: *Salmonella typhi*
S. oleracea: *Spinacia oleracea*
S. aureus: *Staphylococcus aureus*
S. pneumoniae: *Streptococcus pneumoniae*
S. coelicolor: *Streptomyces coelicolor*
T. thermophilus: *Thermus thermophilus*

Enzyme:

CS: Chorismat-Synthase
 DAHPS: 3-Deoxy-D-*arabino*-heptulosonat-7-phosphat-Synthase
 DHQD: 3-Dehydroquinat-Dehydratase
 DHQS: 3-Dehydroquinat-Synthase
 EPSPS: 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat-Synthase
 QDH: Quinat-Dehydrogenase
 SDH: Shikimat-Dehydrogenase
 SK: Shikimat-Kinase

vor Maßeinheiten:

k: Kilo
 m: milli ($\times 10^{-3}$)
 μ : mikro ($\times 10^{-6}$)
 n: nano ($\times 10^{-9}$)
 p: piko ($\times 10^{-12}$)

Aminosäuren:

Alanin	Ala	A
Cystein	Cys	C
Aspartat	Asp	D
Glutamat	Glu	E
Phenylalanin	Phe	F
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Lysin	Lys	K
Leucin	Leu	L
Methionin	Met	M
Asparagin	Asn	N
Prolin	Pro	P
Glutamin	Gln	Q
Arginin	Arg	R
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T

I. Einleitung

I.1. *Corynebacterium glutamicum*

Corynebacterium glutamicum (früher *Micrococcus glutamicus*) ist ein gram-positives, schnellwachsendes Bodenbakterium aus der Gruppe der mycolsäurehaltigen *Actinomycetales*. Es ist unbeweglich, bildet keine Sporen und zeichnet sich durch seine unregelmäßige stäbchen- bis keulenförmige Morphologie aus (*coryne*, griech. Keule).

Im Gegensatz zu verwandten Arten der Gattungen *Mycobacterium* und *Corynebacterium* wie den Human-, Tier- und Pflanzenpathogenen *C. diphtheriae*, *Mycobacterium leprae*, *M. tuberculosis*, *C. michiganese*, *C. poinsettiae* und *C. fascians* ist *Corynebacterium glutamicum* nicht-pathogen.

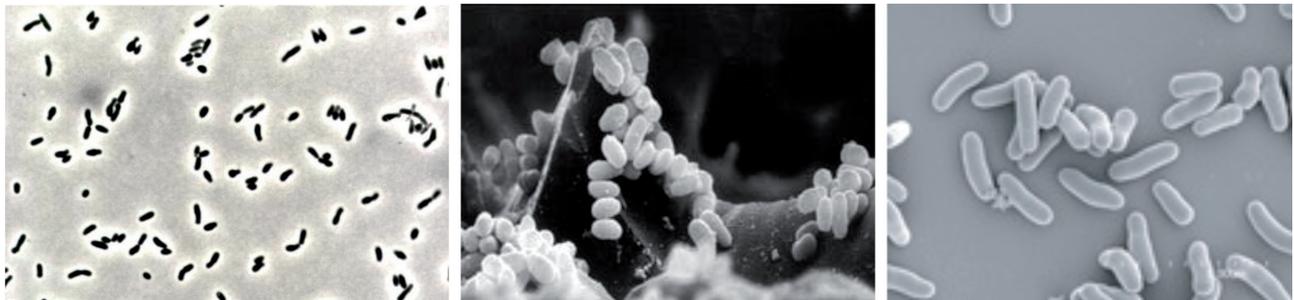


Abb. I.1.: Licht- und elektronenmikroskopische Aufnahmen von *Corynebacterium glutamicum*.

(Quellen: Federal Agriculture Research Centre (links), Forschungszentrum Jülich (Mitte), Research Institute of Innovative Technology for the Earth (rechts))

Mit der Entdeckung von *C. glutamicum* bei der Suche nach Glutamat-produzierenden Mikroorganismen 1956 in Japan durch Kinoshita wurde eine neue Epoche der Entwicklung industriell anwendbarer Prozesse eingeleitet (Kinoshita et al., 1957; Udaka, 1960). Neben der Isolierung z. B. aus Algen, konnte L-Glutamat fortan auch in großen Mengen fermentativ gewonnen werden. Glutamat wird vor allem als Geschmacksverstärker und als Futtermitteladditiv eingesetzt.

C. glutamicum setzt unter optimalen Bedingungen innerhalb weniger Tage Glucose in große Mengen L-Glutamat um. Derzeit werden mit Hilfe dieses Organismus jährlich über eine Millionen Tonnen dieser Aminosäure erzeugt (Sahm et al., 2000).

Des Weiteren wurden verschiedene Mutanten von *C. glutamicum* isoliert, die bedeutende Mengen anderer L-Aminosäuren produzieren. Beispielsweise werden heutzutage etwa 45000 t L-Lysin hergestellt, welches hauptsächlich als Futtermitteladditiv verwendet wird (Sahm et al., 2000, Kalinowski et al., 2003). Aber auch L-Tryptophan-, L-Tyrosin- und L-Phenylalanin-produzierende Mutanten von *C. glutamicum* sind beschrieben worden (Ikeda und Katsumata, 1992).

Seit 2003 ist das komplette Genom von *C. glutamicum* ATCC 13032 entschlüsselt (Ikeda und Nakagawa, 2003; Kalinowski et al., 2003). Es besteht aus einem einzigen ringförmigen Chromosom von ungefähr $3,3 \times 10^6$ bp. Durch automatisierte und manuelle Annotation konnten etwa 3000 Protein-codierende Gene identifiziert werden, von denen ungefähr 2500 eine Funktion bekannter homologer Proteine zugewiesen werden konnte.

Aufgrund dieser Genominformationen und der leichten Kultivierbarkeit von *C. glutamicum* hat sich daher dieser Organismus in der Grundlagenforschung etabliert. Zahlreiche Projekte im Bereich der Transkriptom-, Proteom- und Metabolomanalyse zielen darauf ab, die vollständige Funktionsweise einer Zelle verstehen zu können.

I.2. Der Shikimat-Stoffwechsel

Die aromatischen Metabolite Shikimat und Quinat sind in der Biosphäre sehr weit verbreitet, besonders in höheren Pflanzen.

Der Shikimat-Stoffwechsel verbindet den Kohlenhydratstoffwechsel mit der Biosynthese verschiedener aromatischer Komponenten, wie Quinonen, Folaten, Vitaminen, sekundären Pflanzenstoffen wie Lignin, Alkaloiden und Phenolen, und er ist der Biosyntheseweg für die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan. Etwa 20 % des in grünen Pflanzen fixierten Kohlenstoffs wird durch den Shikimat-Stoffwechsel geleitet (Kishore und Shaw, 1988; Herrmann, 1995a; Singh und Christendat, 2006).

Der Shikimatweg wurde in vielen Vertretern von Algen, Bakterien, Pilzen, höheren Pflanzen und Parasiten des Stammes Apicomplexa beschrieben, jedoch nicht in Säugetieren (Herrmann, 1995a; Roberts et al., 1998 und 2002).

Im Nachfolgenden werden die an den Stoffwechselwegen beteiligten Metabolite wie China- und Shikimisäure der Einfachheit halber nur noch als Salze (z. B. Quinat und Shikimat) bezeichnet.

I.2.1. Enzyme und Reaktionen des Shikimatstoffwechsels

Der Shikimatstoffwechsel umfasst sieben enzymatische Reaktionen und beginnt mit der Kondensation von Phosphoenolpyruvat (PEP) und Erythrose-4-phosphat (E4P) und endet mit der Synthese von Chorismat, welches der Vorläufer der drei aromatischen Aminosäuren und verschiedenen anderen aromatischen Komponenten des Primärstoffwechsels ist (Abb. I.2.1.1.). Diese drei Aminosäuren sind wiederum Vorstufen einer großen Anzahl pflanzlicher Sekundärmetabolite. Weiterhin dienen die Intermediate der Hauptreaktionen des Shikimat-Stoffwechsels als Ausgangsstoffe vieler Sekundärprodukte (Herrmann und Weaver, 1999).

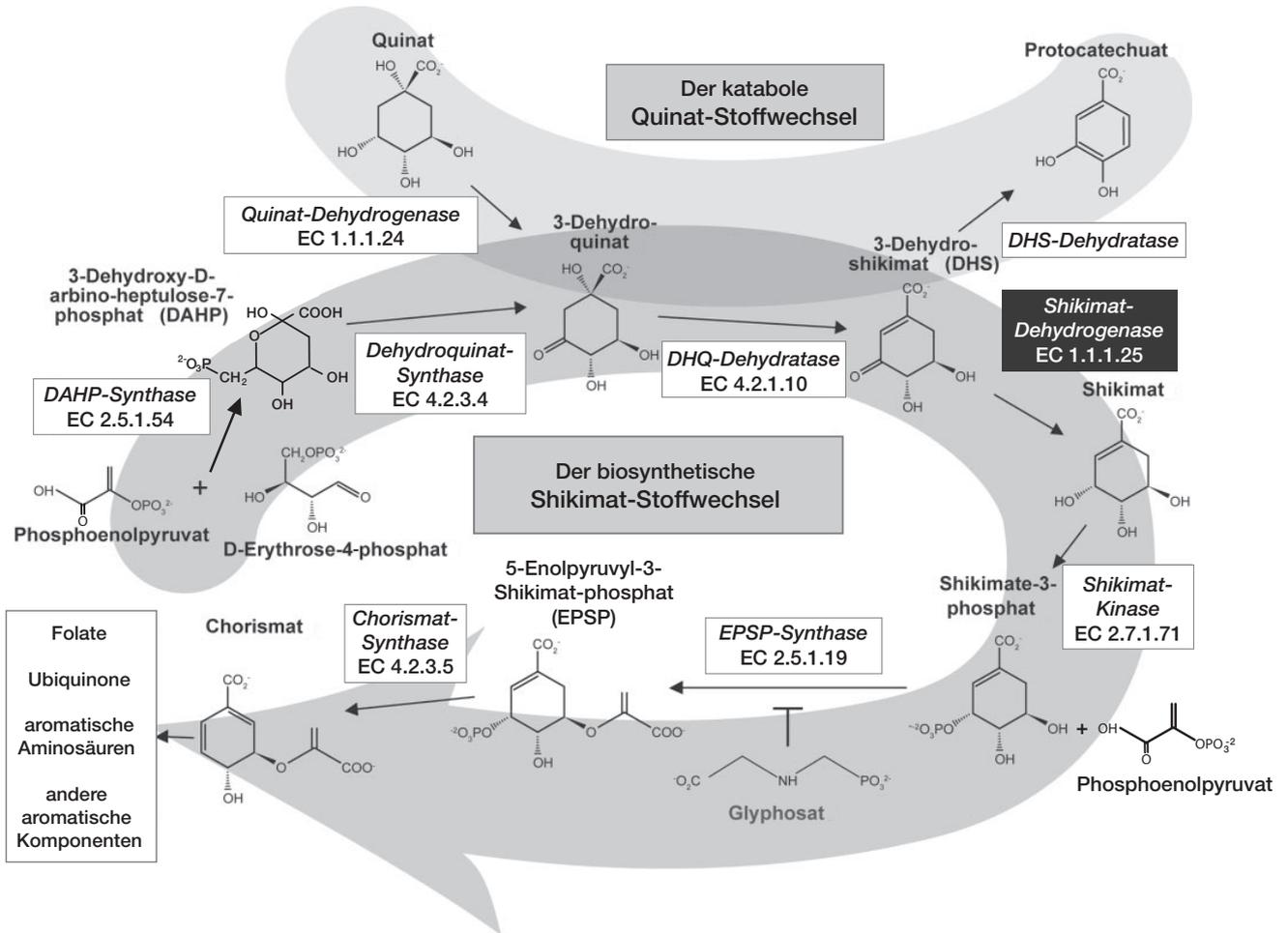
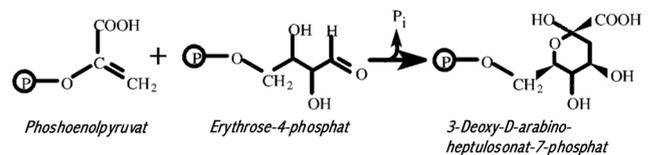


Abb. I.2.1.1.: Schematische Übersicht über die Reaktionen des biosynthetischen Shikimat-Stoffwechsels und seine Verzweigung zum katabolen Quinat-Stoffwechsel.

Weiterhin ist das Zielzym des Herbizids Glyphosat angegeben (Abb. nach Lindner et al., 2005).

3-Deoxy-D-arabino-heptulosonat-7-phosphat-Synthase (EC 2.5.1.54)

Der erste Schritt im Shikimatweg ist die Kondensation von Phosphoenolpyruvat (PEP) und Erythrose-4-phosphat (E4P) zu 3-Deoxy-D-arabino-heptulosonat-7-phosphat (DAHP) und Phosphat durch die 3-Deoxy-D-arabino-heptulosonat-7-phosphat-Synthase (DAHPS).



Dieses Enzym wurde in *E. coli* entdeckt und mittlerweile aus verschiedenen Mikroorganismen und Pflanzen gereinigt und beschrieben. Aufgrund von deutlichen Unterschieden in der Primärstruktur wurden die DAHPS in Typ I und Typ II eingeteilt.

Bakterien und Pilze besitzen mehrere DAHPS-Isoformen, die hinsichtlich ihrer Rückkopplungseffektoren unterschieden werden.

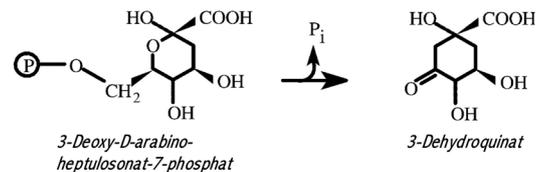
E. coli exprimiert drei durch Rückkopplung inhibierte Isoenzyme der DAHPS: eine Tyrosin-sensitive, eine Phenylalanin- und eine Tryptophan-sensitive DAHPS. Die zugehörigen Struktur-gene sind *aroF*, *aroG* und *aroH*. In anderen Mikroorganismen variiert die Anzahl der Isoenzyme und deren Sensitivität gegenüber diesen drei Aminosäuren (Ray und Bauerle, 1991; Herrmann, 1995a; Akowski und Bauerle, 1997).

Aus Kartoffeln und Tomaten sind zwei Isoformen dieses Enzyms beschrieben worden, aus *Arabidopsis* und *Morinda citrifolia* ebenfalls drei. Die pflanzlichen DAHPS, die N-terminal jeweils eine Plastiden-Import-Sequenz aufweisen, werden jedoch weder durch Aminosäuren inhibiert, noch konnte bislang überhaupt ein allosterischer Hemmstoff gefunden werden. Ihre Regulation scheint sich auf der genetischen Ebene abzuspielen (Herrmann, 1995b; Herrmann und Weaver, 1999).

Verschiedene Isoformen der DAHPS sind in den vergangenen Jahren strukturell aufgeklärt worden, die erste war die Phenylalanin-regulierte DAHP-Synthase aus *E. coli* (Shumilin et al., 1999).

3-Dehydroquinat-Synthase (EC 4.2.3.4)

Die zweite Reaktion im Shikimat-Stoffwechsel ist die Eliminierung von Phosphat von DAHP durch die 3-Dehydroquinat-Synthase (DHQS), aus der 3-Dehydroquinat (DHQ) hervorgeht. Diese Reaktion beinhaltet eine Oxidation, eine β -Eliminierung des Phosphats, eine Reduktion, eine Ringöffnung und eine intramolekulare Aldolkondensation. Die DHQS benötigt katalytische Mengen an NAD^+ , obwohl die stattfindende Reaktion redox-neutral ist (Herrmann und Weaver, 1999).



In *E. coli* wird die DHQS durch das Strukturgen *aroB* codiert.

Die pflanzliche DHQS aus Tomate weist wiederum eine N-terminale Plastiden-Import-Sequenz auf.

Im Vergleich zu Bakterien und Pflanzen werden in Pilzen die Reaktionen zwei bis sechs des Shikimatwegs durch ein Polypeptid katalysiert, das als multifunktionaler AROM-Komplex bezeichnet wird (Giles et al., 1967a; Ahmed und Giles, 1969). Das AROM-Protein aus *Aspergillus nidulans* und *Neurospora crassa* ist als Homodimer aktiv und wird im *arom*-Gencluster (bzw. vom *ARO1*-Gen in *Saccharomyces cerevisiae*; Graham et al., 1993) codiert (Abb. 1.2.1.2.).

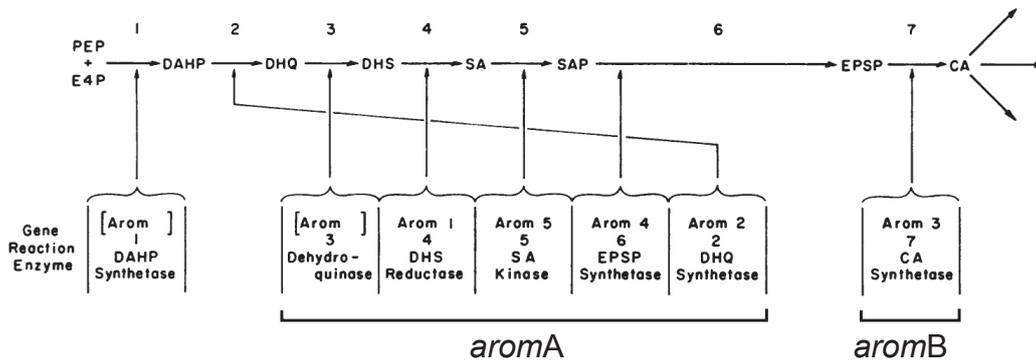


Abb. 1.2.1.2.: Schematische Übersicht des *arom*-Genclusters in *Neurospora crassa*.

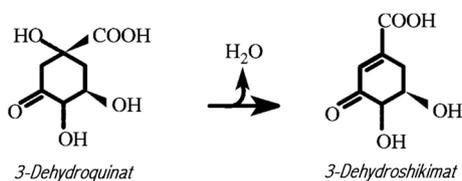
(Abb. nach Giles et al., 1967a und van den Hombergh, 1992)

Der pentafunktionale Multienzymkomplex aus *A. nidulans* weist zwei verschiedene Faltungs- und Funktionsdomänen auf: die N-terminale Hälfte besteht aus der DHQS und der EPSPS, der C-Terminus setzt sich aus der SK, der DHQD und der SDH zusammen (Hawkins und Smith, 1991). Dieser Gencluster wird mittels einer einzigen mRNA transkribiert.

Das vollständige AROM-Protein konnte aus *A. nidulans* und *S. cerevisiae* (Moore et al., 1992; Graham et al., 1993) isoliert werden, ebenso die Dehydroquinat-Synthase-Domäne aus *A. nidulans* (Moore et al., 1994; Carpenter et al., 1998; Park et al., 2004).

Im Jahre 1998 gelang es Carpenter et al., die DHQS-Domäne des AROM-Proteins aus *A. nidulans* strukturell aufzuklären. Es ist bis heute die einzig verfügbare Struktur dieses Enzyms.

3-Dehydroquinat-Dehydratase (EC 4.2.1.10) und die Shikimat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.25)



Der dritte Schritt des Shikimat-Stoffwechsels, die Dehydrierung von 3-Dehydroquinat zu 3-Dehydroshikimat (DHS), wird durch die 3-Dehydroquinat-Dehydratase (DHQD) katalysiert, die ebenfalls in zwei Formen unterteilt wird: Typ I und Typ II.

Die Typ-I-Dehydrogenasen katalysieren eine *syn*-Eliminierung von Wasser, die Typ-II-Dehydrogenasen hingegen eine *anti*-Eliminierung. Diese mechanistischen Unterschiede spiegeln sich in den Proteinstrukturen wieder: es bestehen keine Sequenzähnlichkeiten zwischen den Typ-I- und den Typ-II-Dehydrogenasen (Herrmann und Weaver, 1999).

Die von den Typ-I-Dehydrogenasen katalysierte Reaktion verläuft durch einen Schiff-Basen-Mechanismus über ein Imin-Intermediat, wohingegen bei den Typ-II-Dehydrogenasen kein Imin-

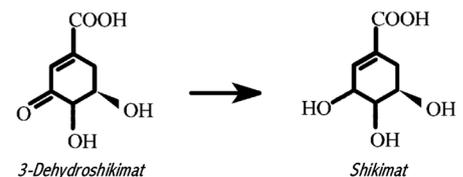
Intermediat auftritt, was die Bildung einer Schiff-Base ausschließt. In diesem Schritt wird die erste Doppelbindung eingeführt.

Einige Bakterien wie *E. coli* und *Salmonella typhi* verfügen über Typ-I-Enzyme, während andere Typ-II-Enzyme aufweisen (z. B. *Streptomyces coelicolor*, *M. tuberculosis*, *Helicobacter pylori*). In *E. coli* wird die Typ-I-DHQB durch das Strukturgen *aroD* codiert, bei *H. pylori* das Typ-II-Enzym durch *aroQ* (Bottomley et al., 1996).

Manche Pilze und das Bakterium *Acinetobacter calcoaceticus* besitzen beide Typen der Dehydratase. In diesen Fällen erfüllen diese Enzyme offenbar unterschiedliche Funktionen im anabolen und katabolen Metabolismus (Ahmed und Giles, 1969; Herrmann und Weaver, 1999).

Bislang wurden sowohl DHQ-Dehydratasen vom Typ I als auch vom Typ II strukturell aufgeklärt, die ersten Strukturen wurden 1999 veröffentlicht (Gourley et al., 1999).

Die vierte Reaktion im Stoffwechselweg ist die Reduktion von 3-Dehydroshikimat zu Shikimat. In *E. coli* wird diese Reaktion durch die NADP⁺-abhängige Shikimat-Dehydrogenase (SDH, Strukturgen *aroE*) katalysiert. Andere Mikroorganismen wie *A. calcoaceticus* besitzen eine Pyrrolo-Quinolinquinon-abhängige Dehydrogenase (Elsmore und Ornston, 1994).



Die erste Struktur einer NADP-abhängigen Shikimat-Dehydrogenase wurde 2003 von Michel et al. veröffentlicht.

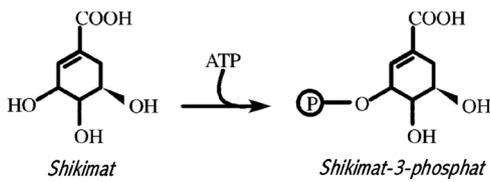
In Pflanzen erfolgen Schritt drei und vier durch eine bifunktionale Dehydroquinat-Dehydratase-Shikimat-Dehydrogenase (Fiedler und Schultz, 1985; Bonner und Jensen, 1994; Singh und Christendat, 2006 und 2007). Für das bifunktionale Enzym aus *Pisum sativum* konnte gezeigt werden, dass es sich bei der Dehydroquinat-Dehydratase um ein Typ-I-Enzym handelt (Deka et al., 1994).

Die von Singh und Christendat gelöste Struktur dieses bifunktionalen Enzyms aus *A. thaliana* ist bislang die einzige, die zur Verfügung steht.

Shikimat-Kinase (EC 2.7.1.71)

Im fünften Schritt des Shikimat-Stoffwechsels wird Shikimat durch die Shikimat-Kinase (SK) phosphoryliert und es entsteht Shikimat-3-phosphat (S3P).

E. coli besitzt zwei Isoenzyme der Shikimat-Kinase (Strukturgene *aroL* und *aroK*), wobei Isoenzym I aufgrund seines hohen K_M -Wertes für Shikimat offenbar kein Enzym des Shikimat-Stoffwechsels



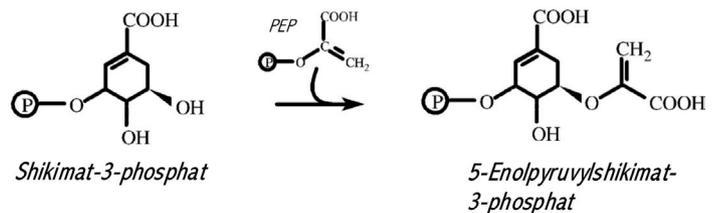
darstellt. Die Expression der Shikimat-Kinase II wird synergistisch durch den Tryptophan- und den Tyrosin-Repressor kontrolliert.

In Tomate wird die Shikimat-Kinase nur durch ein Gen codiert, wobei die entsprechende Aminosäuresequenz auch hier wiederum einen Plastiden-Import-Bereich aufweist (Herrmann und Weaver, 1999).

In den letzten 10 Jahren wurden zwar einige bakterielle Shikimat-Kinasen strukturell aufgeklärt, wobei die erste veröffentlichte Struktur die von einer Typ-II-Shikimat-Kinase aus *Erwinia chrysanthemi* war (Krell et al., 1998), jedoch bislang keine pflanzliche SK oder die entsprechende Domäne aus Pilzen.

5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat-Synthase (EC 2.5.1.19)

Die sechste Reaktion des Shikimat-Stoffwechsels, die Kondensation von Phosphoenolpyruvat und Shikimat-3-phosphat zu 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat (EPSP) unter Abspaltung von Pyrophosphat, wird von der 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat-Synthase (EPSPS) katalysiert.

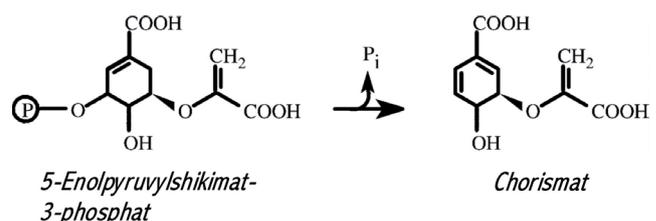


Im Vergleich zu Bakterien besitzen einige Pflanzen wie *Sorghum bicolor* und *Zea mays* zwei Isoenzyme der EPSPS. Alle bisher isolierten pflanzlichen EPSP-Synthasen enthalten eine Transit-Sequenz für den Plastiden-Import (Herrmann und Weaver, 1999).

Auch für dieses Enzym sind einige bakterielle Strukturen vorhanden (beispielsweise die EPSP-Synthase aus *E. coli* (Strukturgen *aroA*), Stallings et al., 1991), jedoch noch keine für ein pflanzliches Enzym oder die AROM-Domäne aus Pilzen.

Chorismat-Synthase (EC 4.2.3.5)

Der letzte Schritt des Shikimatwegs, der von der Chorismat-Synthase (CS) katalysiert wird, besteht aus einer trans-1,4-Eliminierung von Phosphat des EPSP, was zur Bildung von Chorismat führt. In dieser Reaktion wird die zweite Doppelbindung gebildet. Die Choris-



mat-Synthase benötigt für diese Reaktion reduziertes Flavin (FMNH₂) als Cofaktor, auch wenn die Gesamtreaktion redox-neutral ist. In dieser Hinsicht ist das Enzym ähnlich der DHQ-Synthase, dem zweiten Enzym des Shikimat-Stoffwechsels.

In *E. coli* und höheren Pflanzen liegt die Chorismat-Synthase monofunktional vor, während *N. crassa* und *Euglena gracilis* bifunktionale Enzyme besitzen (Herrmann und Weaver, 1999). Das zugehörige Strukturgen in *E. coli* ist *aroC*.

Die erste Chorismat-Synthase Struktur war die aus *Streptococcus pneumoniae* (Maclean und Ali, 2003), während inzwischen aber auch Strukturinformationen zum bifunktionalen Enzym vorliegen.

1.2.2. Verbreitung und Bedeutung des Shikimat-Stoffwechsels

Wie schon erwähnt wurde der Shikimatweg in vielen Vertretern von Algen, Bakterien, Pilzen, höheren Pflanzen und Parasiten des Stammes Apicomplexa beschrieben, jedoch nicht in Säugertieren (Herrmann, 1995a; Roberts et al., 1998 und 2002). Dennoch gibt es unter den genannten Organismen auch Ausnahmen: In *Trichophyton rubrum* beispielsweise konnte der Shikimat-Stoffwechsel ebenfalls nicht nachgewiesen werden (Zussman et al., 1970).

Einige der aromatischen Komponenten des Shikimat-Weges sind für diese Organismen lebenswichtig, so dass der Shikimat-Stoffwechsel ein attraktives Ziel für die Entwicklung antimikrobieller und herbizider Wirkstoffe darstellt.

Für jedes der beschriebenen Enzyme des Shikimat-Weges sind Untersuchungen durchgeführt worden mit dem Ziel, Inhibitoren und praktisch anwendbare antibakterielle und herbizide Agenzien zu finden. Dies gelang jedoch für einige Enzyme entweder nicht oder nur teilweise, während ein Wirkstoff, Glyphosat, seit Jahren kommerziell hergestellt und vertrieben wird.

Die DHQS aus Erbse beispielsweise konnte zwar durch ein Phosphonat-Analog (3,7-Dideoxy-D-*arabino*-heptulosonat-7-phosphat) des DAHPs inhibiert werden, jedoch zeigte es in *in-vivo*-Experimenten keine herbizide Wirkung (Kishore und Shaw, 1988).

Auch für die SDH aus Erbse konnten verschiedene Inhibitoren gefunden werden (3-Dehydroshikimat-Analoga), jedoch zeigten auch sie in *in-vivo*-Untersuchungen keine herbizide Wirkung (Baillie et al., 1972).

Han et al. fanden 2006 für die Shikimat-Dehydrogenase aus *H. pylori* drei verschiedene Inhibitoren, die aber nur eine leichte wachstumshemmende Wirkung auf den Organismus *in vitro* zeigten.

Durch Experimente mit fluorierten Derivaten der Shikimisäure konnte zwar sowohl die Chorismat-Synthase aus *E. coli* inhibiert, als auch eine antibakterielle Wirkung auf diesen Organismus nachgewiesen werden (Davies et al., 1994). Weiterhin ist das Substratanalogon (6S)-6-Fluoroshikimisäure beispielsweise bei Mäusen gegen einige Erreger wie *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylococcus aureus* wirksam, jedoch traten bei *E. coli* spontan resistente Mutanten auf, so dass dieser Stoff nicht als brauchbares antimikrobielles Mittel in Frage kommt (Davies et al., 1994).

Die EPSPS wurde als Target potentiell herbizider Agenzien bislang am besten untersucht. Das Herbizid Glyphosat (N-[phosphonomethyl]-glycin) beispielsweise verhindert die Umsetzung von Shikimisäure zu Anthranilsäure durch die Enolpyruvyl-Shikimat-3-phosphat-Synthase (EPSPS) (Steinrücken und Amrhein, 1980). Glyphosat wird unter dem Produktnamen Roundup® vom Chemiekonzern Monsanto vertrieben. Jedoch treten in Mikroorganismen und Pflanzen bisweilen Resistenzen gegenüber Glyphosat auf, entweder durch Überproduktion der EPSPS oder durch Expression einer Glyphosat-unempfindlichen EPSPS (Steinrücken und Amrhein, 1984; Kishore und Shaw, 1988).

Keine Hemmstoffe konnten bisher für die pflanzlichen DAHPS (Herrmann, 1995b; Herrmann und Weaver, 1999), die DHQ-Dehydratase und die Shikimat-Kinase gefunden werden.

Das Intermediat Shikimat hat darüber hinaus eine enorme Bedeutung bei der Herstellung von Influenza-Therapeutika.

Der unter dem Handelsnamen Tamiflu® (Roche) bekannte Neuraminidase-Hemmer Oseltamivir ((3R,4R,5S)-4-Acetamido-5-amino-3-(1-ethylpropoxy)cyclohex-1-en-1-carbonsäureethylester) wurde und wird aus der Ausgangssubstanz Shikimat hergestellt (Enserink, 2006). Da Shikimat nicht chemisch hergestellt werden konnte, wurde es früher aus *Sternanis* isoliert, bis verschiedene *E. coli*-Stämme genetisch verändert werden konnten, so dass Shikimat mittlerweile fermentativ gewonnen wird (Draths et al., 1999; Chandran et al., 2003; Adachi et al., 2006a).

Auch wird Quinat als Ausgangssubstanz für verschiedene Anti-Influenza-Wirkstoffe verwendet (Kim et al., 1997; Rohloff et al., 1998).

1.3. Synthesewege ausgehend von Chorismat

Chorismat dient als Vorläufer vieler primärer und sekundärer Metabolite (Abb. 1.3.1.).

Die Synthese der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin verläuft über die Prephenat-Route. Hier wird Chorismat durch die Chorismat-Mutase in Prephenat überführt, die unmittelbare Vorstufe des aromatischen Ringes dieser beiden Aminosäuren. Wasserabspaltung und Decarb-

oxylierung führt zu Phenylpyruvat, oxidative Decarboxylierung ergibt *p*-Hydroxyphenylpyruvat. Bei diesem Schritt wird die dritte der für die Aromaten erforderlichen Doppelbindungen eingeführt. Durch Transaminierung dieser beiden α -Ketosäuren entstehen Phenylalanin und Tyrosin. Sie sind die Vorläufer der sekundären Pflanzenstoffe Lignin und der Flavonoide (Herrmann, 1995a; Knaggs, 2003).

Die Synthese von Tryptophan verläuft über Anthranilat, welches durch die Übertragung einer Aminogruppe des Glutamins auf Chorismat und Abspaltung von Pyruvat gebildet wird. Auch hierbei entsteht die dritte Doppelbindung. Diese Reaktion wird durch die Anthranilat-Synthase katalysiert. Tryptophan stellt das Grundgerüst vieler Alkaloide dar (Strasburger, 1998; Herrmann, 1995a).

Über die Umwandlung von Chorismat zu *p*-Hydroxybenzoat unter Abspaltung von Pyruvat durch die Chorismat-Lyase gelangt man auf den Syntheseweg der Quinone. Über einen Aminogruppentransfer von Glutamin auf Chorismat durch die Aminodeoxychorismat-Synthase und anschließende Eliminierung von Pyruvat, katalysiert von der Aminodeoxychorismat-Lyase, entsteht über 4-Amino-4-deoxychorismat das *p*-Aminobenzoat, welches den Vorläufer für die Folate darstellt (Herrmann, 1995a; Strasburger, 1998).

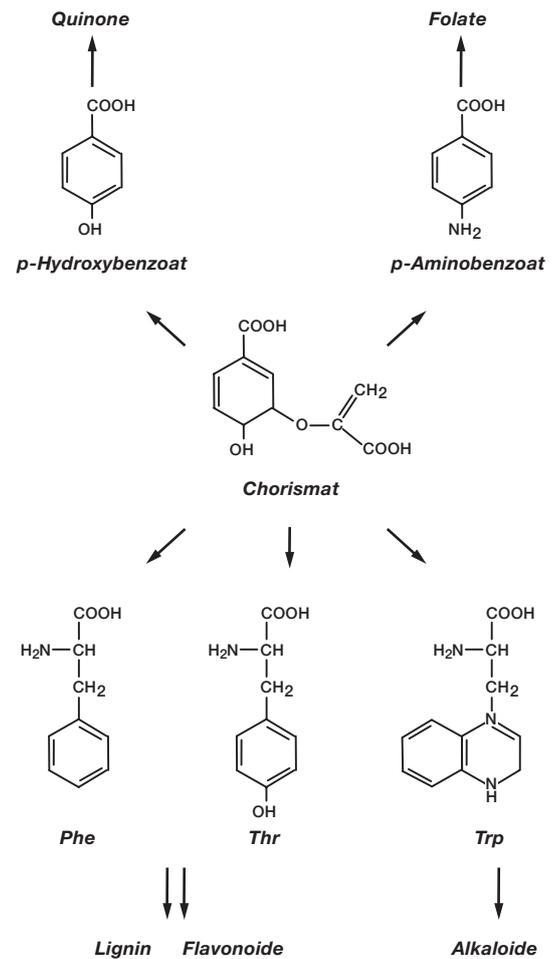


Abb. 1.3.1.: Schematische Darstellung von Chorismat als Vorstufe der verschiedenen primären und sekundären Pflanzenstoffe.

(Abb. nach Herrmann, 1995)

1.4. Verzweigungen des Shikimat-Stoffwechsels

Alle Intermediate der Hauptreaktionen des Shikimatwegs sind mögliche Verzweigungspunkte zu anderen metabolischen Stoffwechselwegen (Floss, 1997).

Beispielsweise wird angenommen, dass Rifamycin ausgehend von 3-Deoxy-D-arabinoheptulosonat-7-phosphat (DAHP) über 3-Amino-5-hydroxybenzoesäure (AHBA) synthetisiert wird (Herrmann und Weaver, 1999).

Zwei weitere Metabolite, 3-Dehydroquinat (DHQ) und 3-Dehydroshikimat (DHS), markieren einen weiteren Verzweigungspunkt.

I.4.1. Der Quinat-Stoffwechsel

Der katabole Quinat-Stoffwechselweg ist mittlerweile in vielen Bakterien und Pilzen beschrieben worden (beispielsweise in *P. aeruginosa*, *A. calcoaceticus*, nocardioformen Actinomyceten, verschiedenen Hefen und filamentösen Pilzen).

Dem mikrobiellen Abbau aromatischer Komponenten kommt eine große biologische Bedeutung zu, nicht nur hinsichtlich der Umweltverschmutzung durch giftige aromatische Kohlenwasserstoffe, sondern auch bezüglich des Ligninabbaus. Dieses Polymer macht etwa ¼ der Landbiomasse auf der Erde aus. Die Wiederverwertung von Lignin und anderem pflanzlichen aromatischen Materials spielt eine unerlässliche Rolle im Kohlenstoff-Kreislauf der Erde (Harwood und Parales, 1996). Darüber hinaus ist die Verwertung von Quinat bei Mikroorganismen ein wichtiges Kriterium für die systematische Einteilung bei Bakterien.

Zwei Zwischenprodukte im Shikimatstoffwechsel stellen ebenfalls Intermediate des Abbaus von Quinat dar: 3-Dehydroquinat (DHQ) und 3-Dehydroshikimat (DHS).

Wie in Abb. I.4.1.1. dargestellt können beide Stoffe entweder über Quinat zu Chlorogenat, einem Kondensationsprodukt aus Quinat und Caffeat, umgewandelt werden, das ein weit verbreitetes Derivat darstellt, welches Pflanzen vor Pilzbefall und UV-Strahlung schützt und zur allgemeinen Pflanzengesundheit beiträgt, indem es als Schranke gegen Mikroorganismen wirkt (Herrmann, 1995a). Oder sie werden, zusammen mit Shikimat zu Protocatechuat umgewandelt (DeCicco und Umbreit, 1964; Grund und Kutzner, 1998), was den

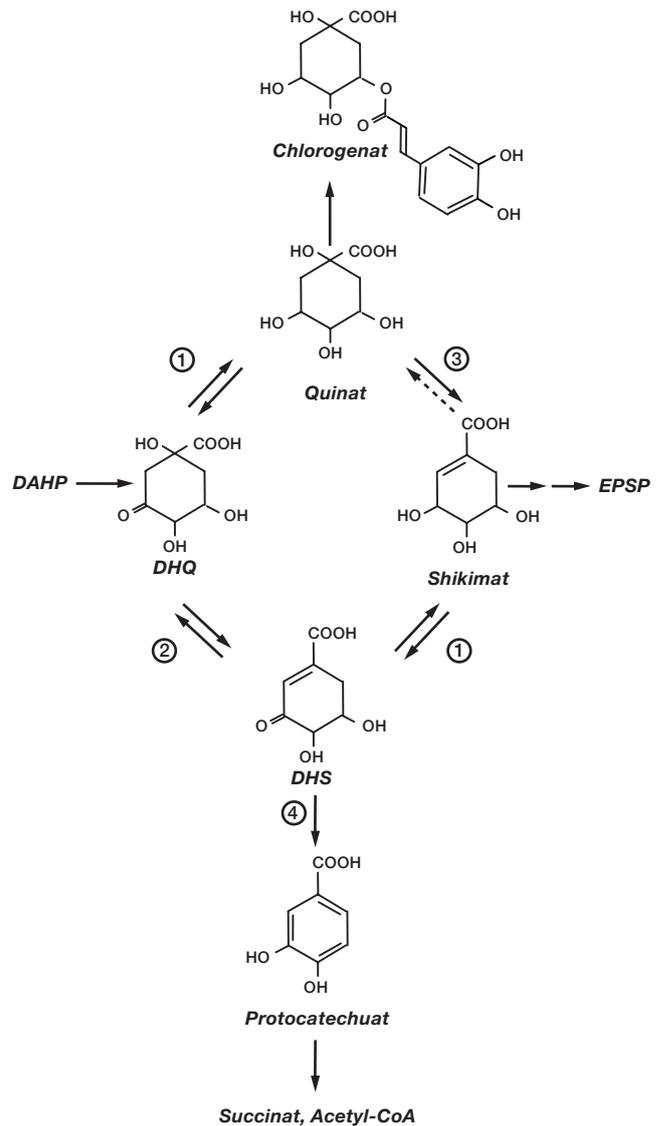


Abb. I.4.1.1.: Schematische Übersicht der Stoffwechselwege ausgehend von den beiden Intermediaten des Shikimat-Stoffwechsels, Dehydroquinat und Dehydroshikimat.

Ausgehend von DAHP geben die Schritte über Dehydroquinat, Dehydroshikimat und Shikimat bis zum EPSP die Hauptreaktionen des Shikimatweges wieder. Die Enzyme des Quinat-Stoffwechsels sind die Quinat(Shikimat)-Dehydrogenase (1), die 3-Dehydroquinat-Dehydratase (2), die Quinat-Hydrolase (3) und die 3-Dehydroshikimat-Dehydratase (4) (Abb. nach Herrmann, 1995).

eigentlichen Quinat-Stoffwechsel darstellt. Protocatechuat kann dann wiederum zu Succinat und Acetyl-CoA abgebaut werden (β -Ketoacidweg). Dieser Stoffwechselweg ermöglicht es einigen Pilzen (z. B. *N. crassa*, *A. nidulans*, *A. niger*) und Bakterien (z. B. *Rhodococcus rhodochrous*, *Lactobacilli*), Quinat als einzige Kohlenstoff-Quelle zu nutzen (Gordon et al., 1950; Cain et al., 1968; Whiting und Coggins, 1971; Hawkins et al., 1982; Giles et al., 1985; Bruce und Cain, 1990).

In manchen Pflanzen wird Quinat selber angereichert und als alicyclischer Kohlenstoffvorrat für die Synthese aromatische Komponenten angesehen (Herrmann und Weaver, 1999).

Der erste der drei Schritte im Quinat-Metabolismus ist die NAD-abhängige Oxidation von Quinat zu 3-Dehydroquinat, gefolgt von der Dehydrierung zuerst zu 3-Dehydroshikimat, dann zu Protocatechuat. Diese Reaktionen werden von der Quinat-Dehydrogenase, der 3-Dehydroquinat-Dehydratase und der 3-Dehydroshikimat-Dehydratase katalysiert (Herrmann, 1995a).

In Pflanzen sind sowohl die Quinat-Dehydratase, die DHQ-Dehydratase als auch eine Quinat-Hydrolase beschrieben worden. Letztere katalysiert die direkte Umwandlung von Quinat zu Shikimat. Alle Enzyme sind in den Plastiden lokalisiert. Quinat kann also entweder über DHQ oder über Shikimat wieder in den Shikimat-Stoffwechsel eintreten (Balinsky und Davies, 1961c; Herrmann und Weaver, 1999).

In Pilzen ist das zweite Enzym des Quinat-Stoffwechsels, die 3-Dehydroquinat-Dehydratase, Teil des oben erwähnten multifunktionalen AROM-Proteinkomplexes. In *A. nidulans*, *Ustilago maydis* und *N. crassa* sind zusätzlich zu diesem Multienzymkomplex eigenständige Isoformen der DHQ-Dehydratase beschrieben worden (Giles et al., 1967b; Ahmed und Giles, 1969).

Das dritte Enzyme (3-Dehydroshikimat-Dehydratase) katalysiert eine *syn*-Eliminierung von Wasser.

Die Expression der Gene des Quinat-Stoffwechsels wird durch Quinat induziert, der Quinat-Umsatz durch transkriptionale Kontrolle durch einen Aktivator und einen Repressor geregelt (Hawkins et al., 1982; Lamb et al., 1990 und 1992), wobei letzterer durch Quinat gehemmt wird.

Die Stoffwechselwege des Quinat-Abbaus und der Chorismat-Biosynthese weisen deutlich unterschiedliche Enzyme auf, obwohl die Intermediate 3-Dehydroquinat (DHQ) und 3-Dehydroshikimat (DHS) in beiden Stoffwechselwegen genutzt werden.

In *A. nidulans* wird die Quinat-Umwandlung zu Protocatechuat auf der Ebene der Quinat-Aufnahme in den Organismus reguliert, ermöglicht durch eine Permease (Wheeler et al., 1996). In diesem Pilz wurde auch der gleichzeitige metabolische Fluss von Quinat zu Chorismat und Protocatechuat untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Überproduktion der DHS-Dehydratase das Wachstum hemmt, da es zu Störungen bei der Chorismat-Synthese kommt (Lamb et al., 1992).

In *N. crassa* und *A. nidulans* existieren zwei Isoformen der 3-Dehydroquinat-Dehydratase, wobei die eine Isoform im Syntheseweg von Chorismat katalytisch aktiv ist, die andere im Quinat-Katabolismus (Abb. I.4.1.2.). Beide Enzyme können sowohl genetisch als auch biochemisch unterschieden werden (Giles et al., 1967b; Charles et al., 1985; Lamb et al., 1991 und 1992).

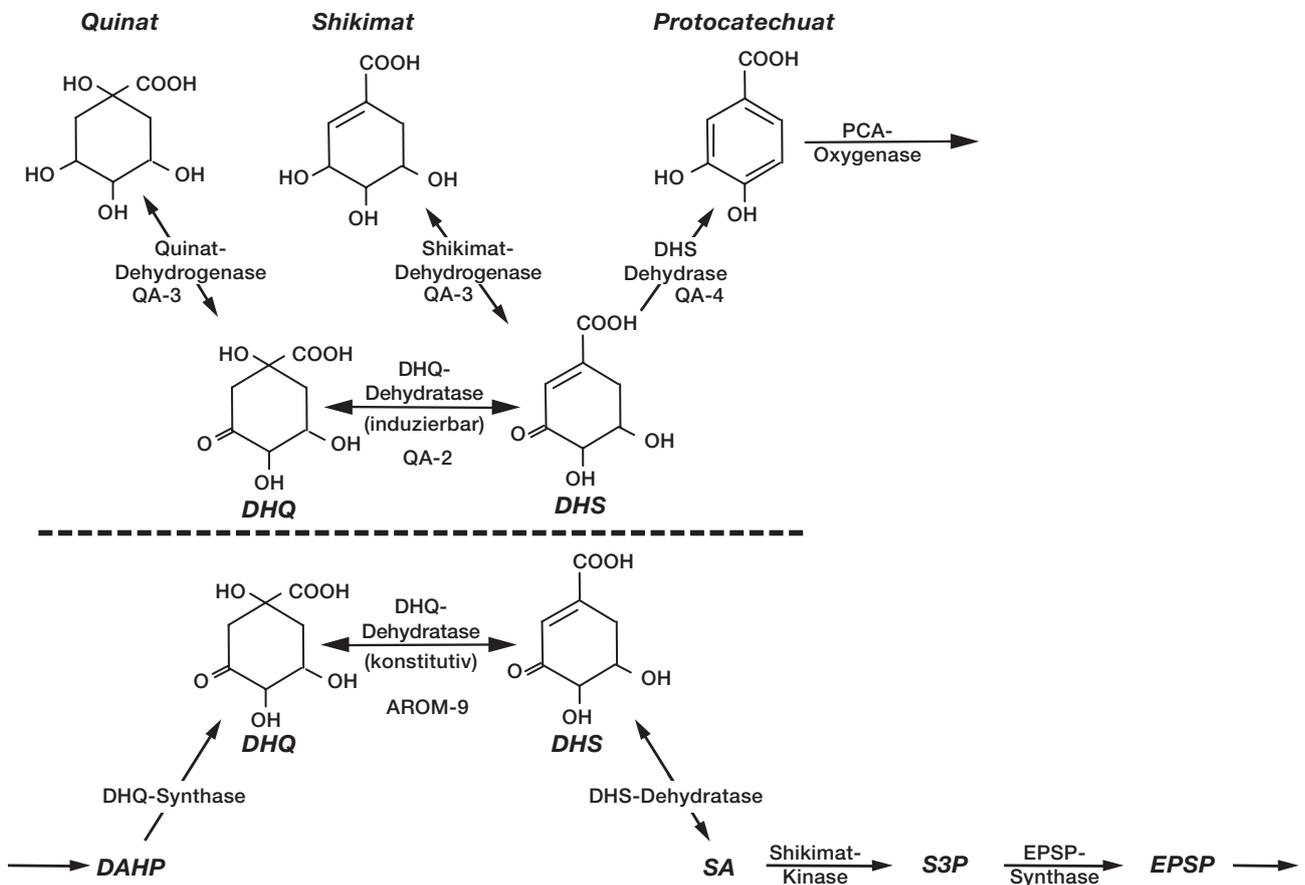


Abb. I.4.1.2.: Schematische Darstellung der Beziehungen der Gene und Enzyme des Quinat/Shikimat-Stoffwechsels in *Neurospora crassa*. Oberhalb der gestrichelten Linie sind einige Reaktionen des katabolen Quinatweges dargestellt, unterhalb die Hauptreaktionen des Shikimatstoffwechsels. Die Umwandlung von 3-Dehydroquinat zu 3-Dehydroshikimat kann entweder von der induzierbaren oder der konstitutiven 3-Dehydroquinat-Dehydratase katalysiert werden (Abb. nach Giles et al., 1985).

1.4.2. Gene und Regulation des Quinat-Stoffwechsels

Im Folgenden sollen die zum Quinat-Stoffwechsel gehörenden Gene und – soweit bekannt – deren Regulation beschrieben werden. Am besten untersucht sind in dieser Hinsicht die drei Organismen *A. calcoaceticus*, *A. nidulans* und *N. crassa*.

Acinetobacter calcoaceticus

In dem gram-negativen Bakterium *A. calcoaceticus* liegen die Gene des Quinat-Stoffwechsels (*qui*) in einem chromosomalen Supraoperon-Gencluster *dca-pca-qui-pob-hca* (Abb. 1.4.2.1.), zusammen mit den Genen für den Umsatz geradkettiger Dicarbonsäuren (*dca*), den Protocatechuat-Katabolismus (*pca*), den Genen für die Umsetzung von *p*-Hydroxybenzoat zu Protocatechuat (*pob*) sowie den Genen für den Katabolismus des Chlorogenats und den freien Hydroxyzimtsäuren (*hca*) (Elsemore und Ornston, 1994 und 1995; Dal et al., 2005).

Die Gene der drei Enzyme des Quinat-Stoffwechsels, die Quinat-Dehydrogenase (QuiA), die 3-Dehydroquinat-Dehydratase (QuiB) und die 3-Dehydroshikimat-Dehydratase (QuiC) liegen stromabwärts des *pca*-Clusters in der Reihenfolge *quiB*, *quiC*, *quiA*. Die enzymatische Aktivität von QuiB ist identisch mit der von AroD (bakterielle 3-Dehydroquinat-Dehydratase). Stromabwärts, zwischen *quiC* und *quiA*, befindet sich ein Genabschnitt, der ein Protein QuiX codiert und das zu etwa 46 % mit OprB aus *P. aeruginosa* identisch ist, welches als Glucose-selektives Porin der äußeren Membran fungiert, was vermuten lässt, dass QuiX am Transport von Quinat oder Shikimat beteiligt ist (Elsemore und Ornston, 1995), wie schon bei *E. coli* für den Shikimat-Transporter ShiA gezeigt werden konnte (Pittard und Wallace, 1966; Brown und Doy, 1976; Whipp et al., 1998).

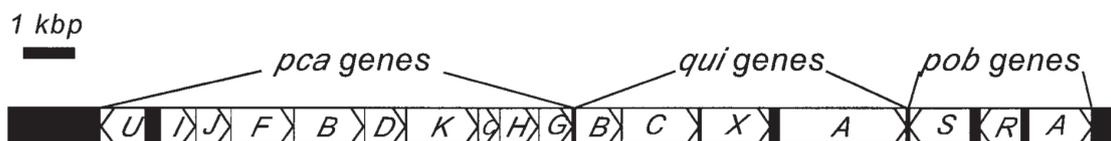


Abb. 1.4.2.1.: Schematische Darstellung der *pca-qui-pob*-Genregion von *Acinetobacter* sp. Stamm ADP1.

Nähere Angaben dazu befinden sich im Text (Abb. nach Dal et al., 2005).

Ergebnisse aus Promotoranalysen und Expressionsuntersuchungen deuten darauf hin, dass die gesamte *pca-qui*-Genregion durch den Promotor *pcaIp* kontrolliert wird und die Gene durch den transkriptionellen Aktivator-Repressor PcaU reguliert werden (Dal et al., 2005).

Die Expression der beiden Gencluster *pca* und *qui* wird durch Protocatechuat induziert und durch Katabolite reprimiert, wobei ein *quiA*-Promotor beschrieben wurde, der unabhängig von der Kohlenstoffquelle und daher konstitutiv ist, wodurch ein Minimalniveau an Quinat-Dehydrogenase sichergestellt wird. Da die Qui-Proteine im Periplasma aktiv sind, wird so die Bildung des zur Induktion führenden Moleküls Protocatechuat unter nicht-induzierenden Bedingungen ermöglicht (Dal et al., 2005).

Aspergillus nidulans

Im Schlauchpilz *A. nidulans* sind die drei Strukturgene des Quinat-Stoffwechsels, die Quinat-Dehydrogenase (*QUTB*), die 3-Dehydroquinat-Dehydratase (*QUTE*) und die 3-Dehydroshikimat-Dehydratase (*QUTC*) ebenfalls geclustert und liegen auf Chromosom VIII (Abb. 1.4.2.2.).

Alle drei Enzymaktivitäten werden in ähnlicher Weise durch die Anwesenheit von Quinat, DHQ und DHS induziert, aber bei uneinheitlichen Kohlenstoffquellen durch Kohlenstoff-Katabolite reprimiert (Hawkins et al., 1982 und 1992; Lamb et al., 1990, 1991 und 1992).

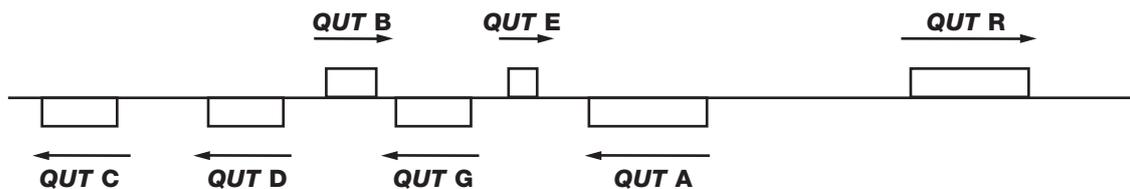


Abb. 1.4.2.2.: Schematische Darstellung des Clusters der an der Quinat-Verwertung beteiligten Gene von *Aspergillus nidulans*.
Nähere Angaben dazu befinden sich im Text (Abb. nach Lamb et al., 1990).

In *A. nidulans* werden die beiden Intermediate DHQ und DHS durch zwei Isoenzyme, die katabole 3-Dehydroquinat-Dehydratase (cDHQD) und die biosynthetisch aktive 3-Dehydroquinat-Dehydratase (bDHQD), ineinander umgewandelt (Lamb et al., 1991). Die bDHQD ist eine der fünf Enzymaktivitäten des pentafunktionalen AROM-Proteins (*aromA*-Gen), während die cDHQD durch das monofunktionale *QUTE*-Gen codiert wird.

Anhand von DNA-Sequenzbestimmungen und Northern-Blot-Analysen zeigte sich, dass die Regulation des *QUT*-Genclusters auf der Ebene der Transkription stattfindet. Sechs dieser Gene weisen eine Quinat-induzierbare mRNA auf (Hawkins et al., 1985 und 1988; Beri et al., 1990; Lamb et al., 1990): *QUTA* (Aktivator), *QUTB* (Quinat-Dehydrogenase), *QUTC* (3-Dehydroshikimat-Dehydratase), *QUTD* (Quinat-Permease), *QUTE* (3-Dehydroquinat-Dehydratase), *QUTR* (Repressor), und die beiden genetisch uncharakterisierten Gene *QUTG* und *QUTH*.

Die abgeleitete Proteinsequenz von *QUTG* weist große Ähnlichkeit mit der Rinder-*myo*-Inositol-Monophosphatase auf, während die von *QUTH* ein DNA-Zinkfinger-Motiv enthält und Ähnlichkeiten mit der DNA-Polymerase des Hepatitis-B-Virus zeigt (Lamb et al., 1990 und 1992).

Allerdings steht Quinat im natürlichen Lebensraum des Organismus nicht immer und nicht in gleichen Mengen zur Verfügung, so dass die beiden Stoffwechselwege des Shikimat- und des Quinatumsatzes aufeinander abgestimmt werden müssen.

Unter optimalen Sauerstoff- und Nährstoffbedingungen sickern die beiden Intermediate DHQ und DHS des Shikimat-Stoffwechsels in den Quinat-Stoffwechsel, und zwar mit einer Rate, die vergleichbar ist mit der Umsatzrate des AROM-Proteins. In Abwesenheit von Quinat fließt DHS verstärkt in den Quinat-Stoffwechsel. Geschieht dies über einen längeren Zeitraum, kompensiert der Organismus dies mit Erhöhung der AROM-Protein-Konzentration.

Durch Untersuchungen an Mutanten konnte gezeigt werden, dass eine postulierte Kanalisierungsfunktion des AROM-Proteins in *A. nidulans* unter optimalen Nährstoff- und Sauerstoffbedingungen nur auf sehr niedrigem Niveau stattfindet, während sie unter nicht-optimalen Bedingungen maßgeblich in Erscheinung tritt. Diese Kanalisierungsfunktion kann als Schutzmaßnahme angesehen werden, die die Verarmung an Shikimatweg-Intermediaten abschwächt, was sonst einen auxotrophen Bedarf an aromatischen Aminosäuren zur Folge hätte (Lamb et al., 1991 und 1992).

Neurospora crassa

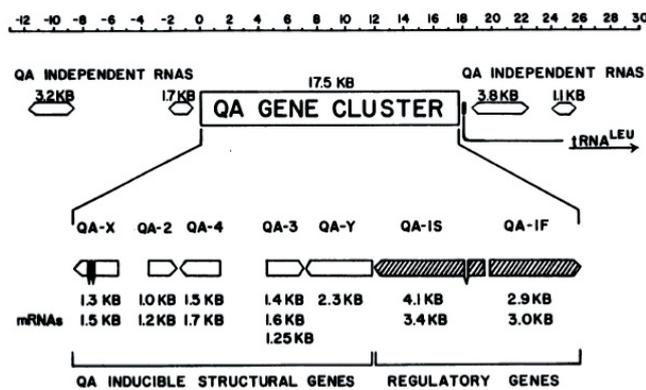


Abb. 1.4.2.3.: Schematische Übersicht des *qa*-Genclusters sowie angrenzenden Bereichen in *Neurospora crassa*.

Nähere Angaben dazu befinden sich im Text (Abb. nach Giles et al., 1985).

In *N. crassa*, einem Schlauchpilz, stehen die drei Reaktionen des Quinat-Katabolismus unter der Kontrolle des *qa*-Genclusters, der in der Kopplungsgruppe VII lokalisiert ist. Dieser Cluster besteht aus drei Strukturgenen, die die induzierbaren Enzyme 3-Dehydroquinat-Dehydratase (*qa-2*), Quinat-Dehydrogenase (*qa-3*) und 3-Dehydroquinat-Dehydratase (*qa-4*) codieren, während *qa-1* einen positiven Regulator codiert (Valone et al., 1971; Case und Giles, 1975; Reinert und Giles, 1977, Reinert et al., 1981; Schweizer et al., 1981). Die Reihenfolge dieser Gene ist *qa-1*, *qa-3*, *qa-4*, *qa-2* (Abb. 1.4.2.3.).

Quinat bewirkt die aufeinander abgestimmte Induktion dieser drei Enzyme. Es wird angenommen, dass der früher als *qa-1* bezeichnete Genbereich zwei Regulator-Proteine herstellt, die verschiedene funktionale Eigenschaften besitzen: Eine Region, die mit dem induzierenden Effektor interagiert (*qa-1F*), eine weitere, die direkt mit der DNA zusammenwirkt und die Transkription der drei Strukturgene initiiert (*qa-1S*).

Ein einfaches Modell postuliert, dass das *qa-1S*-Produkt, ein Repressor, die Expression des Aktivator-codierenden *qa-1F*-Gens kontrolliert. In Abwesenheit eines induzierenden Effektors verhindert der Repressor die Expression von *qa-1F*, wobei die *qa*-Genprodukte in diesem Fall zumindest auf einem niedrigen Grundniveau produziert werden. Bei Anwesenheit eines induzierenden Effektors wird die Inhibierung der *qa-1F*-Expression durch den Repressor aufgehoben, woraufhin der Aktivator sowohl seine eigene Synthese, als auch die der anderen *qa*-mRNAs initiiert (Giles et al., 1985).

Weder der Effektor noch das Aktivatorprotein ist demnach für die Aktivität und die Expression der drei Enzyme notwendig; sie wirken vielmehr als positiver Initiator der *qa*-Enzymsynthese (Case und Giles, 1975; Jacobson et al., 1975).

Zusätzlich zu den oben beschriebenen *qa*-Genen wurden zwei weitere mutmaßliche *qa*-Strukturgene identifiziert, *qa-x* und *qa-y*. Diese beiden Gene codieren jeweils eine Quinat-induzierbare mRNA, die sich von denen der drei oben genannten Strukturgene und den beiden Regulatoren unterscheidet. Über die Funktion dieser beiden Gene kann bislang nur spekuliert werden. Da aber verschiedene Untersuchungen auf das Vorhandensein einer Permease für die Quinat-Aufnahme hindeuten, deren Synthese durch *qa-1S* und *qa-1F* reguliert wird, wäre es denkbar, dass diese Permease entweder von *qa-x* oder *qa-y* codiert wird (Giles et al., 1985).

1.5. Übersicht der Shikimat-Dehydrogenasen

Die Shikimat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.25, meist als „klassische SDH“ oder „AroE“ bezeichnet) gehört zur Superfamilie der NAD(P)H-abhängigen Oxidoreduktasen, die, wie schon beschrieben, sowohl in anabolen und katabolen Stoffwechselwegen als auch bei der xenobiotischen Detoxifikation eine wichtige Rolle spielen.

Diese Superfamilie wird üblicherweise in verschiedene Familien unterteilt: die kurzkettigen Dehydrogenasen, die mittelkettigen Dehydrogenasen, die Aldo-Keto-Reduktasen, die Eisen-aktivierten Alkohol-Dehydrogenasen und die langkettigen Dehydrogenasen (Jörnvall et al., 1981; Inoue et al., 1989; Persson et al., 1991).

Der Reaktionsmechanismus dieser Enzyme ist verbunden mit einem Hydridtransfer vom Cofaktor NAD(P)H, basierend auf einer Stabilisierung der negativen Ladung des Hydrid-aufnehmenden Substrates entweder durch Aminosäure-Seitenketten, die als Protonendonoren fungieren, oder durch prosthetische Kationen im aktiven Zentrum.

Die *in vivo* katalysierte Reaktion der SDH ist die Hydrierung von 3-Dehydroshikimat zu Shikimat unter Oxidation von NAD(P)H, wobei diese Reaktion grundsätzlich reversibel ist.

Die Einteilung der verschiedenen, bisher in der Literatur beschriebenen Shikimat-Dehydrogenasen fällt jedoch nicht leicht, da sie sowohl in monofunktionaler als auch in bi- oder multifunktionaler

Form auftreten und sich z. T. auch hinsichtlich ihrer Cosubstrat-Spezifitäten unterscheiden. Auch gibt es einen fließenden Übergang zu den Shikimat-/Quinat-Dehydrogenasen, die erstmals als YdiB aus *E. coli* beschrieben wurden und die in der Literatur zu den Shikimat-Dehydrogenasen gezählt werden.

Des Weiteren wurde eine dritte Klasse der Shikimat-Dehydrogenasen charakterisiert, die Shikimat-Dehydrogenase-like (SDH-L), die zwar strukturell den SDHs und der YdiB sehr ähnlich ist, aber phylogenetisch als auch bezüglich der kinetischen Parameter deutliche Unterschiede aufweist.

Die klassischen SDHs mit der EC-Nummer 1.1.1.25 sind sowohl streng Substrat- als auch Cofaktorspezifisch, d. h. 3-Dehydroshikimat/Shikimat- und NADP(H)-abhängig.

Im Folgenden soll ein Überblick über die klassischen Shikimat-Dehydrogenasen und die SDH-L gegeben werden, die eine strikte 3-Dehydroshikimat/Shikimat-Spezifität aufweisen, während die Shikimat-/Quinat-Dehydrogenase (YdiB) im nächsten Kapitel (1.6. Einteilung der Quinat-Dehydrogenasen) behandelt wird, da dieses Enzym eher dem Quinat-Stoffwechsel zuzuordnen ist.

Die erste bakterielle Shikimat-Dehydrogenase wurde 1954 von Yaniv und Gilvarg aus *E. coli* beschrieben und ist spezifisch für NADP(H) und Shikimat/3-Dehydroshikimat. In den 1980er und 1990er Jahren wurde dieses Enzym aus *E. coli* von verschiedenen Arbeitsgruppen näher charakterisiert. Da es strikt NADP(H)- und Shikimat/3-Dehydroshikimat-spezifisch ist, wurde es als AroE spezifiziert (Chaudhuri und Coggins, 1985; Anton und Coggins, 1988; Dell und Frost, 1993). Es ist ein Monomer mit einem Molekulargewicht von 29-32 kDa, das ein pH-Optimum im Basischen bei etwa pH 9 bis 10,5 aufweist. Dell und Frost (1993) stellten weiterhin eine Produktinhibition durch Shikimat fest.

Im Jahre 2003 wurde die AroE aus *E. coli* im Komplex mit NADP⁺ strukturell aufgeklärt (Michel et al., 2003). Im gleichen Jahr wurden zwei weitere Strukturen bakterieller AroEs veröffentlicht: die SDH aus *Methanococcus jannaschii* (Padyana und Burley, 2003) und die aus *H. influenzae* (Ye et al., 2003), beide kokristallisiert mit NADP(H). Später folgten die Strukturen der SDH aus *Aquifex aeolicus* (Gan et al., 2007) mit NADP und Shikimat und die AroE aus *Thermus thermophilus* (Bagautdinov und Kunishima, 2007), ebenfalls im Komplex mit Substrat und Cosubstrat.

In der Literatur finden sich unter den bakteriellen Shikimat-Dehydrogenasen ausschließlich NADP(H)-abhängige Enzyme. Lediglich eine AroE-Isoform aus *H. pylori*, ein 30-kDa-Monomer, zeigt enzymatische Aktivität sowohl mit NADPH als auch mit NADH, was möglicherweise in einem alternativen Nukleotid-Bindemotiv begründet sein könnte (Han et al., 2006). Streng genommen darf sie nicht zu den Enzymen der EC-Nummer 1.1.1.25 gezählt werden.

In Pilzen ist die SDH Teil des pentafunktionalen AROM-Proteins (Giles et al., 1967a; Ahmed und Giles, 1969). Auch hier scheint die Shikimat-Dehydrogenase-Aktivität NADP(H)- und

Shikimat/3-Dehydroshikimat-spezifisch zu sein, was aber nicht als gesichert gelten kann, da es in der Literatur kaum kinetische Daten über diese Enzym-Domäne gibt. Für die SDH-Aktivität aus *A. nidulans* konnte gezeigt werden, dass sie durch das Substrat inhibiert wird (Park et al., 2004).

Für höhere Pflanzen werden fast ausschließlich bifunktionale Shikimat-/Dehydroquinat-Dehydrogenasen (EC 1.1.1.25 und 4.2.1.10) beschrieben (Fiedler und Schultz, 1985; Bonner und Jensen, 1994; Singh und Christendat, 2006 und 2007). Auch sie zeigen ein Aktivitätsoptimum im basischen Bereich bei etwa pH 9 bis 10,5 und sind strikt NADP(H)- und Shikimat/3-Dehydroshikimat-abhängig. Die SDH/DHQD aus *Spinacia oleracea* ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 59-67 kDa (Fiedler und Schultz, 1985).

Die Komplexstruktur der bifunktionalen SDH/DHQD mit Shikimat und NADP aus *A. thaliana* (Singh und Christendat, 2006 und 2007) ist bislang die einzig verfügbare im Bereich der pflanzlichen Shikimat-Dehydrogenasen.

Die einzigen Quellen für eine pflanzliche SDH, die offenbar als monofunktionales Enzym vorliegt, stammen aus Untersuchungen an *Pisum sativum* (Balinsky und Davies, 1961a und 1961b; Dennis und Balinsky, 1972). Sie setzt ausschließlich NADP(H)- und Shikimat/3-Dehydroshikimat um und ist in einem pH-Bereich von 10-10,5 am aktivsten. Die katalysierte Reaktion erfolgt nach einem geordneten Bi-Bi-Mechanismus, wobei das Nukleotid jeweils zuerst bindet, dann erst das Substrat (Dennis und Balinsky, 1972).

Obwohl mittlerweile viele Strukturen der Shikimat-Dehydrogenasen zur Verfügung stehen, sowohl als Apoenzym (SDH-L, Singh et al., 2005; AroE aus *Geobacillus kaustophilus*, Bagautdinov und Kunishima, 2008, teilweise veröffentlichte Daten) als auch mit gebundenen Substrat und Cofaktor (Maclean et al., 2000; Padyana und Burley, 2003; Ye et al., 2003; Michel et al., 2003; Singh und Christendat, 2006 und 2007; Bagautdinov und Kunishima, 2007; Gan et al., 2007), herrscht weiterhin große Uneinigkeit über die Vorgänge während der Katalyse und eventuelle Konformationsänderungen bei der Substrat- bzw. Cofaktorbindung: Ye et al. und Gan et al. beobachten eine konformelle Änderung in der Enzymstruktur nach der Bindung von NADP, Singh und Christendat sowie Bagautdinov und Kunishima jedoch nicht.

I.6. Übersicht der Quinat-Dehydrogenasen

Die Quinat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.24) gehört ebenfalls zur Superfamilie der NAD(P)H-abhängigen Oxidoreduktasen, die aber in katabolen Stoffwechselwegen, der xenobiotischen Detoxifikation sowie beim Ligninabbau eine wichtige Rolle spielen. Die *in vivo* katalysierte Reaktion der QDH ist die Dehydrierung von Quinat zu 3-Dehydroquinat unter Reduktion von NAD(P), wobei diese Reaktion grundsätzlich reversibel ist.

Unter den Quinat-Dehydrogenasen herrscht eine große Vielfalt bezüglich der von ihnen umgesetzten Substrate und Cosubstrate. Im Vergleich zu den SDHs, die in der Regel absolut spezifisch für Shikimat/3-Dehydroshikimat und NADP(H) sind, zeigen sich die QDHs recht variabel bezüglich der verwendeten Substrate und ihrer Cofaktoren.

Die klassischen QDHs mit der EC-Nummer 1.1.1.24 sind wieder sowohl streng Substrat-(Quinat/3-Dehydroquinat) als auch Cofaktor-spezifisch, d. h. NAD(H)-abhängig. Daneben gibt es die Pyrroloquinolin-Quinon(PQQ)-abhängigen Quinat-Dehydrogenasen (EC 1.1.99.25) und die schon erwähnten Quinat-/Shikimat-Dehydrogenasen (YdiB, EC 1.1.1.282).

Sieht man von den PQQ-abhängigen Quinat-Dehydrogenasen ab, so treten in der QDH-Familie Enzyme auf, die entweder nur NAD(H) oder NAD(H) und NADP(H) verwenden können. Bezüglich der Substrate setzen sie entweder nur Quinat/3-Dehydroquinat oder Quinat/3-Dehydroquinat und Shikimat/3-Dehydroshikimat um. Auch treten Enzyme auf, die alle möglichen Kombinationen an Substrat- und Cofaktor-Verwendung aufweisen.

Die erste bakterielle Quinat-Dehydrogenase wurde aus *Aerobacter aerogenes* beschrieben (Mitsubishi und Davis, 1954). Diese QDH kann als klassische bezeichnet werden, da sie in gereinigter Form nur NAD(H) und Quinat/3-Dehydroquinat umsetzen kann. Ihr Aktivitätsoptimum liegt bei pH 10.

Aus *Lactobacillus plantarum* konnte eine QDH isoliert werden, die strikt NAD(H)-abhängig ist, aber sowohl Quinat/DHQ als auch Shikimat/DHS verwenden kann. Ihr pH-Optimum liegt für die Reaktion ausgehend von Quinat/Shikimat wiederum im Basischen (pH 10,0), für die Rückreaktion aber bei pH 7,2 (Whiting und Coggins, 1974).

Rhodococcus rhodochrous besitzt eine QDH von etwa 44 kDa, die Quinat/DHQ und Shikimat/DHS umsetzen und der als Cosubstrat sowohl NAD(H) als auch NADP(H) dienen kann, wenn auch mit deutlich schwächerer Aktivität bezüglich NADP(H). Auch ihr pH-Optimum liegt deutlich im Basischen bei pH 10 (Bruce und Cain, 1990).

Aus *Acinetobacter* wurde dagegen fast ausschließlich eine PQQ-abhängige Quinat-Dehydrogenase beschrieben, die membrangebunden ist, ein Molekulargewicht von etwa 88 kDa besitzt und die höchste Aktivität bei pH 6 bis 7 zeigt (van Kleef und Duine, 1988; Elsemore und Ornston, 1994 und 1995; Dal et al., 2005). Als Substrate können sowohl Quinat als auch Shikimat dienen. Adachi et al. fanden aber darüber hinaus in diesem Organismus auch eine schwache Aktivität einer NAD(H)-abhängigen QDH, deren pH-Optimum bei pH 9,5 bis 11,0 liegt (Adachi et al., 2003a).

Auch bei *Gluconobacter* konnte eine solche PQQ-abhängige Quinat-Dehydrogenase nachgewiesen werden (Adachi et al., 2003b).

Whiting und Coggins fanden bei *Acetomonas oxydans* ebenfalls die eine Verwertung von Quinat, jedoch ohne Beteiligung von NAD(H), NADP(H) oder Flavinen. Das entsprechende Enzym zeigt eine maximale Aktivität im acideren Bereich, bei pH 5,5 bis 6 (Whiting und Coggins, 1967), was ein Hinweis auf eine PQQ-abhängige Quinat-Dehydrogenase sein könnte.

Auch bei *Xanthomonas campestris* wird vermutet, dass das Gen *qumA* eine PQQ-abhängige QDH codiert (Lee et al., 1999).

Bei Pilzen besteht ebenfalls eine große Variabilität unter den Quinat-umsetzenden Enzymen. *Aspergillus niger* besitzt eine NAD(H)-abhängige QDH von 23 kDa, die sowohl Quinat als auch Shikimat umsetzt (Cain, 1972), während *A. nidulans* ein Enzym mit den gleichen enzymatischen Eigenschaften, aber einem Molekulargewicht von etwa 57 kDa aufweist (Hawkins et al., 1993).

Die QDH aus *Neurospora crassa* ist ebenfalls bifunktional bezüglich der beiden genannten Substrate, zeigt aber neben der Aktivität mit NAD(H) auch einen schwachen Substratumsatz mit NADP(H). Ihr Molekulargewicht wird mit 39-43 kDa angegeben (Reinert und Giles, 1977; Barea und Giles, 1978; Case et al., 1978; Strøman et al., 1979; Schweizer et al., 1981; Reinert et al., 1981).

In Pflanzen finden sich ebenfalls Quinat-Dehydrogenasen mit verschiedensten biochemischen Eigenschaften.

Aus *Phaseolus aureus* ist eine klassische QDH beschrieben worden, die nur NAD(H) und Quinat/DHQ umsetzen kann. Shikimat eignet sich nicht als Substrat und wirkt nicht inhibitorisch, wird also offenbar nicht vom Enzym gebunden. Ihr pH-Optimum liegt bei etwa 9,5 (Gamborg, 1966).

Aus *Phaseolus mungo* hingegen wurde eine QDH isoliert, die sowohl NAD(H) als auch NADP(H) als Cofaktor verwenden kann, wenn auch die Affinität zu NAD(H) deutlich höher ist. Diese QDH, ein 55-kDa-Protein, das in trimerer Form vorliegt, besitzt ein vergleichbares pH-Optimum, wird jedoch durch Shikimat inhibiert (Kang und Scheibe, 1993).

Eine Sonderform der Quinat-Dehydrogenase wurde aus Zellsuspensionskulturen von *Daucus carota* beschrieben. Einerseits weist sie die biochemischen Eigenschaften der klassischen QDH auf (sie setzt ausschließlich NAD(H) und Quinat/DHQ um), andererseits bindet sie posttranslational eine Ca^{2+} -bindende Proteineinheit, die die QDH vor Dephosphorylierung schützt. Nur in phosphorylierter Form, die durch eine Ca^{2+} -/Calmodulin-abhängige Proteinkinase vermittelt wird, ist diese Quinat-Dehydrogenase aktiv (Ranjeva et al., 1983; Graziana et al., 1984; MacKintosh et al., 1991).

Im Vergleich zu den Angiospermen zeigt sich bei den Gymnospermen eine andere Enzymsituation. Im Allgemeinen sind die QDHs aus Angiospermen spezifisch für NAD(H), während die aus Gymnospermen vorzugsweise NADP(H) als Cofaktor nutzen.

Aus *Pinus taeda* wurden sogar zwei Isoformen der QDH isoliert, die beide NADP(H)-spezifisch sind, aber sowohl Quinat/DHQ als auch Shikimat/DHS umsetzen können, wobei die Affinität zu Shikimat deutlich höher ist. Sie unterscheiden sich in ihren Molekulargewichten (35 und 53 kDa), besitzen aber das gleiche pH-Optimum für die Reaktion ausgehend von Quinat/Shikimat (pH 10) (Ossipov et al., 2000).

Das Enzym YdiB (EC 1.1.1.282) ist bislang nur aus *E. coli* beschrieben worden (Benach et al., 2003; Michel et al., 2003; Lindner et al., 2005). Es kann sowohl Quinat/DHQ als auch Shikimat/DHS als Substrat verwenden, wobei auch hier das pH-Optimum für die Reaktion ausgehend von Quinat/Shikimat im Basischen bei pH 9 bis 10,5 liegt.

Uneinigkeit herrscht bezüglich der Verwendung der Cosubstrate: Benach et al. berichten, dass dieses bifunktionale Enzym nicht in der Lage sei, NADP(H) als Cofaktor zu verwenden, während Michel et al. sogar die kinetischen Parameter bezüglich NADP bestimmt haben. Davon abgesehen war die YdiB aus *E. coli* bis vor kurzem das einzige Quinat-umsetzende Enzym, dessen Struktur aufgeklärt werden konnte, und zwar im Komplex mit NAD (Benach et al., 2003; Michel et al., 2003).

Aus *Corynebacterium glutamicum* wurde ebenfalls ein Enzym isoliert, das sowohl Quinat als auch Shikimat umsetzt und für das postuliert wurde, NAD^+ und NADP^+ als Cofaktoren verwenden zu können. Die Apostruktur dieses Enzyms konnte 2006 aufgeklärt werden (Dissertation Jan Schoepe, 2006).

I.7. Zielsetzung der Arbeit

Innerhalb der Quinat-umsetzenden Enzyme herrscht eine große Vielfalt bezüglich ihrer jeweiligen kinetischen Eigenschaften, insbesondere was die Spezifität gegenüber den Substraten und Cofaktoren angeht. Darüber hinaus ist der genaue Katalysemechanismus und die sich eventuell daraus ergebenden strukturellen Veränderungen der Enzyme weiterhin unklar.

Zwar sind sich die Shikimat- und die Quinat-Dehydrogenasen, was ihre Proteinsequenzen und damit ihre Sekundärstrukturen angeht, zum Teil sehr ähnlich, jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich die von ihnen katalysierten Reaktionen und strukturellen Eigenschaften zur Substrat- und Cofaktor-Diskriminierung deutlich unterscheiden.

Das Ziel dieser Arbeit bestand daher zum einen darin, das als Quinat-Dehydrogenase identifizierte Enzym aus *Corynebacterium glutamicum* zu exprimieren und zu reinigen, um es biochemisch genauer zu charakterisieren und innerhalb der Quinat-umsetzenden Enzyme einem eindeutigen Funktionstyp einordnen zu können.

Da bislang lediglich die Apostruktur des Enzyms bekannt war (Dissertation Jan Schoepe, 2006), sollte dieses Enzym zum anderen sowohl mit dem Cofaktor NAD(H) als auch mit den beiden Substraten (Quinat und Shikimat) und dem Cofaktor kristallisiert sowie strukturell mittels Röntgen-diffraktometrie aufgeklärt werden.

So ließen sich im Idealfall aus dem Vergleich der eingefrorenen katalytischen Zustände Strukturänderungen des Proteins sichtbar machen, die für die enzymvermittelte Reaktion von funktioneller Bedeutung sind. Auch Erkenntnisse bezüglich der unterschiedlichen Substratumsatz-Effektivitäten könnten so erlangt werden.

II. Material und Methoden

II.1. Chemikalien, Materialien und Geräte mit Bezugsquellen

II.1.1. Chemikalien

Ampicillin (Roche, Mannheim)
Bradford-Reagenz (BioRad, München)
Bromphenolblau (Merck, Darmstadt)
BSA (Sigma-Aldrich, Hamburg)
Calciumchlorid, CaCl_2 (Merck, Darmstadt)
Coomassie Servablue (Merck, Darmstadt)
D(-)-Chinasäure (Sigma-Aldrich, Hamburg)
Dinatriumhydrogenphosphat, Na_2HPO_4 (Merck, Darmstadt)
EDTA, Ethylendiamintetraessigsäure (Merck, Darmstadt)
Essigsäure (Merck, Darmstadt)
Ethanol (Merck, Darmstadt)
Glycerin (Roth, Karlsruhe)
Hefeextrakt (Roth, Karlsruhe)
Imidazol (Sigma-Aldrich, Hamburg)
IPTG (Roth, Karlsruhe)
Kaliumacetat, CH_3COOK (Merck, Darmstadt)
Lithiumchlorid, LiCl (Sigma-Aldrich, Hamburg)
Manganchlorid, MnCl_2 (Merck, Darmstadt)
 β -Mercaptoethanol (Merck, Darmstadt)
MES, 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (Roth, Karlsruhe)
MOPS, 3-N-(Morpholino)propansulfonsäure (Roth, Karlsruhe)
 NAD^+ (Sigma-Aldrich, Hamburg)
 NADH (Sigma-Aldrich, Hamburg)
 NADP^+ (Sigma-Aldrich, Hamburg)
Natriumchlorid, NaCl (Roth, Karlsruhe)
Natriumcarbonat, Na_2CO_3 (Merck, Darmstadt)
Natriumhydrogencarbonat, NaHCO_3 (Merck, Darmstadt)
Natriumdihydrogenphosphat, NaH_2PO_4 (Merck, Darmstadt)
Natriumhydroxid, NaOH (Sigma-Aldrich, Hamburg)
 Ni^{2+} -NTA-Agarose (Qiagen, Hilden)

PEG 6000 (Merck, Darmstadt)

Pepton (Roth, Karlsruhe)

2-Propanol (Merck, Darmstadt)

Rubidiumchlorid, RbCl_2 (Sigma-Aldrich, Hamburg)

Salzsäure, HCl (Roth, Karlsruhe)

SDS, Natriumdodecylsulfat (Merck, Darmstadt)

Shikimisäure (Sigma-Aldrich, Hamburg)

tri-Natriumcitrat (Merck, Darmstadt)

Tris, Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Roth, Karlsruhe)

II.1.2. Molekulargewichtsstandards

Proteinmarker Roti[®]-Mark, 10-150 (Roth, Karlsruhe)

II.1.3. Plasmide

Vektor pET3d mit N-terminalem His₆-tag (Novagen, Madison, USA; modifiziert von Chatterjee et al., 2005)

II.1.4. *E. coli*-Stämme

DH5 α -Zellen (Stratagene, La Jolla, USA)

BL21(DE3)-Zellen (Novagen, Madison, USA)

II.1.5. Enzyme

AcTEV[™]-Protease (Invitrogen, Karlsruhe)

II.1.6. Membranen, Filter, Säulen, Kits, sonstige Materialien

Additiv-Screen 1-3 (Hampton Research, Laguna Niguel CA, USA)

Anodisc 13, 0,1 μm (Whatman, Dassel)

Cryoloops (Hampton Research, Laguna Niguel CA, USA)

Crychem™ Plate, Sitting drop Plate (Hampton Research, Laguna Niguel CA, USA)
Crystal Clear Sealing Tape, 2 Inch (Hampton Research, Laguna Niguel CA, USA)
Crystal Screen™ (Hampton Research, Laguna Niguel CA, USA)
Crystal Screen 2™ (Hampton Research, Laguna Niguel CA, USA)
Crystal Screen Cryo™ (Hampton Research, Laguna Niguel CA, USA)
Crystal Screen Lite™ (Hampton Research, Laguna Niguel CA, USA)
Detergenz-Screen 1-3 (Hampton Research, Laguna Niguel CA, USA)
Einmalküvetten, halbmikro PLASTIBRAND® (Brand, Wertheim)
Einmal-UV-Küvetten mikro, 70-850 µl, PLASTIBRAND® (Brand, Wertheim)
Filterröhrchen (Amicon Ultra – 4, Centrifugal Filter Device, 5 MWCO, Millipore, Eschborn)
Grid Screen™ Ammoniumsulfat (Hampton Research, Laguna Niguel CA, USA)
Grid Screen™ MPD (Hampton Research, Laguna Niguel CA, USA)
Grid Screen™ NaCl (Hampton Research, Laguna Niguel CA, USA)
Grid Screen™ PEG 6000 (Hampton Research, Laguna Niguel CA, USA)
Grid Screen™ PEG/LiCl (Hampton Research, Laguna Niguel CA, USA)
Izit™ Crystal Dye (Hampton Research, Laguna Niguel CA, USA)
JBScreen 1-10 (Jena Bioscience, Jena)
Nu-PAGE® 4-12 % Bis-Tris-Gele (Invitrogen, Karlsruhe)
PEG/Ion Screen™ (Hampton Research, Laguna Niguel CA, USA)
pH-Indikatorpapier (Roth, Karlsruhe)
Plasmid Midi Kit, Tip 100 (Qiagen, Hilden)
Reaktionsgefäße 1,5 ml, 2,0 ml (Eppendorf, Hamburg)
Reaktionsgefäße 15 und 50 ml (Cellstar, Greiner Bio-One, Solingen)
Rundfilter 589/1, aschefrei, Ø 125 mm (Schleicher & Schuell)
SaltRx™ Screen (Hampton Research, Laguna Niguel CA, USA)
Säulen (5 ml, Polypropylen Columns, Qiagen, Hilden)

II.1.7. Geräte und EDV-Systeme

Analysenwaage FA-210-4 (Faust, Köln)
Brutschrank (Heraeus FunctionLine B20, Heraeus, Hanau)
Criterion Gelelektrophoresesystems (BioRad, München)
Elektrophorese Powerpac 300 Power Supply (BioRad, München)
Laborwaage SBA 52 (Scaltec, Heiligenstadt)
Mikroskope (Stemi 2000-C, Zeiss, Jena; Leica MZ 125, Leica, Solms)
PC mit SuSE-Linux 9.1 (Novell, Berlin)
PC mit Windows XP (Microsoft, USA)

pH-Meter 766 Calimatic (Knick, Berlin)
Reinstwasseranlage (Christ Ministil P22, Christ, Wiesbaden)
Röntgendiffraktometer, hauseigen
 FR 591 (Nonius, Delft, Niederlande)
 Flächendetektor (MAC Science, Yokohama, Japan)
 MAC-XOS Doppelspiegel (MAC Science, Yokohama, Japan)
 Cryostream Cooler (Oxford Cryosystems, Oxford, UK)
Schüttelinkubatoren (Certomat® BS-1, B. Braun Biotech International, Melsungen;
Incubator Shaker G25, New Brunswick Scientific Co. Ing., New Jersey, USA))
Spiegelreflexkamera EOS 500N (Canon, Tokyo, Japan)
Ultraschall (Bandelin Sonopuls HD 2200; Mikrospitze MS 73)
UV/Visible-Spectrophotometer (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden)
Vortex REAX 2000, REAX top (Heidolph, Schwabach)
Zentrifugen (Eppendorf Centrifuge 5417 C; Eppendorf Centrifuge 5810 R, Eppendorf, Hamburg)

II.1.8. Computerprogramme

ARP/wARP (Perrakis et al., 2001)
CCP4/CCP4i-suite (CCP4, 1994)
GraFit Version 4.0.12 (Erithacus Software Limited, UK)
O (Jones et al., 1991)
PyMOL (DeLano Scientific LLC, San Carlos, CA, USA)

II.2. Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen mit RbCl

Jeweils 50 ml LB-Flüssigmedium wurden mit je 200 µl *E. coli*-Stammzellen (DH5α bzw. BL21(DE3)) angeimpft und über Nacht (ca. 16 h) bei 37 °C und 180 rpm inkubiert.

Je 200 ml LB-Medium wurden mit jeweils 1,5 ml der Vorkultur angeimpft und bei 37 °C und 180 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,3 (DH5α) bzw. 0,5 (BL21(DE3)) inkubiert.

Die Kulturen wurden für 10 min auf Eis abgekühlt und die Zellen anschließend in vorgekühlten Zentrifugenbechern abzentrifugiert (3000 rpm, 4 °C, 10 min).

Die nachfolgenden Arbeitsschritte erfolgten alle im 4 °C-Raum.

Die Bakterienpellets wurden in jeweils 8 ml (DH5α) bzw. 15 ml (BL21(DE3)) eiskaltem Tfb1-Puffer (100 mM RbCl, 45 mM MnCl₂, 35 mM KAc, 10 mM CaCl₂, 0,5 mM LiCl, 15 % (v/v) Glycerin pH 5,8; sterilfiltriert) resuspendiert und weitere 10 min auf Eis gekühlt, bevor sie erneut abzen-

trifugiert wurden (3000 rpm, 4 °C, 10 min). Die Pellets wurden in 8 ml (BL21(DE3)) bzw. 4 ml (DH5 α) eiskaltem Tfb2-Puffer (10 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl, 15 % (v/v) Glycerin pH 7,0; sterilfiltriert) resuspendiert, in bei -80 °C vorgekühlte Eppis aliquotiert und bei -80 °C eingefroren.

II.3. Präparation von DNA

II.3.1. Transformation der Plasmid-DNA in *E. coli*-DH5 α - bzw. BL21(DE3)-Zellen

Die Plasmid-DNA für die Quinat-Dehydrogenase wurde mir freundlicherweise von Jan Schoepe zur Verfügung gestellt.

Zur Plasmidisolation wurden *E. coli*-DH5 α -, zur Proteinexpression *E. coli*-BL21-Zellen benutzt. Für die Transformation wurden die *E. coli*-Zellen auf Eis aufgetaut. 5 μ l der Plasmid-DNA wurden zu 200 μ l DH5 α - bzw. BL21-Zellen gegeben, für 30 min auf Eis inkubiert, 90 sec im 42 °C-Wasserbad erhitzt und weitere 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium wurde der Ansatz für 1 h bei 37 °C auf einem Überkopfschüttler inkubiert, ehe 250 μ l des Ansatzes auf einer LB-Agar-Platte mit 150 mg/l Ampicillin ausplattiert wurde. Die angeimpfte Platte wurde über Nacht (ca. 16 h) bei 37 °C inkubiert.

II.3.2. Plasmidisolation aus *E. coli*-DH5 α -Zellen

Nach Transformation der Plasmid-DNA in DH5 α -Zellen wurde eine Einzelkolonie von der über Nacht inkubierten LB-Agar-Platte gepickt und diese über Nacht (ca. 16 h) in 50 ml LB-Flüssigmedium mit 150 mg/l Ampicillin bei 37 °C bei 180 rpm inkubiert.

Die Plasmide wurde mit dem Plasmid Midi Kit, Tip 100 (QIAGEN) nach Anleitung des „QIAGEN Plasmid Midi Protocol“ für low-copy-Plasmide aus „QIAGEN Plasmid Purification Handbook“ gereinigt (Midi-Präparation).

II.3.3. DNA-Sequenzierung

Die gereinigte Plasmid-DNA wurde als Probe mit 250 ng/ μ l am Zentrum für Molekulare Medizin Köln (ZMMK) der Universität zu Köln mit einem ABI-PRISM™ 377 DNA-Sequencer (Applied Bio-

systems) sequenziert, um die Richtigkeit der DNA-Sequenz und die korrekte Insertion im Vektor zu verifizieren.

II.4. Protein-Präparation

II.4.1. Proteinexpression

Für die heterologe Proteinexpression wurde der Vektor mit dem korrekten Insert in *E. coli*-Zellen des Stammes BL21(DE3) transformiert, wie unter II.3.1. dargestellt. Von der über Nacht inkubierten LB-Agar-Platte wurde eine Bakterienkolonie gepickt und diese über Nacht (ca. 16 h) in 50 ml LB-Flüssigmedium mit 150 mg/l Ampicillin bei 37 °C bei 180 rpm inkubiert (Vorkultur). Mit jeweils 2 ml der Vorkultur wurden jeweils 250 ml LB-Flüssigmedium mit 150 mg/l Ampicillin angeimpft, für ca. 1 h bei 37 °C und 180 rpm bis zu einer Dichte von $OD_{600} = 0,6$ geschüttelt, bevor zur Induktion IPTG mit einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben wurde. Das Protein wurde ca. 4 h bei 37 °C und 180 rpm exprimiert.

Nach Abzentrifugieren der Zellen wurden Bakterienpellets aus jeweils 500 ml Flüssigkultur bis zur Aufarbeitung bei -20 °C eingefroren.

II.4.2. Reinigung der Quinat-Dehydrogenase

Das aufgetaute Zellpellet von 500 ml Zellkultur wurde in ca. 10 ml 4 °C-kaltem Lysispuffer (50 mM NaH_2PO_4/Na_2HPO_4 pH 8,0, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol) aufgenommen, resuspendiert und auf Eis gestellt. Die Zellen wurden durch Ultraschall aufgeschlossen (Bandelin Sonopuls HD 2200; Mikrospitze MS 73): sechsmalige Ultraschallbehandlung der Probe bei 45 % Leistung, wobei stets durch Eis gekühlt wurde.

Das Lysat wurde mit Lysispuffer auf 80 ml verdünnt und der Zelldebris bei 17000 rpm (4 °C) für 30 min abzentrifugiert.

Eine 2 ml-Ni-NTA-Säule wurde mit 20 ml Lysispuffer äquilibriert, bevor der klare Überstand des Lysats aufgetragen wurde. Anschließend wurde die Säule zunächst mit 20 ml Lysispuffer, dann mit 20 ml Waschpuffer (50 mM NaH_2PO_4/Na_2HPO_4 pH 8,0, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol) gespült.

Die Quinat-Dehydrogenase wurde mit 4 × 2 ml Elutionspuffer (50 mM NaH_2PO_4/Na_2HPO_4 pH 8,0, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol) von der Säule gelöst.

Die gereinigten Proteinlösungen wurden entweder bei 4 °C oder -20°C gelagert.

II.4.3. Konzentrierung und Umpufferung der Quinat-Dehydrogenase

Die Elutionsfraktionen wurden vereinigt und in Filtrerröhrchen (Amicon Ultra – 4, Centrifugal Filter Device, 5 MWCO, Millipore) bei 6000 rpm (4 °C) konzentriert (Endvolumen ca. 0,5 bis 1 ml). Die Proteinlösung wurde mit dem ca. 6-fachen Volumen an Puffer (50 mM Tris/HCl pH 7,5, 500 mM NaCl, 20 % (v/v) Glycerin) verdünnt und erneut auf ca. 0,5 bis 1 ml eingeeengt. Dieser Schritt wurde ein zweites Mal wiederholt.

Die Proteinlösungen wurden entweder bei 4 °C oder -20°C gelagert.

II.4.4. Abspaltung des N-terminalen His₆-tags

400 µg Quinat-Dehydrogenase wurden mit 200 Units AcTEV™-Protease (mit N-term. His₆-tag; Invitrogen) in TEV-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,5 mM EDTA) mit 1 mM DTT in einem Gesamtvolumen von 1,5 ml über Nacht (ca. 16 h) bei 4 °C inkubiert.

Dem Spaltungsansatz wurden ca. 100 µl Ni-NTA-Agarose (Qiagen) zugefügt und dieser für 1 h bei RT auf einem Roller inkubiert. Die Ni-NTA-Agarose wurde durch 5-minütige Zentrifugation bei 10000 rpm abgetrennt und der Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt.

Die Proteinlösung wurde bei 4 °C gelagert.

II.4.5. Proteinanalytik

II.4.5.1. Proteinbestimmung nach Bradford

Der Proteingehalt wurde mit Hilfe des Bradford-Tests photometrisch mittels Doppelbestimmungen ermittelt.

200 µl Bradford-Reagenz (Bio-Rad) wurden mit 800 µl verdünnter Proteinlösung (1:1000 bis 1:2000) gemischt. Nach 5 Minuten wurde die Absorption bei 595 nm an einem UV/Visible-Spectrophotometer (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech) gemessen.

Als Proteinstandard wurde BSA (Sigma) verwendet.

II.4.5.2. Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde mit Hilfe des Criterion Gelelektrophoresesystems von BioRad (München) und Nu-PAGE® 4-12 % Bis-Tris-Gelen (Invitrogen) durchgeführt. Falls erforderlich wurden die zu analysierenden Proteinproben mit Wasser verdünnt. Die Proben wurden

nach Herstellerangaben mit SDS-Auftragspuffer (50 mM Tris/HCl pH 8,0, 0,8 mM EDTA, 0,4 % (w/v) Bromphenolblau, 20 % (v/v) β -Mercaptoethanol) versetzt und bei 95 °C für 5 min inkubiert. Die Elektrophorese wurde mit MES/Tris-Puffer (50 mM MES, 50 mM Tris, 0,1 % (w/v) SDS, 0,03 % (w/v) EDTA) nach Angaben des Herstellers (Invitrogen) durchgeführt (Auftrennung der Proben ca. 20-30 min bei etwa 200 V und 120 mA). Die aufgetrennten Proteine wurden durch Färbung mit Coomassie-Reagenz (Färbelösung: 25 % (v/v) Isopropanol, 10 % (v/v) Eisessig, 0,04 % (w/v) Coomassie Servablue; Entfärbelösung: 12 % (v/v) Isopropanol, 10 % (v/v) Eisessig) sichtbar gemacht. Als Größenstandard wurde Roti[®]-Mark 10-150 (Roth) verwendet.

II.4.5.3. Berechnung der Molekulargewichte

Die theoretischen Molekulargewichte der Quinat-Dehydrogenase mit His₆-tag und der Proteinsequenz für die TEV-Schnittstelle und der Quinat-Dehydrogenase nach Abspaltung des His₆-tags wurden mit Hilfe des EnCor-Biotechnology-Servers berechnet (<http://www.encorbio.com/protocols/Prot-MW.htm>).

II.4.6. ESI-Massenspektrometrie

Die ESI-MS-Analyse wurde freundlicherweise von Frau Anja Hochheiser durchgeführt.

Zur Vorbereitung der Proteinproben (Quinat-Dehydrogenase mit His₆-tag und Quinat-Dehydrogenase nach Abspaltung des His₆-tags) für die Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometer-Analyse (ESI-MS) wurden die Proteinlösungen mit H₂O auf 3,0 mg/ml (QDH mit His₆-tag) bzw. 3,7 mg/ml (QDH ohne His₆-tag) verdünnt.

Die Proteinlösungen wurden mittels HPLC mit einem Laufmittelgemisch aus Acetonitril/Isopropanol (Gradient) entsalzt und konzentriert und anschließend in die Ionenquelle injiziert.

II.5. Enzymkinetik

II.5.1. Standardbedingungen

Die Aktivität der Enzyme wurde photometrisch bestimmt. Dazu wurde die Zunahme der Extinktion bei 340 nm durch die Reduktion von NAD⁺ (bzw. NADP⁺) gemessen.

Der molare Extinktionskoeffizient beträgt $\epsilon_{\text{NAD(P)H}} = 6\,220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Die sehr sauren Substrate China- und Shikimisäure (im Nachfolgenden der Einfachheit halber nur noch Quinat und Shikimat genannt) wurden als Stammlösungen mit 320 mM bzw. 600 mM

mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ und NaOH angesetzt, wobei ein pH-Wert von 7 bis 9 sichergestellt werden musste. Für die Bestimmung der kinetischen Parameter bezüglich Quinat bzw. Shikimat wurde von beiden Substraten eine Verdünnungsreihe hergestellt.

Die Cosubstrate NAD^+ und NADP^+ wurden mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ als Stammlösungen mit jeweils 10 mM angesetzt.

Für die Bestimmung der kinetischen Parameter bezüglich NAD^+ und NADP^+ wurden 20 mM Stammlösungen und entsprechende Verdünnungsreihen angesetzt.

Die verwendeten Reaktionspuffer waren für den pH-Bereich 7,0 bis 9,5 100 mM Tris/HCl, für den pH-Bereich 8,5 bis 11,5 100 mM Na-Carbonat.

Das Protein (Quinat-Dehydrogenase mit N-terminalem His_6 -tag) wurde mit 100 mM Tris/HCl pH 7,5 entweder aus der Elutionfraktion (50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ pH 8,0, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol) oder der konzentrierten Lösung (50 mM Tris/HCl pH 7,5, 500 mM NaCl, 20 % (v/v) Glycerin) entsprechend verdünnt.

Die Quinat-Dehydrogenase ohne His_6 -tag wurde nach der Spaltung in gleicher Weise aus dem genannten Puffer verdünnt.

Alle verwendeten Lösungen (bis auf das Protein) wurden für alle kinetischen Messungen auf 30 °C vorgewärmt.

Für die kinetischen Messungen selbst wurde die Küvettenhalterung des Photometers ebenfalls auf 30 °C temperiert.

Alle Komponenten des Reaktionsgemisches bis auf das Enzym wurden zusammenpipettiert und gut gemischt, wonach ein Nullabgleich durchgeführt wurde. Erst nach der Zugabe des Proteins (in die Küvette im Photometer) und kurzem Mischen wurde in Abständen von jeweils 10 bzw. 5 sec die Absorptionsänderung im linearen Bereich gemessen (maximal 2 min).

Alle kinetischen Messungen wurden wenigstens als Doppelbestimmungen durchgeführt, wobei mindestens Enzymlösungen aus drei unabhängigen Reinigungen verwendet wurde (einzige Ausnahme von letzterem war die um den N-terminalen His_6 -tag verkürzte Quinat-Dehydrogenase).

Die kinetischen Parameter wurden mit Hilfe des Programm GraFit (Erithacus Software Limited) berechnet.

Die K_M -, k_{cat} - und K_M/k_{cat} -Werte wurden für die jeweiligen Einzelmessungen berechnet und daraus entsprechenden Mittelwerte und Standardabweichungen bestimmt.

1 Unit ist definiert als die Enzymmenge, die 1 μMol Substrat pro Minute umsetzt.

II.5.2. Bestimmung des pH-Optimums

Die Bestimmung des pH-Optimums der Quinat-Dehydrogenase wurde sowohl bezüglich Quinat als auch im Bezug auf Shikimat durchgeführt.

Der pH-Bereich 7,0 bis 9,5 wurde dazu mit 100 mM Tris/HCl-Puffer abgedeckt, der pH-Bereich von 8,5 bis 11,5 mit 100 mM Na-Carbonat-Puffer (beide in pH-Schritten von 0,5).

Die Substratkonzentrationen betragen 8 mM für Quinat, 50 mM für Shikimat und 0,5 mM für NAD⁺. Die eingesetzte Menge an Protein betrug in allen Fällen 5 nM.

Das 400- μ l-Reaktionsgemisch setzte sich wie folgt zusammen:

- 333,8 μ l 100 mM Puffer
- 40 μ l Substrat (80 mM Quinat bzw. 500 mM Shikimat pH 7)
- 20 μ l 10 mM NAD⁺
- 6,2 μ l Enzymlösung (323 nM)

II.5.3. Bestimmung der kinetischen Parameter

II.5.3.1. Kinetischen Parameter der Substrate Quinat und Shikimat

Die Bestimmung der kinetischen Parameter bezüglich Quinat und Shikimat wurde sowohl im optimalen pH-Bereich als auch bei pH 7,5 durchgeführt. Für Quinat war dies pH 9,0/9,5, für Shikimat pH 10,0/10,5.

Dazu wurden die Stammlösungen der beiden sauren Substrate mit NaOH auf den entsprechenden pH-Wert eingestellt.

Für die Variation der Substrate wurde von den Stammlösungen jeweils eine Verdünnungsreihe hergestellt (für Quinat mit 320; 160; 80; 40; 20; 10; 5 und 2,5 mM, für Shikimat mit 600; 500; 400; 300; 200; 100; 50 und 25 mM).

Die eingesetzte Proteinmenge betrug bei optimalem pH bezüglich beider Substrate 5 nM, während bei pH 7,5 mit Quinat 12,5 nM, bei pH 7,5 mit Shikimat 25 nM notwendig waren.

In allen Messungen betrug die Konzentration an NAD⁺ 1 mM.

Das 400- μ l-Reaktionsgemisch setzte sich wie folgt zusammen:

- 313,8 μ l 100 mM Puffer
- 40 μ l Substratlösung
- 40 μ l 10 mM NAD⁺
- 6,2 μ l Enzymlösung (323 nM bzw. 808 nM oder 1,6 μ M)

Die Endkonzentrationen an Substrat in der Küvette betragen folglich für Quinat 0,25 bis 32 mM, für Shikimat 2,5 bis 60 mM, für NAD⁺ 1 mM.

Die umgekehrten Reaktionen (3-Dehydroquinat bzw. 3-Dehydroshikimat zu Quinat bzw. Shikimat) wurden nicht durchgeführt, da die Substrate nicht kommerziell erhältlich sind.

II.5.3.2. Kinetischen Parameter der Cosubstrate NAD⁺ und NADP⁺

Auch die Messungen zur Bestimmung der kinetischen Parameter bezüglich der Cosubstrate NAD⁺ und NADP⁺ wurden sowohl im optimalen pH-Bereich (für Quinat pH 9,0/9,5, für Shikimat pH 10,0/10,5) als auch bei pH 7,5 durchgeführt.

Von NAD⁺ und NADP⁺ wurden jeweils 20 mM Stammlösungen und entsprechende Verdünnungsreihen angesetzt (mit 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125 und 0,1563 mM).

Die Substratkonzentrationen betragen für Quinat 16 mM, für Shikimat 60 mM, die eingesetzten Enzymmengen 5 nM, 12,5 nM und 25 nM, wie unter II.5.3.1. beschrieben.

Das 400- μ l-Reaktionsgemisch setzte sich wie folgt zusammen:

- 313,8 μ l 100 mM Puffer
- 40 μ l Substratlösung (160 mM Quinat bzw. 600 mM Shikimat)
- 40 μ l NAD⁺- bzw. NADP⁺-Lösung
- 6,2 μ l Enzymlösung (323 nM bzw. 808 nM oder 1,6 μ M)

II.6. Kristallisation

II.6.1. Cokristallisation der Quinat-Dehydrogenase mit NAD⁺

Die für die Cokristallisation mit NAD⁺ eingesetzten Enzymlösungen hatten eine Proteinkonzentration von 8,5 bis 13,5 mg/ml. Ihnen wurde ein entsprechendes Volumen 100 mM NAD⁺-Lösung zugesetzt, so dass ein Endvolumen von 1 mM NAD⁺ in der Enzymlösung vorlag. Diese Enzym/Cosubstrat-Lösungen wurden für ca. 1 h bei 4 °C inkubiert, um die Bindung des Cofaktors sicherzustellen.

Für die initialen Kristallisationsexperimente nach dem Prinzip der unvollständigen faktoriellen

Suche (Jancarik und Kim, 1991) wurden die unter II.1.6. aufgeführten Screens verwendet. Das Reservoirvolumen betrug jeweils 300 μ l, die Tropfen setzten sich aus je 1 bis 2 μ l Proteinlösung und dem gleichen Volumen an Fällungsmittel zusammen.

Es wurde ausschließlich mittels sitzendem Tropfen bei RT durch Dampfdiffusion kristallisiert.

Bei der Definition der Kristallisationsbedingungen handelt es sich grundsätzlich um die Zusammensetzungen des jeweiligen Fällungsmittels und des zugegebenen Cosubstrates, die Komponenten des Proteinpuffers wurde dabei vernachlässigt.

Die Ursprungsbedingungen bei erfolgreicher Kristallisation wurden durch systematische Variation der unterschiedlichen Parameter zur Optimierung der Kristalle verfeinert.

Alle Reservoirs und Tropfen wurden manuell pipettiert und gemischt.

Die Resultate der Kristallisationsexperimente wurden in regelmäßigen Abständen mikroskopisch überprüft, protokolliert und gegebenenfalls photographisch dokumentiert. Tropfen mit potentiellen Proteinkristallen wurden mit einer 1:100 verdünnten Izit™-Lösung (Hampton Research) versetzt, um durch Farbaufnahme auszuschließen, dass es sich um Salzkristalle handelt.

II.6.2. Cokristallisation der Quinat-Dehydrogenase mit Quinat und NADH

Die für die Cokristallisation mit Quinat und NADH eingesetzten Enzymlösungen hatten eine Proteinkonzentration von 9,5 bis 12,5 mg/ml. Ihnen wurde ein entsprechendes Volumen an 520 mM Quinat-Lösung (pH 7 bis 8) und 100 mM NADH-Lösung zugesetzt, so dass ein Endvolumen von 35 mM Quinat und 1 mM NADH in der Enzymlösung vorlag. Diese Enzym/Substrat/Cosubstrat-Lösung wurde für ca. 1 h bei 4 °C inkubiert, um die Bindung des Substrats und NADH sicherzustellen.

Die Kristallisation erfolgte wie unter II.6.1. beschrieben.

II.6.3. Cokristallisation der Quinat-Dehydrogenase mit Shikimat und NADH

Die für die Cokristallisation mit Shikimat und NADH eingesetzten Enzymlösungen hatten eine Proteinkonzentration von ca. 10 mg/ml. Ihnen wurde ein entsprechendes Volumen an 600 mM Shikimat-Lösung (pH 7 bis 8) und 100 mM NADH-Lösung zugesetzt, so dass ein Endvolumen von 35 mM Shikimat und 1 mM NADH in der Enzymlösung vorlag. Diese Enzym/Substrat/Cosubstrat-Lösung wurde für ca. 1 h bei 4 °C inkubiert, um die Bindung von Shikimat und NADH sicherzustellen.

Die Kristallisation erfolgte wie unter II.6.1. beschrieben.

II.7. Röntgendiffraktometrie

Alle Datensätze wurden am Deutschen Elektronen-Synchrotron (DESY, Hamburg) an den Messplätzen des European Molecular Biology Laboratory (EMBL) gemessen (X12 und BW7B). Messplatz X12 verfügt über einen Röntgenstrahl mit veränderlicher Wellenlänge von 2,1-0,7 Å und einen MARMosaic-CCD Detektor [225 mm].

Der Messplatz BW7B arbeitet mit einer festgelegten Wellenlänge von 0,84 Å und einem Mar 345-mm IP-Detektor. Beide Messplätze sind wie die Hausanlage mit einer Cryoanlage der Firma Oxford Cryosystems ausgestattet.

II.7.1. Kristallvorbereitung und –montage

Einige Kristalle wurden an der hauseigenen Röntgenanlage (Drehanode mit Cu-K α -Strahlung) auf ihr Diffraktionsverhalten hin geprüft und vorcharakterisiert.

Bei allen Kristallen wurde mittels des Stickstoffstroms der Kühlanlage die Kristallisationslösung (Mutterlauge) auf ihre Cryotauglichkeit überprüft bzw. potentielle Cryolösungen auf ihre Eignung getestet.

Die Mutterlauge der Cokristalle der Quinat-Dehydrogenase mit NAD⁺ (1,6 M tri-Natriumcitrat pH 6,5 bis 6,9, 25 bis 62,5 mM CoCl₂) eignete sich ohne weitere Modifikation für Cryomessungen bei 100 K. Die Kristalle wurden mit einer Nylonschleife aus dem Kristallisationstropfen gefischt, direkt in flüssigen Stickstoff überführt und darin bis zur eigentlichen Messung aufbewahrt.

Die Mutterlauge der Kristalle mit Quinat und NADH bzw. Shikimat und NADH (24 % (w/v) PEG 6000, 360 bis 400 mM CaCl₂, 100 mM Tris/HCl pH 8,0 bis 9,5) eignete sich nicht für Messungen unter Cryobedingungen, weshalb die Kristalle für ca. 1 h in eine Lösung aus 30 % (w/v) PEG 6000, 25 % (v/v) Glycerin, 100 mM Tris/HC pH 8,5 überführt wurden, bevor sie, wie oben beschrieben, in flüssigem Stickstoff eingefroren und aufbewahrt wurden.

II.7.2. Diffraktionsexperimente

Die Diffraktionsexperimente wurden mittels Stickstoffstrom bei einer Temperatur von 100 K durchgeführt.

II.7.2.1. Komplexkristalle der Quinat-Dehydrogenase mit NAD⁺

Es wurde ein weitgehend vollständiger Datensatz eines QDH/NAD⁺-Kristalls (Raumgruppe C2) mit hoher Auflösung gemessen, sowie ein Teildatensatz eines gleichen Komplexkristalls bei niedrigerer Auflösung, um die Datenqualität zu erhöhen (Messplatz BW7B, EMBL, Hamburg).

Messparameter für den hochaufgelösten Datensatz:

Höchste Auflösung: 0,98 Å
Wellenlänge: 0,8423 Å
Kristall-Detektor-Abstand: 139,85 mm
Rotation pro Aufnahme: 0,5 °
Anzahl der Diffraktionsaufnahmen: 436
Gesamtrotation: 218 °
Mar 345-mm IP-Detektor 345 mm × 345 mm

Messparameter für den niedrigaufgelösten Datensatz:

Höchste Auflösung: 2,1 Å
Wellenlänge: 0,8423 Å
Kristall-Detektor-Abstand: 399,87 mm
Rotation pro Aufnahme: 1,0 °
Anzahl der Diffraktionsaufnahmen: 191
Gesamtrotation: 191 °
Mar 345-mm IP-Detektor 345 mm × 345 mm

II.7.2.2. Komplexkristalle der Quinat-Dehydrogenase mit Quinat und NADH

Von der Quinat-Dehydrogenase im Komplex mit Quinat und NADH (Raumgruppe C2) wurde wiederum ein vollständiger Datensatz mit hoher Auflösung gemessen, sowie ein Teildatensatz bei niedrigerer Auflösung, um die Datenqualität zu erhöhen (Messplatz X12, EMBL, Hamburg).

Messparameter für den hochaufgelösten Datensatz:

Höchste Auflösung: 1,16 Å
Wellenlänge: 0,9000 Å
Kristall-Detektor-Abstand: 109,85 bzw. 109,94 mm

Rotation pro Aufnahme: 0,5 °
Anzahl der Diffraktionsaufnahmen: 452
Gesamtrotation: 226 °
MARMosaic-CCD Detektor 225 mm × 225 mm

Messparameter für den niedrigaufgelösten Datensatz:

Höchste Auflösung: 1,43 Å
Wellenlänge: 0,9000 Å
Kristall-Detektor-Abstand: 149,60 mm
Rotation pro Aufnahme: 0,5 °
Anzahl der Diffraktionsaufnahmen: 262
Gesamtrotation: 131 °
MARMosaic-CCD Detektor 225 mm × 225 mm

II.7.2.3. Komplexkristalle der Quinat-Dehydrogenase mit Shikimat und NADH

Es wurde ein vollständiger Datensatz eines QDH/Shikimat/NADH-Kristalls (Raumgruppe C2) mit hoher Auflösung gemessen, sowie ein Teildatensatz bei niedrigerer Auflösung, um die Datenqualität zu erhöhen (Messplatz X12, EMBL, Hamburg).

Messparameter für den hochaufgelösten Datensatz:

Höchste Auflösung: 1,0 Å
Wellenlänge: 0,9000 Å
Kristall-Detektor-Abstand: 109,83 mm
Rotation pro Aufnahme: 0,5 °
Anzahl der Diffraktionsaufnahmen: 360
Gesamtrotation: 180 °
MARMosaic-CCD Detektor 225 mm × 225 mm

Messparameter für den niedrigaufgelösten Datensatz:

Höchste Auflösung: 1,43 Å
Wellenlänge: 0,9000 Å
Kristall-Detektor-Abstand: 200,00 mm

Rotation pro Aufnahme: 1,0 °

Anzahl der Diffraktionsaufnahmen: 91

Gesamtrotation: 91 °

MARMOsaic-CCD Detektor 225 mm × 225 mm

II.8. Datenreduktion

Die Röntgendiffraktionsbilder aller gemessenen Datensätze wurden mit den Programmen DENZO und SCALEPACK aus dem HKL-Programmpaket (Otwinowski und Minor, 1997) indiziert, integriert und skaliert.

Die Strukturfaktoramplituden wurden bei allen Datensätzen mit TRUNCATE (CCP4, 1994) aus den gemessenen Intensitäten berechnet.

Zur Berechnung des freien R-Werts wurden 5 % (QDH mit NAD⁺) bzw. 2 % (QDH mit NADH und Quinat bzw. Shikimat) der gemessenen Reflexe mit UNIQUE (CCP4, 1994) zufällig ausgewählt.

II.9. Strukturlösung, Modellbau und Verfeinerung der QDH-Komplexe

II.9.1. Quinat-Dehydrogenase mit NAD⁺

Die Struktur des QDH/NAD⁺-Komplexes wurde mit der Methode des molekularen Ersatzes gelöst. Da eine isomorphe Struktur vorhanden war, erübrigte sich die Translations- und Rotationsuche. Als Startmodell diente die Apostruktur der QDH aus *Corynebacterium glutamicum* (Schoepe et al., 2006; 2nlo), wobei vor Beginn der Rechnungen alle Wassermoleküle aus der Datei entfernt wurden.

Das erste Strukturmodell basierte auf einem Datensatz mit einer Auflösung von 0,98 Å (BW7B, EMBL, Hamburg). Die Elektronendichte war in fast allen Bereichen der Proteinkette und an der Cosubstrat-Bindungsstelle gut definiert. Zunächst erfolgte eine Starre-Körper-Verfeinerung mit dem Programm REFMAC (CCP4, 1994).

Die weitere Verfeinerung des Modells erfolgte durch Kombination von iterativen Zyklen manueller Anpassung des Strukturmodells mit Hilfe des Programms O (Jones et al., 1991) und molekularen Verfeinerungsrechnungen mit dem Programm REFMAC.

Die Atomkoordinaten des Cosubstrat-Moleküls NAD⁺ wurden aus einer pdb-Datei eines Proteinkomplexes aus der Protein-Datenbank (pdb; Berman et al., 2000) isoliert und mit Hilfe des PRODRG2-Servers (<http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/programs/prodrgr/>) in das REFMAC5-

Format konvertiert. Der Einbau des Cofaktors in die Elektronendichte erfolgte manuell. Die Wassermoleküle wurden mit Hilfe des Programms ARP/wARP (Perrakis et al., 2001) eingefügt. Die Verfeinerung erfolgte wiederum durch manuelle Anpassung mit Hilfe des Programms O und molekularen Verfeinerungsrechnungen mit dem Programm REFMAC.

II.9.2. Quinat-Dehydrogenase mit Quinat und NADH

Als Startmodell für die Verfeinerung des ternären Komplexes QDH/Quinat/NADH diente die verfeinerte Komplexstruktur der QDH mit NAD⁺.

Dieses Modell basierte auf einem Datensatz mit einer Auflösung von 1,16 Å. Die Elektronendichte war in fast allen Bereichen der Proteinkette, der Cosubstrat- und der Substratbindungsstelle gut definiert. Es erfolgte zunächst eine Starre-Körper- und TLS-Verfeinerung mit dem Programm REFMAC. Die weitere Verfeinerung des Modells erfolgte durch Kombination von iterativen Zyklen manueller Anpassung des Strukturmodells mit Hilfe des Programms O und molekularen Verfeinerungsrechnungen mit dem Programm REFMAC.

Die Atomkoordinaten des Substrates Quinat wurden aus einer pdb-Datei eines Proteinkomplexes isoliert und mit Hilfe des PRODRG2-Servers in das REFMAC5-Format konvertiert. Der Einbau des Substratmoleküls in die Elektronendichte erfolgte manuell.

Die Wassermoleküle wurden mit Hilfe des Programms ARP/wARP eingefügt. Die Verfeinerung erfolgte wiederum durch manuelle Anpassung mit Hilfe des Programms O und molekularen Verfeinerungsrechnungen mit dem Programm REFMAC.

II.9.3. Quinat-Dehydrogenase mit Shikimat und NADH

Als Startmodell für die Verfeinerung des ternären Komplexes QDH/Shikimat/NADH diente die verfeinerte Komplexstruktur der QDH mit NAD⁺.

Dieses Modell basierte auf einem Datensatz mit einer Auflösung von 1,16 Å. Die Elektronendichte war in fast allen Bereichen der Proteinkette, der Cosubstrat- und der Substratbindungsstelle gut definiert. Es erfolgte zunächst eine Starre-Körper- und TLS-Verfeinerung mit dem Programm REFMAC.

Die weitere Verfeinerung des Modells erfolgte durch Kombination von iterativen Zyklen manueller Anpassung des Strukturmodells mit Hilfe des Programms O und molekularen Verfeinerungsrechnungen mit dem Programm REFMAC.

Die Atomkoordinaten des Substrates Shikimat wurden aus einer pdb-Datei eines Proteinkomplexes isoliert und mit Hilfe des PRODRG2-Servers in das REFMAC5-Format konvertiert. Der Einbau des Substratmoleküls in die Elektronendichte erfolgte manuell.

Die Wassermoleküle wurden mit Hilfe des Programms ARP/wARP eingefügt. Die Verfeinerung

erfolgte wiederum durch manuelle Anpassung mit Hilfe des Programms O und molekularen Verfeinerungsrechnungen mit dem Programm REFMAC.

II.10. Analyse der Strukturmodelle

Während der Verfeinerung wurden die Modelle mit dem Programm PROCHECK (Laskowski et al., 1993) und den Routinen in REFMAC auf ihre stereochemische Qualität geprüft. Weiterhin wurde der Validation-Server der Protein-Datenbank (<http://deposit.pdb.org/validate/>) genutzt, um stereochemische Mängel zu beseitigen.

Ein weiteres wichtiges Kriterium für die Beurteilung der Verfeinerungsprozesse war die Beobachtung der R-Werte. Fiel der R_{free} in vergleichbarem Maße wie der R_{work} , war dies ein Hinweis auf eine signifikante Verbesserung der Strukturmodelle.

II.11. Abbildungen der Strukturmodelle

Alle Moleküldarstellungen wurden mit dem Programm PyMOL (DeLano Scientific LLC, San Carlos, CA, USA) erstellt.

III. Ergebnisse

Wie schon in der Einleitung beschrieben ist die Quinat-Dehydrogenase (QDH) aus *Corynebacterium glutamicum* bereits biochemisch vorcharakterisiert sowie als Apoenzym kristallisiert und strukturell aufgeklärt worden (Dissertation Jan Schoepe, 2006). Genauere kinetische Daten und Informationen über die Substrat- und Cosubstratbindung fehlten jedoch bislang, so dass diesbezüglich lediglich Modelle zur Verfügung standen und über den möglichen Katalysemechanismus nur Vermutungen geäußert werden konnten.

Im Folgenden wird die verbesserte Expression und Reinigung der Quinat-Dehydrogenase dargestellt, sowie die Ergebnisse aus den erweiterten enzymkinetischen Untersuchungen. Darüber hinaus konnte die QDH zum einen mit dem Cofaktor NAD⁺, zum anderen sowohl im Komplex mit NADH und dem Substrat Quinat als auch mit NADH und Shikimat kokristallisiert und strukturell gelöst werden, so dass nun Detailinformationen zum Bindungsmodus und zur Substrat- und Cosubstratspezifität vorliegen.

III.1. Expression und Reinigung der Quinat-Dehydrogenase aus *Corynebacterium glutamicum*

Die in den modifizierten pET3d-Vektor (Chatterjee et al., 2005) klonierte DNA-Sequenz der QDH wurde mir freundlicherweise von Jan Schoepe zur Verfügung gestellt.



Abb. III.1.1.: SDS-Gelelektrophorese der einzelnen Reinigungsfractionen der QDH.

M: Marker, **1:** klarer Überstand nach Zellaufschluss, **2:** Durchfluss der Nickel-Säule, **3:** Waschfraktion, **4:** 1. Elutionsfraktion, **5:** 2. Elutionsfraktion, **6:** 3. Elutionsfraktion, **7:** 4. Elutionsfraktion

Die heterologe Expression der Quinat-Dehydrogenase (QDH) aus *Corynebacterium glutamicum* erfolgte in *E. coli*. Dabei zeigte sich, dass ein *E.-coli*-Kulturvolumen von 250 ml in einem 1-l-Kolben (statt von 1 l in einem 2-l-Kolben), bei der Expression zu einer deutlich höheren Proteinüberproduktion führte.

Nach der Expression wurden die Zellen durch Ultraschall aufgeschlossen, die Zelltrümmer durch Zentrifugation entfernt und das N-terminal His₆-getagte Enzym in einem Reinigungsschritt mittels Nickel-Affinitätschromatographie isoliert.

Aus 500 ml Bakterienkultur konnte auf diese Weise immer zwischen 6 und 10 mg an reinem Protein gewonnen werden, was etwa einer Verdreifachung der Proteinmenge verglichen mit dem vorherigen Protokoll entspricht. Der Erfolg

der Reinigung wurde stets mittels SDS-PAGE überprüft (Abb. III.1.1.). Da nach der Isolation keine Verunreinigungen zu erkennen waren und das Protein gut kristallisierte, war kein weiterer Reinigungsschritt notwendig.

Aufgrund der verbesserten Proteinexpression und der lediglich einstufigen Reinigung konnte eine gute Anreicherung um den Faktor 8,8 sowie eine sehr hohe Proteinausbeute von 94,6 % erzielt werden (Tab. III.1.2.).

Tab. III.1.2.: Reinigungstabelle der Quinat-Dehydrogenase aus *C. glutanicum*, exprimiert in *E. coli*.

Die Ergebnisse beziehen sich auf die Proteinisolation aus 0,5 l Flüssigkultur. Die Gesamtmenge an reinem Protein konnte auf etwa 6 bis 10 mg gesteigert werden, die Anreicherung beläuft sich auf einen Faktor von 8,8 und die Ausbeute beträgt 94,6 %.

Fraktion	Volumen [ml]	Protein-konz. [mg/ml]	Gesamt-protein [mg]	Aktivität [Units/ml] *	Gesamt-aktivität (Units)	Spezifische Aktivität [Units/mg]	Reinigungs-faktor	Ausbeute [%]
klares Lysat	75	1,1	82,5	65,27	4895,25	59,34	1	100
Durchfluß	75	0,9	67,5	0,11	8,25	0,12		
Waschfraktion	40	0,02	0,68	0,39	15,60	22,94		
vereinigte Elutionen	8	4,44	8,91	578,97	4631,76	519,84	8,8	94,6

* 1 Unit ist die Enzymmenge, die 1 µMol Substrat pro Minute umsetzt

III.2. Entfernung des N-terminalen His₆-tags der Quinat-Dehydrogenase

Nach der Spaltung des Fusionsproteins mittels der AcTEV-Protease wurde die QDH durch Nickel-Affinitätschromatographie von der Protease, den abgespaltenen His₆-tags und den eventuell noch vorhandenen Fusionsproteinen gereinigt.

Die Entfernung des Tags und die Reinheit der Proteinprobe wurden durch Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometer-Analyse überprüft. Es zeigte sich, dass das Fusionsprotein spezifisch gespalten wurde.

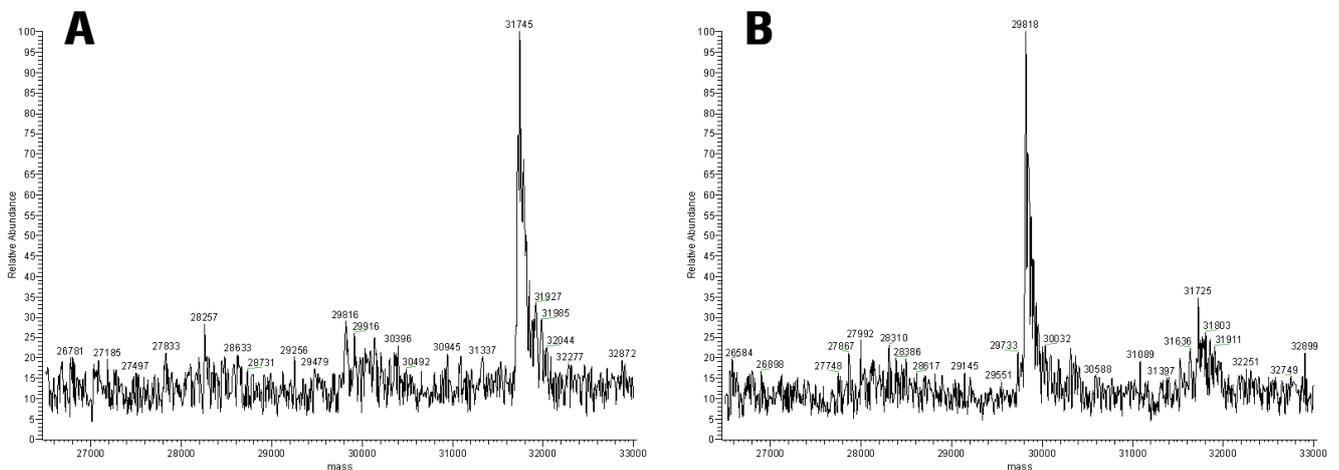


Abb. III.2.1.: ESI-MS-Spektren der Quinat-Dehydrogenase vor (A) und nach (B) der Abspaltung des N-terminalen His₆-tags.

Die ermittelten Molekulargewichte von 31 745 und 29 818 Da stimmen gut mit den theoretisch zu erwartenden Werten von 31 854 und 29 814 Da überein. Beide Proteinproben enthalten keine groben Verunreinigungen.

Für die QDH mit N-terminalem His₆-tag ergibt sich eine molare Masse von 31 745 Da, für das gespaltene Enzym von 29 818 Da (Abb. III.2.1.), was mit den theoretisch ermittelten Massen von 31 854 und 29 814 Da gut übereinstimmt.

Neben der erfolgreichen Spaltung konnte durch diese Analyse ebenfalls nachgewiesen werden, dass beide Proteinproben keine groben Verunreinigungen enthielten.

III.3. Enzymkinetik

Die *in vivo* katalysierte Reaktion der QDH ist die Dehydrierung von Quinon zu 3-Dehydroquinon unter Reduktion von NAD(P), wobei diese Reaktion grundsätzlich reversibel ist. Der Reaktionsmechanismus dieses Enzyms ist verbunden mit einem Hydridtransfer vom C3-Atom des Substrats auf das C4-Atom des Cofaktors NAD(P).

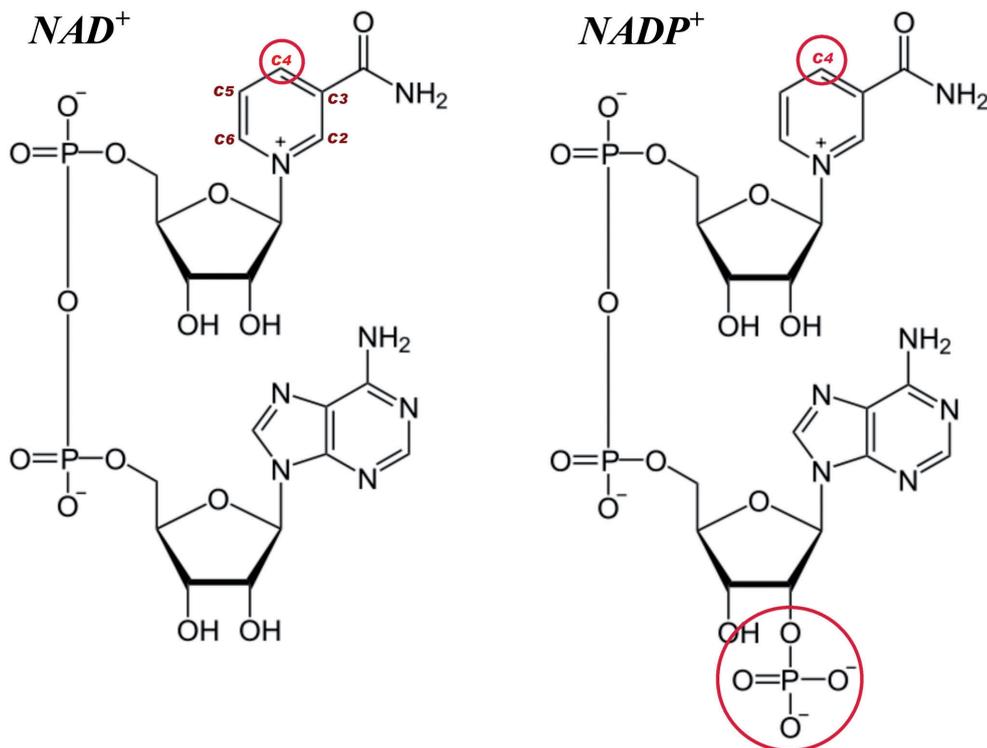


Abb. III.3.1.: Chemische Strukturen der Cofaktoren NAD⁺ (links) und NADP⁺ (rechts).

Im NAD⁺-Molekül sind die C-Atome des Nikotinamidsrings nummeriert, besonders gekennzeichnet ist das Hydrid-aufnehmende C4-Atom und die zusätzliche Phosphatgruppe beim NADP⁺.

III.3.1. pH-Optimum der Quinat-Dehydrogenase

Die pH-Optima der Quinat-Dehydrogenase gegenüber den beiden Substraten China- und Shikimisäure wurde in zwei verschiedenen Puffersystemen (Tris/HCl und Natriumcarbonat) über einen pH-Bereich von 7,0 bis 11,5 bestimmt. Dabei war unbedingt darauf zu achten, dass die Lösungen der beiden sehr sauren Substrate China- und Shikimisäure (im Nachfolgenden der Einfachheit halber nur noch Quinat und Shikimat genannt) auf einen pH-Wert von ungefähr 7-8 gebracht wurden, da sonst deutliche Verschiebungen in den Optimumskurven zu verzeichnen waren.

Die QDH besitzt ein pH-Optimum von etwa 9,0 bis 9,5 bezüglich Chinasäure, während der optimale pH für den Umsatz von Shikimisäure weiter im Basischen bei etwa 10,0 bis 10,5 liegt (Abb. III.3.1.1.).

Generell lässt sich feststellen, dass die relative Aktivität gegenüber Quinat höher ist als die bezüglich Shikimat.

Für die Umsetzung von Quinat scheint der Tris/HCl-Puffer geeigneter zu sein, für die Reaktion mit Shikimat der Natriumcarbonat-Puffer, möglicherweise dadurch begründet, dass dieser Puffer seine Kapazität in einem basischeren Bereich besitzt.

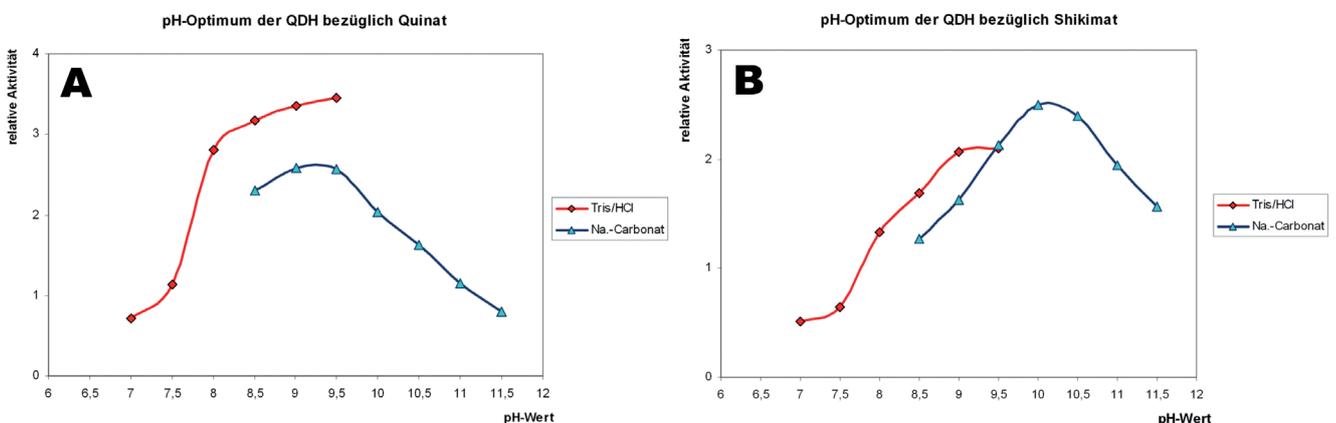


Abb. III.3.1.1.: pH-Optima der Quinat-Dehydrogenase gegenüber Quinat (A) und Shikimat (B).

Die Aktivität der QDH wurde in zwei verschiedenen Puffersystemen bestimmt (100 mM Tris/HCl und 100 mM Natriumcarbonat).

III.3.2. Kinetische Parameter der Quinat-Dehydrogenase

Um das vorliegende Enzym eindeutig einer Enzymklasse zuzuordnen zu können, ist es wichtig, die Substrat- und Cosubstratspezifitäten zu klären.

Das hier untersuchte Protein wurde sowohl von der Universität Bielefeld und der Kyowa Hakko Kogyo Co. Ltd. als auch von der eigenen Arbeitsgruppe als Shikimat-Dehydrogenase annotiert. Weiterhin konnte dieses Enzym in Rahmen einer Dissertation kinetisch vorcharakterisiert werden (Jan Schoepe, 2006).

Um genauere Daten bezüglich der Reaktionskatalyse zu erhalten, wurden für diese Arbeit die bisher durchgeführten enzymkinetischen Messungen wiederholt und erweitert.

Die QDH besitzt katalytische Aktivität gegenüber den Substraten Quinat und Shikimat, die chemisch sehr ähnlich sind (Abb. III.3.2.1.). Quinat weist im Vergleich zu Shikimat am C1-Atom eine zusätzliche Hydroxygruppe auf, während Shikimat zwischen dem C1- und dem C2-Atom eine Doppelbindung besitzt.

Das pH-Optimum für beide Reaktionen liegt deutlich im basischen Bereich, für die Quinat-Umsetzung bei pH 9,0 bis 9,5, für die Shikimat-Umwandlung bei pH 10,0 bis 10,5 (siehe Abb. III.3.1.1.).

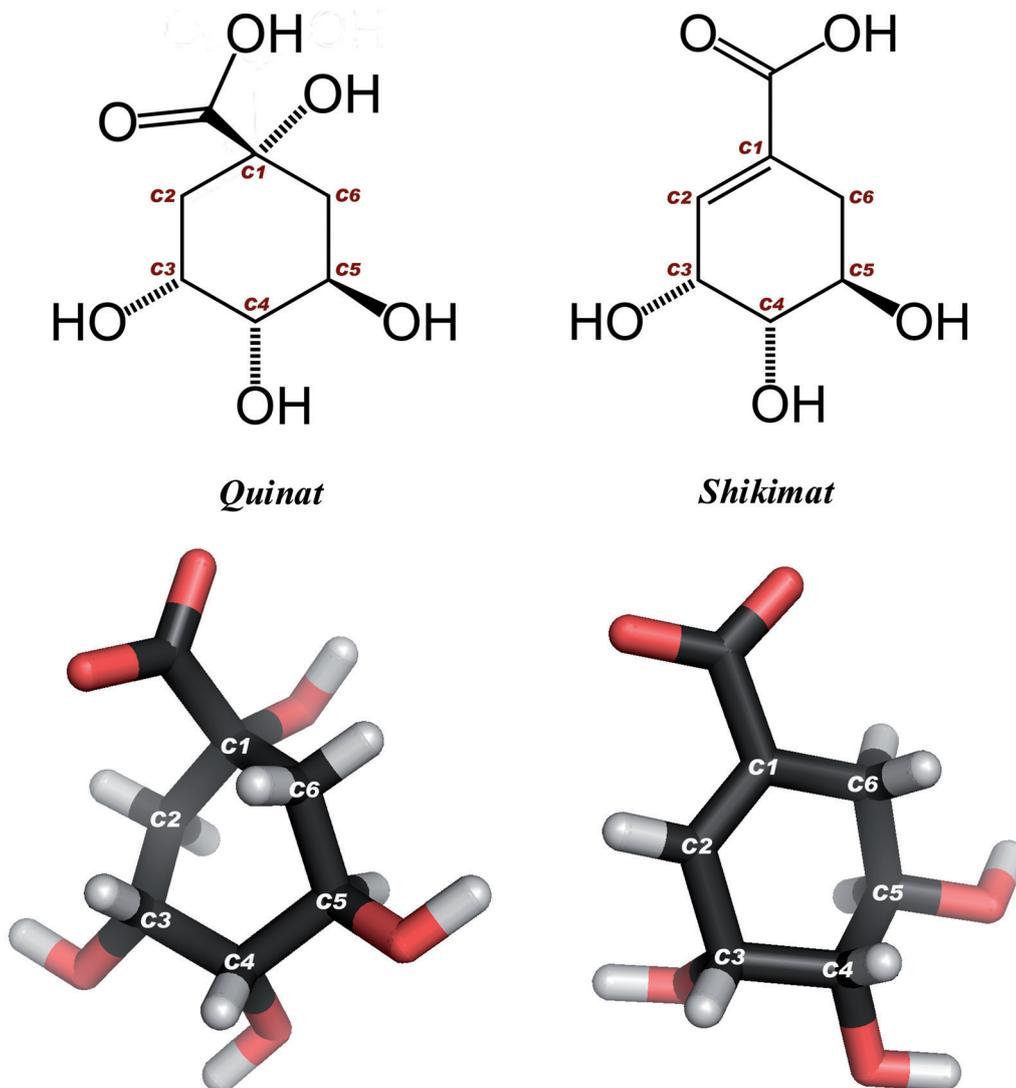


Abb. III.3.2.1.: Strukturen der beiden Substrate Quinat (links) und Shikimat (rechts)

Die in den im Vorfeld durchgeführten kinetischen Messungen verwendeten Substratkonzentrationen lagen bei maximal 8 mM, da eine Substratüberschusshemmung beschrieben wurde (Dissertation Jan Schoepe, 2006). Dadurch lag die Substratkonzentration zumindest bezüglich Shikimat deutlich unterhalb der berechneten Michaelis-Konstante.

Um diese Beobachtung zu überprüfen, wurde die Substratkonzentration bezüglich Quinat auf einen Bereich von 0,25 bis 32 mM ausgedehnt, für Shikimat auf 2,5 bis 60 mM.

Für die beiden verwendeten Substrate Quinat und Shikimat in den genannten Konzentrationen konnte bei keiner Messung eine Substratinhibition festgestellt werden. Die in Abbildung III.3.2.2. dargestellten Umsatzkurven belegen diese Befunde.

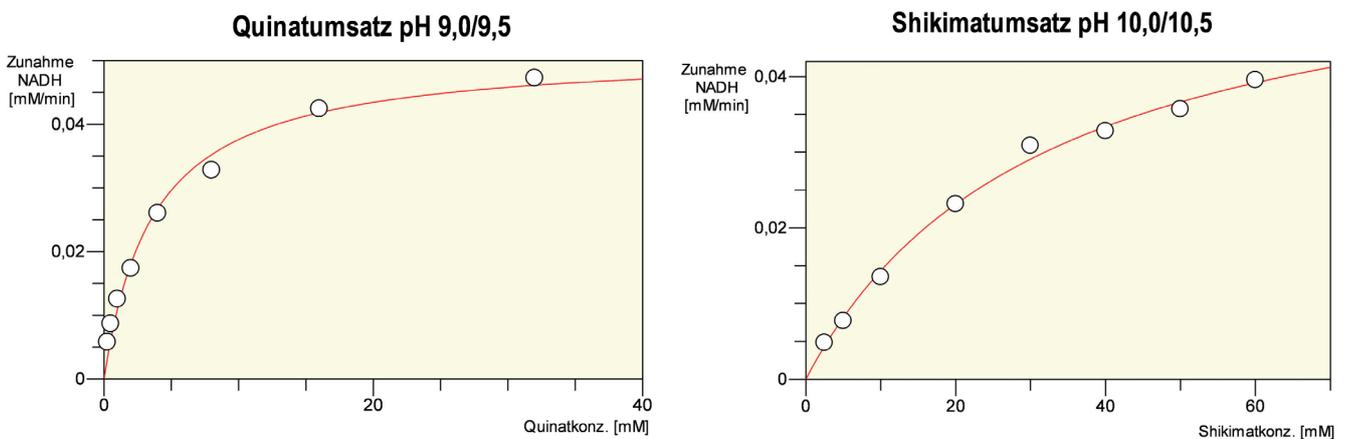


Abb. III.3.2.2.: Umsatzkurven der QDH von Quinat (links) und Shikimat (rechts), gezeigt anhand der Zunahme des reduzierten Cofaktors NADH.

Unter Bedingungen mit optimalem pH erreicht die QDH (mit N-terminalem His₆-tag) mit Shikimat als Substrat eine etwa doppelt so hohe Wechselzahl als gegenüber Quinat (k_{cat} -Wert für Quinat: 105 sec^{-1} , k_{cat} -Wert für Shikimat: 214 sec^{-1}) wie aus den Tabellen III.3.2.1. und III.3.2.2. hervorgeht. Noch deutlicher aber unterscheiden sich die Michaelis-Konstanten bezüglich dieser beiden Substrate. Der K_{M} -Wert für Quinat beträgt etwa 2,4 mM, der für Shikimat ist mit ungefähr 54 mM etwa 23-mal höher. Die sich daraus ergebenden katalytischen Effizienzen unterscheiden sich in einer Zehnerpotenz: das $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Verhältnis liegt bezüglich Quinat bei etwa $44 \text{ sec}^{-1} \times \text{mM}^{-1}$, das für Shikimat bei ungefähr $4 \text{ sec}^{-1} \times \text{mM}^{-1}$.

Betrachtet man die katalytischen Parameter, die sich für das Cosubstrat NAD⁺ entweder mit Quinat oder mit Shikimat als Substrat ergeben, so unterscheiden sich die Wechselzahlen praktisch nicht (beide k_{cat} -Werte im Bereich von etwa 205 bis 220 sec^{-1}), jedoch die Michaelis-Konstanten. Für NAD⁺ mit Quinat beträgt der K_{M} -Wert etwa 0,28 mM, für NAD⁺ mit Shikimat ist er mit etwa 0,46 mM fast doppelt so hoch. Dieses Verhältnis spiegelt sich auch in den $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Verhältnissen wieder (Tab. III.3.2.1. und Tab. III.3.2.2.).

Unter physiologischen Bedingungen jedoch ändern sich die katalytischen Parameter der QDH etwas. Die Wechselzahlen bezüglich der Substrate Quinat und Shikimat unterscheiden sich kaum mehr, wobei der k_{cat} -Wert für Quinat mit etwa 50 sec^{-1} ungefähr halb so groß ist wie unter optimalen pH-Bedingungen, während der k_{cat} -Wert für Shikimat mit etwa 30 sec^{-1} ungefähr 7-mal niedriger als bei optimalem pH-Wert. Die Michaelis-Konstanten werden für beide Substrate niedriger, für Quinat sinkt der K_{M} -Wert auf etwa $1,6 \text{ mM}$, für Shikimat auf etwa 10 mM .

Auch unter physiologischen Bedingungen unterscheiden sich die katalytischen Effizienzen in der Größenordnung einer Zehnerpotenz, wobei diese nur geringfügig niedriger sind als unter optimalem pH-Wert: das $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Verhältnis liegt bezüglich Quinat bei etwa $33 \text{ sec}^{-1} \times \text{mM}^{-1}$, das für Shikimat bei ungefähr $3 \text{ sec}^{-1} \times \text{mM}^{-1}$ (Tab. III.3.2.1. und Tab. III.3.2.2.).

Tab. III.3.2.1.: Kinetische Parameter der Quinat-Dehydrogenase gegenüber Quinat und NAD⁺.

Die QDH mit N-terminalem His₆-tag wurde sowohl bei optimalem pH-Wert (pH 9,0 bis 9,5) als auch unter physiologischem pH (7,5) charakterisiert. Die kinetischen Parameter der QDH nach Entfernen des His₆-tags wurden ausschließlich gegenüber Quinat bei optimalem pH-Wert ermittelt.

pH 9,0/9,5	Substrat	K _M [mM]	k _{cat} [sec ⁻¹]	k _{cat} /K _M [sec ⁻¹ mM ⁻¹]
mit His	Quinat	2,37 ± 0,77	104,87 ± 43,78	44,05 ± 10,84
ohne His	Quinat	2,31 ± 0,29	173,33 ± 16,78	75,62 ± 9,59
mit His	NAD ⁺	0,28 ± 0,07	223,06 ± 27,04	826,61 ± 226,52

pH 7,5	Substrat	K _M [mM]	k _{cat} [sec ⁻¹]	k _{cat} /K _M [sec ⁻¹ mM ⁻¹]
mit His	Quinat	1,56 ± 0,50	50,82 ± 17,31	33,30 ± 7,44
mit His	NAD ⁺	0,13 ± 0,03	43,67 ± 8,64	329,14 ± 20,52

Tab. III.3.2.2.: Kinetische Parameter der Quinat-Dehydrogenase gegenüber Shikimat und NAD⁺.

Die QDH mit N-terminalem His₆-tag wurde sowohl bei optimalem pH-Wert (pH 10,0 bis 10,5) als auch unter physiologischem pH (7,5) charakterisiert. Die kinetischen Parameter der QDH nach Entfernen des His₆-tags wurden ausschließlich gegenüber Shikimat bei optimalem pH-Wert ermittelt.

pH 10,0/10,5	Substrat	K _M [mM]	k _{cat} [sec ⁻¹]	k _{cat} /K _M [sec ⁻¹ mM ⁻¹]
mit His	Shikimat	53,88 ± 15,43	214,09 ± 30,37	4,24 ± 1,38
ohne His	Shikimat	53,31 ± 6,29	249,40 ± 28,54	4,69 ± 0,36
mit His	NAD ⁺	0,46 ± 0,09	205,78 ± 29,58	464,65 ± 84,15

pH 7,5	Substrat	K _M [mM]	k _{cat} [sec ⁻¹]	k _{cat} /K _M [sec ⁻¹ mM ⁻¹]
mit His	Shikimat	10,16 ± 3,53	30,13 ± 7,84	3,10 ± 0,76
mit His	NAD ⁺	0,87 ± 0,25	61,12 ± 13,77	71,58 ± 12,16

Für das Cosubstrat ergeben sich deutlichere Veränderungen. Die Wechselzahlen für NAD⁺ mit Quinat und mit Shikimat nehmen um das drei- bis fünffache ab, wobei sie sich mit etwa 44 sec^{-1} und 61 sec^{-1} bei pH 7,5 wiederum kaum voneinander unterscheiden. Interessant ist bei diesem pH-Wert jedoch die Veränderung der Michaelis-Konstanten, die sich diesmal in unterschiedlichen Richtungen vollzieht: während der K_{M} -Wert für NAD⁺ mit Quinat auf etwa die Hälfte sinkt

(0,13 mM), steigt er für NAD⁺ mit Shikimat auf etwa das Doppelte (0,87 mM) verglichen mit den optimalen pH-Bedingungen. Daraus ergibt sich für die katalytische Effizienz, dass sich das k_{cat}/K_M -Verhältnis von NAD⁺ mit Quinat auf etwa die Hälfte verringert ($330 \text{ sec}^{-1} \times \text{mM}^{-1}$), während das von NAD⁺ mit Shikimat sogar um das 6-fache abnimmt.

Um zu überprüfen, ob der N-terminale His₆-tag einen Einfluss auf die katalytischen Eigenschaften der QDH hat, wurde dieses proteolytisch abgespalten und das verkürzte Enzym hinsichtlich seiner katalytischen Parameter bezüglich Quinat und Shikimat bei optimalem pH-Wert untersucht.

Es zeigt sich, dass die Wechselzahl bezüglich Quinat mit etwa 173 sec^{-1} etwas höher ist als bei dem Fusionsprotein, während die Michaelis-Konstante vollkommen übereinstimmt (etwa 2,3 mM). Dadurch ergibt sich eine leicht höhere katalytische Effizienz von ungefähr $76 \text{ sec}^{-1} \times \text{mM}^{-1}$ bei dem verkürzten Enzym (Tab. III.3.2.1. und Tab. III.3.2.2.).

Kinetische Untersuchungen bezüglich der Cosubstrate ergaben, dass ausschließlich NAD⁺ als Reaktionspartner eine Rolle spielt. Bei allen Messungen mit NADP⁺, egal ob mit Quinat oder Shikimat, ob bei optimalem pH-Wert oder unter physiologischen Bedingungen, konnte keinerlei Umsatz gemessen werden, so dass ausgeschlossen werden kann, dass NADP⁺ als Cofaktor dienen kann.

Um zu testen, ob NADP⁺ überhaupt gebunden wird, wurden beide Cofaktoren (NAD⁺ und NADP⁺) und das Substrat Quinat zum Reaktionsgemisch gegeben. Der Umsatz war in allen Fällen identisch mit dem, wenn allein NAD⁺ als Cosubstrat eingesetzt wurde.

Die umgekehrten Reaktionen (3-Dehydroquinat bzw. 3-Dehydroshikimat zu Quinat bzw. Shikimat) wurden nicht durchgeführt, da beide Substrate nicht kommerziell erhältlich sind.

Die Lagerung der Enzyme sowohl bei 4 °C als auch bei -20 °C hatte keinen Einfluss auf die Funktionstüchtigkeit des Enzyms. Auch nach etwa 6 Monaten konnte keine verminderte katalytische Aktivität beobachtet werden.

III.4. Kristallisation der Quinat-Dehydrogenase

Im Rahmen der Dissertation von Jan Schoepe (2006) konnte das Apoenzym der QDH kristallisiert und strukturell aufgeklärt werden, jedoch gelang es seinerzeit nicht, das Enzym mit NAD⁺ zu kokristallisieren.

Um aber mögliche Ursachen für die unterschiedliche Substrat- und Cosubstratverwendung zu finden, sind Komplexstrukturen sehr nützlich.

Für alle Kokristallisationsversuche wurde die QDH als Fusionsprotein eingesetzt.

III.4.1. Cokristallisation der Quinat-Dehydrogenase mit NAD⁺

Um eine Bindung des Cosubstrates NAD⁺ mit hohem Besetzungsgrad zu ermöglichen, wurde der Cofaktor sowohl im molarem Überschuß gegenüber dem Protein als auch in einer Konzentration, die dem etwa zwei- bis dreifachen K_M -Wert von NAD⁺ entspricht, eingesetzt (Endkonzentration 1 mM).

Erste Kristalle lieferte der Crystal Screen 2 der Firma Hampton Research. Die Kristallisationslösung bestand aus 1,6 M tri-Natriumcitrat pH 6,5.

Im Laufe der Optimierungsversuche konnten Einkristalle der QDH mit NAD⁺ gezüchtet werden, die ein sehr gutes Diffraktionsvermögen besaßen. Das optimierte Fällungsmittel setzte sich aus 1,6 M tri-Natriumcitrat pH 6,5 bis 6,9 und 25 bis 62,5 mM CoCl₂ zusammen. Das Enzym konnte unter diesen Bedingungen reproduzierbar und zuverlässig kristallisiert werden, wobei die größten Einkristalle schon nach wenigen Tagen eine Kantenlänge von etwa 0,4 × 0,13 × 0,13 mm³ erreichten (Abb. III.4.1.1.). Die Mutterlauge eignete sich als Cryolösung, so dass die Kristalle ohne weitere Vorbereitung in Diffraktionsexperimenten eingesetzt werden konnten.

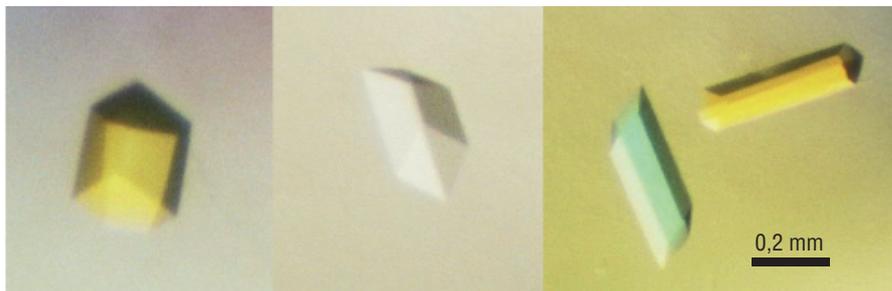


Abb. III.4.1.1.: Verschiedene Kristallformen der QDH im Komplex mit NAD⁺.

Das Fällungsmittel bestand aus 1,6 M tri-Natriumcitrat pH 6,9, mit 0 bis 62,5 mM CoCl₂ (die beiden äußeren Aufnahmen wurden mit Polarisationsfilter aufgenommen).

III.4.2. Cokristallisation der Quinat-Dehydrogenase mit Quinat und NADH sowie mit Shikimat und NADH

Um eine gute Bindung von Substrat (Quinat bzw. Shikimat) und reduziertem Cofaktor (NADH) an das Enzym zu ermöglichen, wurden beide gegenüber dem Protein in hohem molarem Überschuß und in Konzentrationen, die bezüglich Quinat deutlich über dem entsprechenden K_M -Wert und bezüglich Shikimat zumindest im Bereich der Michaelis-Konstanten lagen, zugegeben (Endkonzentration Quinat bzw. Shikimat: 35 mM, Endkonzentration NADH: 1 mM).

Erste Kristalle lieferte der Grid Screen PEG 6000 der Firma Hampton Research. Die Kristallisationslösung bestand aus 20 % PEG 6000, 100 mM Tris/HCl pH 8,0.

Im Zuge der Optimierungsversuche konnten Einkristalle der QDH mit Quinat bzw. Shikimat und NADH gezüchtet werden, die ein sehr gutes Diffraktionsvermögen besaßen. Das optimierte Fällungsmittel setzte sich aus 24 % PEG 6000, 360 bis 400 mM CaCl_2 und 100 mM Tris/HCl pH 8,0 bis 9,5 zusammen, durch welches das Enzym reproduzierbar und zuverlässig kristallisiert werden konnte.

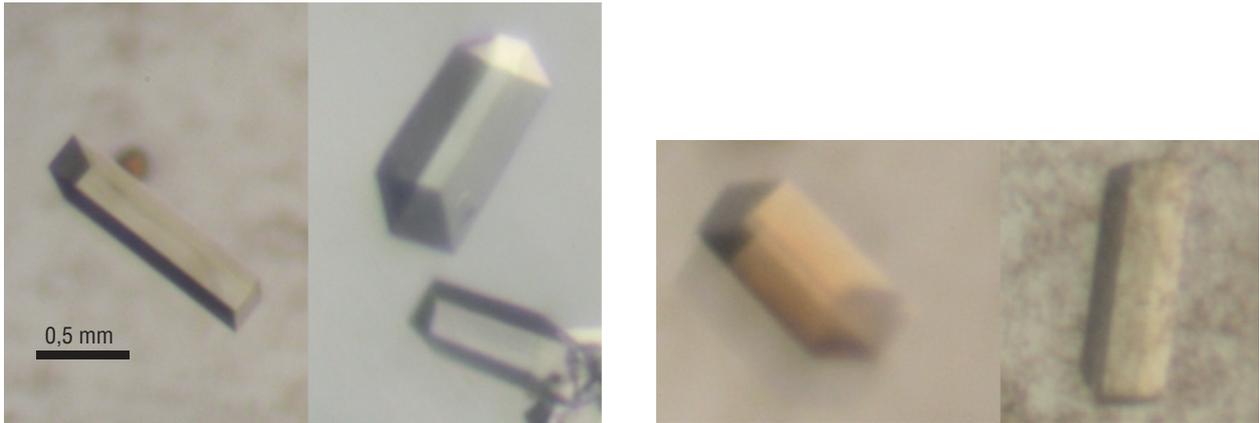


Abb. III.4.1.2.: Verschiedene Kristallformen der QDH im Komplex mit NADH und Quinat (links) bzw. NADH und Shikimat (rechts).

Das Fällungsmittel bestand aus 24 % PEG 6000, 360 bis 400 mM CaCl_2 und 100 mM Tris/HCl pH 8,0 bis 9,5.

Die größten Einkristalle beider Komplexe erreichten eine Kantenlänge von ca. $1,0 \times 0,12 \times 0,12 \text{ mm}^3$ nach etwa einer Woche (Abb. III.4.1.2.). Die Mutterlauge eignete sich nicht als Cryolösung, so dass die Kristalle in eine Lösung aus 30 % PEG 6000, 25 % Glycerin und 100 mM Tris/HC pH 8,5 überführt werden mussten, bevor sie in Diffraktionsexperimenten eingesetzt werden konnten.

III.5. Diffraktionsmessungen

III.5.1. Diffraktionsmessung der QDH im Komplex mit NAD^+

Ein weitgehend vollständiger hochaufgelöster Datensatz des QDH/ NAD^+ -Komplexes wurde am Synchrotron in Hamburg aufgenommen. Der Kristall zeigte ein außerordentlich gutes Diffraktionsvermögen, so dass ein Auflösungsmaximum von $0,98 \text{ \AA}$ erreicht werden konnte (Abb. III.5.1.1.).

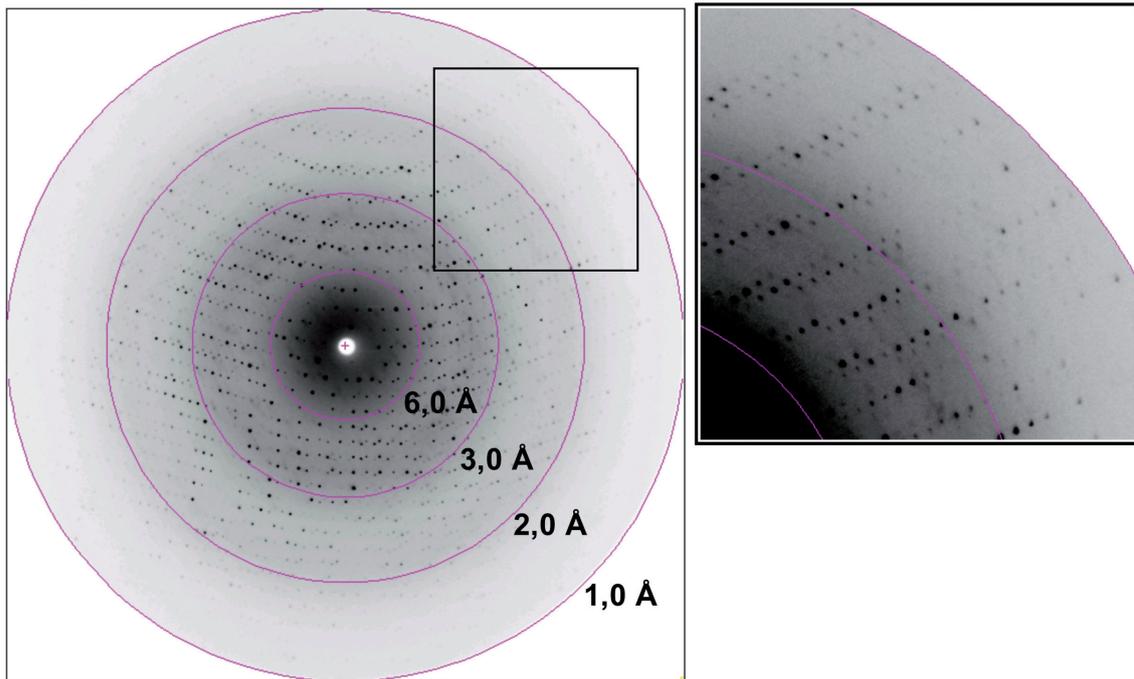


Abb. III.5.1.1.: Diffraktionsaufnahme eines monoklinen QDH/NAD/Komplexkristalles bis zu einer Auflösung von 0,98 Å. Rechts ist eine Vergrößerung des im linken Bildes markierten Ausschnittes zu sehen.

Um die Datenqualität zu erhöhen, wurde ein Teildatensatz eines gleichen Komplexkristalls bei niedrigerer Auflösung gemessen (bis 2,1 Å).

Tabelle III.5.1.1. gibt die Statistiken dieser Datensätze wieder.

Die Indizierung und Skalierung der Daten mit DENZO und SCALEPACK (Otwinowski und Minor, 1997) führte zur monoklinen Raumgruppe C2 mit den Gitterkonstanten $a=121,54 \text{ \AA}$, $b=63,28 \text{ \AA}$, $c=36,34 \text{ \AA}$ und $\beta=94,46^\circ$.

Tab. III.5.1.1.: Ausgewählte kristallographische Parameter des Datensatzes des QDH/NAD⁺-Komplexes

		BW7B, EMBL, Hamburg
Wellenlänge [Å]		0,8423
Gitterkonstanten [Å]	a	121,45
	b	63,28
	c	36,34
	β	94,46 °
Raumgruppe		C2
Anzahl Monomere/asym. Einheit		1
V_m [Å ³ Da ⁻¹]		2,19
Rotation pro Aufnahme [°]		0,5 bzw. 1,0
Anzahl der Bilder		627
Temperatur während der Datensammlung [K]		100
Auflösung [Å]		0,98
Vollständigkeit [%]		90,0
Redundanz		3,7
Redundanz (höchste Auflösungsschale)		2,6 (1,02-0,98 Å)
R_{sym} [%]		8,1
R_{sym} [%] (höchste Auflösungsschale)		70,4 (1,02-0,98 Å)
I/σ		40,92
I/σ (höchste Auflösungsschale)		1,57 (1,02-0,98 Å)

III.5.2. Diffraktionsmessung der QDH im Komplex mit Quinat und NADH

Ein vollständiger hochaufgelöster Datensatz des QDH/Quinat/NADH-Komplexes mit einem Auflösungsmaximum von $1,16 \text{ \AA}$ wurde am Synchrotron in Hamburg aufgenommen. Auch hier wurde ein Teildatensatz eines gleichen Komplexkristalls bei niedrigerer Auflösung bis $1,43 \text{ \AA}$ gemessen (Abb. III.5.1.2.).

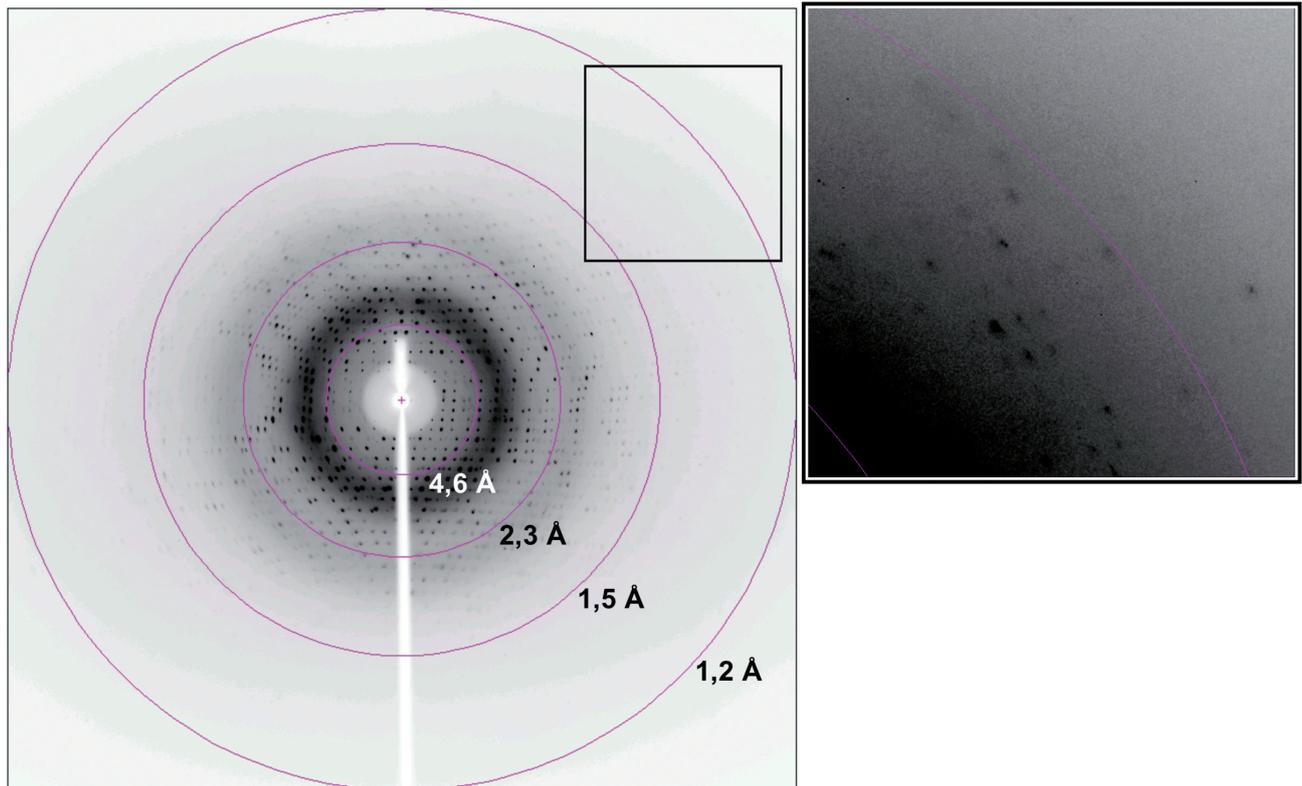


Abb. III.5.1.2.: Diffraktionsaufnahme eines monoklinen Kristalls des QDH/Quinat/NADH-Komplexes bis zu einer Auflösung von $1,16 \text{ \AA}$. Rechts ist eine Vergrößerung des im linken Bildes markierten Ausschnittes zu sehen.

Tabelle III.5.1.2. gibt die Statistiken dieser Datensätze wieder.

Die Indizierung und Skalierung der Daten führte zur monoklinen Raumgruppe $C2$ mit den Gitterkonstanten $a=120,82 \text{ \AA}$, $b=63,25 \text{ \AA}$, $c=35,73 \text{ \AA}$ und $\beta=94,39^\circ$.

Tab. III.5.1.2.: Ausgewählte kristallographische Parameter des Datensatzes des QDH/Quinat/NADH-Komplexes

		X12, EMBL, Hamburg
Wellenlänge [Å]		0,9000
Gitterkonstanten [Å]	a	120,82
	b	63,25
	c	35,73
	β	94,39 °
Raumgruppe		C2
Anzahl Monomere/asym. Einheit		1
V_m [Å ³ Da ⁻¹]		2,13
Rotation pro Aufnahme [°]		0,5 bzw. 1,0
Anzahl der Bilder		714
Temperatur während der Datensammlung [K]		100
Auflösung [Å]		1,16
Vollständigkeit [%]		95,5
Redundanz		6,3
Redundanz (höchste Auflösungsschale)		4,3 (1,20-1,16 Å)
R_{sym} [%]		8,1
R_{sym} [%] (höchste Auflösungsschale)		68,5 (1,20-1,16 Å)
I/σ		26,87
I/σ (höchste Auflösungsschale)		4,19 (1,20-1,16 Å)

III.5.3. Diffraktionsmessung der QDH im Komplex mit Shikimat und NADH

Ein vollständiger hochaufgelöster Datensatz des QDH/Shikimat/NADH-Komplexes mit einem Auflösungsmaximum von 1,16 Å und ein Teildatensatz eines gleichen Komplexkristalls bei niedrigerer Auflösung (bis 1,43 Å) wurden am Synchrotron in Hamburg aufgenommen (Abb. III.5.1.3.).

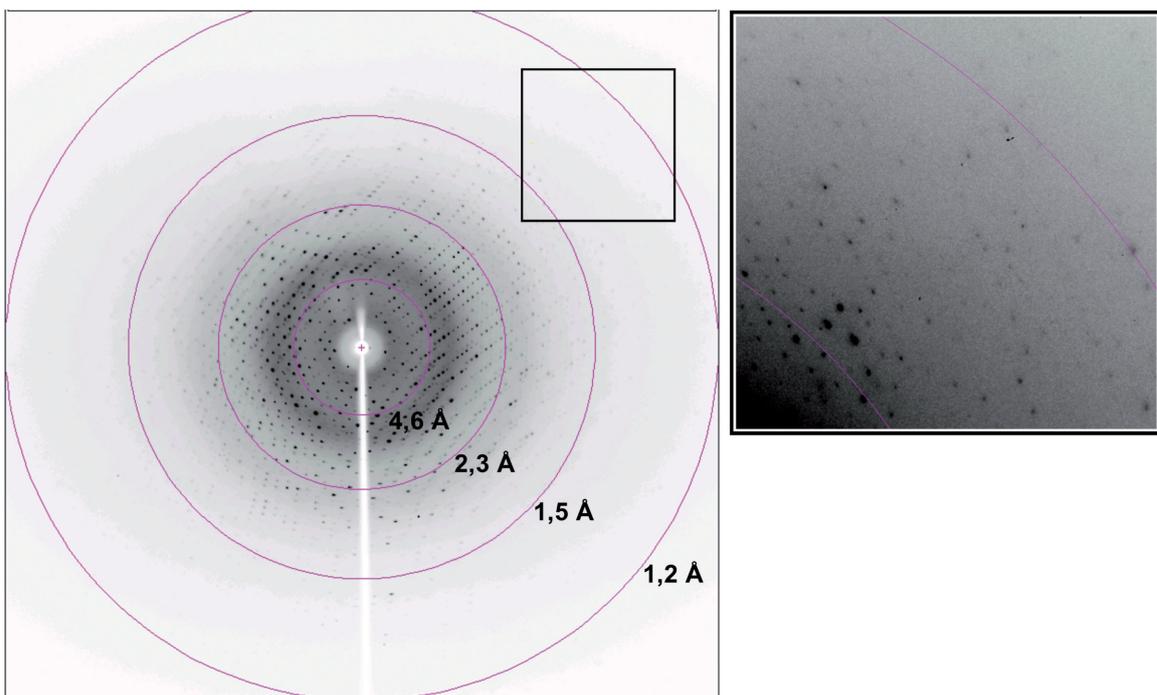


Abb. III.5.1.3.: Diffraktionsaufnahme eines monoklinen Kristalls des QDH/Shikimat/NADH-Komplexes bis zu einer Auflösung von 1,16 Å. Rechts ist eine Vergrößerung des im linken Bildes markierten Ausschnittes zu sehen.

Tabelle III.5.1.3. gibt die Statistiken dieser Datensätze wieder.

Die Indizierung und Skalierung der Daten führte zur monoklinen Raumgruppe C2 mit den Gitterkonstanten $a=120,92 \text{ \AA}$, $b=63,39 \text{ \AA}$, $c=35,67 \text{ \AA}$ und $\beta=94,34^\circ$.

Tab. III.5.1.3.: Ausgewählte kristallographische Parameter des Datensatzes des QDH/Shikimat/NADH-Komplexes

		X12, EMBL, Hamburg
Wellenlänge [\AA]		0,9000
Gitterkonstanten [\AA]	a	120,92
	b	63,39
	c	35,67
	β	94,34 °
Raumgruppe		C2
Anzahl Monomere/asym. Einheit		1
V_m [$\text{\AA}^3 \text{ Da}^{-1}$]		2,13
Rotation pro Aufnahme [°]		0,5 bzw. 1,0
Anzahl der Bilder		451
Temperatur während der Datensammlung [K]		100
Auflösung [\AA]		1,16
Vollständigkeit [%]		96,1
Redundanz		3,4
Redundanz (höchste Auflösungsschale)		2,6 (1,20-1,16 \AA)
R_{sym} [%]		8,8
R_{sym} [%] (höchste Auflösungsschale)		36,2 (1,20-1,16 \AA)
I/σ		18,36
I/σ (höchste Auflösungsschale)		2,33 (1,20-1,16 \AA)

III.6. Kristallpackung

Die Anzahl der Proteinmonomere pro asymmetrischer Einheit, die Packungsdichte und der Lösungsmittelanteil im Kristall lassen sich unter Verwendung der Kristallparameter, des Molekulargewichts des Proteins und mit der Annahme einer für Proteinkristalle typischen Dichte von 1,22 mg/ml (Andersson und Hovmöller, 2000) berechnen.

Tab. III.6.1.: Packungsdichte der QDH-Kristalle

	Monomere	V_M -Wert [$\text{\AA}^3 \text{Da}^{-1}$]	Lösungsmittelanteil [%]
QDH mit NAD ⁺	1	2,19	43,96
QDH mit Quinat und NADH	1	2,13	42,36
QDH mit Shikimat und NADH	1	2,13	42,33

In allen drei Kristallformen liegt jeweils ein Proteinmonomer in der asymmetrischen Einheit, die V_M -Werte liegen in dem für Proteinmoleküle üblichen Bereich (Matthews, 1968).

III.7. Strukturlösung und Verfeinerung

Als Startmodell für die Strukturlösung bzw. -Verfeinerung des QDH/NAD⁺-Komplexes diente die Apostruktur der QDH aus *Corynebacterium glutamicum* (Schoepe et al., 2006; 2nlo), wobei vor Beginn der Rechnungen alle Wassermoleküle aus der Datei entfernt wurden.

Als Startmodell für die Verfeinerung der ternären Komplexe QDH/Quinat/NADH und QDH/Shikimat/NADH diente die bis zu einem R-Wert von 16,3 % verfeinerte Komplexstruktur der QDH mit NAD⁺.

Die Elektronendichte war in fast allen Bereichen der Proteinkette und an der Cosubstrat-Bindungsstelle (bzw. der Cosubstrat- und der Substratbindungsstelle) gut definiert, so dass sich die Proteinkette gut in die Elektronendichte legen ließ.

In allen drei Elektronendichten sind die Aminosäuren der Quinat-Dehydrogenase (Reste 21-302) gut zu identifizieren, lediglich die Aminosäurereste des N-terminalen Fusionspeptids (His₆-tag und Aminosäuren der TEV-Schnittstelle, Reste 1-19) und die erste Aminosäure des QDH (Met20) sind nicht zu erkennen.

Es erfolgte zunächst eine Starre-Körper- und TLS-Verfeinerung mit dem Programm REFMAC (CCP4, 1994). Die weitere Verfeinerung der drei Modelle erfolgte durch Kombination von iterativen Zyklen manueller Anpassung des Strukturmodells mit Hilfe des Programms O (Jones et al., 1991) und molekularen Verfeinerungsrechnungen mit dem Programm REFMAC.

Die Atomkoordinaten des Cosubstrat-Moleküls NAD⁺ und der Substrate Quinat und Shikimat wurden aus einer pdb-Datei eines Proteinkomplexes isoliert und mit Hilfe des PRODRG2-Servers (<http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/programs/prodrg/>) in das REFMAC5-Format konvertiert. Der Einbau des Cofaktors und der Substrate in die Elektronendichte erfolgte manuell.

Aufgrund der hohen Auflösung waren an einigen Stellen alternative Seitenkettenkonformationen sichtbar, die ebenfalls manuell eingearbeitet wurden.

Die Wassermoleküle wurden mit Hilfe des Programms ARP/wARP (Perrakis et al., 1999) eingefügt. Die Verfeinerung erfolgte wiederum durch manuelle Anpassung mit Hilfe des Programms O und molekularen Verfeinerungsrechnungen mit dem Programm REFMAC.

Tabelle III.7.1. gibt die Statistiken der drei verfeinerten QDH-Strukturen wieder.

Tab. III.7.1.: Statistische Parameter der verfeinerten QDH-Strukturen

	QDH/NAD ⁺	QDH/Quinat/NADH	QDH/Shikimat/NADH
Raumgruppe	C2	C2	C2
Moleküle/asym. Einheit	1	1	1
Anzahl der Atome (ohne H-Atome)	5886	5516	5596
Anzahl der Wassermoleküle	441	369	388
fehlende Reste	1-20	1-20	1-20
Auflösungsbereich [Å]	19,89 - 1,00	30,00 – 1,16	30,00 – 1,16
R _{work} [%]	16,3	13,8	14,9
R _{free} [%]	19,4	15,9	17,4
B-Faktoren [Å ²]	17,18	17,48	18,83
RMS-Abweichungen von Idealwerten			
Bindungslängen [Å]	0,017	0,009	0,012
Bindungswinkel [°]	1,764	1,359	1,561
Korrelationskoeffizient [%]			
F _o -F _c	97,49	97,50	97,74
F _o -F _c _{free}	95,93	96,57	96,84

Die drei endverfeinerten QDH-Komplexstrukturen bestehen jeweils aus 282 Aminosäuren, einem NAD⁺- bzw. NADH-Molekül und unterschiedlich vielen Wassermolekülen (siehe Tabelle III.7.1.). Die beiden ternären Komplexe enthalten weiterhin jeweils ein Quinat- bzw. Shikimat-Molekül.

In allen drei Komplexstrukturen ist der Bereich der NAD⁺- bzw. NADH-Bindung sehr gut durch die Elektronendichte definiert, ebenso das gebundene Substrat im QDH/Quinat/NADH-Komplex. Lediglich die Elektronendichte im Bereich des Shikimats im QDH/Shikimat/NADH-Komplex ist an einer Stelle (zwischen C2 und C3) nicht eindeutig definiert (vgl. Abb. III.8.5).

III.8. Qualität der Strukturmodelle

Die Qualität der verfeinerten Modelle wurde anhand der stereochemischen Parameter der Verfeinerungsprogramme und des Validation-Servers der Protein-Datenbank sowie durch visuelle Begutachtung der Elektronendichtekarten und Ramachandran-Plots überprüft.

Abbildungen III.8.1.a-c zeigen die Ramachandran-Plots (Verteilung der Hauptkettentorsionswinkel Φ und Ψ) der drei verschiedenen QDH-Strukturen. In allen liegen wenigstens 95 % aller Aminosäurereste in den begünstigten und maximal 5 % in den zusätzlich erlaubten Winkelbereichen.

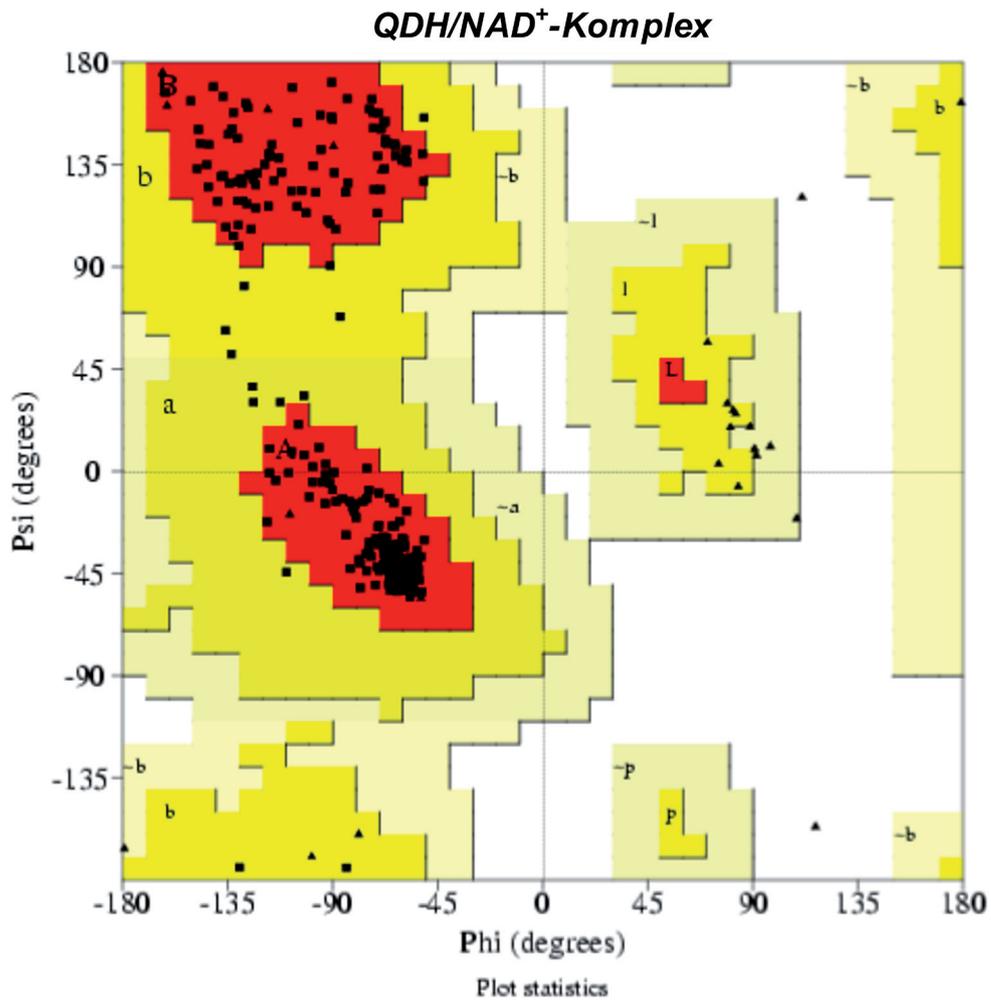


Abb. III.8.1.a: Ramachandran-Plot der QDH im Komplex mit NAD⁺.

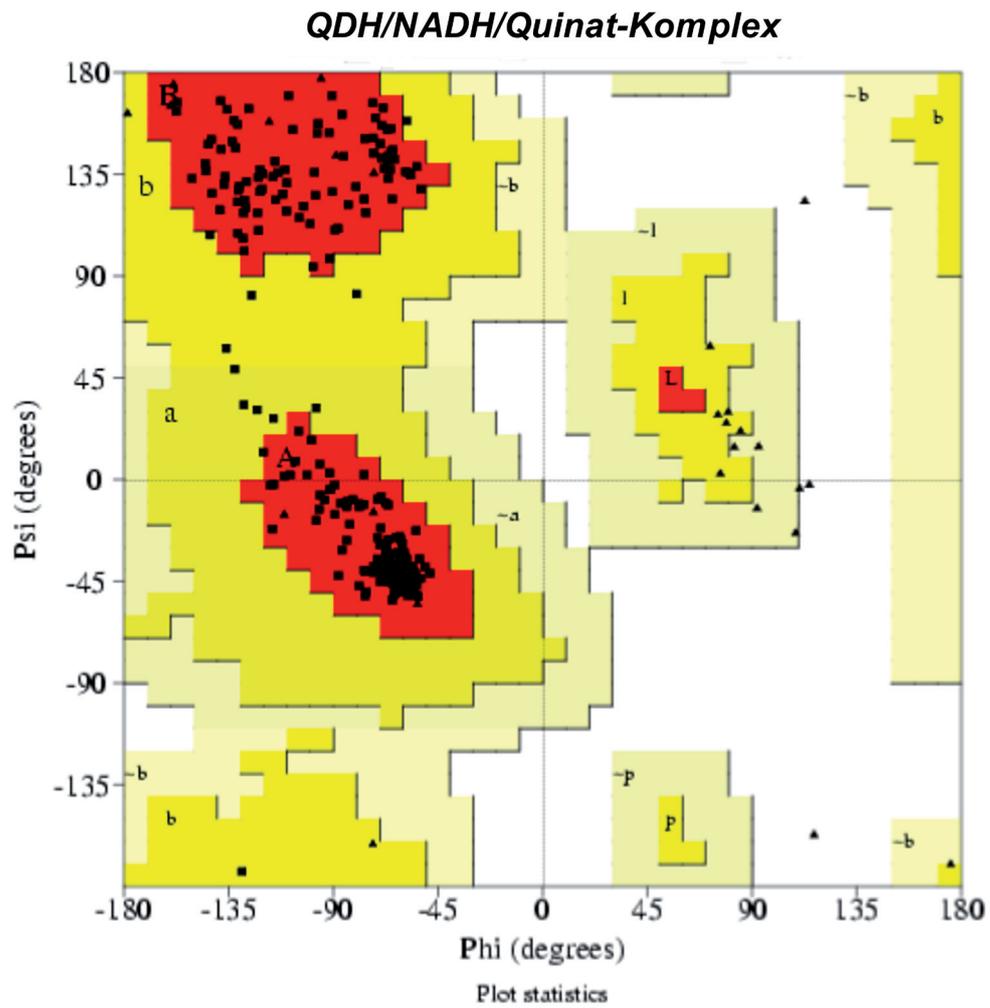


Abb. III.8.1.b: Ramachandran-Plot der QDH im Komplex mit NADH und Quinat.

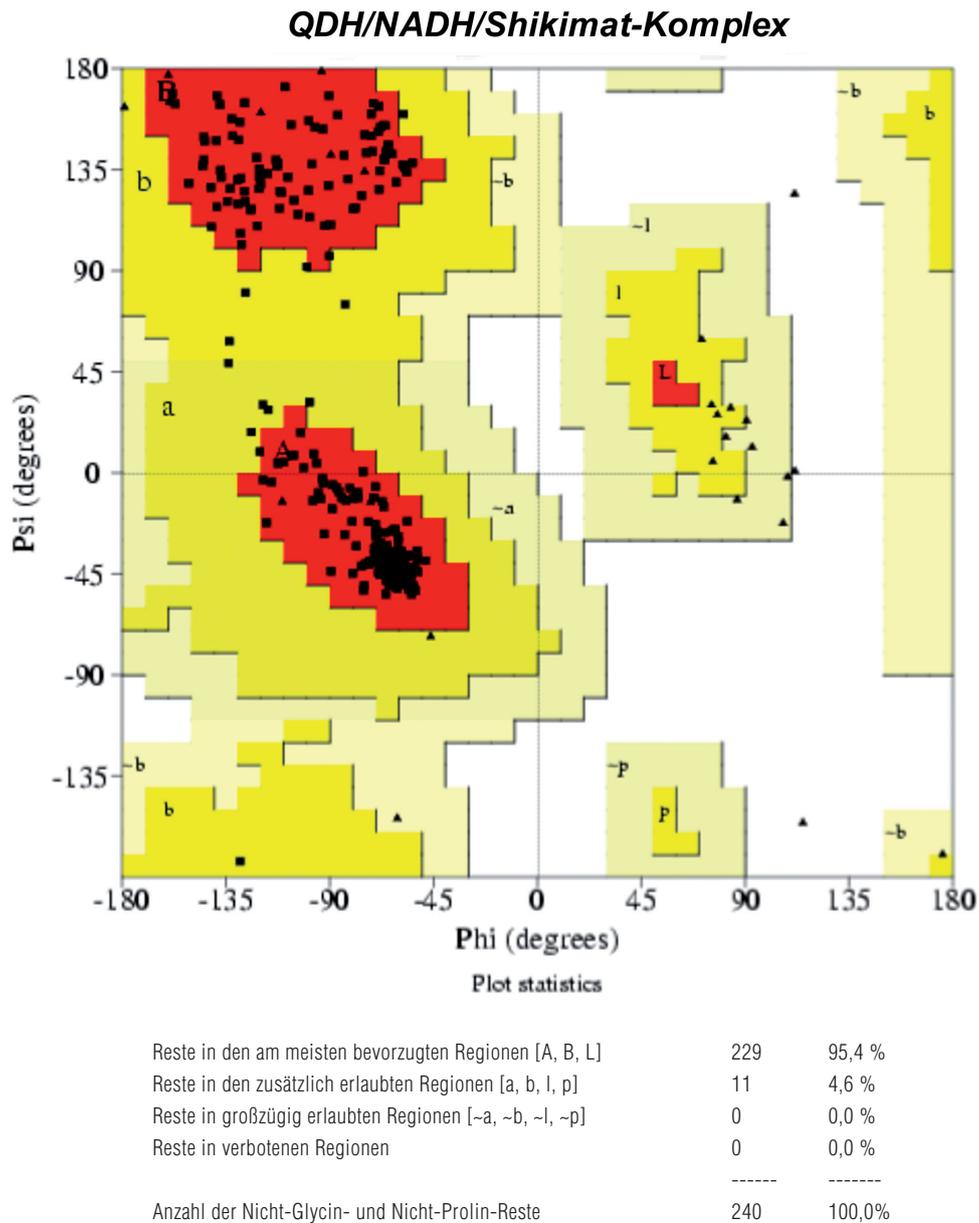


Abb. III.8.1.c: Ramachandran-Plot der QDH im Komplex mit NADH und Shikimat.

Aufgrund der hohen Auflösung aller drei Strukturen (QDH mit NAD⁺ bis 1,0 Å, QDH mit NADH und Quinat bzw. Shikimat bis 1,16 Å) wurden sehr viele Details, wie beispielsweise alternative Seitenkettenkonformationen, sichtbar (Abb. III.8.2. bis III.8.5.), was gerade im Bereich des aktiven Zentrums von großer Bedeutung ist.

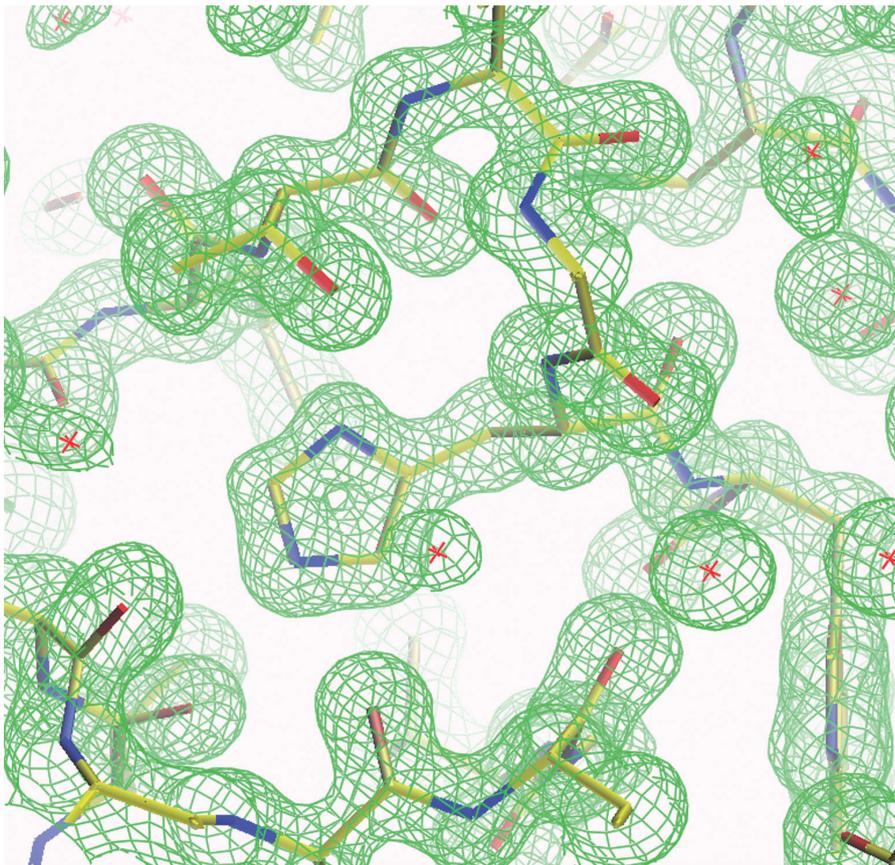


Abb. III.8.2.: Ausschnitt aus der Elektronendichtekarte der QDH im ternären Komplex mit NADH und Quinat.

Die $2|F_o - F_c|$ -Elektronendichte ist mit 1σ konturiert.

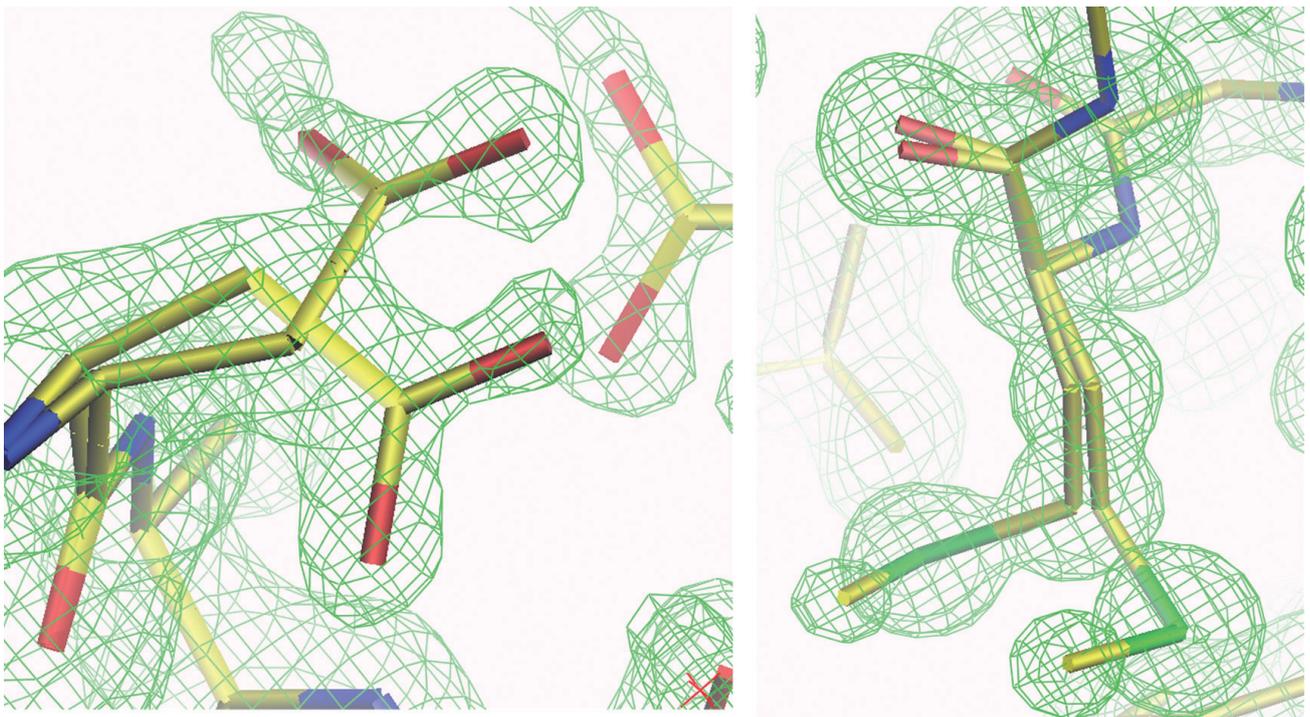


Abb. III.8.3.: Alternative Seitenkettenkonformationen am Beispiel von Asp118 (links) und Met137 (rechts).

Ausschnitt aus der Elektronendichtekarte der QDH im ternären Komplex mit NADH und Quinat. Die $2|F_o - F_c|$ -Elektronendichte ist mit 1σ konturiert.

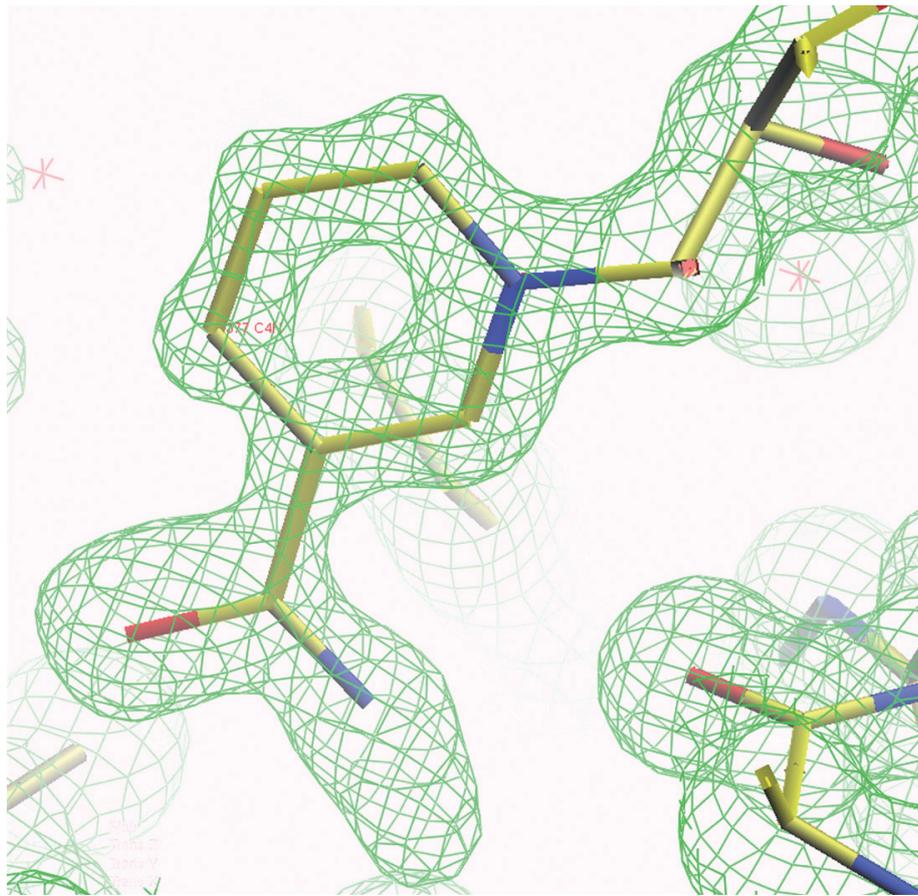


Abb. III.8.4.: Ausschnitt aus der Elektronendichtekarte des Cofaktors der QDH im ternären Komplex mit NADH und Quinat.

Die $2|F_o - F_c|$ -Elektronendichte ist mit 1σ konturiert.

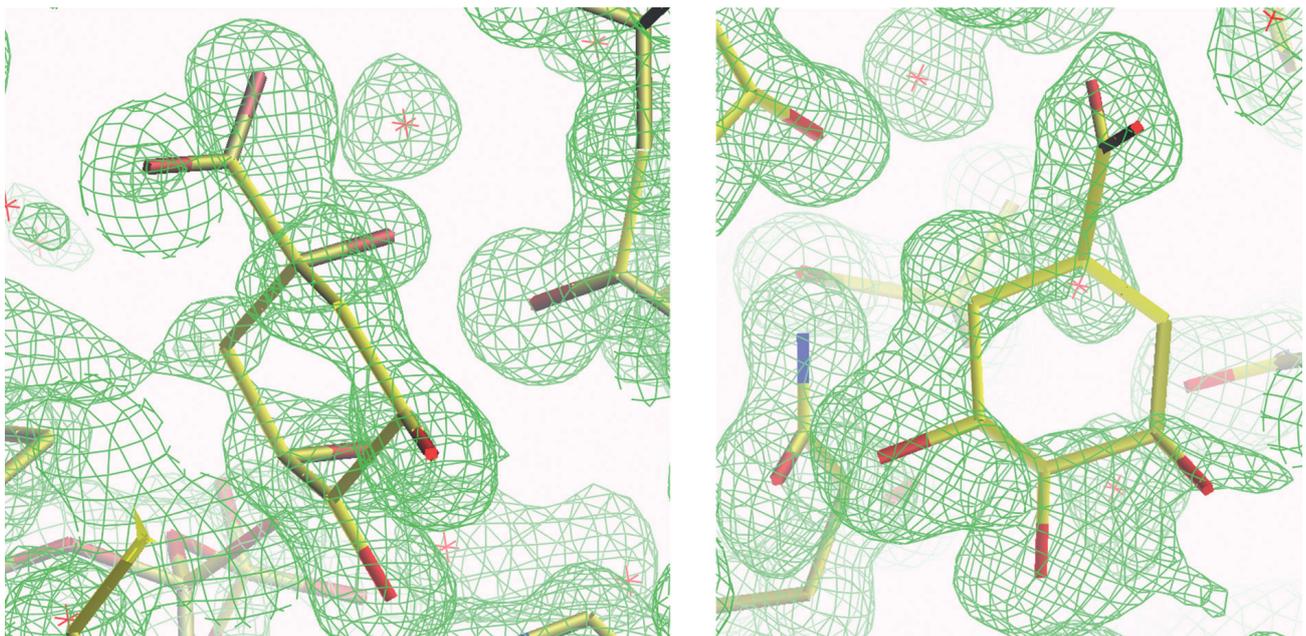


Abb. III.8.5.: Elektronendichtekarten der Substrate Quinat (links) und Shikimat (rechts) der QDH in den ternären Komplexen.

Die $2|F_o - F_c|$ -Elektronendichte von Quinat ist mit 1σ konturiert, die von Shikimat mit $0,7 \sigma$.

Der R-Wert der Strukturen fiel im Zuge der Verfeinerung auf 16,3 % für den Komplex mit NAD⁺, 13,8 % für den ternären Komplex mit Quinat und 14,9 % für den mit Shikimat, was ein Beleg für die hohe Datenqualität ist. Auch die Korrelationskoeffizienten zwischen den gemessenen und berechneten Strukturfaktoramplituden mit über 97 % weisen auf die Güte der Strukturmodelle hin.

III.9. Tertiärstruktur der QDH

Die QDH aus *Corynebacterium glutamicum* besteht aus 283 Aminosäuren und gehört zur Familie der α/β -Proteine. Wie schon durch die Strukturlösung des Apoenzyms bekannt (Dissertation Jan Schoepe, 2006) faltet sie sich in zwei Domänen, eine N-terminale oder katalytische Domäne und eine C-terminale oder Cosubstrat-bindende Domäne. Die N-terminale Domäne umfasst die Aminosäuren 21 bis 132 und 275 bis 302, die C-terminale die Reste 133 bis 274. In Lösung liegt die QDH als Homodimer vor (Dissertation Jan Schoepe, 2006).

Die C-terminale, Cosubstrat-bindende Domäne enthält eine Nukleotid-bindende Rossmann-Faltung, die aus einem 6-strängigen parallelen β -Faltblatt besteht ($\beta 9$, $\beta 8$, $\beta 7$, $\beta 10$, $\beta 11$ und $\beta 12$), das auf der Molekülinnenseite von drei α -Helices ($\alpha 7$, $\alpha 6$ und $\alpha 5$), auf der Außenseite von zwei α -Helices ($\alpha 8$ und $\alpha 10$) und einer 3_{10} -Helix ($\alpha 9$) flankiert wird. Der Nukleotid-bindende Bereich weist eine Glycin-reiche Schleife auf, die das Sequenzmotiv GXGGXG besitzt.

Die katalytische Domäne beinhaltet ebenfalls ein 6-strängiges β -Faltblatt ($\beta 2$, $\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 5$, $\beta 6$ und $\beta 4$), dessen Stränge alle bis auf $\beta 5$ parallel verlaufen. Es wird auf der Molekülinnenseite von zwei ($\alpha 1$ und $\alpha 11$), auf der Außenseite von drei α -Helices ($\alpha 2$, $\alpha 3$ und $\alpha 4$) flankiert. Die Helices $\alpha 5$ und $\alpha 11$ verbinden die beiden Domänen miteinander. Zwischen diesen beiden Domänen erstreckt sich eine tiefe Spalte, in der das Substrat und der Cofaktor gebunden werden (Abb. III.9.1. und III.9.2.).

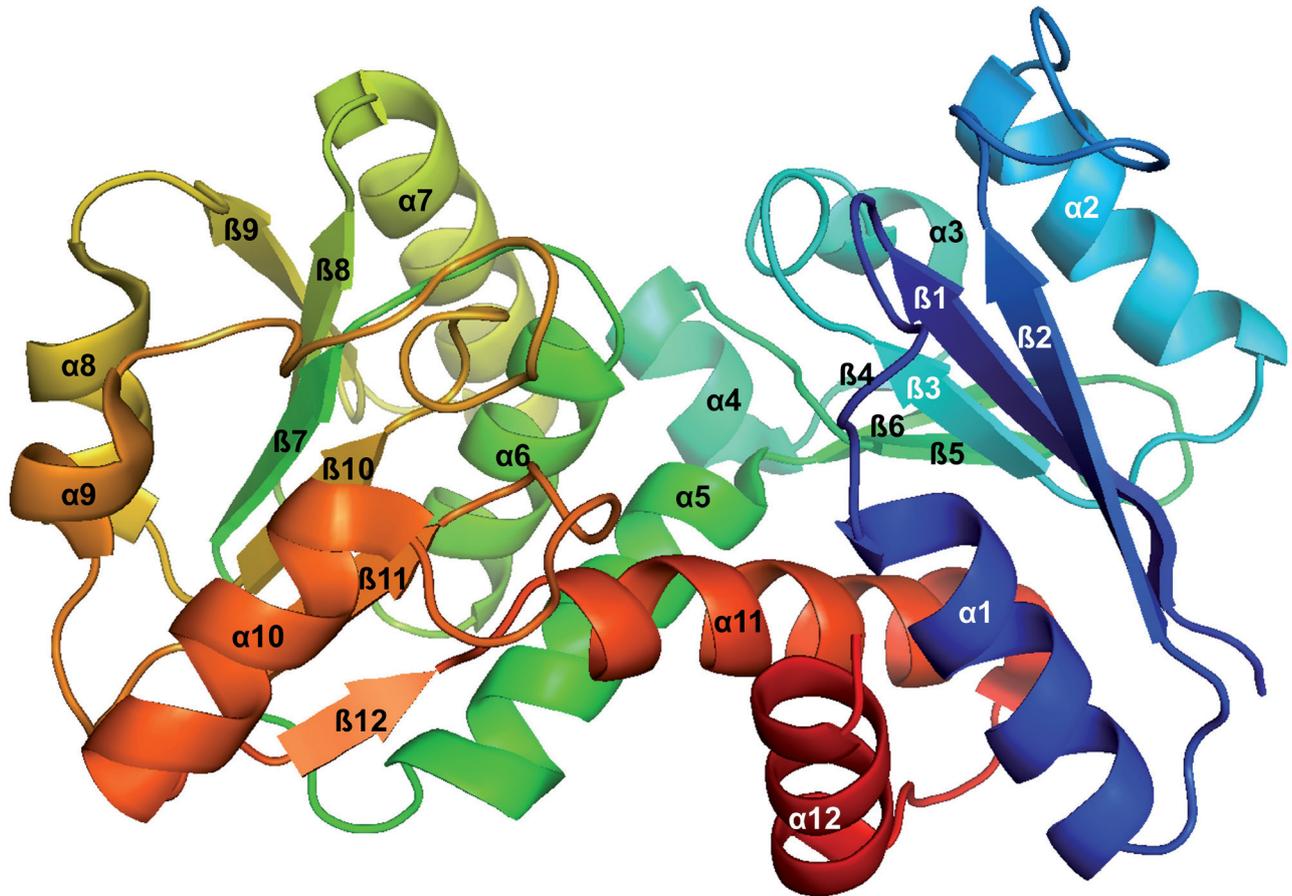


Abb. III.9.1.: Schematische Darstellung der Faltung des Apoenzyms der QDH (2nlo) als Monomer.

Die N-terminale Domäne (rechts) bindet das Substrat, die C-terminale Domäne den Cofaktor. Zwischen diesen beiden Domänen befindet sich eine tiefe Furche.

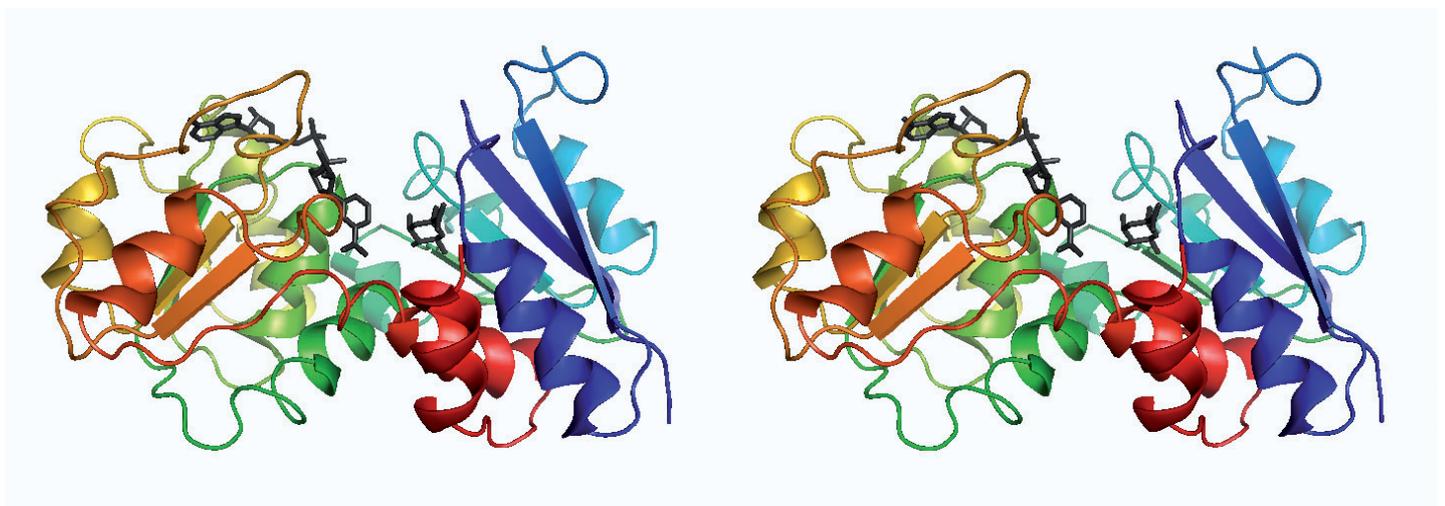


Abb. III.9.2.: Schematische Darstellung der Faltung der QDH mit gebundenem NADH und Quinat als Stereodiagramm.

Beide Substrate sind in schwarz dargestellt.

III.10. Konformationsänderungen der tertiären Struktur nach Cofaktor und Substrat-Bindung

III.10.1. Cofaktor-Bindung

Vergleicht man den Verlauf der Hauptkette des Apoenzyms mit der des Komplexes, also nach Bindung des Cofaktors NAD^+ , so liegen die C_α -Spuren beider Strukturen in weiten Teilen mehr oder weniger exakt übereinander (Abb III.10.1.1.).

Die Hauptkettenverläufe in der N-terminalen Domäne jedoch unterscheiden sich signifikant, da sich das Proteinrückgrad des Komplexes um bis zu $1,2 \text{ \AA}$ von der C-terminalen Domäne weg bewegt, so dass die Spalte zwischen den beiden Domänen nach der Cofaktor-Bindung weiter wird.

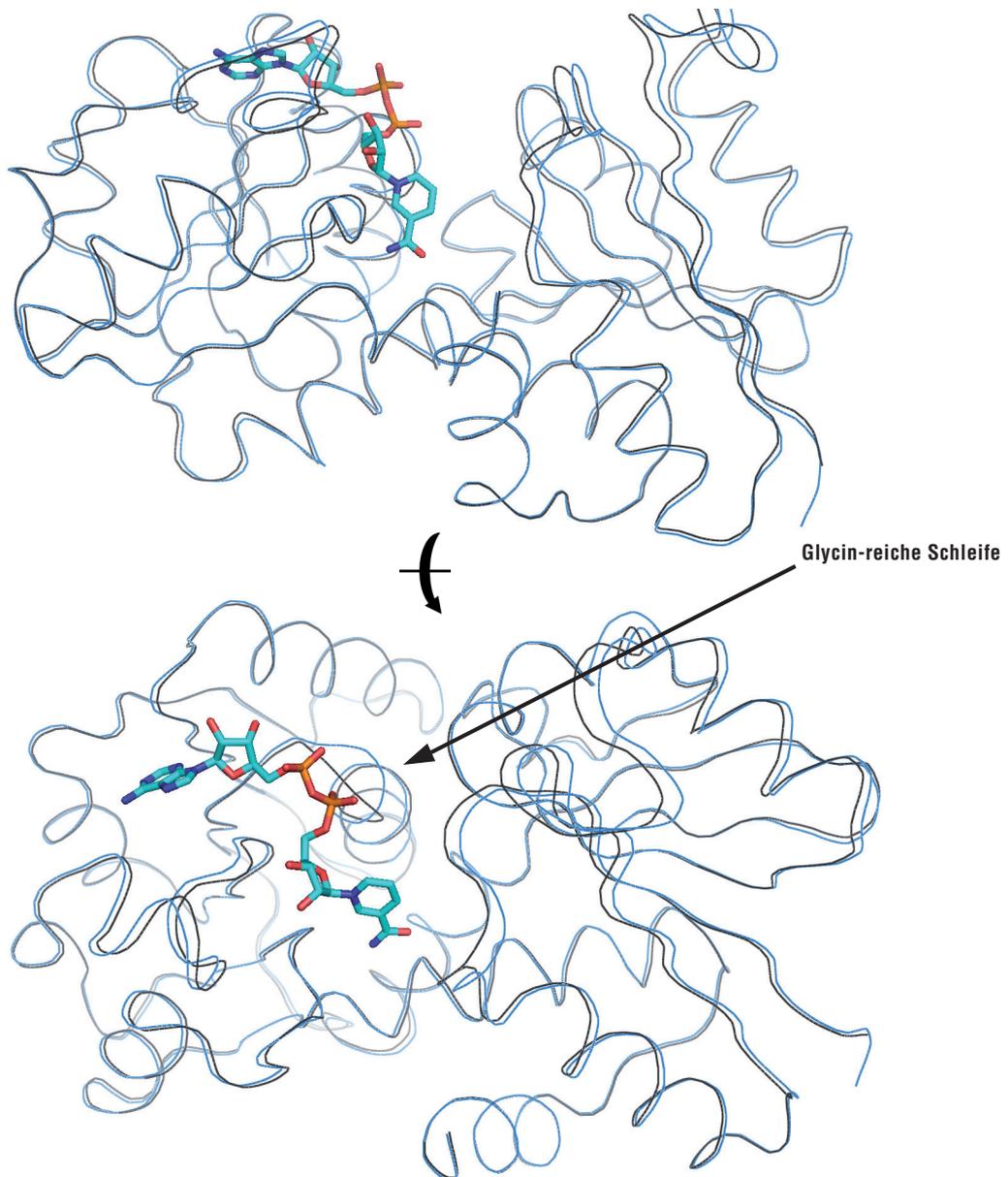


Abb. III.10.1.1.: Schematischer Vergleich der Hauptkettenverläufe im QDH-Apoenzym (schwarz) und im QDH-Komplex mit NAD^+ (blau). Zur besseren Orientierung ist auch das gebundene NAD^+ -Molekül dargestellt.

Innerhalb der C-terminalen Domäne im Bereich des gebundenen NADs bestehen an einzelnen Stellen ebenfalls deutliche Unterschiede.

Sowohl die α -Helices als auch die Stränge des β -Faltblattes und die sie verbindenden Schleifen rücken ein wenig nach außen, so dass die Spalte zwischen den beiden Domänen etwas geräumiger wird. Der Verlauf des Proteinrückgrats bleibt dabei aber gleich, bis auf einen kleinen Teil einer einzigen Schleife: das Gly156, das im Apoenzym die letzte Aminosäure der Schleife von β -Strang 7 zur Helix $\alpha 6$ darstellt, liegt im Komplex deutlich weiter außen und markiert hier die erste Aminosäure der α -Helix 6. Die benachbarten Reste Gly155 und Val157 sind dagegen kaum in ihrer Position verändert. Wie in Abb. III.10.1.2 ersichtlich, ist das „Herausklappen“ von Gly156 notwendig, damit der Cofaktor überhaupt im Bereich der Nukleotid-Bindestelle, der Glycin-reichen Schleife, gebunden werden kann.

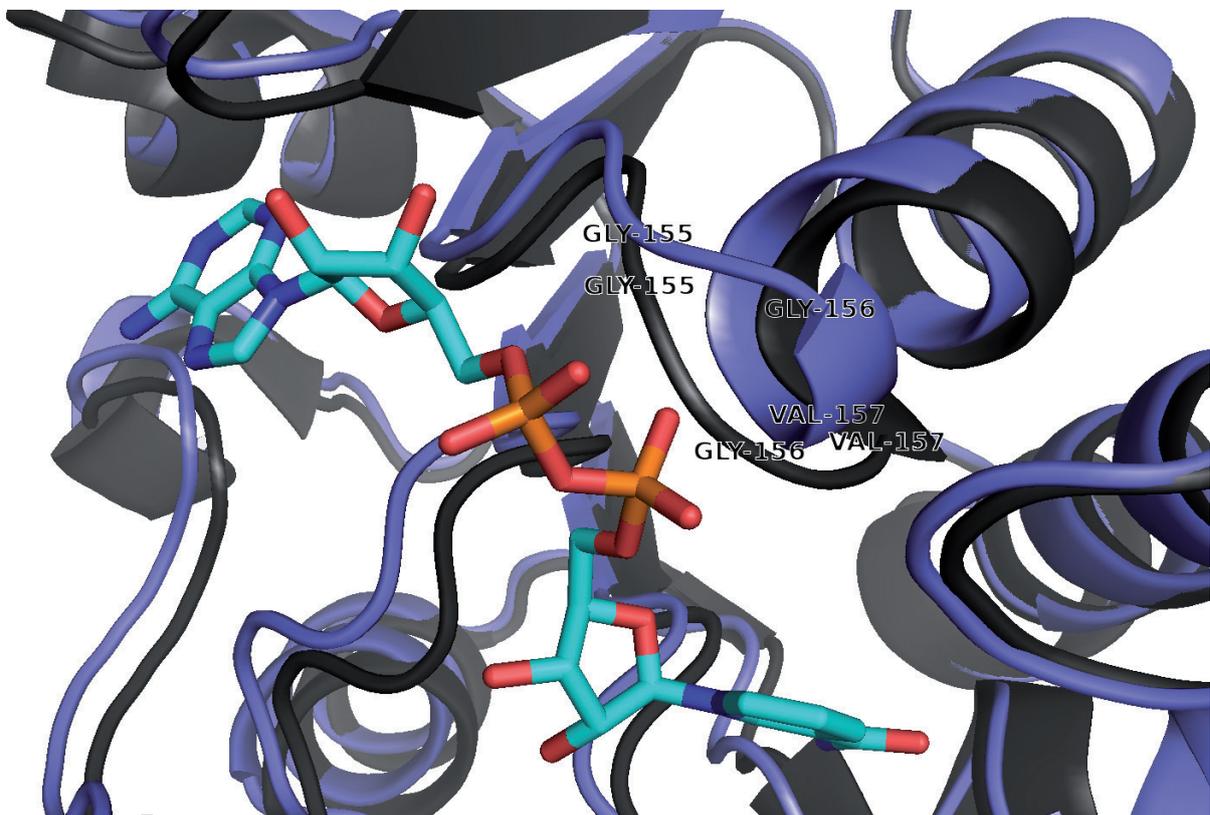


Abb. III.10.1.2.: Positionsänderungen der an der Cofaktor-Bindung beteiligten Aminosäuren.

Die in schwarz dargestellte Struktur entspricht dem Apoenzym, die blaue dem Komplex mit NAD⁺. Das gebundene NAD-Molekül ist farblich dargestellt.

Noch eindrücklicher werden die Unterschiede zwischen der Apo- und der NAD⁺-Komplexstruktur, wenn man die Veränderung der Hauptkettentorsionswinkel Φ und Ψ betrachtet, wie dies in Abbildung III.10.1.3. dargestellt ist.

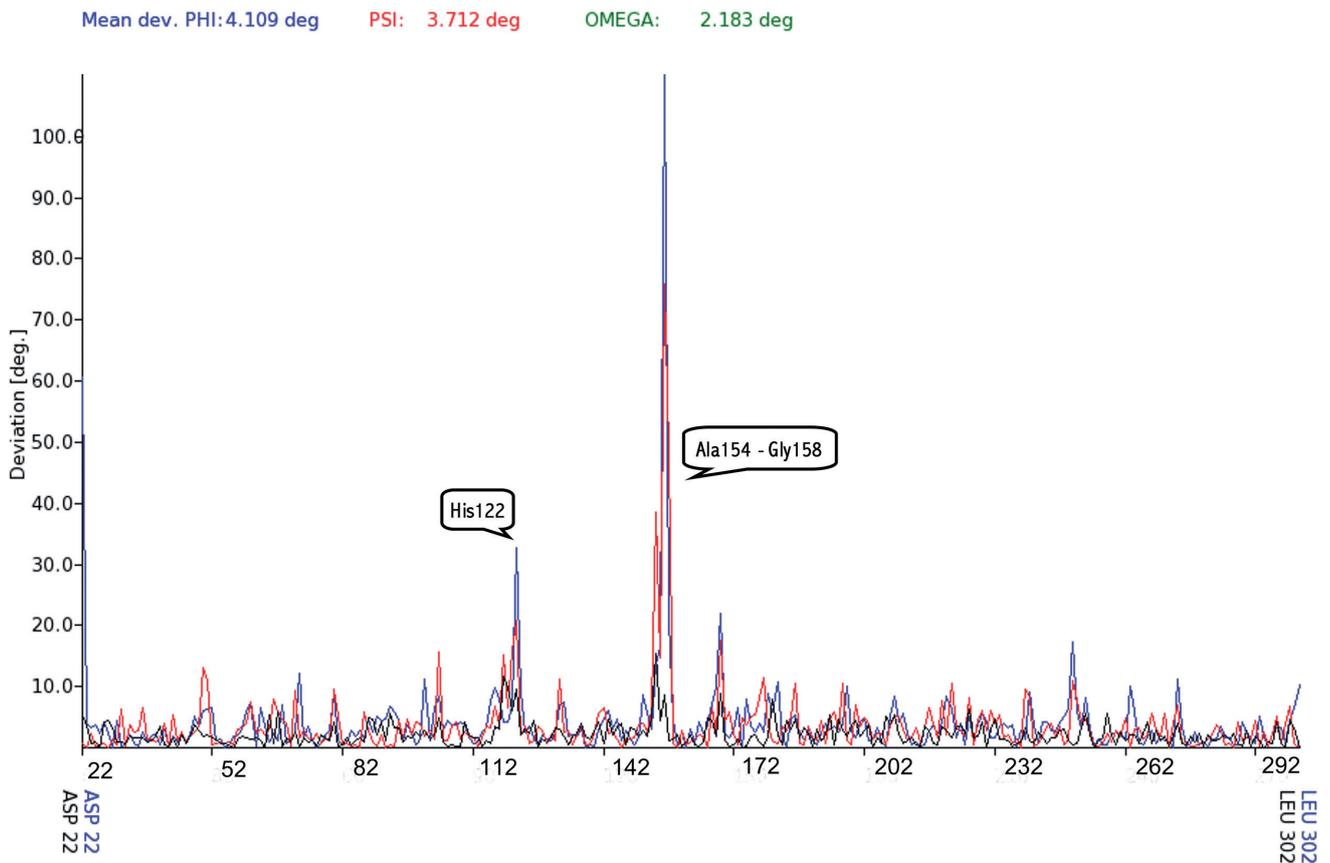


Abb. III.10.1.3.: Veränderung der Hauptkettentorsionswinkel Φ und Ψ nach der NAD⁺-Bindung.

Die Aminosäuren des Apoenzyms der QDH sind in schwarz dargestellt, die des QDH/NAD⁺-Komplexes in blau. Die signifikanten Unterschiede im Bereich der Glycin-reichen Schleife (Gly153 bis Gly158) sind deutlich zu erkennen. Der Rest His122 befindet sich im N-terminalen Bereich von β -Strang 6, weit vom katalytischen Zentrum entfernt.

III.10.2. Substrat-Bindung

Legt man die C α -Spuren des Apoenzyms, des Enzymkomplexes mit gebundenem NAD⁺ und die des ternären Komplexes mit Quinat und NADH übereinander, erkennt man wieder im Bereich der N-terminalen Domäne, die für die Substrat-Bindung verantwortlich ist, die Veränderungen bezüglich des Hauptkettenverlaufs im Zuge der Cofaktor- und Substratbindung (Abb. III.10.2.1.). Beim Vergleich der QDH mit gebundenem Cofaktor und der QDH mit gebundenem Substrat und Cofaktor lassen sich praktisch keine Veränderungen feststellen. Die Hauptketten im Komplex mit NAD⁺ und im ternären Komplex unterscheiden sich nur leicht in den Schleifen-Bereichen. Das Proteinerückgrad rückt nach der Quinat-Bindung im N-terminalen Bereich ein wenig (um maximal 0,5 Å) auf die C-terminale Domäne zu, so dass sich die Spalte wieder leicht verengt.

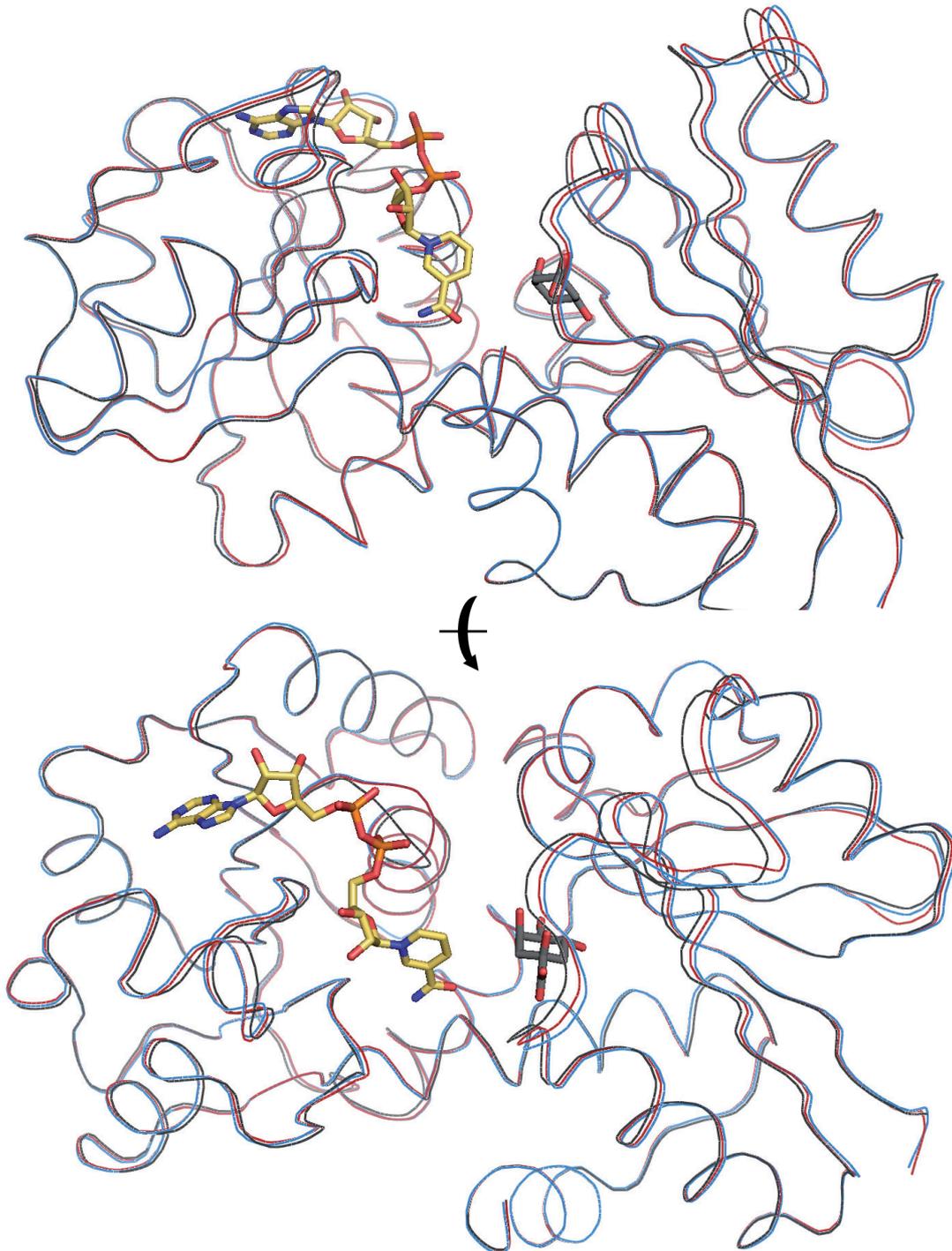


Abb. III.10.2.1.: Schematischer Vergleich der Hauptkettenverläufe im QDH-Apoenzym (schwarz), im QDH-Komplex mit NAD⁺ (blau) und im ternären Komplex mit NADH und Quinat (rot).

Zur besseren Orientierung ist auch das im ternären Komplex gebundene NADH- (farbig) und Quinat-Molekül (grau) dargestellt.

Der C-terminale Bereich des ternären Komplexes gleicht dem des Komplexes mit NAD⁺ fast gänzlich, doch rückt auch hier das Proteinhauptkette mit maximal 0,25 Å geringfügig näher an das Cofaktor-Molekül heran.

Zur Verdeutlichung dieser geringfügigen Unterschiede ist auch hier der Vergleich der Hauptkettentorsionswinkel Φ und Ψ zwischen dem QDH/NAD⁺- und dem ternären Komplex hilfreich (Abb. III.10.2.2.).

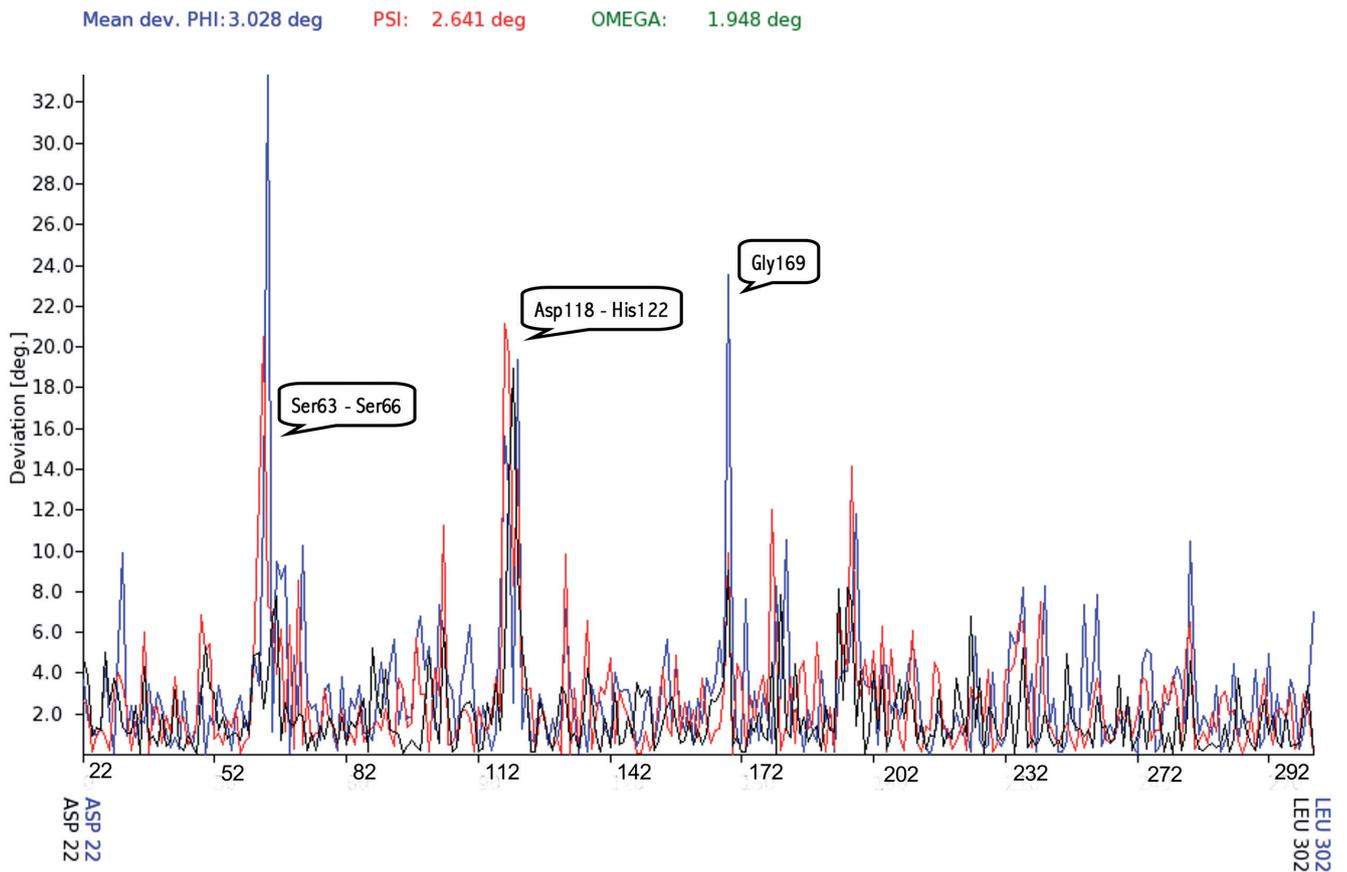


Abb. III.10.2.2.: Veränderung der Hauptkettentorsionswinkel Φ und Ψ nach der Quinat-Bindung.

Die Aminosäuren des QDH/NAD-Komplexes sind in schwarz dargestellt, die des ternären Komplexes in blau. Insgesamt fallen die Unterschiede im Hauptkettenverlauf nach der Substrat-Bindung gering aus. Die Aminosäuren Ser63 bis Ser66 befinden sich in der Schleife zwischen β -Faltblatt 2 und α -Helix 2, die Reste Asp118 bis His122 im Bereich der β -Stränge 5 und 6, Gly169 am C-Terminus der α -Helix 6. Alle sind weit vom katalytischen Zentrum entfernt.

III.11. Das aktive Zentrum

III.11.1. Bindung des Cofaktors NAD⁺

Das längliche Cofaktor-Molekül NAD⁺ wird fast ausschließlich durch Aminosäuren der Schleifenregionen der C-terminalen Domäne im Bereich der Enzymspalte gebunden und geht dort Wechselwirkungen mit dem Protein ein (Abb. III.11.1.1.).

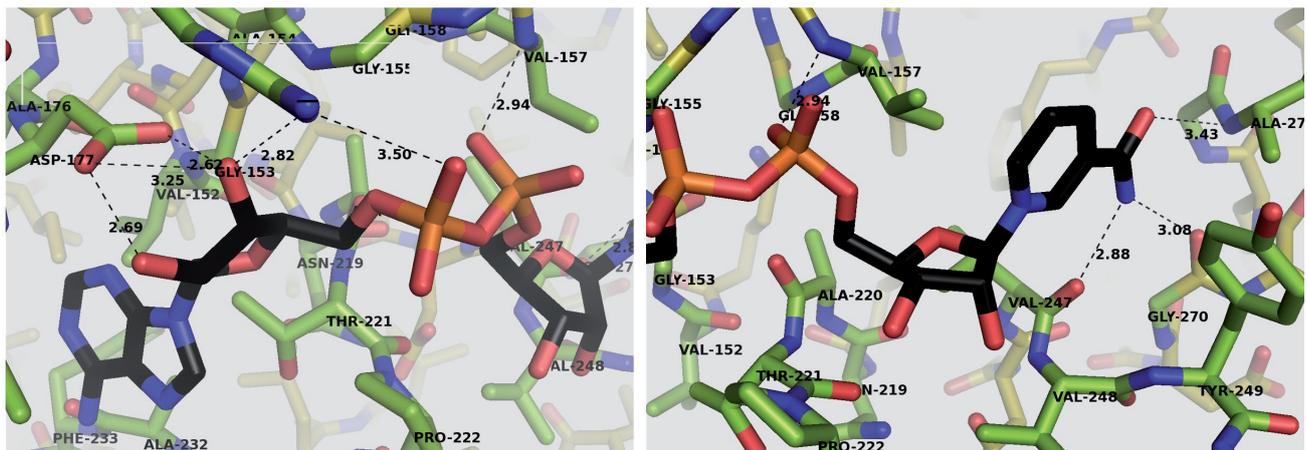


Abb. III.11.1.1.: Polare Wechselwirkungen des Cofaktors NAD⁺ mit dem Protein.

C-Atome des Cofaktors sind in schwarz, C-Atome der interagierenden Aminosäuren in grün dargestellt.

Während der Adenin-Teil des Moleküls nicht interagiert, wird der Ribosering mittels der beiden Hydroxylgruppen über Wasserstoffbrücken mit den Seitenketten von Asp177 und Arg182 gebunden. Eine der beiden OH-Gruppen des ersten Phosphats bildet ebenfalls eine H-Brücke mit der Seitenkette von Arg182, so dass der Ring wie durch eine Klemme gehalten wird. Das zweite Phosphat interagiert über eine der beiden Hydroxylgruppen mit dem Hauptketten-Stickstoff des Val157, während der zweite Ribosering keinerlei Wechselwirkungen mit dem Protein eingeht. Der Nicotinamidring wird schließlich durch die terminale NH₂-Gruppe über eine Wasserstoffbrücke mit der Carbonylgruppe des Val247 und Gly270 und durch die Hydroxygruppe mit dem Hauptketten-Stickstoff des Ala274 verankert.

Die Anwesenheit des Asp177 im Bereich der 2'-OH-Gruppe erklärt die strikte NAD-Abhängigkeit der QDH sehr deutlich: eine weitere Phosphatgruppe an dieser Stelle wie beim NADP würde zu sterischen Hinderungen und zu elektrostatischer Abstoßung mit der Carboxygruppe des Asp177 führen.

Das Nukleotid-bindende Motiv vom Typ GXGGXG umfasst die Reste Gly153-Ala154-Gly155-Gly156-Val157-Gly158.

Vergleicht man die Veränderungen der an der Cofaktorbinding beteiligten Aminosäuren zwischen dem Apoenzym und dem Komplex mit NAD⁺, lassen sich deutlichere Unterschiede als im Hauptkettenverlauf feststellen (Abb. III.11.1.2.).

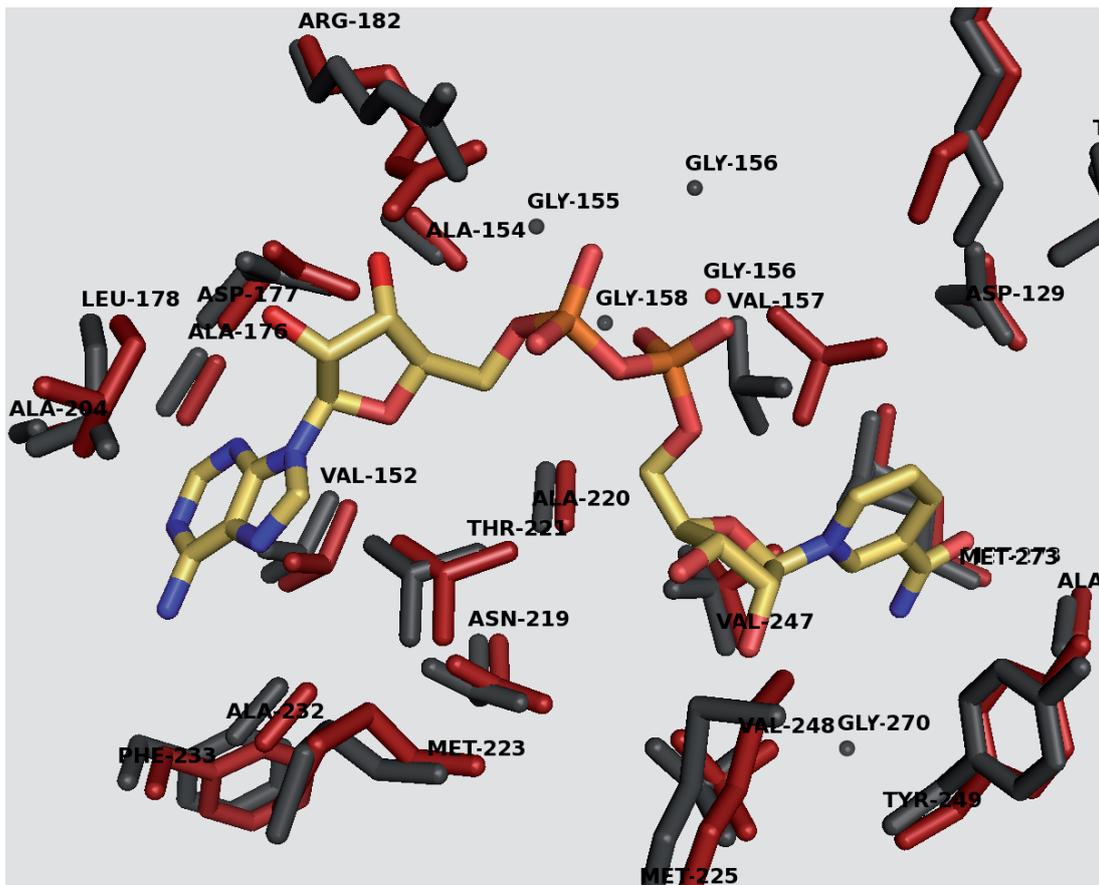


Abb. III.11.1.2.: Konformations- und Positionsänderungen der an der Cofaktor-Bindung beteiligten Aminosäuren nach der NAD⁺-Bindung. Reste des Apoenzym sind in rot, Reste der QDH im Komplex mit NAD⁺ in schwarz dargestellt.

Die meisten Reste in der Komplexstruktur sind lediglich ein wenig weiter nach außen positioniert, andere zeigen signifikante Änderungen in ihrer Seitenkettenkonformation: Das Met225 weist mit seiner endständigen CH₃-Gruppe nach außen, wodurch für die Hydroxygruppe am Ribosering Raum geschaffen wird.

Die Seitenkette des Val247 dreht sich um etwa 120 ° weg vom Nikotinamidring, so dass dort keine sterischen Hinderungen mehr vorliegen. Das Val157 hingegen dreht sowohl seine Seitenkette und rückt gleichzeitig näher an das NAD⁺-Molekül heran. Die Seitenkette des Arg182 nimmt einen fast geraden Verlauf an und gewinnt so Abstand zu der Hydroxygruppe am C3 des Riboseringes. Gut sichtbar ist die deutlich weiter außen positionierte Aminosäure Gly156, wodurch die Cofaktorbindung erst ermöglicht wird, da sie anderenfalls mit der Phosphatgruppe kollidieren würde.

III.11.2. Bindung des Substrats Quinat

Das Substratmolekül Quinat wird in der N-terminalen Domäne sowohl von Aminosäuren der Schleifen (Ser36, Thr88, Lys92, Asn113) als auch von Resten, die in den Helices lokalisiert sind, gebunden (Ser38, Asp129, Gln277). Dabei geht das Substrat eine Vielzahl an Wechselwirkungen mit dem Enzym ein, wie in der Abbildung III.11.2.1. zu erkennen ist: Die Carboxygruppe am C1 des Sechsrings ist über Wasserstoffbrücken an die OH-Gruppen der Seitenketten des Ser36 und Thr88 gebunden, die Hydroxygruppen des C1 und des C3 mit der OH-Gruppe der Seitenkette des Thr88. Letztere bildet ebenfalls eine H-Brücke mit der NH₂-Gruppe der Lys92-Seitenkette. Die OH-Gruppe an C4 geht sogar insgesamt vier Wasserstoffbrücken ein, jeweils eine mit den NH₂-Gruppen der Reste Lys92 und Asn113, zwei mit der Carboxygruppe des Asp129, wodurch das Substratmolekül klammerartig eingespannt wird. Die OH-Gruppe der Seitenkette des Gln277 schließlich geht mit der Hydroxygruppe am C5 des Sechsrings eine polare Wechselwirkung ein.

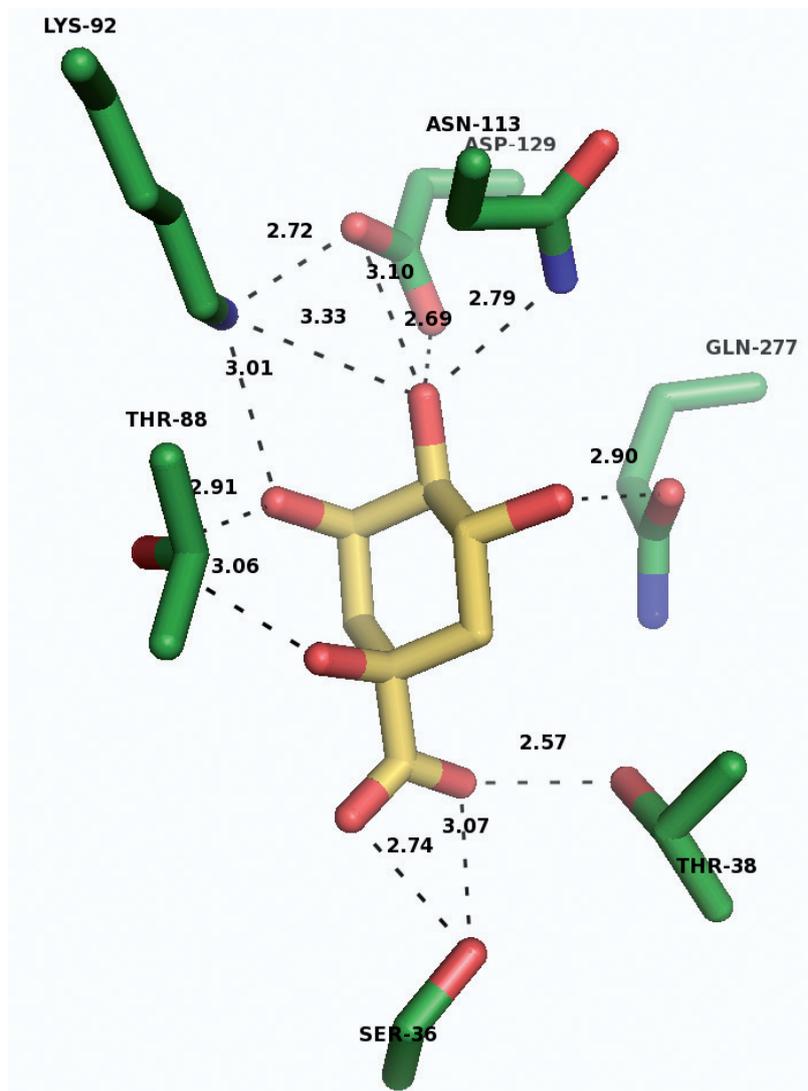


Abb. III.11.2.1.: Polare Wechselwirkungen des Substrats Quinat mit dem Protein.

C-Atome des Substrats Quinat sind in gelb, C-Atome der interagierenden Aminosäuren in grün dargestellt.

Vergleicht man auch hier die Veränderungen der an der Substratbindung beteiligten Aminosäuren zwischen dem Apoenzym und dem ternären Komplex mit Quinat und NADH (Abb. III.11.2.2.), sind diese eher schwächer ausgeprägt. Einzig die Seitenkette von Lys92 zeigt im Komplex einen annähernd geraden Verlauf, so dass es zu einer Wechselwirkung der endständigen NH_2 -Gruppe mit der OH-Gruppe am C3 des Quinats kommen kann. Alle übrigen Reste rücken lediglich ein wenig in Richtung der C-terminalen Domäne, wodurch der Abstand von Substrat und Cofaktor verkleinert wird.

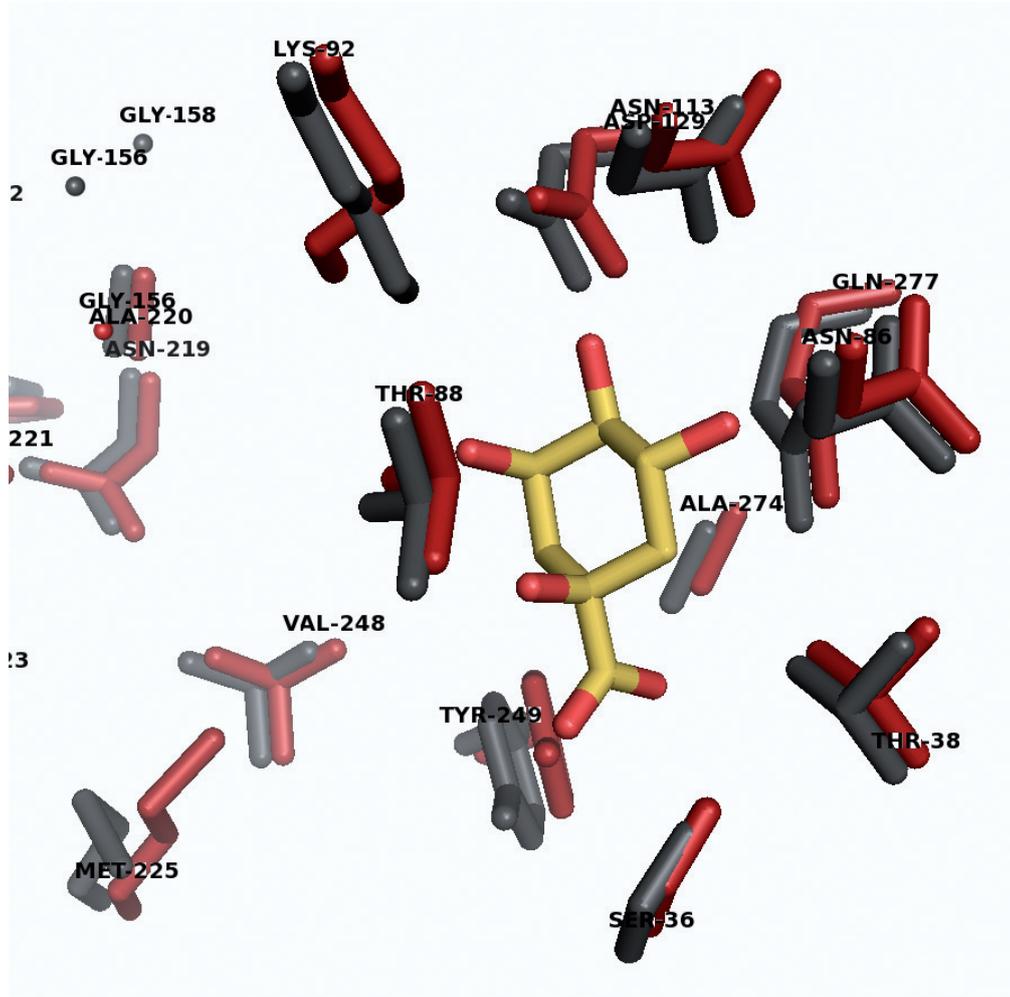


Abb. III.11.2.2.: Konformations- und Positionsänderungen der an der Substrat-Bindung beteiligten Aminosäuren nach der NADH- und Quinat-Bindung.

Reste des Apoenzyms sind rot, Reste der QDH im Komplex mit NADH und Quinat in schwarz gekennzeichnet, Quinat in gelb.

Diese Beobachtung wird untermauert, wenn darüber hinaus die beiden Komplexstrukturen, also QDH mit NAD^+ und QDH mit NADH und Quinat, miteinander verglichen werden (Abb. III.11.2.3. und III.11.2.4.). Hier wird ganz deutlich, dass sich sowohl die an der NAD^+ -Bindung beteiligten Aminosäuren, und damit auch der Cofaktor, um etwa $0,26 \text{ \AA}$ in Richtung des Substratmoleküles rücken, nachdem dieses gebunden wurde.

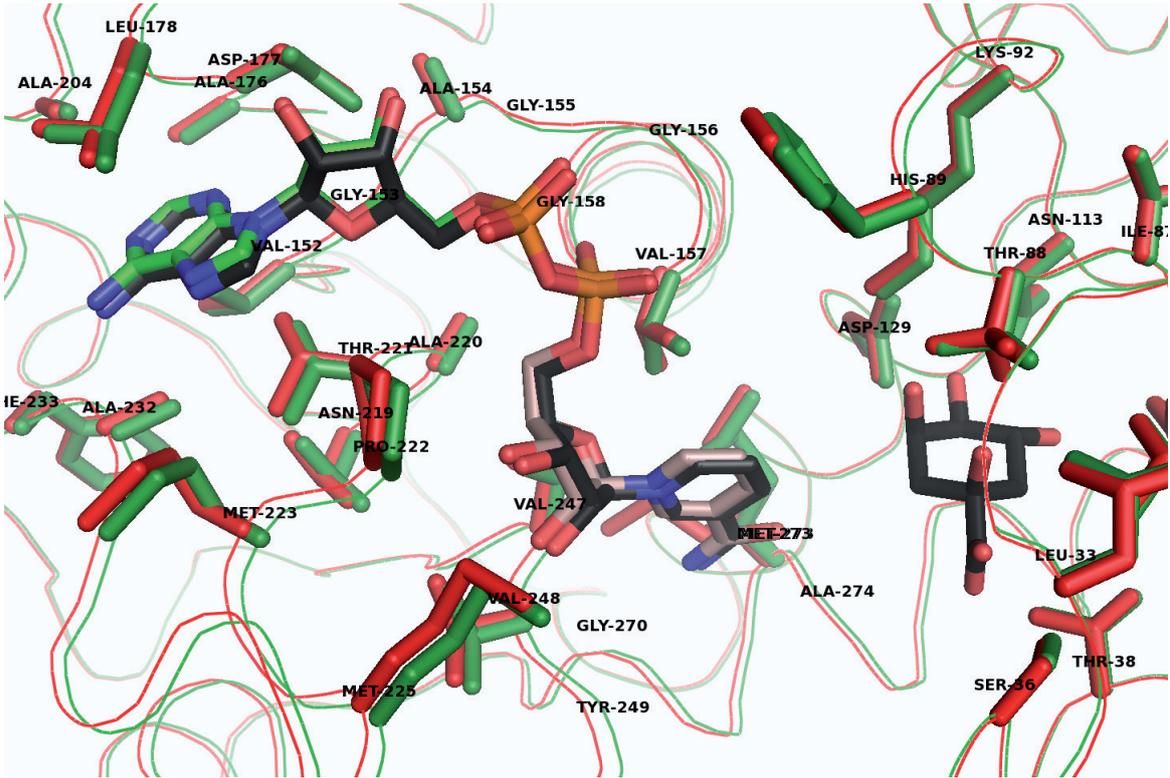


Abb. III.11.2.3.: Positionsänderungen der an der Substrat- und Cofaktor-Bindung beteiligten Aminosäuren nach der Quinat-Bindung. Reste der QDH im Komplex mit NAD⁺ sind in rot gekennzeichnet, das dazugehörige NAD⁺-Molekül in braunrot. Reste des QDH-Komplexes mit NADH und Quinat sind grün dargestellt, das dazugehörige Substrat und der Cofaktor in schwarz-bunt. Proteinhauptketten sind als Linien in den entsprechenden Farben gezeigt.

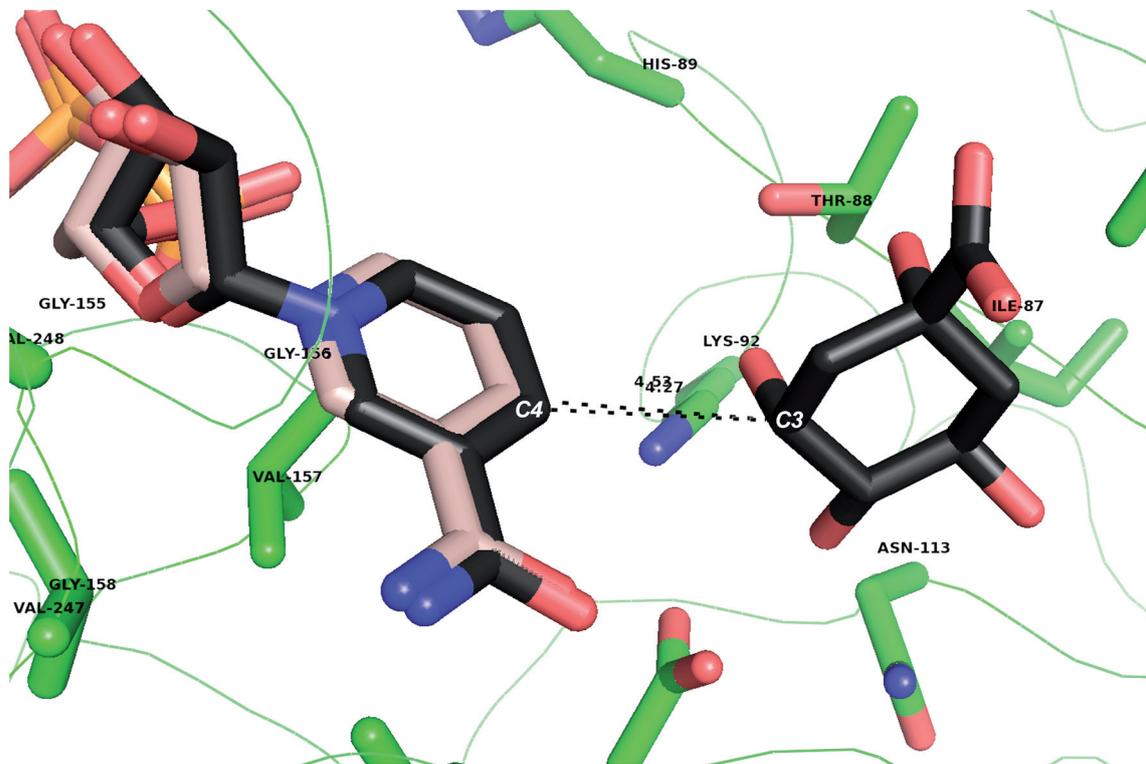


Abb. III.11.2.4.: Veränderung der Position des NADH-Moleküls nach der Substratbindung. Nach der Bindung von Quinat rückt der Cofaktor NADH näher zum C3-Atom des Substrats, so dass sich der Abstand von (theoretisch) 4,53 Å auf 4,27 Å nach der Substratbindung verringert (Farbgebung wie in Abb. III.11.2.3. beschrieben).

III.11.3. Bindung des Substrats Shikimat

An der Bindung des Substratmoleküls Shikimat sind bis auf Thr38 die gleichen Aminosäuren beteiligt wie beim Quinat (Abb. III.11.3.1.), jedoch kommen bedeutend weniger Wechselwirkungen zwischen Substrat und Enzym zustande: Die Carboxygruppe am C1 des Sechsrings ist über Wasserstoffbrücken nur mit der OH-Gruppe der Seitenketten des Ser36 verbunden, die Hydroxygruppen des C3 mit der OH-Gruppe der Seitenkette des Thr88 und mit der NH₂-Gruppe der Lys92-Seitenkette. Die OH-Gruppe an C4 geht hier nur insgesamt drei Wasserstoffbrücken ein, eine mit der NH₂-Gruppe des Asn113, zwei mit der Carboxygruppe des Asp129. Die OH-Gruppe der Seitenkette des Gln277 schließlich bildet auch hier wiederum eine H-Brücke mit der Hydroxygruppe am C5 des Sechsrings.

Insgesamt kann das Quinat-Molekül mit dem Protein elf Wasserstoffbrücken eingehen, das Shikimat-Molekül dagegen nur acht (vgl. Abb. III.11.2.1. und III.11.3.1.).

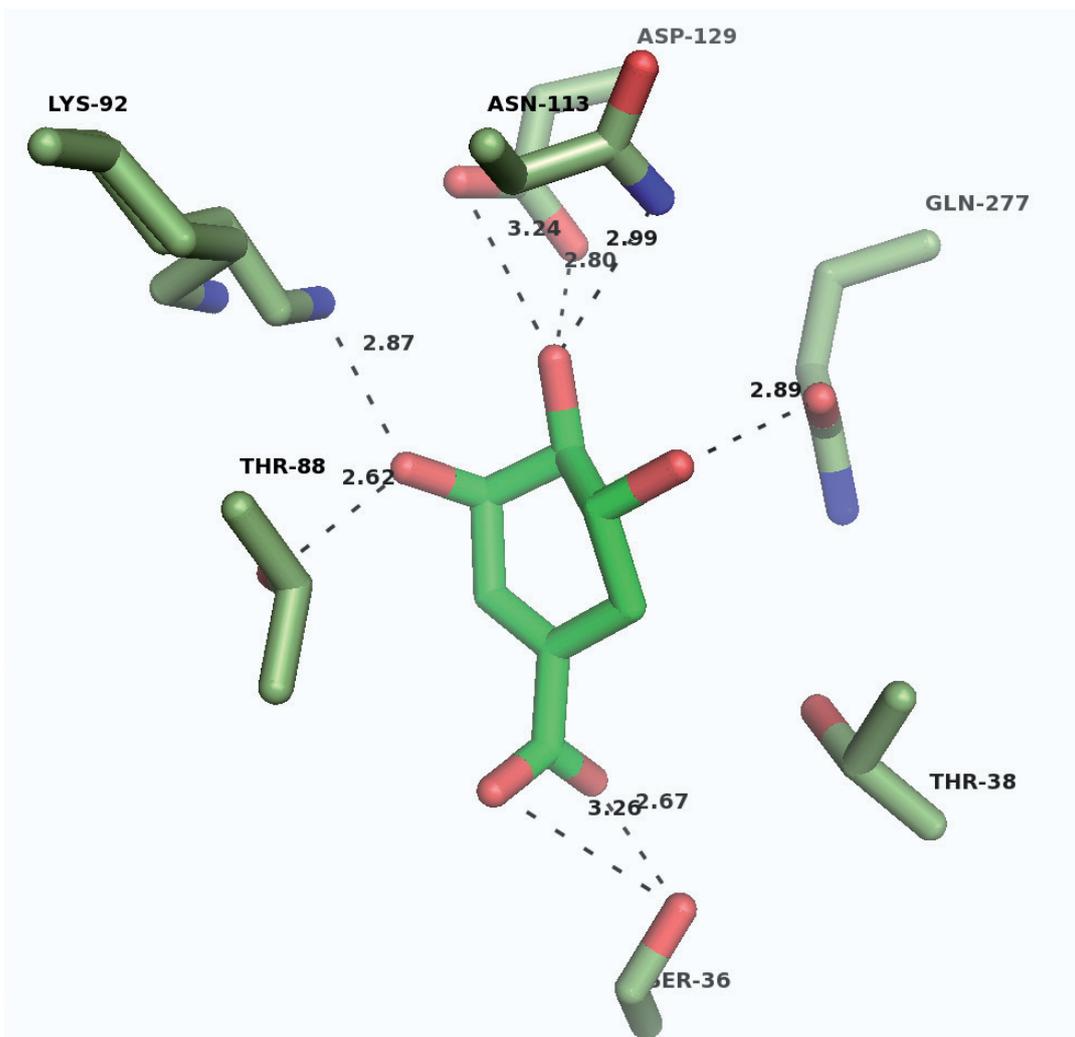


Abb. III.11.3.1.: Polare Wechselwirkungen des Substrats Shikimat mit dem Protein.

C-Atome des Substrats sind in grün, C-Atome der interagierenden Aminosäuren in olivgrün dargestellt.

III.11.4. Unterschiedliche Bindung der Substrate Quinat und Shikimat

Legt man die Substrat-bindenden Seitenketten und die beiden Substratmoleküle Quinat und Shikimat aus den beiden ternären Komplexen übereinander (Abb. III.11.4.1.), so lässt sich gut erkennen, dass sich die Aminosäureseitenketten praktisch nicht in ihrer Position und Konformation unterscheiden. Die einzige Ausnahme stellt eine alternative Seitenkettenkonformation von Lys92 dar, die im Komplex mit Shikimat auftritt. Die alternative Konformation dieses Restes liegt hier ähnlich wie in der Apostruktur vor, so dass keine Wasserstoffbrücke mit der OH-Gruppe am C3 gebildet werden kann.

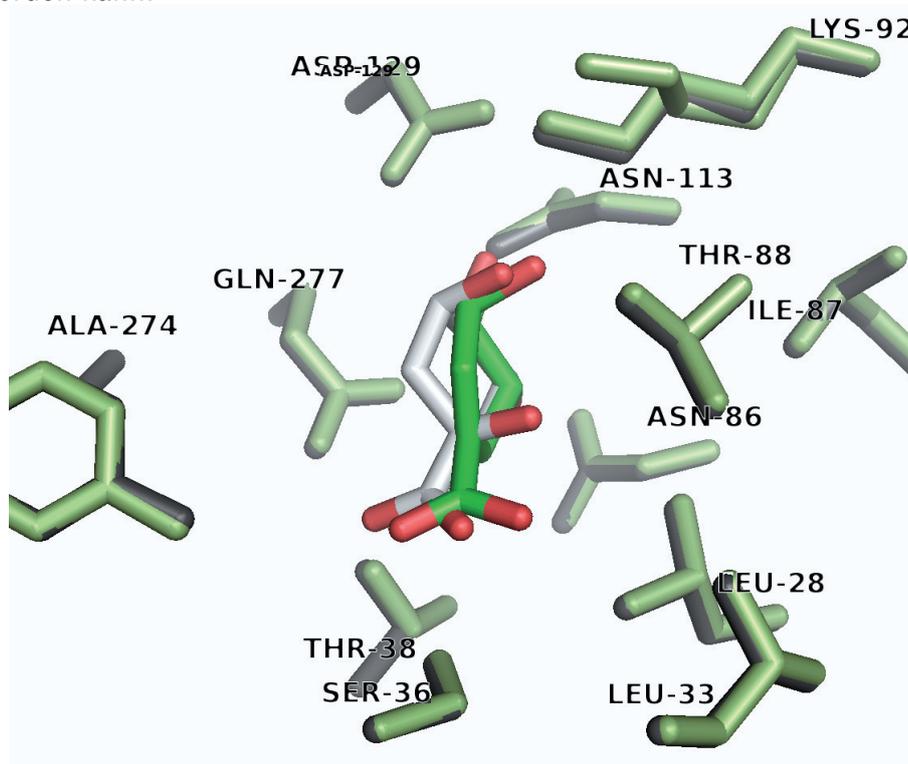


Abb. III.11.4.1.: Vergleich der Wechselwirkungen des Proteins mit den Substraten Quinat (hellgrau) und Shikimat (grün). Aminosäuren des QDH/Quinat-Komplexes in schwarz dargestellt, die des QDH/Shikimat-Komplexes in Olivgrün.

Bei Betrachtung der Substratmoleküle selber tritt eine deutliche Veränderung zutage: Im Vergleich zum Quinat ist das Shikimat mit seinem C2-Atom leicht aus der Ebene des Ringes herausgedreht, was durch die Doppelbindung zwischen C1 und C2 begründet ist. Das Shikimat nimmt daher eher eine Halbsessel-Konformation ein, während das Quinat-Molekül in einer Sesselkonformation gebunden wird. Durch diese strukturbedingten Unterschiede rückt auch die Carboxygruppe am C1 in eine andere Position, so dass die H-Brücke zum Thr38 nicht mehr ausgebildet werden kann. Ein weiterer – wenn auch scheinbar geringer – Unterschied fällt darüber hinaus am C3-Atom des Shikimats ins Auge, welcher für die Katalyse aber von Bedeutung sein könnte: Seine Position ist etwa 0,4 Å weiter entfernt vom Cofaktor NADH im Vergleich zum Komplex von Quinat und NADH (vgl. Abb. III.11.2.4 und III.11.4.3.).

Betrachtet man den Abstand zwischen den C3-Atomen der beiden Substrate und dem jeweils gebundenen NADH im Detail, so wird die größere Distanz zwischen NADH und Shikimat deutlicher, wie in Abbildung III.11.4.2. dargestellt.

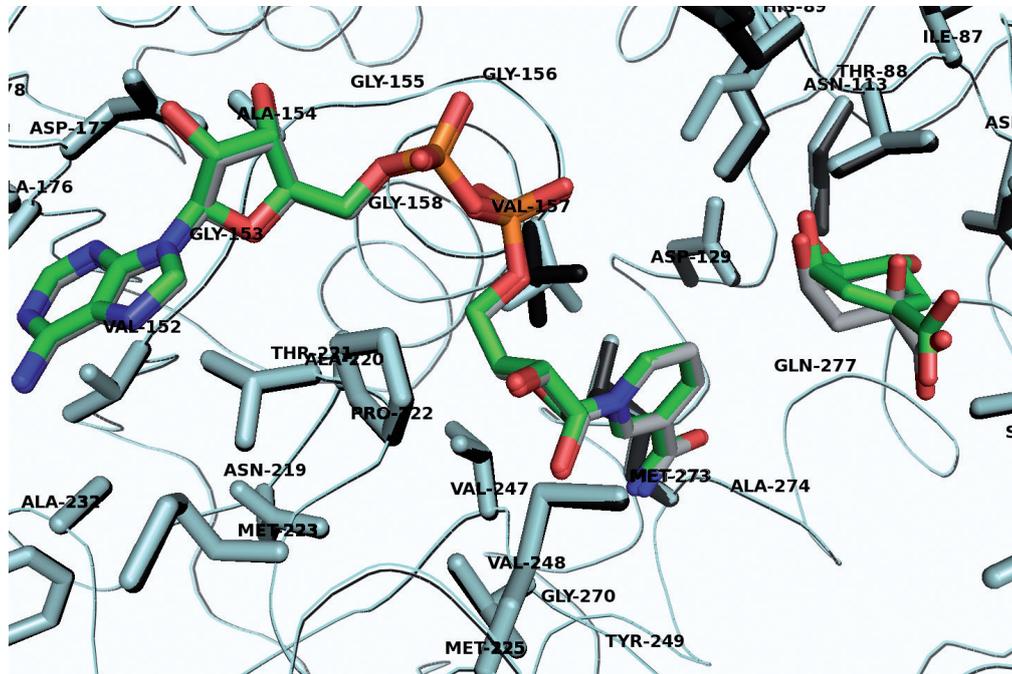


Abb. III.11.4.2.: Abstand zwischen dem Cofaktor NADH und den Substraten Quinat (hellgrau) bzw. Shikimat (grün).

Aminosäuren des QDH/Quinat-Komplexes sind in schwarz dargestellt, das dazugehörige NADH hellgrau; Aminosäuren des QDH/Shikimat-Komplexes sind in cyan gehalten, das dazugehörige NADH in grün.

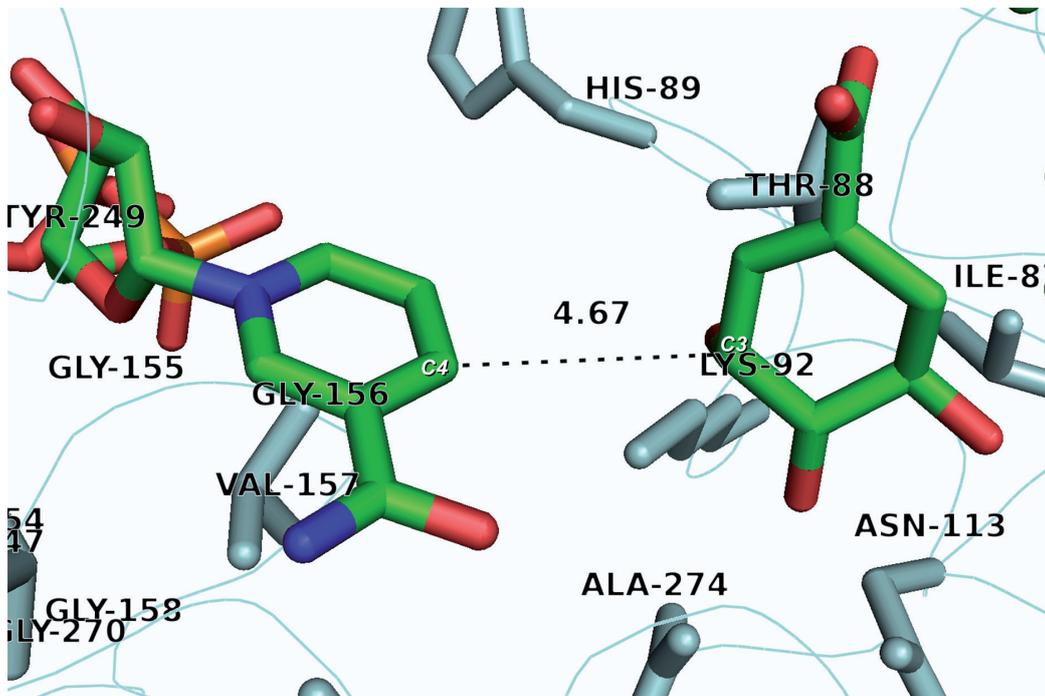


Abb. III.11.4.2.: Abstand des NADH-Moleküls zum Substrat nach der Shikimatbindung.

Nach der Bindung von Shikimat beträgt der Abstand zwischen dem Cofaktor NADH zum C3-Atom des Substrats 4,63 Å. Diese Distanz ist um etwa 0,4 Å größer als die zwischen NADH und Quinat (Farbgebung wie bei Abb. III.11.4.2. beschrieben).

IV. Diskussion

IV.1. Enzymkinetische Charakterisierung der Quinat-Dehydrogenase aus *Corynebacterium glutamicum*

IV.1.1. Substrat- und Cosubstratverwendung

Die einzelnen Befunde der enzymkinetischen Untersuchungen können belegen, dass Quinat mit hoher Wahrscheinlichkeit das Hauptsubstrat der Quinat-Dehydrogenase aus *C. glutamicum* darstellt.

Quinat hat unter optimalen pH-Bedingungen einen K_M -Wert von 2,4 mM, während der von Shikimat mit 54 mM etwa 23-mal höher ist (Tab. IV.1.1.1. und IV.1.1.2.).

Die Umsatzgeschwindigkeit mit Shikimat ist zwar etwa doppelt so hoch wie mit Quinat (k_{cat} -Wert für Quinat: 105 sec^{-1} , k_{cat} -Wert für Shikimat: 214 sec^{-1}), doch liegen *in vivo* Substratsättigungen selten vor, weshalb der k_{cat} -Wert nicht besonders aussagekräftig ist.

Das k_{cat}/K_M -Verhältnis stellt hingegen ein gutes Maß der katalytischen Effizienz eines Enzyms dar, das unter Substratkonzentrationen unterhalb der Sättigung agiert:

Aufgrund des niedrigen K_M -Wertes von Quinat ergibt sich für letztes eine etwa 10-fach höhere katalytische Effizienz verglichen mit Shikimat ($44 \text{ sec}^{-1} \times \text{mM}^{-1}$ bzw. $4 \text{ sec}^{-1} \times \text{mM}^{-1}$).

Tab. VI.1.1.1.: Kinetische Parameter der Quinat-Dehydrogenase gegenüber Quinat und NAD⁺.

Zusammenfassende Darstellung der unter III.3.2. beschriebenen Ergebnisse.

	Substrat	K_M [mM]	k_{cat} [sec ⁻¹]	k_{cat}/K_M [sec ⁻¹ mM ⁻¹]
pH 9,0/9,5	Quinat	2,37 ± 0,77	104,87 ± 43,78	44,05 ± 10,84
pH 7,5	Quinat	1,56 ± 0,50	50,82 ± 17,31	33,30 ± 7,44
pH 9,0/9,5	NAD ⁺	0,28 ± 0,07	223,06 ± 27,04	826,61 ± 226,52
pH 7,5	NAD ⁺	0,13 ± 0,03	43,67 ± 8,64	329,14 ± 20,52

Tab. IV.1.1.2.: Kinetische Parameter der Quinat-Dehydrogenase gegenüber Shikimat und NAD⁺.

Zusammenfassende Darstellung der unter III.3.2. beschriebenen Ergebnisse.

	Substrat	K_M [mM]	k_{cat} [sec ⁻¹]	k_{cat}/K_M [sec ⁻¹ mM ⁻¹]
pH 10,0/10,5	Shikimat	53,88 ± 15,43	214,09 ± 30,37	4,24 ± 1,38
pH 7,5	Shikimat	10,16 ± 3,53	30,13 ± 7,84	3,10 ± 0,76
pH 10,0/10,5	NAD ⁺	0,46 ± 0,09	205,78 ± 29,58	464,65 ± 84,15
pH 7,5	NAD ⁺	0,87 ± 0,25	61,12 ± 13,77	71,58 ± 12,16

Die höhere Umsatzgeschwindigkeit mit Shikimat ändert sich jedoch unter physiologischen Bedingungen (pH 7,5): Sie fällt sogar noch unter den Wert des Quinats (k_{cat} Quinat: 50 sec^{-1} , k_{cat} Shikimat: 30 sec^{-1}).

Betrachtet man die kinetischen Parameter des Cofaktors NAD^+ , so ist auch hier der K_M -Wert bezüglich Quinat deutlich niedriger als der mit Shikimat (K_M -Wert $\text{NAD}_{\text{Quinat}}$: $0,28 \text{ mM}$, K_M -Wert $\text{NAD}_{\text{Shikimat}}$: $0,46 \text{ mM}$) und auch die katalytische Effizienz von NAD^+ bezüglich Shikimat ist etwa um die Hälfte geringer (k_{cat}/K_M -Verhältnis $\text{NAD}_{\text{Quinat}}$: $827 \text{ sec}^{-1} \times \text{mM}^{-1}$, $\text{NAD}_{\text{Shikimat}}$: $465 \text{ sec}^{-1} \times \text{mM}^{-1}$).

Unter physiologischen Bedingungen (pH 7,5) werden die Unterschiede noch offenkundiger: Der K_M -Wert für NAD^+ mit Quinat sinkt auf $0,13 \text{ mM}$, während er für NAD^+ mit Shikimat auf etwa das Doppelte ansteigt ($0,87 \text{ mM}$). Die sich ergebenden k_{cat}/K_M -Verhältnisse für den Cofaktor NAD^+ zeigen dadurch sehr deutliche Veränderungen: Der k_{cat}/K_M -Wert für NAD^+ unter Quinat-Sättigung fällt bei pH 7,5 auf etwa die Hälfte ($329 \text{ sec}^{-1} \times \text{mM}^{-1}$), wohingegen der k_{cat}/K_M -Wert für NAD^+ unter Shikimat-Sättigung sogar fast um das 7-fache sinkt ($72 \text{ sec}^{-1} \times \text{mM}^{-1}$).

In Tabelle IV.1.1.3. sind die einzelnen k_{cat}/K_M -Verhältnisse unter Substrat- und Cofaktor-Sättigung bei den verschiedenen pH-Werten noch einmal dargestellt.

Tab. IV.1.1.3.: k_{cat}/K_M -Verhältnisse der Quinat-Dehydrogenase gegenüber Quinat, Shikimat und NAD^+ .

pH	NAD ⁺ -Sättigung [sec ⁻¹ mM ⁻¹]		Substrat-Sättigung [sec ⁻¹ mM ⁻¹]	
	(k_{cat}/K_M) _{Quinat}	(k_{cat}/K_M) _{Shikimat}	(k_{cat}/K_M) _{NAD⁺, Quinat-Sättigung}	(k_{cat}/K_M) _{NAD⁺, Shikimat-Sättigung}
9,0/9,5 (Quinat); 10,0/10,5 (Shikimat)	44,05 ± 10,84	4,24 ± 1,38	826,61 ± 226,52	464,65 ± 84,15
7,5	33,30 ± 7,44	3,10 ± 0,76	329,14 ± 20,52	71,58 ± 12,16

Alle Ergebnisse der enzymkinetischen Untersuchungen, insbesondere die Veränderung der k_{cat}/K_M -Verhältnisse der beiden Substrate sowie des Cofaktors unter den verschiedenen pH-Bedingungen, untermauern daher, dass Quinat das Hauptsubstrat der QDH darstellt. Endgültige Aussagen über die Situation *in vivo* können jedoch nicht getroffen werden, da in diesem Fall die Verwendung der Substrate von ihrer Verfügbarkeit abhängt.

Des Weiteren wurde überprüft, ob der N-terminale His₆-tag einen Einfluss auf die katalytischen Eigenschaften der QDH hat. Dazu wurde das um den Tag verkürzte Enzym für die entsprechenden kinetischen Messungen eingesetzt. Es zeigte sich lediglich, dass die Wechselzahl bezüglich Quinat etwas höher ist als bei dem Fusionsprotein, während die Michaelis-Konstante vollkommen übereinstimmt. Dadurch ergibt sich eine leicht höhere katalytische Effizienz bei dem verkürzten Enzym. Gegenüber Shikimat als Substrat traten jedoch keinerlei Veränderungen der katalytischen Parameter auf, woraus geschlossen werden kann, dass der His₆-tag keine Effekte auf die katalytischen Eigenschaften der QDH hat.

Die leichten Unterschiede der kinetischen Parameter bezüglich Quinat resultieren möglicherweise daraus, dass für die kinetischen Messungen mit dem Fusionsprotein immer Enzym aus mindestens drei voneinander unabhängigen Reinigungen eingesetzt wurde, für die Messungen mit dem verkürzten Protein jedoch nur Enzym aus einem einzigen Spaltungsansatz.

Bezüglich der Verwendung des Cofaktors NADP⁺ konnte kein Umsatz, weder mit Quinat noch mit Shikimat, festgestellt werden. Da es aber auch nicht in der Lage ist, das Cosubstrat NAD⁺ zu verdrängen, kann ausgeschlossen werden, dass das NADP⁺ überhaupt an der Cosubstratbindungsstelle gebunden wird, da sonst eine Inhibierung zu erwarten gewesen wäre. Die von Jan Schoepe (Dissertation, 2006) beobachtete Verwendung von NADP⁺ als Cofaktor kann daher nicht bestätigt werden.

IV.1.2. Vergleich der QDH aus *C. glutamicum* mit QDHs und SDHs aus anderen Organismen

Vergleicht man die katalytischen Parameter der QDH aus *Corynebacterium glutamicum* mit denen von QDHs aus anderen Organismen, so liegen die ermittelten Werte in einem ähnlichen Bereich. Die einzige Ausnahme stellt die YdiB aus *E. coli* dar: Sowohl ihre K_M - als auch die k_{cat} -Werte bezüglich der beiden Substrate Quinat und Shikimat sowie den Cofaktoren liegen in einem deutlich niedrigeren Bereich als die der hier untersuchten QDH.

In Tabelle IV.1.2.1. sind die K_M -Werte verschiedener QDHs zum Vergleich angegeben, wobei sich die substratbezogenen Werte ausschließlich auf die Reaktion mit NAD⁺ als Cofaktor beziehen, die NAD⁺-bezogenen nur auf die Verwendung von Quinat als Substrat. Auf die übrigen katalytischen Parameter wurde in dieser Darstellung verzichtet, da diese nicht überall angegeben wurden.

Tab. IV.1.2.1.: Vergleich der kinetischen Parameter der QDH aus *C. glutamicum* mit vergleichbaren Enzymen aus anderen Organismen.

Die substratbezogenen Werte beziehen sich ausschließlich auf die Reaktion mit NAD⁺ als Cofaktor, die NAD-bezogenen nur auf die Verwendung von Quinat als Substrat.

QDH aus	K _M Quinat [mM]	K _M Shikimat [mM]	K _M NAD ⁺ [mM]	K _M NADP ⁺ [mM]	Referenz
<i>C. glutamicum</i>	2,37	53,88	0,28	k. U.	diese Arbeit
<i>A. aerogenes</i>	0,49	n. a.	0,014	n. a.	Mitsubishi und Davies, 1954
<i>L. plantarum</i>	0,85	0,75	0,45	k. U.	Whiting und Coggins, 1974
<i>R. rhodochrous</i>	2,95	5,25	n. a.	n. a.	Bruce und Cain, 1990
<i>A. niger</i>	6,25	11,5	0,26	n. a.	Cain, 1972
<i>A. nidulans</i>	0,45	1,7	0,15	n. a.	Hawkins et al., 1993
<i>N. crassa</i>	0,37	1,18	n. a.	n. a.	Barea und Giles, 1978
<i>P. aureus</i>	0,32	n. a.	0,031	n. a.	Gamborg, 1966
<i>P. mungo</i>	0,37	k. U.	0,05	0,7	Kang und Scheibe, 1993
<i>E. coli</i> (YdiB)	0,009	0,003	0,018	n. a.	Lindner et al., 2005
<i>E. coli</i> (YdiB)	0,02	0,02	0,116	0,5	Michel et al., 2003

n. a.: nicht angegeben; k. U.: kein Umsatz

Unter Vernachlässigung einer bifunktionalen Quinat-/Shikimat-Dehydrogenasen aus *Pinus taeda* (Ossipov et al., 2000) und der PQQ-abhängigen QDH aus *Acinetobacter*, die beide ein pH-Optimum im physiologischen bis sauren Bereich aufweisen, zeigen alle übrigen Quinat-Dehydrogenasen ihre maximale Aktivität im Basischen, etwa im Bereich pH 9,0 bis 10,5.

Betrachtet man nun die katalytischen Parameter der Shikimat-Dehydrogenasen im Vergleich zu denen der Quinat-Dehydrogenasen, so liegen deren K_M-Werte für Substrat und Cosubstrat tendenziell etwas niedriger, aber dennoch in einem ähnlichen Bereich. Auch die SDHs zeigen ein pH-Optimum im basischen Bereich, etwa zwischen pH 8,0 und 10,0. Tabelle IV.1.2.2. gibt die K_M-Werte verschiedener SDHs an, wobei hier ausschließlich die Reaktion mit Shikimat und NADP⁺ dargestellt ist.

Tab. IV.1.2.2.: Vergleich der kinetischen Parameter der SDHs aus verschiedenen Organismen.

Die angegebenen Werte beziehen sich ausschließlich auf die Reaktion mit Shikimat und NADP⁺.

SDH aus	K _M Shikimat [mM]	K _M NADP ⁺ [mM]	Referenz
<i>E. coli</i>	0,055	0,031	Yaniv und Gilvarg, 1954
<i>E. coli</i>	0,065	0,056	Michel et al., 2003
<i>H. pylori</i>	0,148	0,182	Han et al., 2006
<i>P. sativum</i>	0,225	0,007-0,009	Balinsky und Davies, 1961a und b
<i>S. oleracea</i>	0,2	0,008-0,026	Fiedler und Schultz, 1985
<i>A. aeolicus</i>	0,042	0,042	Gan et al., 2007
<i>A. thaliana</i>	0,685	0,131	Singh und Christendat, 2006

IV.1.3. Klassifizierung der QDH

Die Zuweisung einer EC-Nummer ist im Falle der Quinat-Dehydrogenase aus *Corynebacterium glutamicum* praktisch nicht möglich.

Die klassischen Quinat-Dehydrogenasen der EC 1.1.1.24 setzen ausschließlich Quinat und NAD⁺ um, die QDHs der EC 1.1.99.25 benötigen PQQ als Cofaktor und die Enzyme der EC 1.1.1.282 (YdiB) können sowohl Quinat und Shikimat als auch NAD(H) und NADP(H) verwenden. Die klassischen Shikimat-Dehydrogenasen (EC 1.1.1.25) wiederum sind strikt 3-Dehydroshikimat/Shikimat- und NADP(H)-spezifisch.

Die QDH aus *C. glutamicum* fällt aufgrund ihrer Quinat- und Shikimat-Umsatzfähigkeit und ihrer strengen NAD-Abhängigkeit in keine dieser Klassen, weshalb die Eröffnung einer neuen Enzymklasse sinnvoll erscheint.

IV.2. Tertiär- und Quartärstruktur der QDH im Vergleich mit verwandten Enzymen

In der Protein-Datenbank finden sich, wie bereits in der Einleitung dargelegt, bislang verschiedene Strukturen der Shikimat-Dehydrogenasen (EC 1.1.1.25) und der YdiB (EC 1.1.1.282), aber nur eine einer Quinat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.24; Dissertation Jan Schoepe). Informationen zu den entsprechenden ternären Komplexen sind noch spärlicher und stehen bisher nur von drei Enzymen zur Verfügung: Von der SDH aus *Thermus thermophilus* (Bagautdinov und Kunishima, 2007), der SDH aus *Aquifex aeolicus* (Gan et al., 2007) und der pflanzlichen, bifunktionalen Dehydroquinat-Dehydratase/Shikimat-Dehydrogenase aus *Arabidopsis thaliana* (Singh und Christendat, 2007).

Die in dieser Arbeit charakterisierte QDH aus *C. glutamicum* konnte 2006 als Apoenzym strukturell aufgeklärt werden (Dissertation Jan Schoepe), jedoch gelang die Kristallisation mit dem Cofaktor seinerzeit nicht.

In dieser Arbeit sollen nun die verschiedenen Komplexstrukturen der QDH aus *C. glutamicum* mit denen der bislang veröffentlichten eng verwandten Strukturen verglichen werden, um so nähere Informationen zur Substrat- und Cosubstratspezifität sowie zum möglichen Katalysemechanismus zu erlangen.

Die Tertiärstruktur der QDH aus *C. glutamicum* ist denen der bisher beschriebenen Shikimat-Dehydrogenasen und der YdiB sehr ähnlich. Alle Enzyme falten sich in eine N- und C-terminale Domäne, deren β -Faltblätter von α -Helices flankiert werden, deren Anzahl ein wenig variiert, was aber teilweise durch unterschiedliche Definitionen begründet ist.

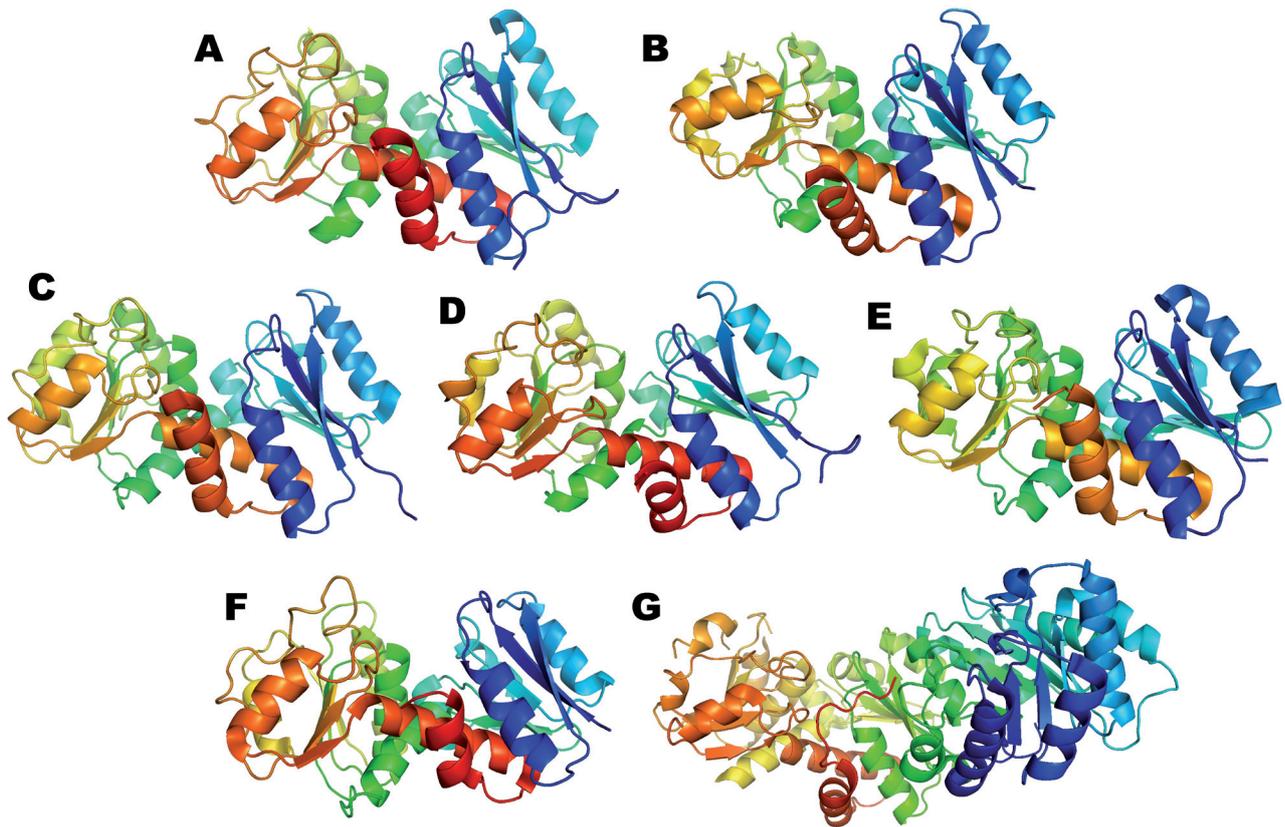


Abb. IV.2.1.: Vergleich der Tertiärstrukturen verschiedener Shikimat-Dehydrogenasen.

A: AroE aus *M. jannaschii*, (1nvt), **B:** AroE aus *H. influenzae* (1p77), **C:** AroE aus *G. kaustophilus*, (2egg), **D:** AroE aus *A. aeolicus* (2hk8), **E:** AroE aus *T. thermophilus* (1wxd), **F:** YdiB aus *E. coli*, (1o9b), **G:** bifunktionale DHQD/SDH aus *A. thaliana* (2gpt). Der pdb-Code ist in Klammern angegeben, Referenzen dazu stehen im Text.

Die C-terminale Domäne der YdiB aus *E. coli* (Abb. IV.2.1., F) zeigt ein paralleles 6-strängiges β -Faltblatt, das auf der einen Seite von zwei α -Helices, auf der anderen Seite von dreien umgeben ist. Die in dieser Domäne lokalisierte Rossmann-Faltung weicht an einer Stelle von der typischen Topologie ab: eine der flankierenden Helices ist hier durch eine lange hochgeordnete Schleife ersetzt, die eine kleine 3_{10} -Helix enthält.

Die N-terminale Domäne besteht ebenfalls aus einem 6-strängigen β -Faltblatt, dessen Strang 5 als einziger antiparallel verläuft. Dieses zentrale β -Faltblatt wird auf jeder Seite von zwei α -Helices flankiert (Benach et al., 2003; Michel et al., 2003).

Eine leicht veränderte Anordnung der Sekundärstrukturen liegt bei der SDH aus *M. jannaschii* vor (Abb. IV.2.1., A). Das parallele 6-strängige β -Faltblatt der C-terminalen Domäne ist an der

Molekülaußenseite von zwei Schleifen und einer α -Helix umgeben, während es an der Innenseite von drei α -Helices flankiert wird.

Das 6-strängige β -Faltblatt der N-terminalen Domäne (Strang 5 als einziger antiparallel) wird von vier α -Helices und zwei 3_{10} -Helices begleitet (Padyana und Burley, 2003).

Das parallele 6-strängige β -Faltblatt der C-terminalen Domäne der SDH aus *H. influenzae* (Abb. IV.2.1., B) wird von vier α -Helices umgeben, jeweils zwei auf einer Seite, während das zentrale β -Faltblatt der N-terminalen Domäne wiederum einen einzigen antiparallelen Strang beinhaltet und sogar gegen 7 α -Helices gepackt ist (Ye et al., 2003).

Bei der SDH aus *A. aeolicus* (Abb. IV.2.1., D) wird das parallele 6-strängige β -Faltblatt der C-terminalen Domäne von drei α -Helices auf der einen Seite und zwei 3_{10} -Helices auf der anderen flankiert, das überwiegend parallele 6-strängige β -Faltblatt der N-terminalen Domäne von jeweils drei α -Helices auf jeder Seite (Gan et al., 2007).

Vier α -Helices und eine 3_{10} -Helix umgeben das C-terminale parallele 6-strängige β -Faltblatt der SDH aus *T. thermophilus* (Abb. IV.2.1., E), wohingegen das N-terminale gemischte β -Faltblatt von vier α -Helices und zwei 3_{10} -Helices flankiert wird (Bagautdinov und Kunishima, 2007).

Das einzige strukturell aufgeklärte SDH-Enzym aus Pflanzen ist die bifunktionale Dehydroquinat-Dehydratase/Shikimat-Dehydrogenase aus *A. thaliana* (Abb. IV.2.1., G).

Die C-terminale Domäne des SDH-Teils besteht wiederum aus einem parallelen 6-strängigen β -Faltblatt, das von je zwei α -Helices auf beiden Seiten umgeben ist.

Im 6-strängigen β -Faltblatt der N-terminalen Domäne verläuft wieder ein Strang antiparallel zu den übrigen. Auch dieses wird von zwei α -Helices auf jeder Seite flankiert (Singh und Christendat, 2006).

Zusammengefasst zeigen alle diese Enzyme und die QDH aus *C. glutamicum* die gleiche Tertiärstruktur, wenn auch die Anzahl der α -Helices leicht variiert.

Die QDH aus *C. glutamicum* ist als Homodimer beschrieben worden (Dissertation Jan Schoepe, 2006), ebenso wie die *Tth*SDH (Bagautdinov und Kunishima, 2007), die *Mja*SDH (Padyana und Burley, 2003) und die *EcoYdiB* (Michel et al., 2003), während die *Aae*SDH (Gan et al., 2007) und die *Eco*SDH (Michel et al., 2003) im Kristall als Tetramer vorliegen.

Die Kontakte zwischen den beiden Monomeren der *Cg*/QDH werden durch die N-terminalen Domänen ausgebildet, wobei die Helices $\alpha 1$ und $\alpha 2$, die β -Stränge 1 und 2 sowie die sie verbindenden Schleifen direkt an den hydrophoben Kontakten beteiligt sind (Abb. IV.2.2.).

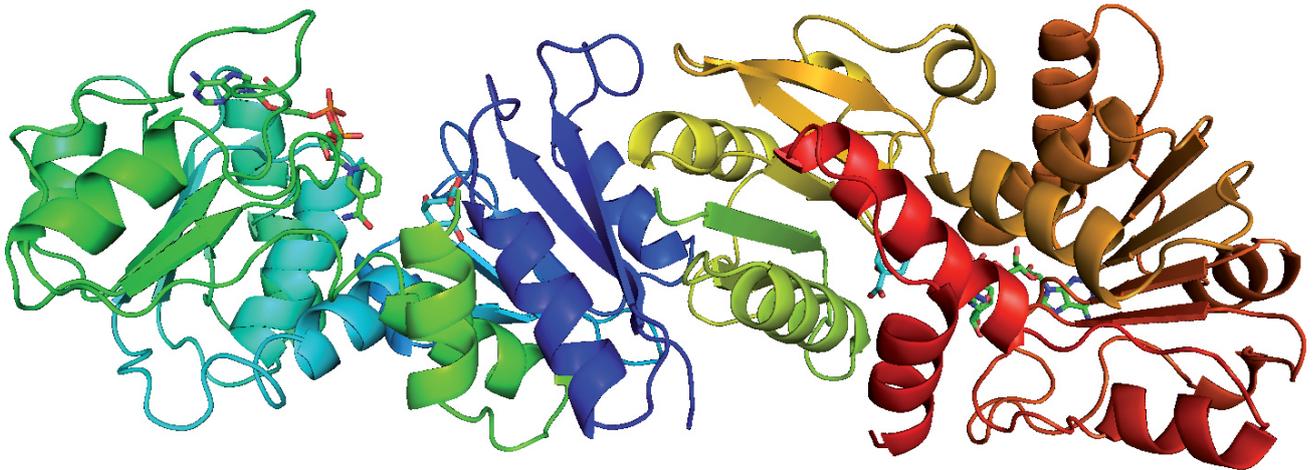


Abb. IV.2.2.: Die Quartärstruktur der *Cg*/QDH.

Die beiden Monomere (grün-blau bzw. rot-gelb) der ternären Komplexe bilden über die α -Helices 1 und 2, die β -Stränge 1 und 2 sowie über die sie verbindenden Schleifen der N-terminalen Domäne ein Homodimer. Das Substrat Quinat und der Cofaktor NADH sind als Stabmodell dargestellt.

Beim Vergleich der Quartärstruktur der *Cg*/QDH mit denen der oben genannten Shikimat-Dehydrogenasen und der YdiB (jeweils mit dem dimeren Enzym) bilden alle Proteine mit der gleichen Domänenregion den Kontakt zum benachbarten Monomer aus, einzige Ausnahme ist die *Tth*SDH (Abb. IV.2.3.). Bei dieser werden die hydrophoben Kontakte durch die α -Helices 2, 3 und 4, die β -Stränge 4, 5 und 6 sowie den entsprechenden Schleifenbereichen vermittelt (Abb. IV.2.4.).

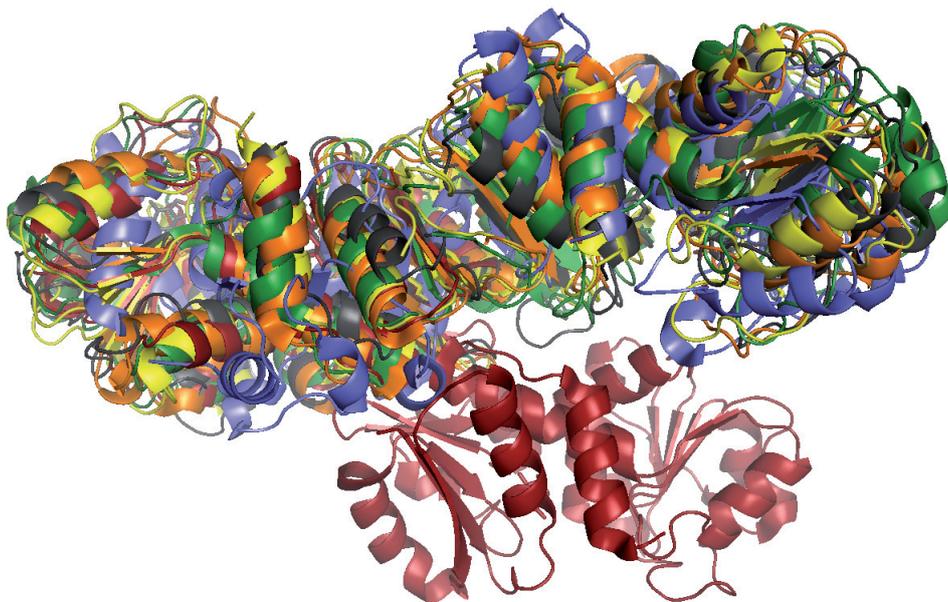


Abb. IV.2.3.: Vergleich der Quartärstruktur der *Cg*/QDH mit denen verwandter Enzyme.

schwarz: *Cg*/QDH; **gelb:** *Mja*SDH (1nvt); **blau:** *Eco*SDH (1nyt); **grün:** *Eco*YdiB (1npd); **orange:** *Aae*SDH (2hk9); **rot:** *Tth*SDH (2ev9)

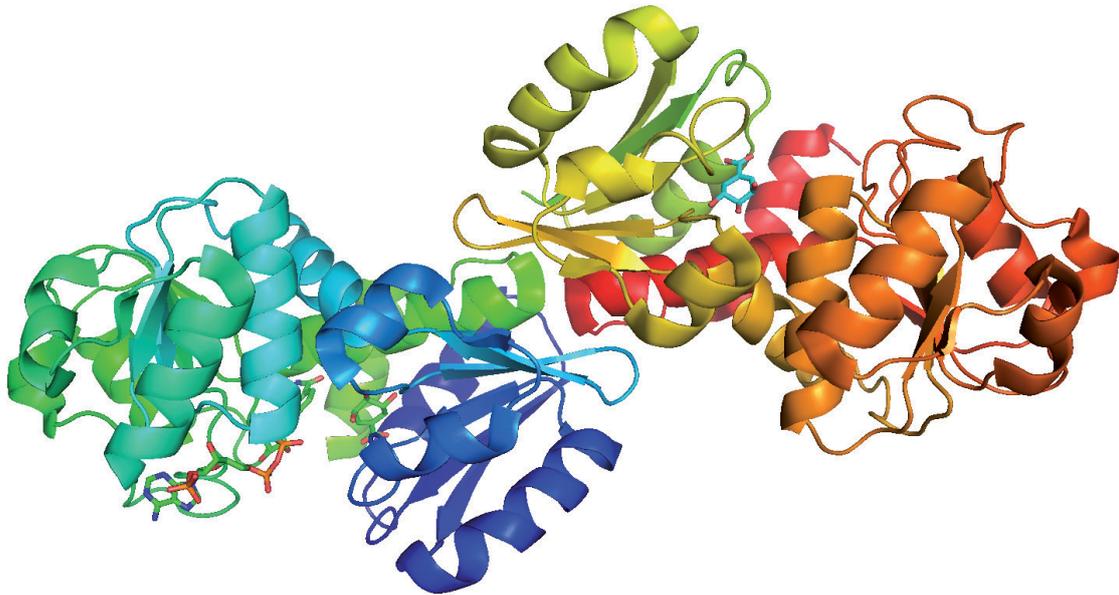


Abb. IV.2.4.: Die Quartärstruktur der *TthSDH* (2ev9).

Die beiden Monomere (grün-blau bzw. rot-gelb) der ternären Komplexe bilden über die α -Helices 2, 3 und 4, die β -Stränge 4, 5 und 6 sowie über die sie verbindenden Schleifen der N-terminalen Domäne ein Homodimer. Das Substrat Shikimat und der Cofaktor NADPH sind als Stabmodell dargestellt.

Bei diesem gänzlich andersartigen Dimerisierungsmodus der *TthSDH* könnte es sich möglicherweise um ein kristallographisches Artefakt handeln, worauf im nächsten Kapitel ausführlicher eingegangen wird.

IV.2.1. Offene oder geschlossenen Konformation?

Eine wichtige Frage der strukturbasierten Enzymologie ist, ob und wie das Enzym auf Substrat- und/oder Cofaktor-Bindung reagiert.

Im Folgenden sollen zunächst die konformellen Änderungen bei der Quinat-Dehydrogenase aus *C. glutamicum* (*Cg/QDH*) dargestellt werden. Informationen zu diesen strukturellen Veränderungen sind bislang nur von wenigen eng verwandten Enzymen der Quinat-Dehydrogenase bekannt (*TthSDH*, *AaeSDH* und *AthDHQD/SDH*). Diese werden im Anschluss vorgestellt, um Unterschiede und Gemeinsamkeiten der *Cg/QDH* mit diesen Enzymen zu beleuchten.

Die *Cg*/QDH zeigt als Apoenzym eine geschlossene Konformation. Während aber der Cofaktor NAD^+ gebunden wird, öffnet sich die Spalte zwischen der N- und C-terminalen Domäne um etwa $1,5 \text{ \AA}$, so dass die Spalte zwischen beiden etwas geräumiger wird und somit eine offene Konformation vorliegt (Abb. IV.2.1.1.).

Wie bereits unter III.10.1. dargestellt, klappt während der Cofaktor-Bindung ein Teil der Glycin-reichen Schleife weiter nach außen (Abb. III.10.1.2.).

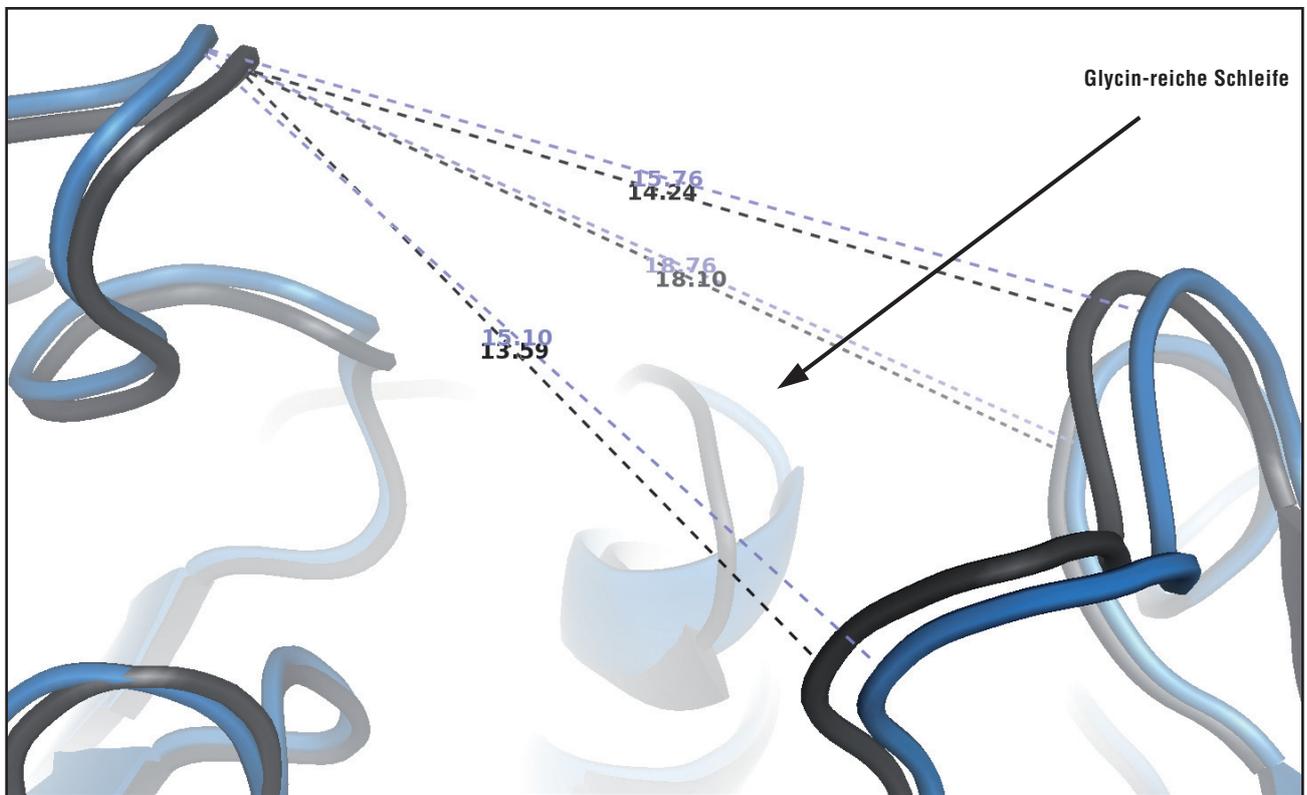
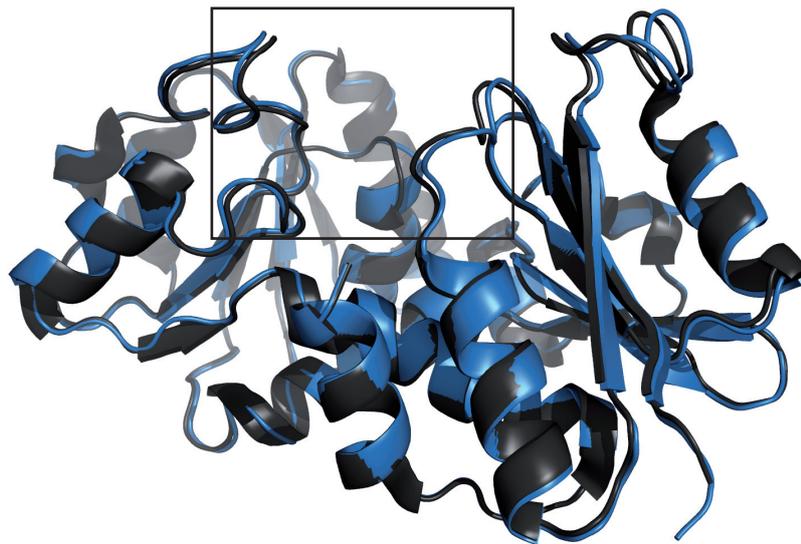


Abb. IV.2.1.1.: Konformelle Unterschiede zwischen dem *Cg*/QDH-Apoenzym (schwarz) und dem *Cg*/QDH-Komplex nach NAD^+ -Bindung (blau). Der in der oberen Abbildung gekennzeichnete Ausschnitt zeigt die Abstände zwischen der N- und C-terminalen Domäne im Apoenzym und im QDH/ NAD^+ -Komplex. Die Abstände verringern sich nach der Cofaktor-Bindung um bis zu $1,52 \text{ \AA}$.

Bindet nun auch das Substrat Quinat, so rücken diese beiden Domänen wieder ein Stück zusammen, so dass die dazwischenliegende Spalte um bis zu 0,5 Å enger wird (Abb. IV. 2.1.2.). Da dieser Unterschied jedoch sehr gering ist, kann man auch hier von einer offenen Konformation sprechen.

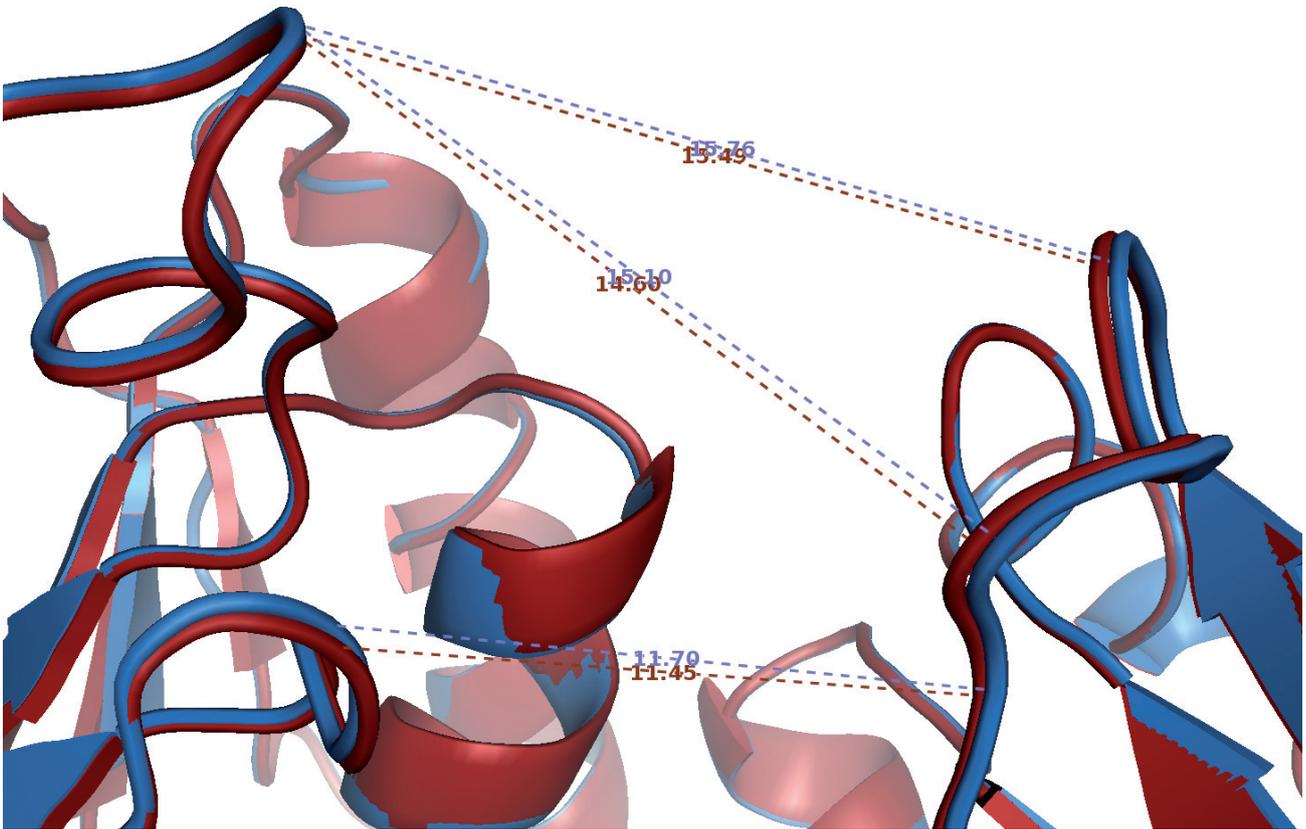


Abb. IV.2.1.2.: Konformelle Unterschiede zwischen dem *Cg*/QDH/NAD⁺-Komplex (blau) und dem ternären QDH-Komplex (rot).

Die Abstände zwischen der N- und C-terminalen Domäne im QDH-Komplex mit NADH und dem Substrat verringern sich nach der Quinat-Bindung um 0,25 bis 0,5 Å, so dass die Spalte wieder etwas enger wird.

Ganz anders beschrieben wurde die Situation für die Shikimat-Dehydrogenase aus *Thermus thermophilus*, *TthSDH*, (Bagautdinov und Kunishima, 2007). Dieses Enzym liegt in Lösung und im Kristall als Homodimer vor, wobei die beiden Protomere A und B des Apoenzyms zwei unterschiedliche Konformationen einnehmen: Das Protomer A zeigt eine geschlossene Konformation, Protomer B eine offene (Abb. IV.2.1.3.).

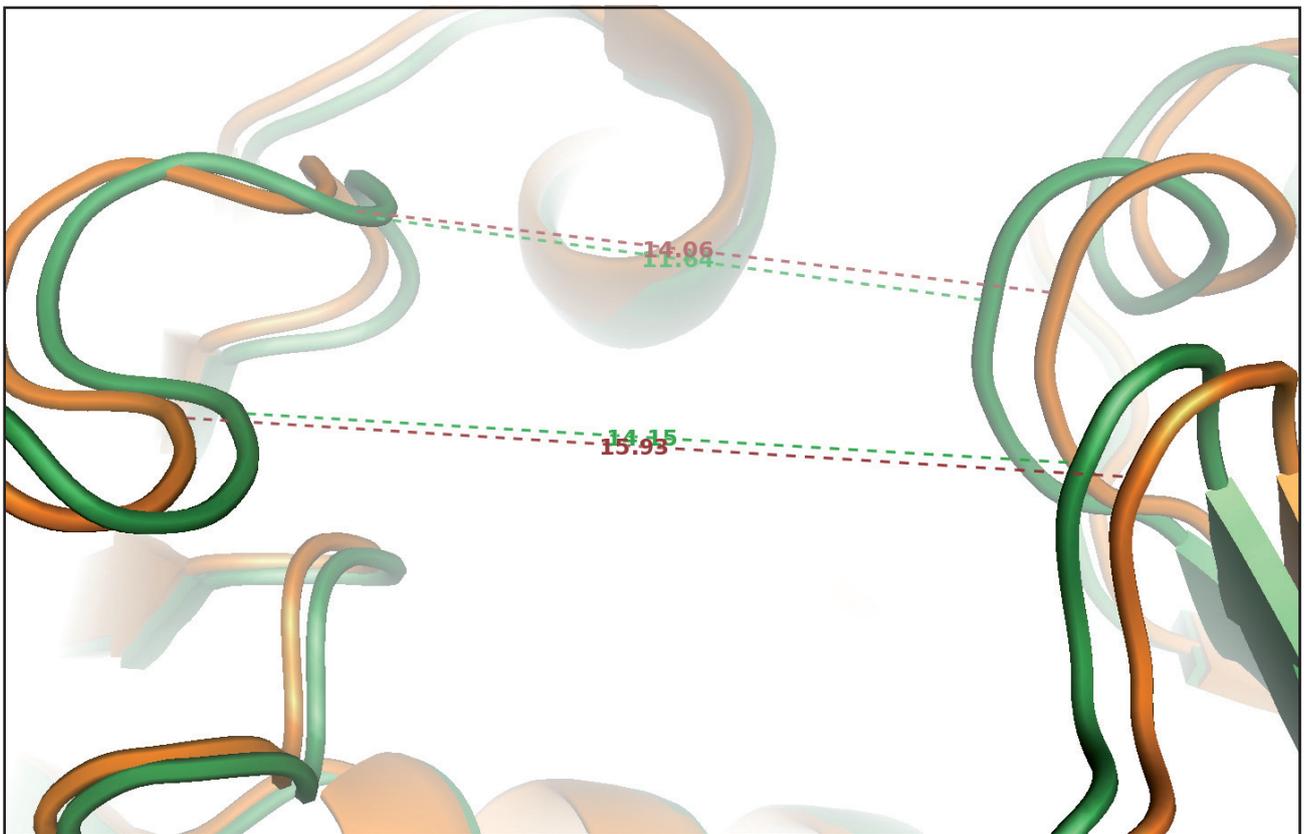
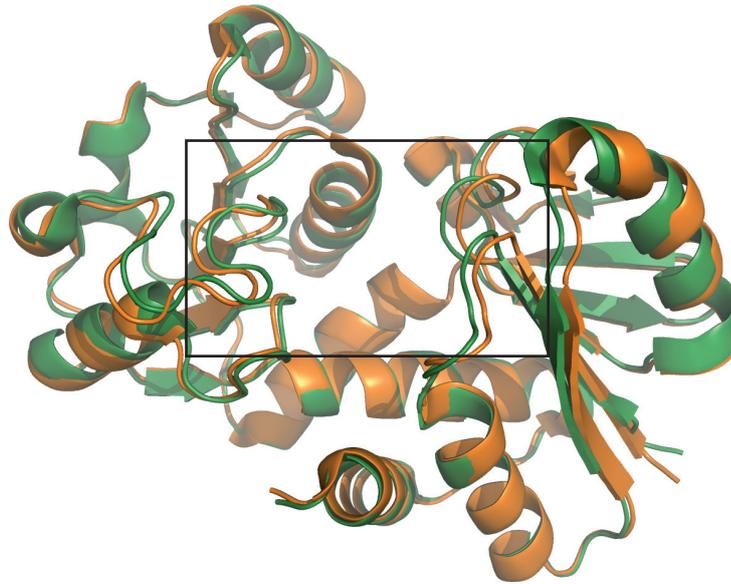


Abb. IV.2.1.3.: Konformelle Unterschiede zwischen den beiden Protomeren A (grün) und B (orange) des *TthSDH*-Apoenzym (1wxd).

Der in der oberen Abbildung gekennzeichnete Ausschnitt zeigt die Abstände zwischen der N- und C-terminalen Domäne der Protomere A (geschlossen) und B (offen) im Apoenzym der *TthSDH*. Die Abstände unterscheiden sich um 1,8 bis 2,4 Å.

Der Cofaktor NADP(H) bindet offenbar nur an das Protomer A mit der geschlossenen Konformation und bewirkt dabei praktisch keinerlei weitere konformelle Änderung. Auch wenn sowohl der Cofaktor als auch das Substrat gebunden werden, lassen sich kaum strukturelle Änderungen feststellen. Wird hingegen allein das Substrat Shikimat an Protomer A gebunden, so nähern sich die N- und C-terminale Domäne einander an, so dass sich der Spalt zwischen beiden noch weiter verengt.

Im Vergleich zum Cofaktor kann das Substratmolekül jedoch auch an das Protomer B mit der offenen Konformation binden.

Der Abstand zwischen der N- und C-terminalen Domäne unterscheidet sich bei den Protomeren A und B um etwa 1,8 bis 2,4 Å, also in einem vergleichbaren Maße wie bei der Konformationsänderung der QDH aus *C. glutamicum* bei der Cofaktor-Bindung beobachtet wurde.

Entscheidend aber ist der Unterschied, dass sich bei der *Cg*/QDH die beiden Domänen vor oder während der NAD⁺-Bindung öffnen und sich bei der *Tth*SDH offenbar keinerlei konformelle Änderung vollzieht. Vielmehr scheinen die beiden Protomere schon im Apoenzym unterschiedliche Konformationen einzunehmen, wobei der Cofaktor offenbar ausschließlich an die geschlossene Protomerform binden kann. Die Autoren folgern daher einen so genannten konformellen Selektionsmechanismus des Cofaktors, bei dem die Ligand-Bindung für das Schließen der Domänen nicht erforderlich ist (Bagautdinov und Kunishima, 2007).

Da es aber nicht sinnvoll erscheint, dass in einem Homodimer lediglich eines der beiden Protomere, nämlich das geschlossene, den Cofaktor binden kann, und darüber hinaus offenbar keine Kooperativität zwischen den beiden Protomeren herrscht, ist es wahrscheinlicher, dass es sich bei diesen unterschiedlichen Protomer-Konformationen um kristallographische Artefakte handelt. Auch die schon beschriebenen Befunde bezüglich der Konformationsänderung bei der *Cg*/QDH und der völlig andersartige Dimerisierungsmodus der *Tth*SDH stützen diese Vermutung.

Betrachtet man in der Komplexstruktur der *Tth*SDH den Abstand zwischen dem Cofaktor NADP(H) und dem Substrat Shikimat (Abb. IV.2.1.4.), so ist dieser mit 4,13 Å fast identisch mit dem im ternären Komplex der *Cg*/QDH mit NADH und Quinat, der sich auf 4,27 Å beläuft (vgl. Abb. III.11.2.4.).

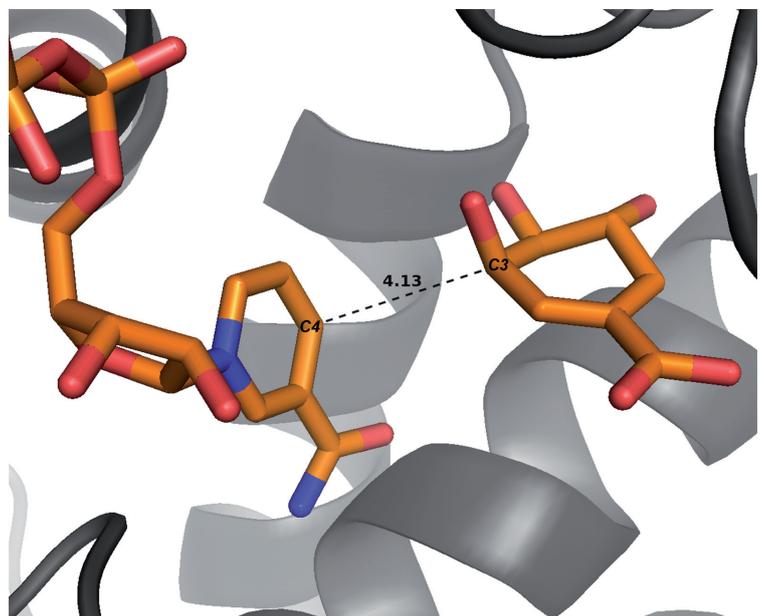


Abb. IV.2.1.4.: Abstand zwischen dem Cofaktor NADP(H) und dem Substratmolekül Shikimat im Protomer A des ternären Komplexes der *Tth*SDH (1ev9).

Die Distanz beträgt hier 4,13 Å, was vergleichbar ist mit dem Abstand von 4,27 Å zwischen dem Cofaktor NADH und dem Substrat Quinat im ternären Komplex der *Cg*/QDH.

Bei der Shikimat-Dehydrogenase aus *Aquifex aeolicus*, *AaeSDH* (Gan et al., 2007), befinden sich beim Apoenzym acht Monomere in der asymmetrischen Einheit (Moleküle A bis H), beim ternären Komplex mit NADP⁺ und Shikimat vier (Moleküle A bis D). Molekül F des Apoenzyms zeigt dabei die am weitesten geöffnete Konformation, Molekül D des ternären Komplexes die am weitesten geschlossene (Abb. IV.2.1.5.).

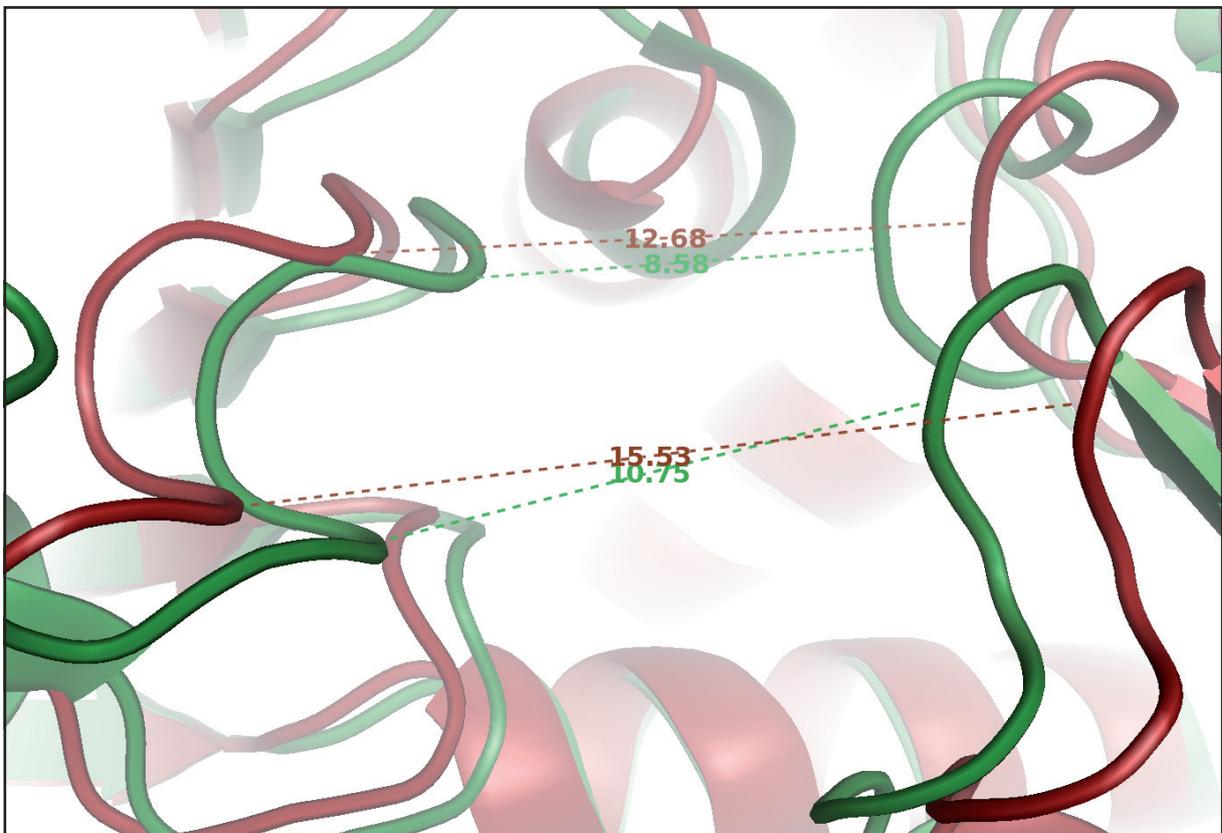
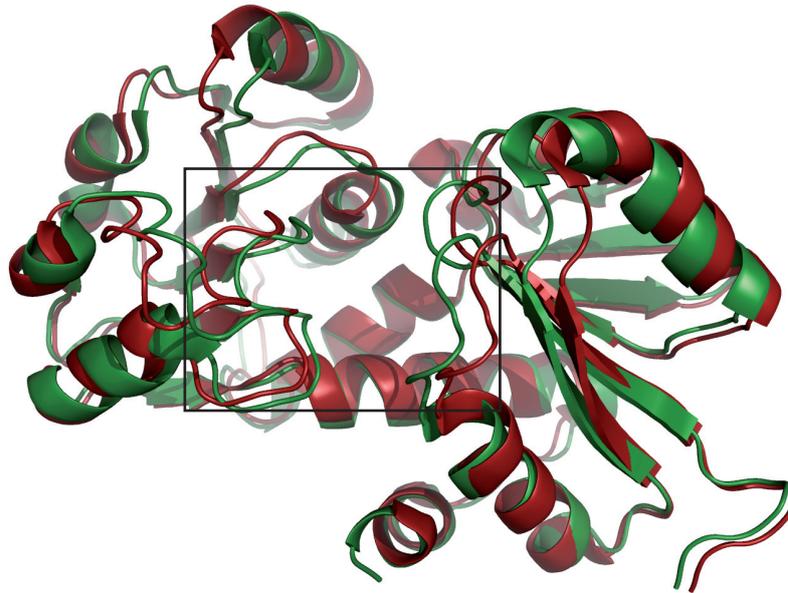


Abb. IV.2.1.5.: Konformelle Unterschiede zwischen den beiden Monomeren F des Apoenzyms (rot) und D des ternären Komplexes (grün) der *AaeSDH* (1hk8 und 1hk9).

Der in der oberen Abbildung gekennzeichnete Ausschnitt zeigt die Abstände zwischen der N- und C-terminalen Domäne der Protomere F (offen) und D (geschlossen) der *AaeSDH*. Die Abstände unterscheiden sich um bis zu 4,78 Å.

Die Abstände zwischen den N- und C-terminalen Domänen unterscheiden sich bei diesen beiden extremen Konformeren um bis zu 4,78 Å, vergleicht man hingegen die übrigen Monomere miteinander, so beläuft sich dieser Abstandsunterschied nur auf etwa 2,8 Å.

Da von der SDH aus *A. aeolicus* lediglich die Apostruktur und die des ternären Komplexes vorliegen, können keine Aussagen zu eventuellen Zwischenkonformationen getroffen werden, wie etwa der Konformation nach der Cofaktor-Bindung. Dennoch liegt auch diese Dehydrogenase nach der Substrat- und NADP⁺-Bindung in einer geschlossenen Konformation vor, wie dies schon für die SDH aus *T. thermophilus* beschrieben wurde.

Ein Unterschied besteht jedoch sowohl gegenüber der *Tth*SDH als auch bezüglich der QDH aus *C. glutamicum*: der Abstand zwischen dem Cofaktor NADP⁺ und dem Substrat Shikimat ist mit 3,52 Å bei der *Aae*SDH etwas geringer (Abb. IV.2.1.6.), weshalb die Autoren davon überzeugt sind, dass dies dem katalytisch aktiven Komplex der SDH entspricht. Dies muss jedoch kritisch betrachtet werden, da eine Reaktion bewiesenermaßen nicht stattfindet. Gan et al. begründen dies damit, dass die Gleichgewichtskonstante für diese Reaktion bei niedrigem pH die Bildung von Shikimat und NADP⁺ begünstigt (die Proteinlösung wurde mit dem Substrat und dem Cofaktor in einem Puffer mit pH 7,2 zusammengebracht und dann mit dem sauren Fällungsmittel (pH 4,6) gemischt).

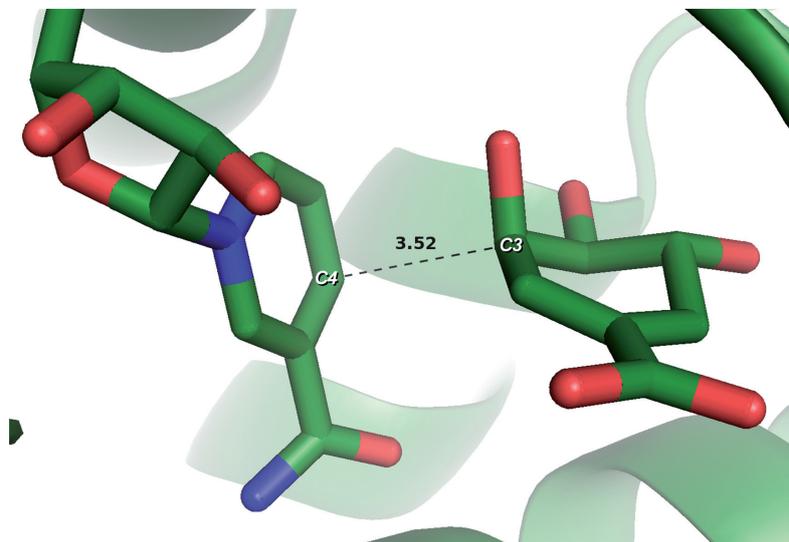


Abb. IV.2.1.6.: Abstand zwischen dem Cofaktor NADP⁺ und dem Substratmolekül Shikimat im Monomer D des ternären Komplexes der *Aae*SDH (1hk9).

Die Distanz ist hier mit 3,52 Å etwas geringer verglichen mit denen bei der *Tth*SDH und der *Cg*/QDH (4,13 Å und 4,27 Å).

Von der bifunktionalen Dehydroquinat-Dehydratase/Shikimat-Dehydrogenase aus *Arabidopsis thaliana*, *AthDHQD/SDH*, sind bislang drei verschiedene Komplexstrukturen veröffentlicht (Singh und Christendat, 2006 und 2007), wobei hier nur die SDH-Domäne des Enzyms betrachtet werden soll: die *AthSDH* im Komplex mit Shikimat, mit Dehydroshikimat und mit Dehydroshikimat und NADP⁺.

Vergleicht man diese drei Strukturen miteinander, so sind praktisch keine strukturellen Unterschiede erkennbar, weder zwischen dem Komplex mit Shikimat und dem mit Dehydroshikimat, noch nach der Bindung des Cofaktors im ternären Komplex (Abb. IV.2.1.7. und IV.2.1.8.).

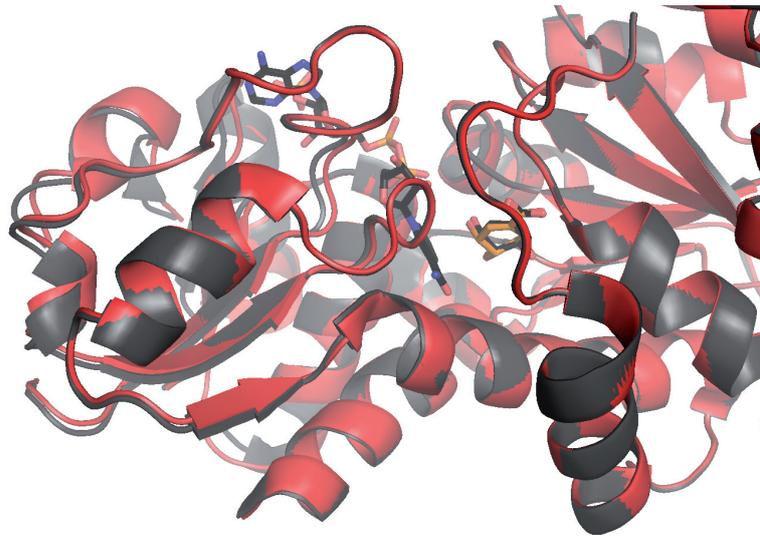


Abb. IV.2.1.7.: Übereinanderlagerung der *AthSDH*-Domänen des Komplexes mit Shikimat (rot, 2gtp) und des ternären Komplexes mit Dehydroshikimat und NADP⁺ (schwarz, 2o7s).

Das im Shikimat-Komplex gebundene Substrat ist in orange dargestellt, die beiden Substrate im ternären Komplex in schwarz. Nach der Übereinanderlagerung beider Strukturen liegen praktisch keine Unterschiede vor, lediglich einige Schleifen im äußeren Bereich des Enzyms zeigen einen leicht veränderten Hauptkettenverlauf.

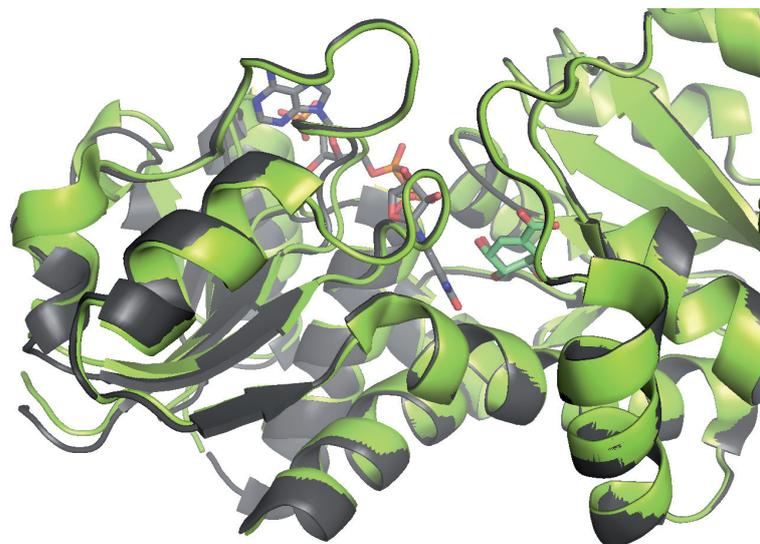


Abb. IV.2.1.8.: Übereinanderlagerung der *AthSDH*-Domänen des Komplexes mit Dehydroshikimat (hellgrün, 2o7q) und des ternären Komplexes mit Dehydroshikimat und NADP⁺ (schwarz, 2o7s).

Das im Dehydroshikimat-Komplex gebundene Substrat ist in grün dargestellt, die beiden Substrate im ternären Komplex in schwarz. Auch hier liegen praktisch keine strukturellen Unterschiede vor.

Da leider keine Apostruktur des bifunktionalen Enzyms aus *A. thaliana* verfügbar ist, kann auch keine Aussage zu einer möglichen Konformationsänderung nach Substrat- oder Cofaktor-Bindung getroffen werden.

Anhand von Strukturvergleichen zwischen der *AthSDH*-Domäne mit der geschlossenen Domäne D des ternären *AaeSDH*-Komplexes wird jedoch deutlich, dass es sich bei der *AthSDH* in den Komplexstrukturen um eine geschlossene Konformation handelt.

Bei Betrachtung des Abstandes der beiden Substrate im *AthSDH*-Komplex mit Dehydroshikimat und NADP⁺ (Abb. IV.2.1.9.) wird ersichtlich, dass dieser mit 3,34 Å vergleichbar ist mit dem bei der SDH aus *A. aeolicus*.

Für die *AthDHQD/SDH* konnte gezeigt werden, dass sie im Kristall katalytisch aktiv ist. Kristalle des Enzyms wurden in einer Lösung mit NADP⁺ und Dehydroquinat eingelegt, woraufhin letzteres an der DHQD-Domäne zu Dehydroshikimat umgesetzt wurde (Singh und Christendat, 2007).

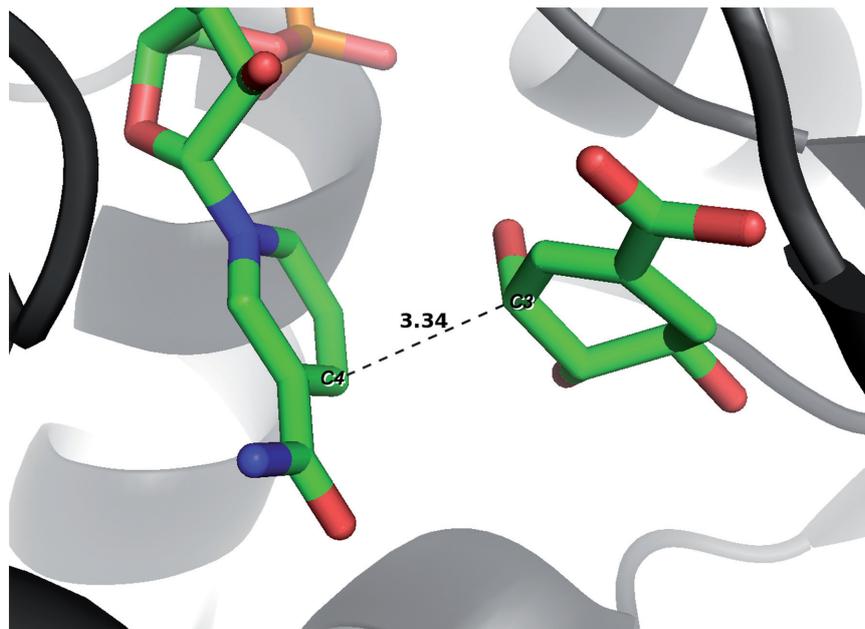


Abb. IV.2.1.9.: Abstand zwischen dem Cofaktor NADP⁺ und dem Substratmolekül

Dehydroshikimat in der SDH-Domäne des ternären Komplexes der *AthDHQD/SDH* (2o7s).

Der Abstand von 3,34 Å zwischen den beiden Substraten ist dem bei der *AaeSDH* beobachteten (3,52 Å) sehr ähnlich.

Um nun die hier charakterisierte Quinat-Dehydrogenase aus *C. glutamicum* hinsichtlich ihrer Konformation einordnen zu können, wurde sie mit den oben beschriebenen Komplexstrukturen verglichen (Abb. IV.2.1.10.).

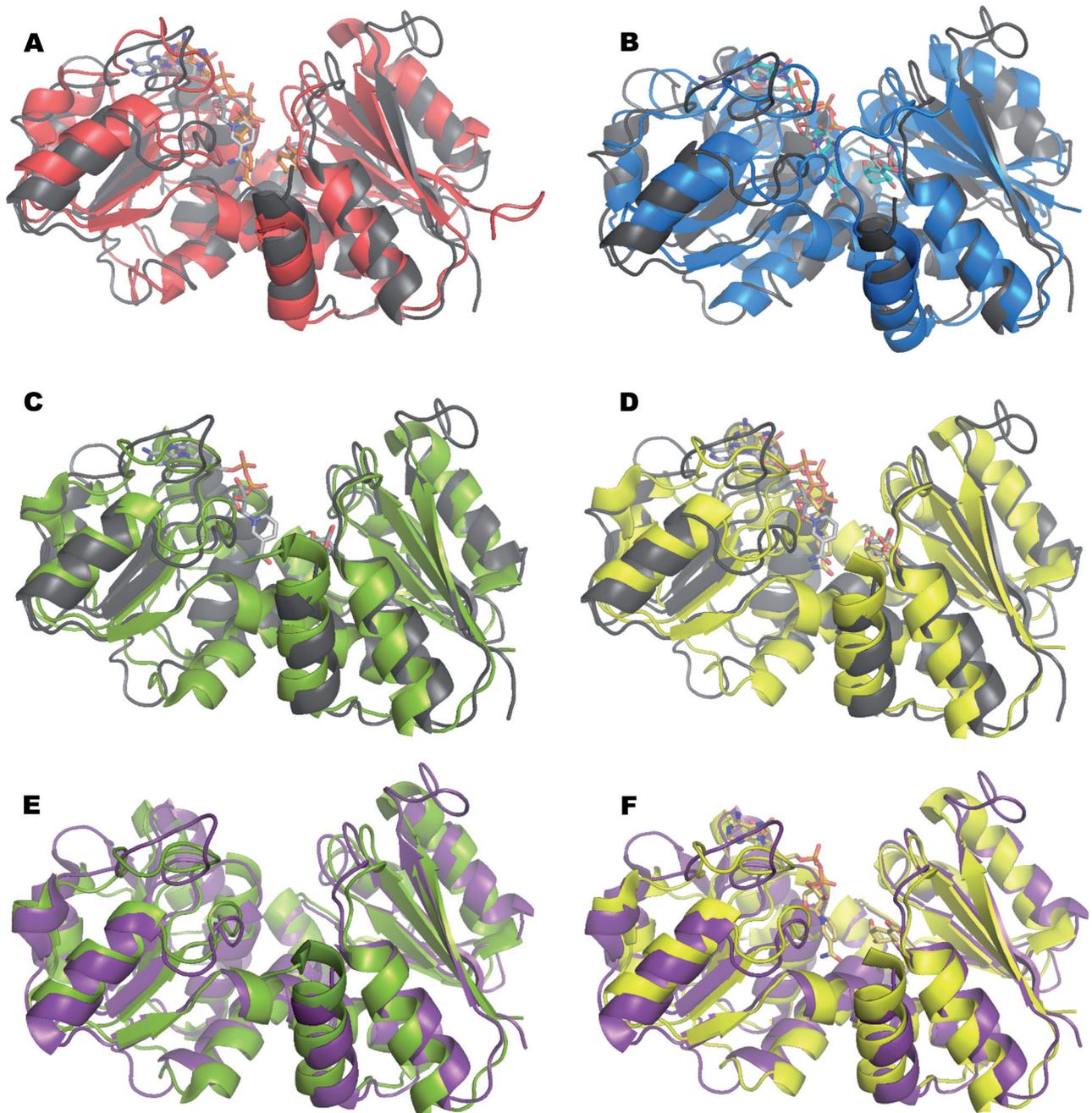


Abb. IV.2.1.10.: Vergleich der Tertiärstruktur der *Cg*/QDH im ternären Komplex (schwarz) bzw. des Apoenzyms (2nlo, violett) mit den im Text beschriebenen verwandten Strukturen.

Die gebundenen Substrate sind in ähnlichen Farben gehalten wie die dazugehörigen Komplexstrukturen.

A: *Cg*/QDH und Monomer D der *Aae*SDH (rot, 2hk9), B: *Cg*/QDH und *Ath*SDH-Domäne (blau, 2o7s), C: *Cg*/QDH und Protomer B der *Tth*SDH (grün, 1wxd), D: *Cg*/QDH und Protomer A der *Tth*SDH (gelb, 2ev9), E: *Cg*/QDH (2nlo) und Protomer B der *Tth*SDH (grün, 1wxd), F: *Cg*/QDH (2nlo) und Protomer A der *Tth*SDH (gelb, 2ev9)

Das Apoenzym der *Cg*/QDH (2nlo) stimmt hinsichtlich der Konformation der N- und C-terminalen Domäne am besten mit dem geschlossenen Protomer A der SDH aus *T. thermophilus* (2ev9) überein (Abb. IV.2.1.10., D), während die offene Konformation des ternären *Cg*/QDH-Komplexes fast exakt den gleichen Hauptkettenverlauf zeigt wie das offene Monomer F des Apoenzyms der SDH aus *A. aeolicus* (2hk8), wie in Abb. IV. 2.1.11. dargestellt.

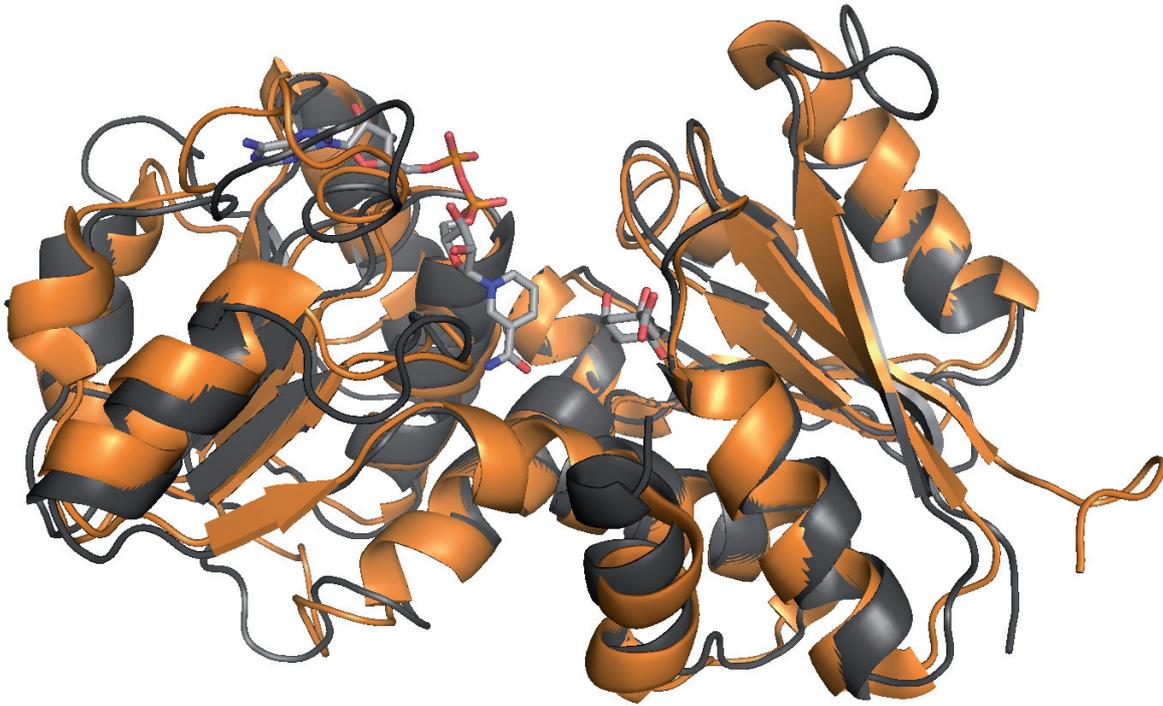


Abb. IV.2.1.11.: Vergleich der Tertiärstruktur der *Cg*/QDH im ternären Komplex (schwarz) mit der des Monomers F des SDH-Apoenzym aus *A. aeolicus* (orange, 2hk8).

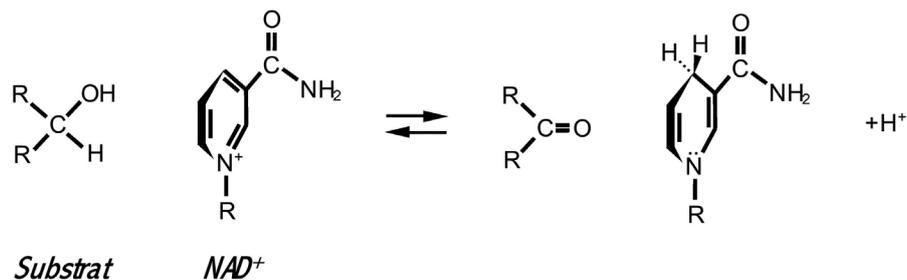
Die N- und C-terminalen Domänen der beiden Strukturen weisen den gleichen Abstand zueinander auf und die Proteinbereiche, die an der Substrat- und Cofaktor-Bindung beteiligt sind, befinden sich fast alle in nahezu identischen Positionen. Lediglich einige Schleifenverläufe an den Proteinaußenseiten unterscheiden sich voneinander.

Die Quinat-Dehydrogenase aus *C. glutamicum* besitzt daher eindeutig eine geschlossene Konformation als Apoenzym, während der ternäre Komplex eine offene Konformation einnimmt. Damit zeigt die *Cg*/QDH ein völlig anderes Verhalten als die bislang beschriebenen Shikimat-Dehydrogenasen, die erst nach der Substrat- bzw. Cofaktor-Bindung eine geschlossene Konformation aufweisen.

Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass die geschlossene Konformation des Apoenzyms der *Cg*/QDH nicht der natürlichen Konformation des Enzyms entspricht, da das Protein bei sehr niedrigem pH-Wert (pH 4,6) kristallisiert wurde, was weder den physiologischen noch den optimalen enzymkinetischen Bedingungen entspricht (das Enzym besitzt *in vitro* unterhalb von pH 7,0 schon deutlich geringere Aktivität). Im Vergleich dazu konnten von der *Cg*/QDH mit dem Cofaktor NAD⁺ nur im pH-Bereich 6,5 bis 6,9 qualitativ gute Kristalle gezüchtet werden, von der *Cg*/QDH mit NADH und den Substraten Quinat bzw. Shikimat nur im pH-Bereich 8,0 bis 9,5.

IV.3. Das katalytische Zentrum

Um den Hydridionen-Transfer zwischen dem Substrat und dem Cofaktor zu ermöglichen, muss das Enzym die beiden Moleküle sowohl in räumliche Nähe zueinander bringen als auch für ihre optimale Orientierung sorgen.



Wie schon unter III.11.1. und III.11.2. dargestellt, geht die Quinat-Dehydrogenase aus *C. glutamicum* sowohl mit dem Cofaktor NAD(H) als auch mit dem Substrat Quinat zahlreiche Wechselwirkungen ein.

Die wichtigsten Aminosäuren für die Cofaktor-Bindung sind Asp177 (Schleife zwischen α -Helix 7 und β -Strang 8), Arg182 (α -Helix 7), Val157 (α -Helix 6), Val247 (Schleife zwischen α -Helix 10 und β -Strang 11), Gly270 und Ala274 (beide in der Schleife zwischen β -Strang 12 und α -Helix 11). Daneben werden vielfältige Wasserstoff-Brücken über Wassermoleküle zu anderen Aminosäuren (Asp129, Gly 155, Gly158, Ala 220, Ala232, Tyr249) oder zu freien Wassermolekülen gebildet, wie in Abbildung IV.3.1. gezeigt ist.

Das Substrat-Molekül Quinat wird ebenfalls durch eine Vielzahl an H-Brücken im katalytischen Zentrum fixiert. Die daran beteiligten Aminosäuren sind Ser36 (Schleife zwischen β -Strang 1 und α -Helix 1), Thr38 (α -Helix 1), Thr88, Lys92 (beide in der Schleife zwischen β -Strang 3 und α -Helix 3), Asn113 (β -Strang 5), Asp129 (α -Helix 5) und Gln277 (α -Helix 11). Darüber hinaus werden von den Hydroxygruppen des Substrats zahlreiche Wasserstoffbrücken mit freien Wassermolekülen gebildet (Abb. IV.3.1.).

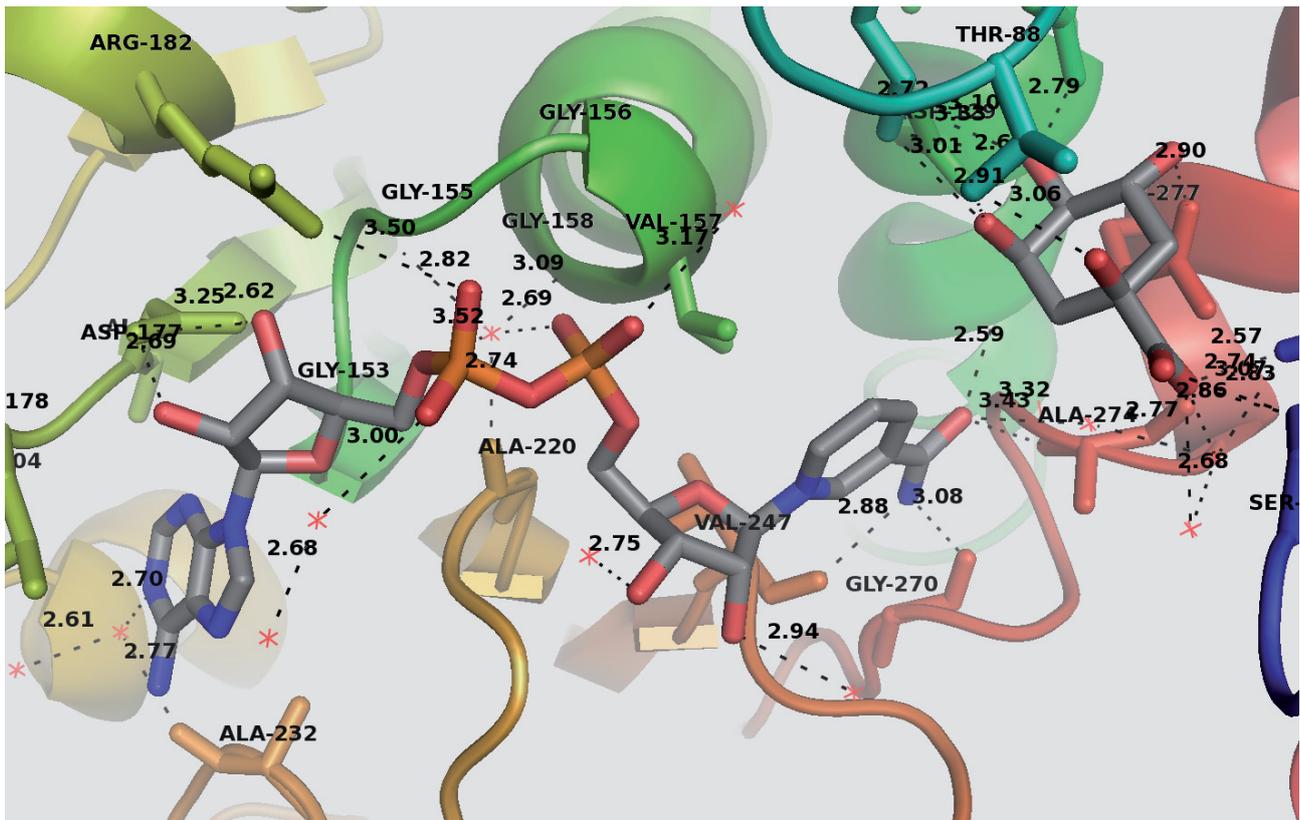


Abb. IV.3.1.: Polare Kontakte der *Cg*/QDH mit dem Cofaktor NADH und dem Substrat Quinat (beide in schwarz-bunt).

Gezeigt ist der Bereich des katalytischen Zentrums. Der Hauptkettenverlauf ist mit den entsprechenden Sekundärstrukturen dargestellt, Wassermoleküle als rote Kreuze, die an den polaren Kontakten beteiligten Aminosäuren sind als Stabmodelle hervorgehoben.

Die für die Substrat- und Cofaktor-Bindung wichtigen Aminosäuren, die in dieser Arbeit bei der *Cg*/QDH identifiziert werden konnten, stimmen mit denen der bisher veröffentlichten Strukturen gut überein (*TthAroE*, Bagautdinov und Kunishima, 2007; *MjaAroE*, Padyana und Burley, 2003; *AaeAroE*, Gan et al., 2007; *EcoYdiB*, Benach et al., 2003; *EcoAroE* und *EcoYdiB*, Michel et al., 2003; *AthSDH*, Singh und Christendat, 2006 und 2007; *HinAroE*, Ye et al., 2003).

Zur Verdeutlichung gibt Abb. IV.3.2. einen Sequenzvergleich der *Cg*/QDH mit den oben genannten verwandten Proteinen wieder, in dem die an der Substrat- und Cofaktor-Bindung beteiligten Aminosäuren – soweit bekannt - kenntlich gemacht sind.

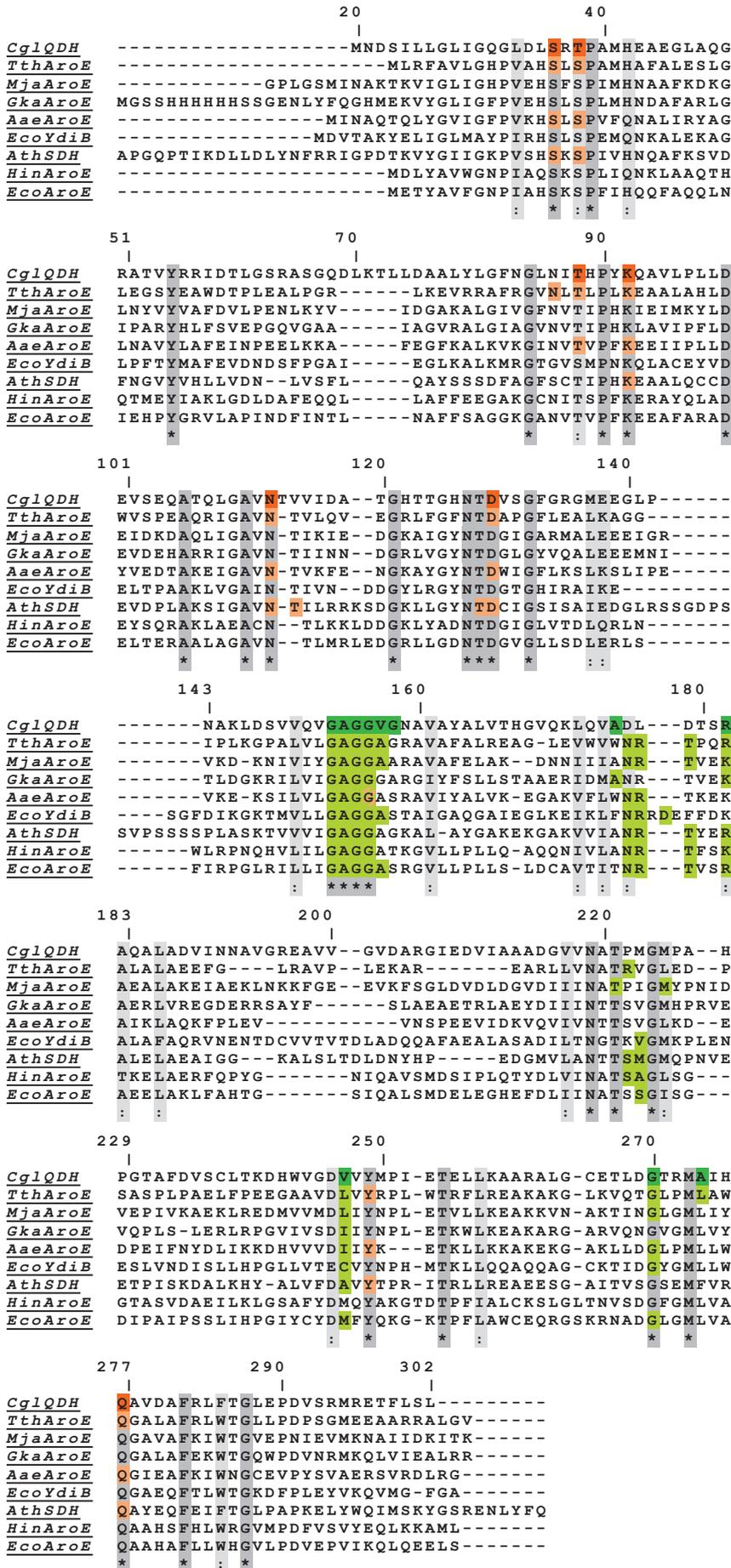


Abb. IV.3.2.: Vergleich der Proteinsequenz der Quinat-Dehydrogenase aus *C. glutamicum* (*CgIQDH*) mit denen verwandter Enzyme.

Farblich hervorgehoben sind die an der Substrat- und Cofaktor-Bindung beteiligten Aminosäuren, soweit dies bekannt ist (grün: NAD(P)-Bindung, orange: Quinat- bzw. Shikimat-Bindung).

Dunkelgrau unterlegte Reste markieren hochkonservierte Aminosäuren, hellgrau unterlegt sind konservierte bzw. chemisch ähnliche Aminosäuren.

TthAroE: AroE aus *Thermus thermophilus*, Bagautdinov und Kunishima, 2007;

MjaAroE: AroE aus *Methanococcus jannaschii*, Padyana und Burley, 2003;

GkaAroE: AroE aus *Geobacillus kaustophilus*, Bagautdinov und Kunishima, unveröffentlicht;

AaeAroE: AroE aus *Aquifex aeolicus*, Gan et al., 2007;

EcoAroE und **EcoYdiB:** AroE und YdiB aus *Escherichia coli*, Michel et al., 2003;

AthSDH: SDH-Domäne aus *Arabidopsis thaliana*, Singh und Christendat, 2006 und 2007;

HinAroE: AroE aus *Haemophilus influenzae*, Ye et al., 2003

IV.3.1. Die Substrat- und Cofaktor-Bindung und -Spezifität

Hinsichtlich der Substrat- und Cofaktor-Spezifität zeigen sich unter den Shikimat- und Quinat-Dehydrogenasen sowie der YdiB deutliche Unterschiede.

Die Shikimat-Dehydrogenasen aus *T. thermophilus* und *A. aeolicus* beispielsweise sind strikt NADP- und Shikimat-abhängig, während die YdiB aus *E. coli* sowohl NAD/NADP als auch die beiden Substrate Quinat und Shikimat umsetzen kann.

Unter den Quinat-Dehydrogenasen ist die Verwendung der beiden Substrate und Cofaktoren deutlich variabler. Einige QDHs sind ebenfalls strikt NAD- und Quinat-abhängig, andere können daneben auch den Cofaktor NADP oder das Substrat Shikimat verwerten. Bislang waren jedoch keine Strukturinformationen der Quinat-Dehydrogenasen verfügbar, die Aufschluss über die Substrat- oder Cosubstrat-Spezifität geben konnten.

Im Folgenden sollen die katalytischen Zentren verschiedener Cosubstrat- bzw. ternärer Komplexe miteinander verglichen werden, um so mögliche Ursachen einer Substrat- und Cofaktor-Diskriminierung herauszufinden.

Betrachtet man zunächst die Shikimat-Bindung in den Shikimat-Dehydrogenasen aus *T. thermophilus* (Bagautdinov und Kunishima, 2007) und *A. aeolicus* (Gan et al., 2007), so fallen in beiden Strukturen die zahlreichen polaren Wechselwirkungen des Proteins mit dem Substrat auf (Abb. IV.3.1.1 und IV.3.1.2. rechte Seite). Diese Wechselwirkungen sind mit denen bei der Quinat-Dehydrogenase aus *C. glutamicum* bezüglich der Quinat-Bindung vergleichbar (Abb. III.11.2.1.). Läge nun in den beiden Shikimat-Dehydrogenasen ein Quinat-Molekül im aktiven Zentrum, könnten einige dieser Wasserstoffbrücken mit dem Protein nicht ausgebildet werden, da zum einen die Carboxygruppe am C1 des Quinats um etwa 90 ° gedreht ist und sich zum anderen dort eine zusätzliche Hydroxygruppe befindet, die in beiden Strukturen in sterischen Konflikt mit dem Thr60/66 geraten würde. Dieses Threonin (Thr88) befindet sich in der *Cg*/QDH deutlich weiter vom Substrat entfernt, wobei seine Position bei der Shikimat-Bindung identisch ist mit der bei der Quinat-Bindung (vgl. Abb. III.11.4.1.).

Dieser strukturelle Unterschied könnte daher erklären, warum diese beiden Enzyme (*Tth*AroE und *Aae*AroE) ausschließlich Shikimat binden und umsetzen können.

Die schwächere Aktivität der *Cg*/QDH bezüglich Shikimat liegt darin begründet, dass das Protein mit diesem Substrat weniger polare Wechselwirkungen eingehen kann, wie schon unter III.11.4. beschrieben. Das Shikimat-Molekül besitzt eine andere Konformation und am C1-Atom eine Hydroxygruppe weniger, so dass es eine etwas andere Position im aktiven Zentrum einnimmt. Dadurch können insgesamt drei H-Brücken weniger ausgebildet werden und der Abstand zum

Cofaktor vergrößert sich leicht (vgl. Abb. III.11.4.1. und III.11.4.3.).

Diese strukturbasierten Beobachtungen decken sich mit den Ergebnissen der enzymkinetischen Untersuchungen: Die *Cg*/QDH besitzt eine deutlich höhere Affinität zu Quinat, wie an den signifikant unterschiedlichen K_M -Werten ersichtlich ist (optimaler pH: K_M Quinat: 2,4 mM; K_M Shikimat: 54 mM; pH 7,5: K_M Quinat: 1,6 mM; K_M Shikimat: 10 mM).

Hinsichtlich der NADP-Bindung sind sich die beiden Enzyme *Tth*AroE und *Aae*AroE sehr ähnlich. In beiden Strukturen werden zwischen dem Protein und dem Cofaktor zahlreiche Wasserstoffbrücken ausgebildet, auch wenn sich die daran beteiligten Aminosäuren an zwei Stellen leicht unterscheiden (*Tth*AroE: Arg151, Leu205; *Aae*AroE: Lys158, Ile214).

Die meisten polaren Kontakte werden in beiden Enzymen mit der zusätzlichen Phosphatgruppe an der Ribose ausgebildet, wobei der Phosphatrest bei der *Tth*AroE durch die Aminosäuren Asn146, Arg147, Thr148 und Arg151 (bei der *Aae*AroE durch Asn153, Arg154, Thr155, Lys158) von drei Seiten klammerartig fixiert wird (Abb. IV.3.1.1 und IV.3.1.2. linke Seite).

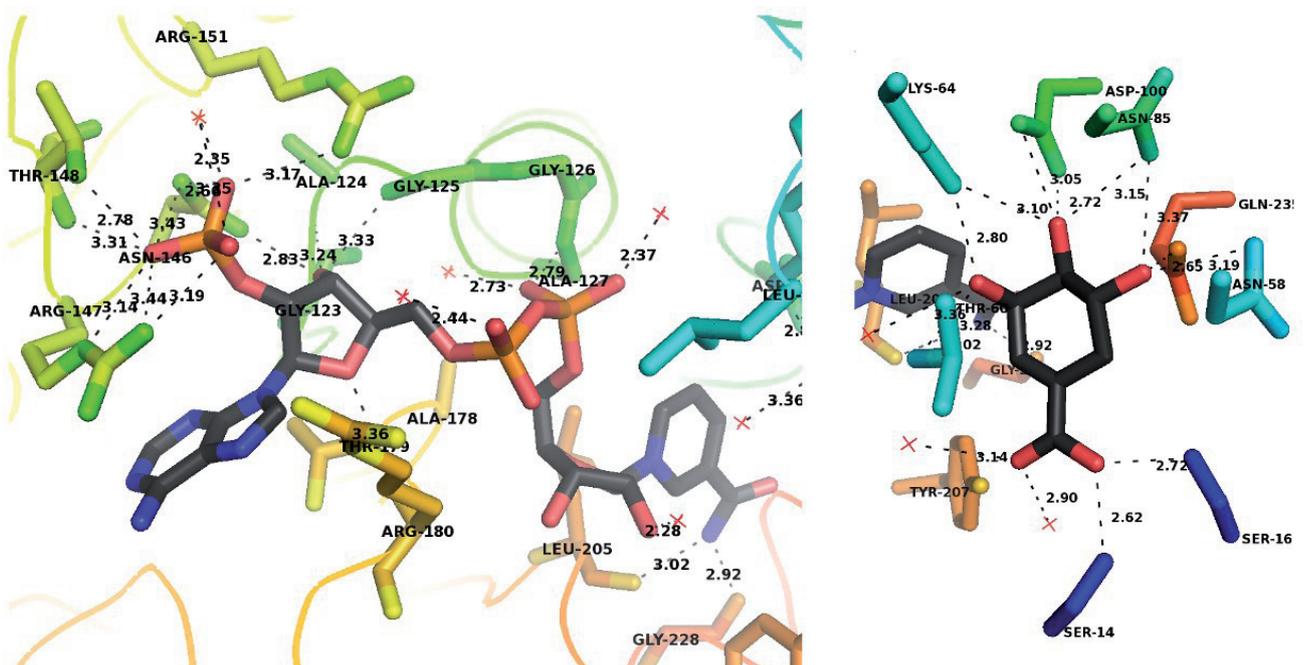


Abb. IV.3.1.1.: Katalytisches Zentrum der *Tth*AroE (Protomer A, 2ev9) mit gebundenem NADP⁺ und Shikimat (beide in schwarz-bunt).

Gezeigt ist der Bereich des katalytischen Zentrums. Der Hauptkettenverlauf ist mit den entsprechenden Sekundärstrukturen dargestellt, Wassermoleküle als rote Kreuze, die an den polaren Kontakten beteiligten Aminosäuren sind als Stabmodelle hervorgehoben.

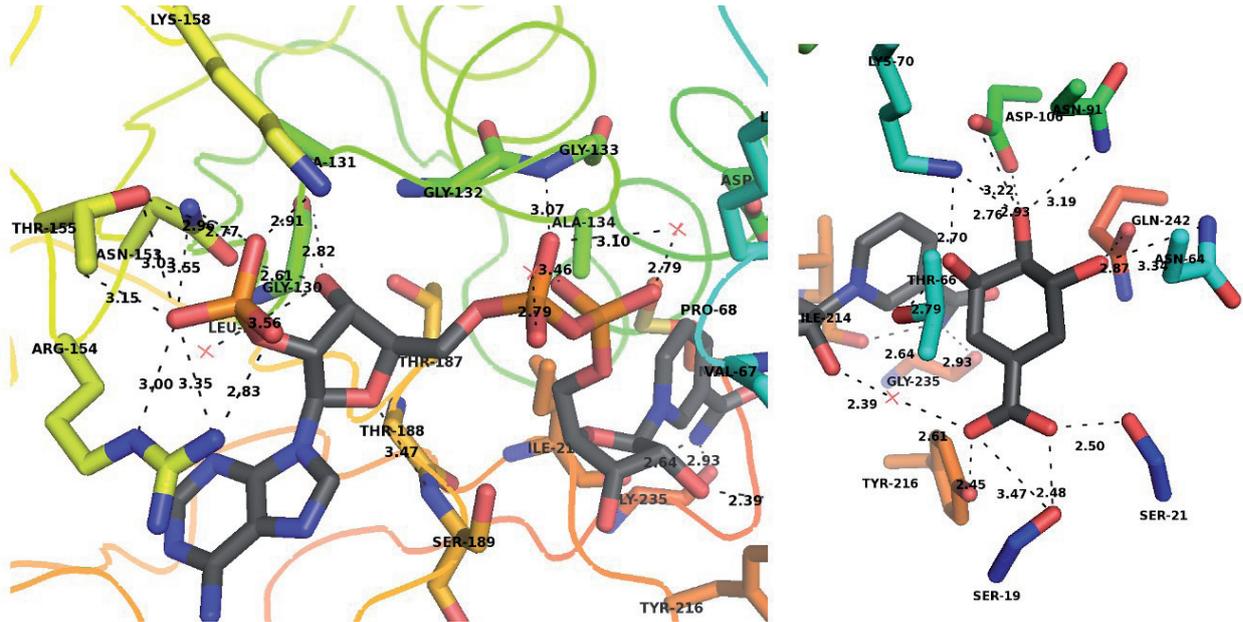


Abb. IV.3.1.2.: Katalytisches Zentrum der *AaeAroE* (Domäne D, 2hk9) mit gebundenem NAD⁺ und Shikimat (beide in schwarz-bunt).
Gezeigt ist der Bereich des katalytischen Zentrums. Der Hauptkettenverlauf ist mit den entsprechenden Sekundärstrukturen dargestellt, Wassermoleküle als rote Kreuze, die an den polaren Kontakten beteiligten Aminosäuren sind als Stabmodelle hervorgehoben.

Bei der *AroE* aus *E. coli* (Michel et al., 2003) reicht das Arg154 sogar noch etwas weiter nach außen und ist so gedreht (Abb. IV.3.1.3.), dass die Phosphatgruppe praktisch von allen vier Seiten in polare Interaktionen eingebunden ist (Asn149, Arg150, Thr151, Arg154).

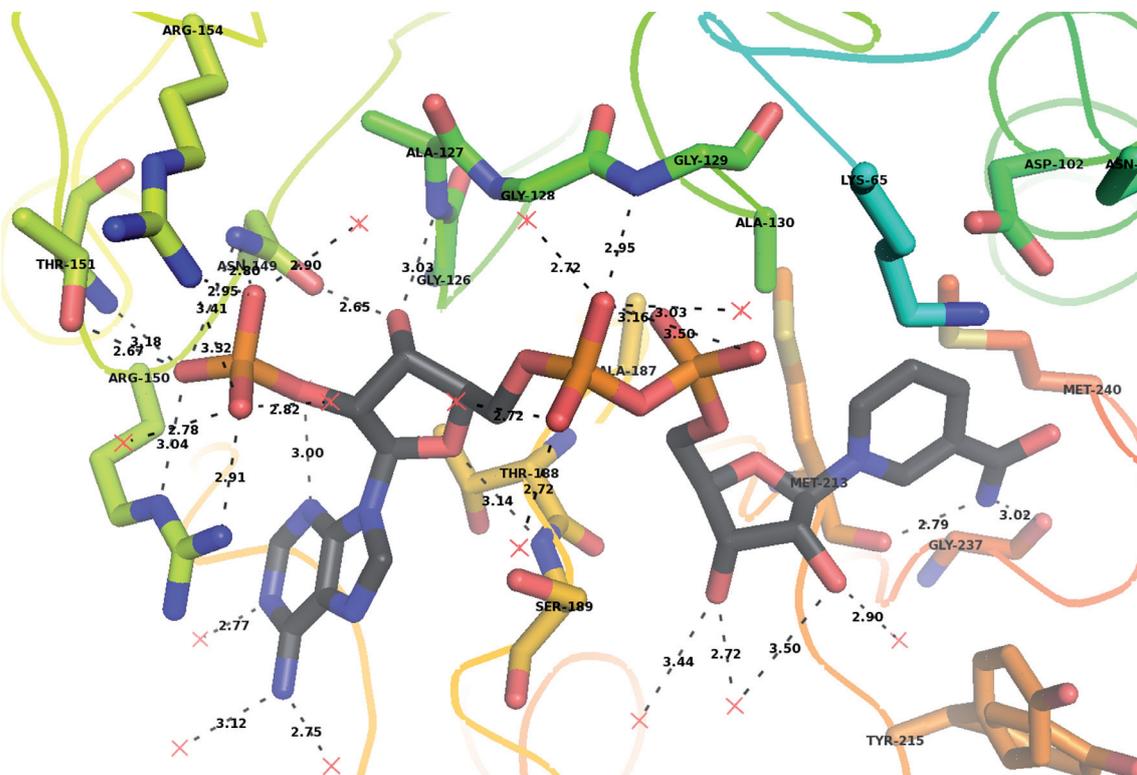


Abb. IV.3.1.3.: Katalytisches Zentrum der *EcoAroE* (Domäne A, 1nyt) mit gebundenem NAD⁺ (schwarz-bunt).
Gezeigt ist der Bereich des katalytischen Zentrums. Der Hauptkettenverlauf ist mit den entsprechenden Sekundärstrukturen dargestellt, Wassermoleküle als rote Kreuze, die an den polaren Kontakten beteiligten Aminosäuren sind als Stabmodelle hervorgehoben.

In der SDH-aktiven Domäne des bifunktionalen Enzyms aus *A. thaliana* (207s; Singh und Christendat, 2006 und 2007) wird das Substratmolekül Dehydroshikimat ebenfalls durch zahlreiche polare Kontakte fixiert, vergleichbar mit denen bei den AroEs aus *T. thermophilus* und *A. aeolicus*, jedoch bildet die *AthSDH* mit dem Cofaktor NADP⁺ etwas weniger H-Brücken aus (nicht dargestellt). Doch auch in diesem Enzym umspannen die Aminosäuren Arg484, Thr485 und Arg488 die zusätzliche Phosphatgruppe an der Ribose, wenn auch nur über zwei ihrer OH-Gruppen. Dieser Unterschied könnte erklären, warum der K_M -Wert der *AthSDH* bezüglich NADP⁺ etwa dreifach höher ist als bei der *AaeSDH* (K_M NADP⁺: *AthSDH* 0,131 mM; *AaeSDH* 0,042 mM; für *TthSDH* nicht angegeben).

Ein NAD⁺-Molekül würde räumlich betrachtet in alle aktiven Zentren der beschriebenen Enzyme hineinpassen. Jedoch würden aufgrund der räumlichen Beschaffenheit der Cofaktor-bindenden Bereiche und der daran beteiligten Aminosäuren deutlich weniger Wechselwirkungen mit dem jeweiligen Protein zustande kommen, was die strenge NADP-Abhängigkeit erklären kann.

Das katalytische Zentrum der *Cg/QDH* stellt sich dagegen etwas anders dar (Abb. IV.3.1.4.). Wie durch enzymkinetische Untersuchungen in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, kann dieses Protein ausschließlich NAD⁺ als Cofaktor verwenden, während mit NADP⁺ weder ein Substratumsatz noch eine Inhibition beobachtet wurde. Dies belegt, dass NADP⁺ nicht vom Enzym gebunden werden kann.

Die in diesem Zusammenhang wichtigen Aminosäuren im katalytischen Zentrum der *Cg/QDH* sind Asp177, Leu178, Asp179 und Arg182.

Der von diesen Aminosäuren flankierte Bereich ist bei der Quinat-Dehydrogenase relativ eng, so dass eine zusätzliche Phosphatgruppe am Ribosering in dieser Konformation keinen Platz finden würde. Außerdem ist die zweite Aminosäure, die bei den NADP-bindenden Enzymen von einem geladenen Rest eingenommen wird (in den oben genannten Beispielen ein Arginin), hier durch eine neutrale Aminosäure ersetzt (Leu178). Dieser Rest kann daher nicht zu polaren Wechselwirkungen beitragen und die zusätzliche Phosphatgruppe an der Adenin-Ribose eines NADP-Moleküls nicht stabilisieren.

Die Notwendigkeit einer sauren Seitenkette im Bereich der beiden Hydroxygruppen der Adenin-Ribose sowie einer hydrophoben Aminosäure in benachbarter Position wurde schon für die Erzeugung einer rein NAD-abhängigen Variante der R-spezifischen Alkohol-Dehydrogenase aus *Lactobacillus brevis* postuliert (Dissertation Nils Helge Schlieben, 2001).

In der *Cg/QDH* ist genau diese Aminosäure-Anordnung vorhanden (Asp177 und Leu178), was die enzymkinetisch festgestellte strikte NAD-Abhängigkeit untermauert.

Ein NADP-Molekül im aktiven Zentrum der *Cg*/QDH würde aufgrund dieser Architektur eine Vielzahl an sterischen Konflikten nach sich ziehen: Das Asp177 ragt in Richtung der beiden Hydroxygruppen der Ribose und würde mit einer daran gebundenen Phosphatgruppe in sterische Zwänge geraten. Darüber hinaus liegt der Cofaktor NADP⁺ aufgrund der zusätzlichen Phosphatgruppe am C2-Atom der Ribose in einer etwas abgewinkelteren Konformation vor, so dass das Arg182 mit dieser Phosphatgruppe kollidieren würde. Zwar könnte sich dieser Rest ein wenig nach außen drehen, jedoch gingen dabei alle möglichen polaren Wechselwirkungen mit dem Cofaktor verloren.

Weitere räumliche Beschränkungen ergeben sich aus der Lage der Glycin-reichen Schleife, vor allem im Bereich des Val157 und Gly158. Da das NADP-Molekül etwas sperriger ist, würde es daher im Bereich der beiden mittleren Phosphate mit dem Valin und Glycin der Schleife kollidieren. Da diese Schleife im ternäre Komplex der *Cg*/QDH jedoch schon „aufgeklappt“ vorliegt (vgl. Abb. III.10.1.2.) und der Bereich um das N-terminale Ende der α -Helix 6 dadurch deutlich enger wird, ist hier ein weitere räumliche Öffnung kaum möglich.

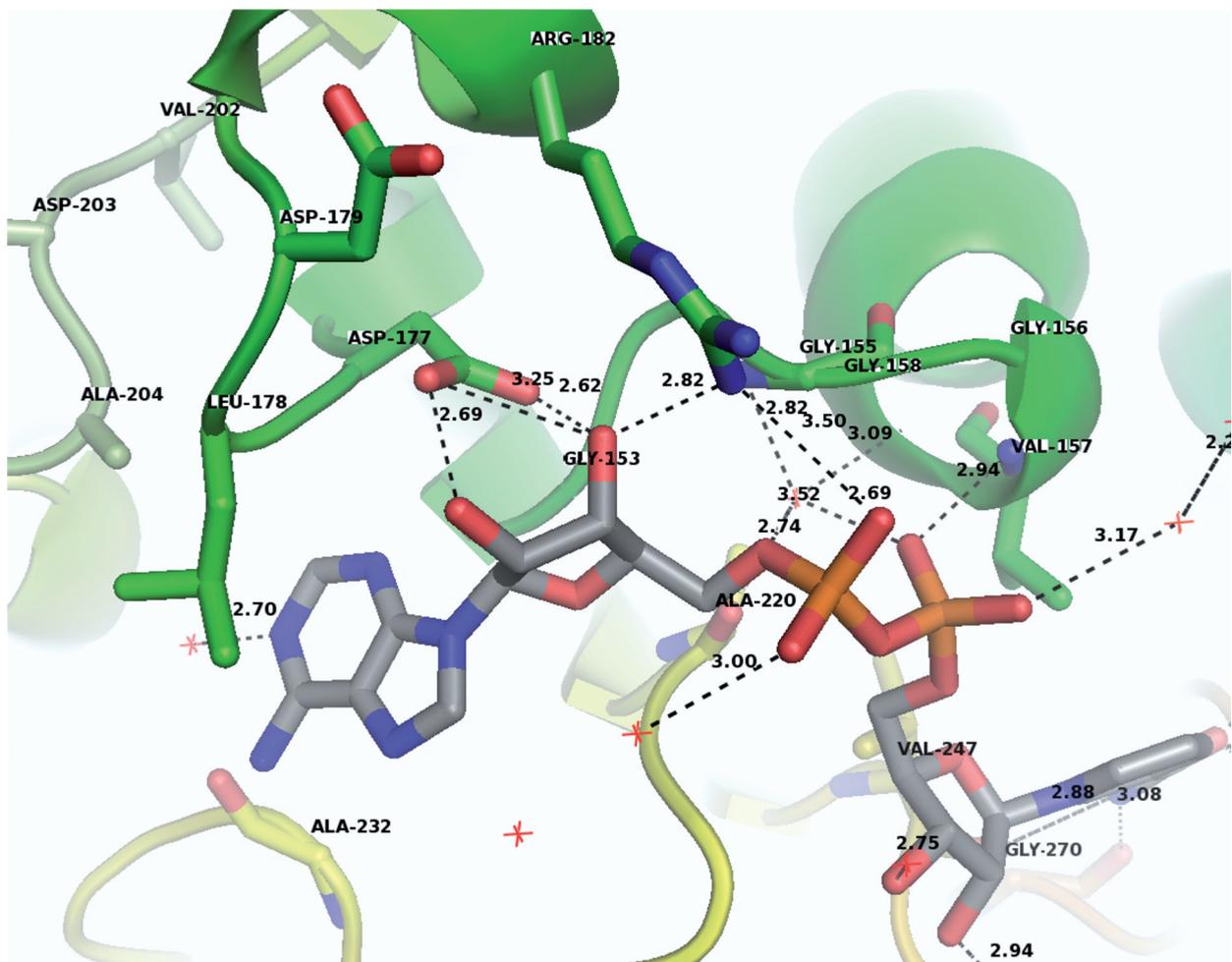


Abb. IV.3.1.4.: Katalytisches Zentrum der *Cg*/QDH mit gebundenem NAD⁺ (schwarz-bunt).

Gezeigt ist der Bereich des katalytischen Zentrums. Der Hauptkettenverlauf ist mit den entsprechenden Sekundärstrukturen dargestellt, Wassermoleküle als rote Kreuze, die an den polaren Kontakten beteiligten Aminosäuren sind als Stabmodelle hervorgehoben.

Bei der YdiB aus *E. coli* herrscht Unklarheit darüber, ob das Enzym beide Cosubstrate NAD⁺ und NADP⁺ umsetzen kann oder nicht. Während Benach et al. (2003) schreiben, dass die YdiB kein NADP verwenden könne, äußern sich Lindner et al. (2005) ausschließlich zum NAD⁺-Umsatz, wohingegen Michel et al. (2003) sogar die katalytischen Parameter bezüglich NADP⁺ für dieses Enzym angeben.

Die für die Diskriminierung des Cofaktors wichtigen Aminosäuren bei der YdiB sind Asn155, Arg156, Glu159 und Phe160. Sie flankieren den Adenin-Ribose-Teil des Cosubstrats und gehen zum Teil polare Kontakte mit ihm ein.

Betrachtet man das katalytische Zentrum der YdiB aus *E. coli*, einmal in der von Michel et al. gelösten Struktur (1o9b) und zum anderen in der von Benach et al. (1npd), unterscheiden sich sowohl die polaren Kontakte zum NAD-Molekül als auch die Konformation des Enzyms in einigen Bereichen (Abb. IV.3.1.5 und IV.3.1.6.). In der 1o9b-Struktur kommen insgesamt weniger Wechselwirkungen zwischen dem Protein und dem Cofaktor zustande, es kann beispielsweise keine H-Brücke vom Asp158 mit der 2'-OH-Gruppe der Ribose ausgebildet werden. Des Weiteren ist der Abstand zwischen der α -Helix 7 und dem außen angrenzenden β -Strang in hier etwas größer als in 1npd-Struktur.

In beiden Fällen ist jedoch der Raum im katalytischen Zentrum, der den Adenin-Ribose-Teil des Cofaktor beherbergt, sehr eng, so dass es in dieser Konformation nicht möglich wäre, das sehr viel sperrigere NADP-Molekül aufzunehmen. Auch im Bereich der Glycin-reichen Schleife käme es in beiden Strukturen zu sterischen Konflikten mit den Phosphatgruppen des NADPs.

Da in der von Michel et al. veröffentlichten Struktur (1o9b) allerdings der Abstand der Helix α 7 zu den benachbarten β -Strängen etwas weiter ist, wäre es hier zumindest denkbar, dass diese Helix und die Schleife mit den genannten Cofaktor-bindenden Resten eine Position weiter außerhalb einnehmen, wodurch das katalytische Zentrum geräumiger würde. Darüber hinaus müssten für die NADP-Bindung aber auch die α -Helix 6 und die daran angrenzende Glycin-reiche Schleife aus dem katalytischen Zentrum herausrücken.

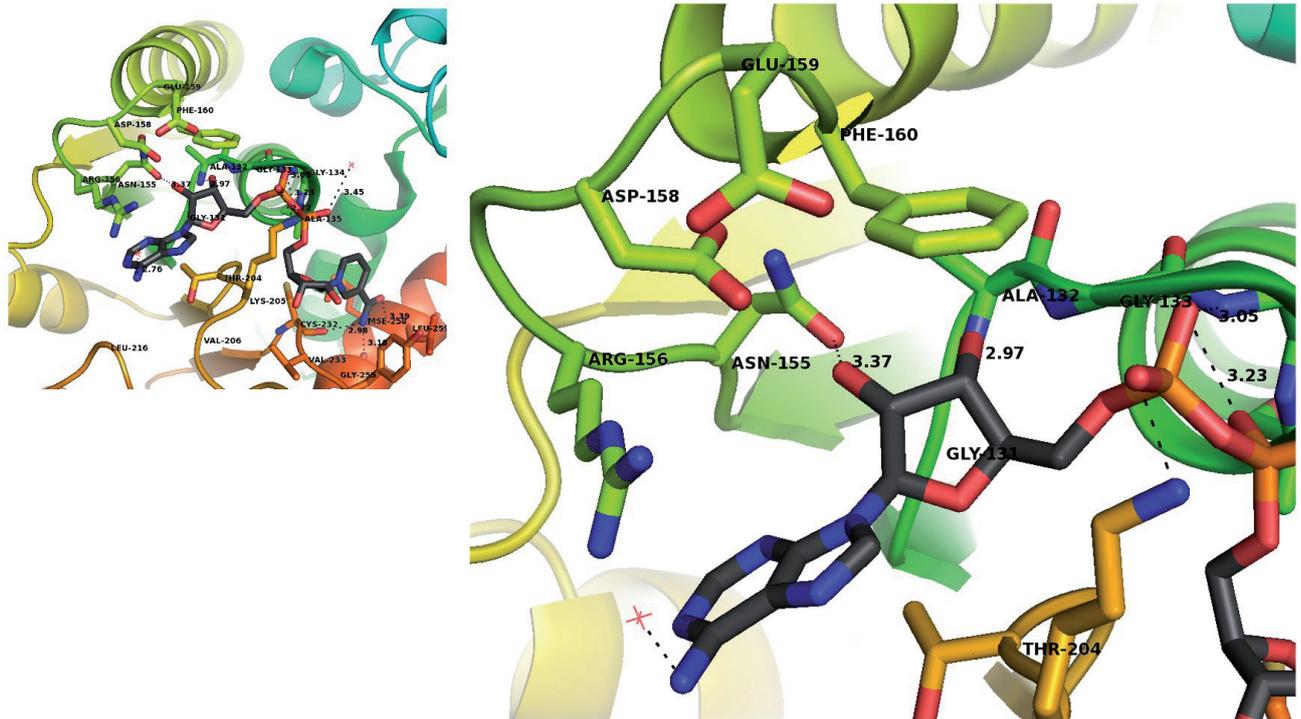


Abb. IV.3.1.5.: Katalytisches Zentrum der *EcoYdib* (Domäne A, 1o9b) mit gebundenem NAD⁺ (schwarz-bunt).

Gezeigt ist der Bereich des katalytischen Zentrums in der Übersicht (links) und im Detail (rechts). Der Hauptkettenverlauf ist mit den entsprechenden Sekundärstrukturen dargestellt, Wassermoleküle als rote Kreuze, die an den polaren Kontakten beteiligten Aminosäuren sind als Stabmodelle hervorgehoben.

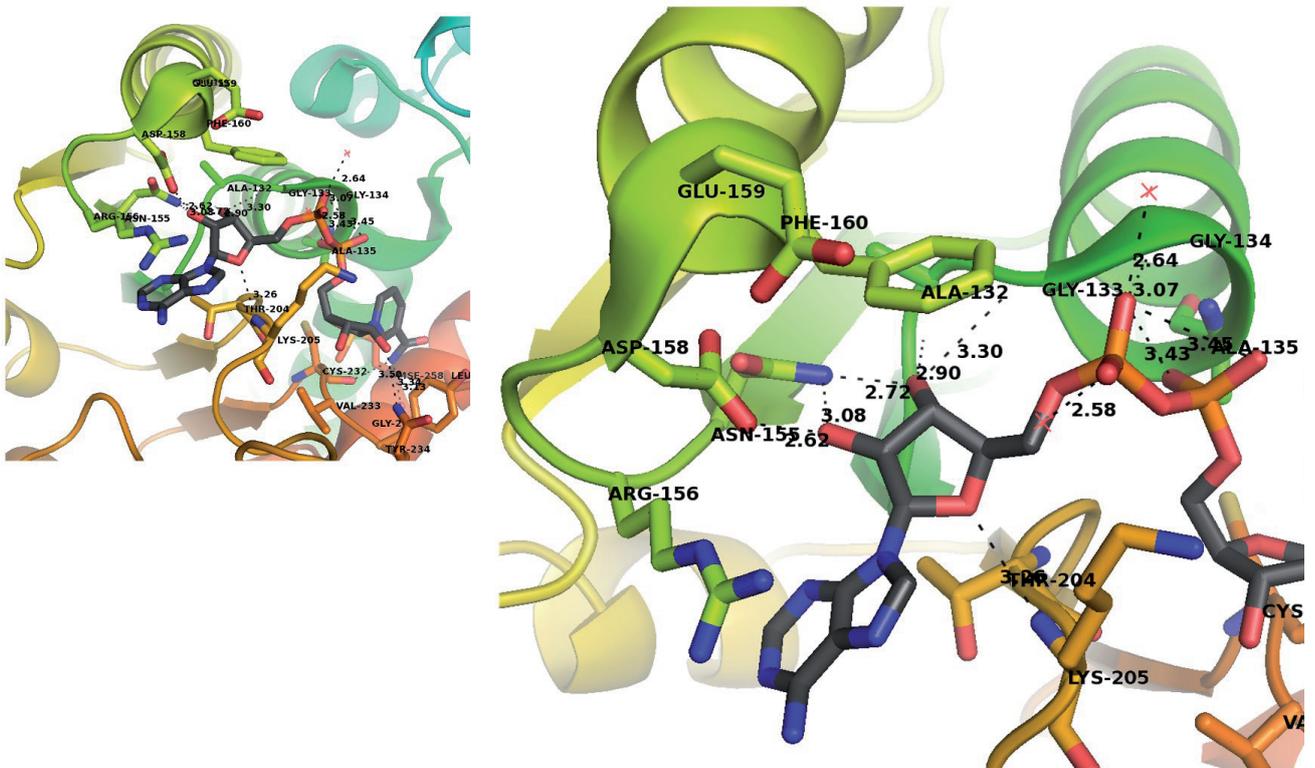


Abb. IV.3.1.6.: Katalytisches Zentrum der *EcoYdib* (Domäne A, 1npd) mit gebundenem NAD⁺ (schwarz-bunt).

Gezeigt ist der Bereich des katalytischen Zentrums in der Übersicht (links) und im Detail (rechts). Der Hauptkettenverlauf ist mit den entsprechenden Sekundärstrukturen dargestellt, Wassermoleküle als rote Kreuze, die an den polaren Kontakten beteiligten Aminosäuren sind als Stabmodelle hervorgehoben.

Betrachtet man die NAD(P)-bindenden Aminosäuren bei den unterschiedlichsten Enzymen, lassen sich bestimmte Motive in der Proteinsequenz erkennen (Wierenga et al., 1985). Charakteristisch bei allen Nukleotid-bindenden Enzymen ist die Glycin-reiche Schleife mit der allgemeinen Sequenz GXGXXG, wobei die Anzahl der vorhandenen Glycin-Reste variieren kann.

Darüber hinaus befindet sich bei NAD- oder FAD-verwertenden Enzymen am C-Terminus des zweiten β -Stranges der Nukleotid-bindenden Einheit $\beta\alpha\beta$ eine konservierte negativ geladene Aminosäure, meist Aspartat oder Glutamat. Dieser Rest interagiert mit der 2'-OH-Gruppe der Ribose. In NADP-bindenden Enzymen fehlt diese negativ geladene Aminosäure meist, da sich an dieser Stelle die 2'-Phosphatgruppe befindet (Wierenga et al., 1985 und 1986; Baker et al., 1992).

Diese Motive sind zwar hochkonserviert, gelten jedoch nicht absolut. Beispielsweise kann das erste Glycin in der GXGXXG-Sequenz durch ein Alanin ersetzt sein (Lesk, 1995). Auch ist bei einigen NADP-abhängigen oder NAD/NADP-verwertenden Enzymen der oben genannte saure Rest der $\beta\alpha\beta$ -Einheit vorhanden (Baker et al., 1992).

Generell sind die Sequenzmotive der NAD-spezifischen Enzyme und die damit verbundenen Interaktionen mit dem Cofaktor sehr viel konservierter als die der NADP-bindenden Proteine. Bei beiden tritt jedoch häufig ein Arginin an der $\beta\alpha\beta$ -Einheit auf, dessen Seitenkette die Ringebeine des Cofaktor-Adenins flankiert und die bei den NADP-verwendenden Enzymen mit der Phosphatgruppe über Wasserstoffbrücken verbunden ist (Carugo und Argos, 1997).

Die NAD(P)-bindenden Aminosäuren der hier beschriebenen Enzyme stimmen alle mit dem allgemeinen Nukleotid-Bindemotiv GXGG überein (vgl. Abb. IV.3.2.).

Die strikt NADP-abhängigen Enzyme *TthAroE*, *AaeAroE* und *EcoAroE* weisen darüber hinaus an der Stelle, die bei den NAD-bindenden Enzymen von der konservierten sauren Aminosäure besetzt ist, ein Asparagin auf, das mit der 2'-Phosphatgruppe des Cofaktors interagiert. Auch der den Adenin-Teil flankierende Arginin-Rest ist bei allen drei Enzymen vorhanden, ebenso wie bei der *EcoYdiB*. Nur bei der *Cg/QDH* ist diese Aminosäure durch einen hydrophoben Rest ersetzt (Leu178).

Die rein NAD-spezifische *Cg/QDH* besitzt hingegen die konservierte negativ saure Aminosäure (Asp177), die mit den beiden OH-Gruppen des Ribose-Rings interagiert. Im Gegensatz dazu findet sich bei der *EcoYdiB* an dieser Stelle wieder ein Asparagin (Asn155).

Obwohl also die beschriebenen Cofaktor-spezifischen Sequenzmotive nicht absolut streng gelten, unterstützen sie dennoch die enzymkinetischen Ergebnisse bezüglich der *Cg/QDH*: Dieses Enzym ist eine NAD-abhängige Dehydrogenase.

IV.3.2. Postulierter Katalysemechanismus

Durch Mutationsanalysen und Strukturdaten verwandter Enzyme der Quinat-Dehydrogenase konnten die katalytisch wichtigen Aminosäuren Lysin und Aspartat bei verschiedenen Proteinen identifiziert werden (Michel et al., 2003; Singh et al., 2005; Lindner et al., 2005; Singh und Christendat, 2006 und 2007; Bagautdinov und Kunishima, 2007; Gan et al., 2007).

Im ternären Komplex der Quinat-Dehydrogenase aus *C. glutamicum* sind die beiden ionisierbaren Aminosäuren Lys92 und Asp129 ebenfalls direkt an der Bindung des Substrates beteiligt. Lys92 steht in polarem Kontakt zu den Hydroxygruppen an C3 und C4 des Quinats, Asp129 mit der OH-Gruppe am C4 und mit Lys92.

Das C4-Atom des Cofaktormoleküls NAD(H) ist in diesem Komplex 4,27 Å vom C3-Atom des Substrates entfernt (Abb. IV.3.2.1.).

Bei der Katalyse könnte Lys92 als Base fungieren und ein Proton vom C3 des Quinats abziehen, was vom benachbarten Asp129 mit seiner negativen Ladung erleichtert würde, ebenso wie der anschließende Hydridionen-Transfer vom C3-Atom des Quinats auf das C4-Atom des NAD⁺.

Damit die Katalyse in dieser Form stattfinden kann, muss die Lysinseitenkette jedoch deprotoniert vorliegen. Da das pH-Optimum der *Cg*/QDH bezüglich Quinat bei pH 9,0 bis 9,5 liegt und der pK_a -Wert für die Lysinseitenkette meist mit 10,0 bis 10,5 angegeben wird, ergäbe sich daraus ein Widerspruch.

Andererseits konnte durch Titrationsexperimente an Säugetier-Calmodulin (CaM) gezeigt werden, dass die pK_a -Werte für die verschiedenen Lysinseitenketten im intakten Protein deutlich variieren, da sie sich alle in ihrer eigenen Mikroumgebung befinden (Zhang und Vogel, 1993). Den niedrigsten pK_a -Wert von 9,29 weist in diesem Fall das Lys75 im CaM/Ca²⁺-Komplex auf.

Ähnlich niedrig muss daher auch der pK_a -Wert des Lys92 im ternären *Cg*/QDH-Komplex mit Quinat sein.

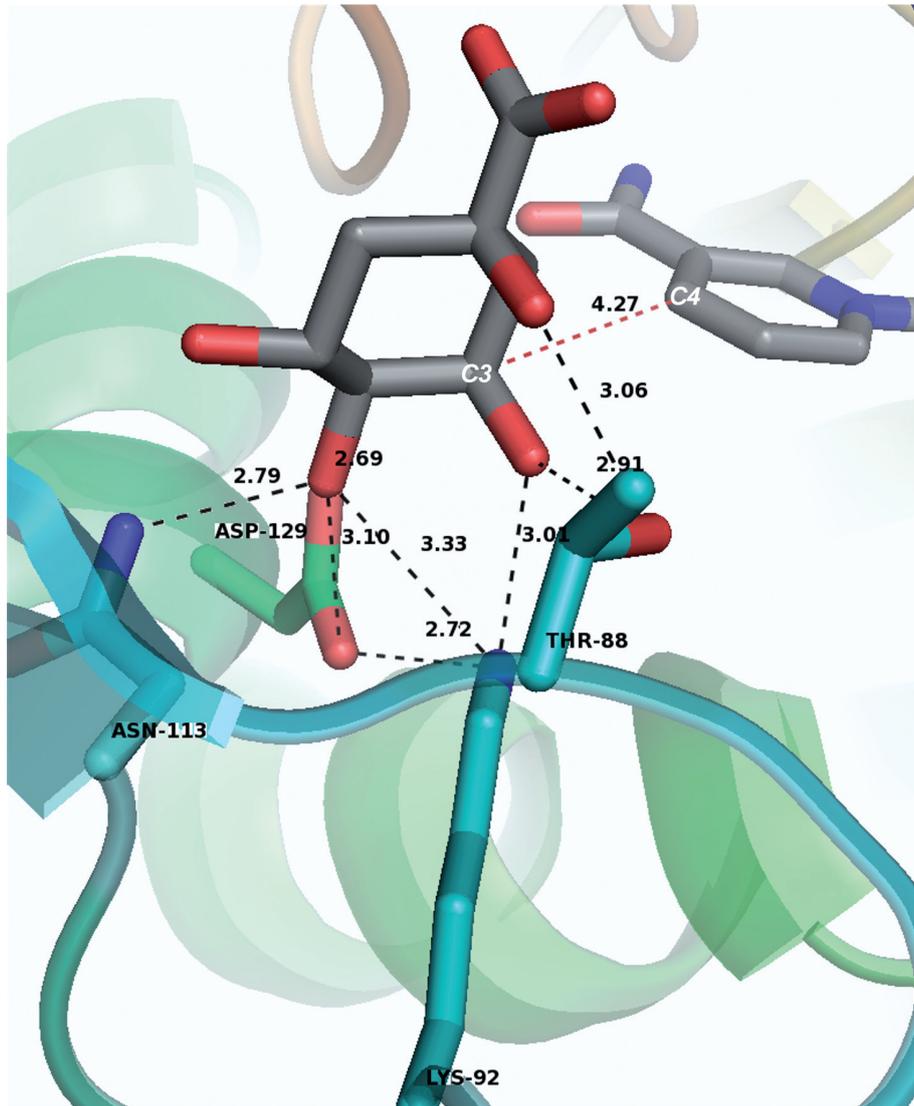


Abb. IV.3.2.1.: Ausschnitt des katalytischen Zentrums der *Cg*/QDH im Komplex mit NADH und Quinat (beide in schwarz-bunt).

Gezeigt sind ausschließlich die katalytisch wichtigen Aminosäuren und deren polare Kontakte (schwarze gestrichelte Linien). Der Abstand vom C3-Atom des Substrats zum C4-Atom des Cofaktors beträgt 4,27 Å (rote gestrichelte Linie).

Im Vergleich zum Quinat-Komplex sehen die Verhältnisse im katalytischen Zentrum des Shikimat-Komplexes der *Cg*/QDH etwas anders aus (Abb. IV.3.2.2.): Das Asp129 verhält sich ähnlich und bildet auch hier Wasserstoffbrücken sowohl zur Hydroxygruppe am C4 des Shikimats als auch zum Lys92 aus, allerdings sind die Abstände in allen Fällen etwas größer als die im Quinat-Komplex. Weiterhin ist der Abstand zwischen dem C4-Atom des Cofaktors und dem C3-Atom des Shikimats mit 4,67 Å um 0,4 Å größer als der im Quinat-Komplex.

Ein gravierender Unterschied besteht jedoch beim Lys92. Im ternären Komplex ist eine alternative Seitenkettenkonformation dieses Restes sichtbar (Abb. IV.3.2.3.), welche keine polare Wechselwirkung mit den OH-Gruppen am C4- und am C3-Atom des Shikimat-Moleküls eingehen kann, da die NH₂-Gruppe zu weit entfernt ist. Bei der anderen Lysinseitenkette kommt es lediglich zu einer H-Brücke an der C3-Hydroxygruppe.

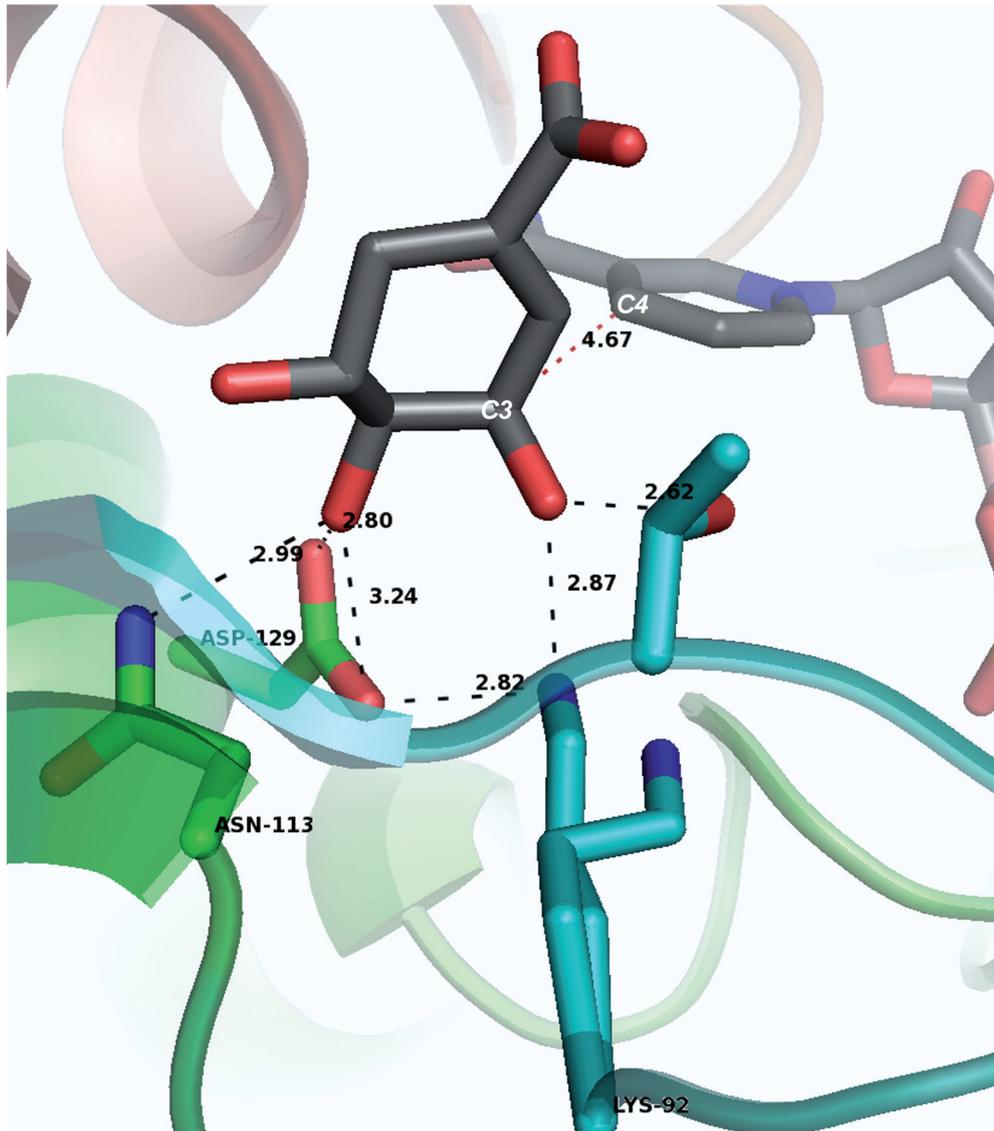


Abb. IV.3.2.2.: Ausschnitt des katalytischen Zentrums der *Cg*/QDH im Komplex mit NADH und Shikimat (beide in schwarz-bunt).

Gezeigt sind ausschließlich die katalytisch wichtigen Aminosäuren und deren polare Kontakte (schwarze gestrichelte Linien). Der Abstand vom C3-Atom des Substrats zum C4-Atom des Cofaktors beträgt 4,67 Å (rote gestrichelte Linie).

Möglich wäre es, dass der Besetzungsgrad der Proteinmoleküle im Kristall bezüglich Shikimat nicht ausreichend ist und diese alternative Seitenkettenkonformation nur bei den Enzym-Molekülen auftritt, die kein Substrat gebunden haben. Doch wäre auch in diesem Fall die andere Konformation der Lysin-Seitenkette nicht optimal für die Shikimat-Dehydrierung.

Da das pH-Optimum der *Cg*/QDH bezüglich Shikimat bei pH 10,0 bis 10,5 liegt, scheint im ternären Komplex mit Shikimat die Lys92-Seitenkette einen höheren pK_a -Wert zu haben als im Quinat-Komplex. Wodurch diese unterschiedlichen pK_a -Werte begründet sind, kann zu diesem Zeitpunkt nicht geklärt werden, da sich die Umgebung des Lys92 in den beiden Enzym-Substrat-Komplexen kaum unterscheidet. Möglich wäre es jedoch, dass für den pK_a -Wert nicht nur die dem Lysin

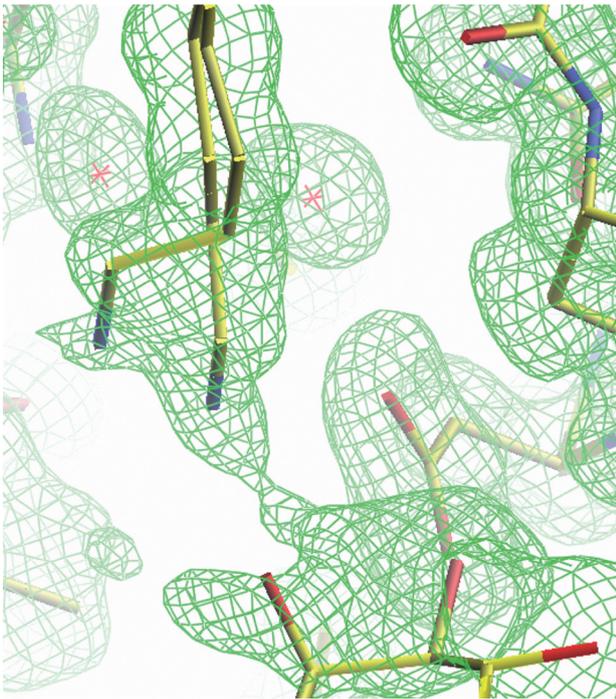


Abb. IV.3.2.3.: Ausschnitt der Elektronendichte um die Aminosäure Lys92 im katalytischen Zentrum der *Cg*/QDH im Komplex mit NADH und Shikimat.

Unten im Bild ist ein Teil des Shikimat-Moleküls mit den drei Hydroxygruppen zu sehen. Die $2|F_o - F_c|$ -Elektronendichte ist mit $0,8 \sigma$ konturiert.

benachbarten Aminosäuren und die Zugänglichkeit des Lösungsmittels verantwortlich sind. Denkbar wäre es, dass sich Kationen aus dem Proteinpuffer oder dem Fällungsmittel (bzw. cytosolische) im Bereich des aktiven Zentrums befinden und den pK_a -Wert der Lysin-Seitenkette herabsetzen, wie dies schon für Calmodulin nach der Ca^{2+} -Bindung beobachtet werden konnte (Zhang und Vogel, 1993).

Offenbar unterscheiden sich die Verhältnisse aber in den beiden ternären Komplexen, da bei Shikimat-Bindung der pK_a -Wert von Lys92 aufgrund des basischeren pH-Optimums etwas höher sein muss.

Die enzymkinetischen Untersuchungen im Vorfeld (Dissertation Jan Schoepe, 2006) und zu dieser Arbeit konnten eindeutig zeigen, dass Shikimat von der *Cg*/QDH deutlich schlechter umgesetzt wird als Quinat. Sowohl die Affinität

als auch die katalytische Effizienz der *Cg*/QDH ist mit Quinat als Substrat deutlich höher als mit Shikimat.

Durch die Unterschiede im katalytischen Zentrum der Quinat-Dehydrogenase, die durch die Strukturinformationen der beiden ternären Komplexe mit Quinat und Shikimat erst deutlich geworden sind, kann die schlechtere Shikimat-Verwertung jetzt gedeutet werden:

Unter der Annahme, dass Lys92 als Base fungiert und zusammen mit der negativen Ladung des Asp129 den Hydrid-Transfer auf den Cofaktor unterstützt, liegen im ternären Komplex mit Quinat alle beteiligten Aminosäuren sowie Substrat und Cofaktor selber in optimalen Positionen zueinander. Im Shikimat-Komplex kann das Lys92 jedoch nicht alle polaren Wechselwirkungen mit dem Substrat eingehen, so dass es lediglich als schwache Base fungieren kann. Weiterhin ist der Abstand zwischen dem Lys92 und dem Asp129 etwas größer, so dass der unterstützende Einfluss des Aspartat-Restes zum Protonenabzug und zum Hydrid-Transfer geringer ist.

Der schon postulierte Reaktionsmechanismus der katalytischen Dyade bestehend aus Lysin und Aspartat (Lindner et al., 2005; Gan et al., 2005; Bagautdinov und Kunishima, 2007) stimmt daher mit den in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen sowohl aus den enzymkinetischen Untersuchungen als auch aus den Strukturanalysen gut überein und kann durch diese gestützt werden.

IV.4. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Quinat-Dehydrogenase (*Cg*/QDH) aus *Corynebacterium glutamicum* enzymkinetisch charakterisiert und in drei verschiedenen funktionellen Zuständen röntgenkristallographisch analysiert. Sie ist damit die erste Quinat-Dehydrogenase, von der strukturbasierte Informationen bezüglich der Substrat- und Cofaktor-Bindung vorliegen.

Zwar sind von verschiedenen Shikimat-Dehydrogenasen (SDHs) schon ternäre Komplexstrukturen verfügbar (SDH aus *Thermus thermophilus*, Bagautdinov und Kunishima, 2007; SDH aus *Aquifex aeolicus*, Gan et al., 2007; bifunktionale DHQD/SDH aus *Arabidopsis thaliana*, Singh und Christendat, 2007), jedoch fehlten bislang Strukturinformationen, die den Mechanismus der unterschiedlichen Substrat- und Cofaktor-Selektivität bei Enzymen mit dualer Substrat- und/oder Cofaktor-Verwendung hätten beleuchten können.

Die hier vorgestellten hochaufgelösten Strukturen der *Cg*/QDH, im binären Komplex mit NAD⁺ (1,0 Å) und in zwei verschiedenen ternären Komplexen (jeweils 1,16 Å, zum einen mit Quinat und NADH, zum anderen mit Shikimat und NADH), geben erstmalig Einsichten in verschiedene wichtige Bereiche der strukturbasierten Enzymologie der Quinat- und Shikimat-Dehydrogenasen:

- 1.) Wie können die unterschiedlichen Affinitäten und katalytischen Effektivitäten gegenüber chemisch ähnlichen Substraten (bzw. Cofaktoren) einiger bifunktionaler Enzyme dieser Familie, insbesondere der *Cg*/QDH, erklärt werden?
- 2.) Wodurch ist die strikte NAD-Abhängigkeit der *Cg*/QDH begründet?
- 3.) Welcher Reaktionsmechanismus ist bei der Oxidation des Substrats via Hydridionen-Transfer auf den Cofaktor, speziell bei der *Cg*/QDH, wahrscheinlich?

Die Ergebnisse aus den enzymkinetischen Untersuchungen ergaben, dass die *Cg*/QDH einerseits eine signifikant höhere Affinität und katalytische Effektivität gegenüber Quinat verglichen mit Shikimat besitzt. Außerdem ist sie strikt NAD-abhängig.

Die Befunde aus den Analysen der verschiedenen Komplexstrukturen decken sich mit den biochemischen Erkenntnissen und liefern mögliche Ursachen für das kinetische Profil der *Cg*/QDH:

- 1.) Aufgrund der Aminosäurezusammensetzung und der Architektur des aktiven Zentrums im Bereich der Cofaktor-Bindung kann das sperrigere Cosubstrat NADP(H) von der *Cg*/QDH nicht gebunden werden.
- 2.) Die Substrate Quinat und Shikimat werden im aktiven Zentrum unterschiedlich fixiert und liegen in leicht verschiedenen Orientierungen und Abständen zum Cofaktor-Molekül NADH.

3.) Der Reaktionsmechanismus verläuft mit hoher Wahrscheinlichkeit über eine schon postulierte katalytische Dyade, bei der das Lys92 als Protonenakzeptor agiert, während das benachbarte Asp129 diesen Protonenabzug vom Substrat und den anschließenden Hydridionen-Transfer auf den Cofaktor erleichtert.

Durch die unterschiedliche Bindung der beiden Substrate und die daraus resultierenden Veränderungen der Orientierung und des Abstandes zum Cofaktor können die verschiedenen Affinitäten und katalytischen Effektivitäten der *Cg*/QDH gegenüber Quinat und Shikimat interpretiert werden.

VII. Literaturverzeichnis

Abell C., Allen F. H., Bugg T. D. H., Doyle M. J., Raithby P. R.; 1988; Structure of (-)-Quinic Acid; *Acta Cryst. C*; 44, 1287-1290

Abell C., Allen F. H., Bugg T. D. H., Doyle M. J., Raithby P. R.; 1988; Structure of Sodium (-)-Shikimate Dihydrate; *Acta Cryst. C*; 44, 1204-1207

Adachi O., Ano Y., Toyama H., Matsushita K.; 2006; High Shikimate Production from Quinate with Two Enzymatic Systems of Acetic Acid Bacteria; *Biosci. Biotechnol. Biochem.*; 70 (10), 2579-2582

Adachi O., Tanasupawat S., Yoshihara N., Toyama H., Matsushita K.; 2003; 3-Dehydroquinone Production by Oxidative Fermentation and Further Conversion of 3-Dehydroquinone to the Intermediates in the Shikimate Pathway; *Biosci. Biotechnol. Biochem.*; 67 (10), 2124-2131

Adachi O., Yoshihara N., Tanasupawat S., Toyama H., Matsushita K.; 2003; Purification and Characterization of Membrane-bound Quinoprotein Quinate Dehydrogenase; *Biosci. Biotechnol. Biochem.*; 67 (10), 2115-2123

Ahmed S. I., Giles N. H.; 1969; Organization of Enzymes in the Common Aromatic Synthetic Pathway: Evidence for Aggregation in Fungi; *J. Bacteriol.*; 99 (1), 231-237

Akowski J. P., Bauerle R.; 1997; Steady-State Kinetics and Inhibitor Binding of 3-Deoxy-D-*arabino*-heptulosonate-7-phosphate Synthase (Tryptophan sensitive) from *Escherichia coli*; *Biochem.*; 36 (50), 15817-15822

Andersson K. M., Hovmöller S.; 2000; The protein content in crystals and packing coefficients in different space groups; *Acta Cryst. D*; 56 (7), 789-790

Anton I. A., Coggins J. R.; 1988; Sequencing and overexpression of the *Escherichia coli aroE* gene encoding shikimate dehydrogenase; *Biochem. J.*; 249, 319-326

Badger J., Sauder J.M., Adams J.M., Antonysamy S., Bain K., Bergseid M.G., Buchanan S.G., Buchanan M.D., Batiyenko Y., Christopher J.A., Emtage S., Eroshkina A., Feil I., Furlong E.B., Gajiwala K.S., Gao X., He D., Hendle J., Huber A., Hoda K., Kearins P., Kissinger C., Laubert B., Lewis H.A., Lin J., Loomis K., Lorimer D., Louie G., Maletic M., Marsh C.D., Miller I., Molinari J., Muller-Dieckmann H.J., Newman J.M., Noland B.W., Pagarigan B., Park F., Peat T.S., Post K.W., Radojicic S., Ramos A., Romero R., Rutter M.E., Sanderson W.E., Schwinn K.D., Tresser J., Winhoven J., Wright T.A., Wu L., Xu J., Harris T.J.; 2005; Structural Analysis of a Set of Proteins

Resulting From a Bacterial Genomics Project; *PROTEINS: Structure, Function and Bioinformatics*; 60 (4), 787-796

Bagautdinov B., Kunishima N.; 2007; Crystal Structures of Shikimate Dehydrogenase AroE from *Thermus thermophilus* HB8 and its Cofactor and Substrate Complexes: Insights into the Enzymatic Mechanism; *J. Gen. Appl.*; 373, 424-438

Baillie A. C., Corbett J. R., Dowsett J. R., McCloskey P.; 1972; Inhibitors of Shikimate Dehydrogenase as Potential Herbicides; *Biochem. J.*; 126 (3), 21

Baker P. J., Britton K. L., Rice D. W., Rob A., Stillman T. J.; 1992; Structural Consequences of Sequence Patterns in the Fingerprint Region of the Nucleotide Binding Fold; *J. Mol. Biol.*; 228, 662-671

Balinsky D., Davies D. D.; 1961; Aromatic Biosynthesis in Higher Plants 2. Mode of attachment of shikimic acid and dehydroshikimic acid to dehydroshikimic reductase; *Biochem. J.*; 80, 296-300

Balinsky D., Davies D. D.; 1961; Aromatic Biosynthesis in Higher Plants 3. Preparation and Properties of Dehydroquinase; *Biochem. J.*; 80, 300-304

Balinsky D., Davies D. D.; 1961; Aromatic Biosynthesis in Higher Plants - 1. Preparation and Properties of Dehydroshikimic Reductase; *Biochem. J.*; 80, 292-296

Barea J. L., Giles N. H.; 1978; Purification and characterization of quinate (shikimate) dehydrogenase, an enzyme in the inducible quinic acid catabolic pathway of *Neurospora crassa*; *Biochim. Biophys. Acta*; 524, 1-14

Benach J., Lee I., Edstrom W., Kuzin A. P., Chiang Y., Acton T. B., Montelione G. T., Hunt J. F.; 2003; The 2.3-A Crystal Structure of the Shikimate 5-Dehydrogenase Orthologue YdiB from *Escherichia coli* Suggests a Novel Catalytic Environment for an NAD-dependent Dehydrogenase; *J. Biol. Chem.*; 278 (21), 19176-19182

Beri R. K., Grant S., Roberts C. F., Smith M., Hawkins A. R.; 1990; Selective overexpression of the *QUTE* gene encoding catabolic 3-dehydroquinase in multicopy transformants of *Aspergillus nidulans*; *Biochem. J.*; 265, 337-342

Berlyn M. B., Giles N. H.; 1969; Organisation of Enzymes in the Polyaromatic Synthetic Pathway: Separability in Bacteria; *J. Bacteriol.*; 99 (1), 222-230

Berman H. M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T. N., Weissig H., Shindyalov I. N., Bourne P. E.; 2000; The Protein Data Bank; *Nucleic Acids Res.*; 28 (1), 235-42

Bonner C. A., Jensen R. A.; 1994; Cloning of cDNA encoding the bifunctional dehydroquinase-shikimate dehydrogenase of aromatic-amino-acid biosynthesis in *Nicotiana tabacum*; *Biochem. J.*; 302, 11-14

Borek D., Minor W., Otwinowski Z.; 2003; Measurement errors and their consequences in protein crystallography; *Acta Cryst. D*; 59, 2031-2038

Bottomley J. R., Clayton C. L., Chalk P. A., Kleanthous C.; 1996; Cloning, sequencing, expression, purification and preliminary characterization of a type II dehydroquinase from *Helicobacter pylori*; *Biochem. J.*; 319, 559-565

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

Brown K. D., Doy C. H.; 1976; Transport and Utilization of the Biosynthetic Intermediate Shikimic Acid in *Escherichia coli*; *Biochim. Biophys. Acta*; 428, 550-562

Bruce N. C., Cain R. B.; 1990; Hydroaromatic metabolism in *Rhodococcus rhodochrous*: purification and characterisation of its NAD-dependent quinate dehydrogenase; *Arch. Microbiol.*; 154, 179-186

Cain R. B.; 1972; The Identity of Shikimate Dehydrogenase and Quinate Dehydrogenase in *Aspergillus niger*; *Biochem. J.*; 127, 15

Cain R. B., Bilton R. F., Darrah J. A.; 1968; The Metabolism of Aromatic Acids by Microorganism - Metabolic pathways in the fungi; *Biochem. J.*; 108, 797-828

Carpenter E. P., Hawkins A. R., Frost J. W., Brown K. A.; 1998; Structure of dehydroquinase synthase reveals an active site capable of multistep catalysis; *Nature*; 394, 299-302

Carugo O., Argos P.; 1997; NADP-Dependent Enzymes. I: Conserved Stereochemistry of Cofactor Binding; *PROTEINS: Structure, Function and Genetics*; 28, 10-28

Case M. E., Giles N. H.; 1975; Genetic evidence on the organization and action of the *qa-1* gene product: a protein regulating the induction of three enzymes in quinate catabolism in *Neurospora crassa*; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 72 (2), 553-557

Case M. E., Pueyo C., Barea J. L., Giles N. H.; 1978; Genetical and Biochemical Characterization of *qa-3* Mutants and Revertants in the *qa* Gene Cluster of *Neurospora crassa*; *Genetics*; 90, 69-84

Chandran S. S., Yi J., Draths K. M., von Daeniken R., Weber W., Frost J. W.; 2003; Phosphoenolpyruvate Availability and the Biosynthesis of Shikimic Acid; *Biotechnol. Prog.*; 19 (3), 808-814

Charles I. G., Keyte J. W., Brammar W. J., Hawkins A. R.; 1985; Nucleotide sequence encoding the biosynthetic dehydroquinase function of the penta-functional arom locus of *Aspergillus nidulans*; *Nucleic Acids Res.*; 13 (22), 8119-28

Charles I. G., Keyte J. W., Brammar W. J., Smith M., Hawkins A. R.; 1986; The isolation and nucleotide sequence of the complex AROM locus of *Aspergillus nidulans*; *Nucleic Acids Res.*; 14 (5), 2201-2213

Chatterjee S., Schoepe J., Lohmer S., Schomburg D.; 2005; High level expression and single-step purification of hexahistidine-tagged L-2-hydroxyisocaproate dehydrogenase making use of a versatile expression vector set; *Protein Expr Purif.*; 39 (2), 137-43

Chaudhuri S., Coggins J. R.; 1985; The purification of shikimate dehydrogenase from *Escherichia coli*; *Biochem. J.*; 226, 217-223

Collaborative Computational Project, Number 4; 1994; The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography; *Acta Cryst. D*; 50, 760-763

Dal S., Trautwein G., Gerischer U.; 2005; Transcriptional Organisation of Genes for Protocatechuate and Quinate Degradation from *Acinetobacter* sp. Strain ADP1; *Appl. Environ. Microbiol.*; 71 (2), 1025-1034

Davies G. M., Barrett-Bee K. J., Jude D. A., Lehan M., Nichols W. W., Pinder P. E., Thain J. L., Watkins W. J., Wilson G.; 1994; (6S)-6-Fluoroshikimic Acid, an Antibacterial Agent Acting on the Aromatic Biosynthetic Pathway; *Antimicrob. Agents Chemother.*; 38, 403-406

DeCicco B. T., Umbreit W. W.; 1964; Utilization of Aromatic Amino Acids by *Hydrogenomonas facilis*; *J. Bacteriol.*; 88 (6), 1590-1594

Deka R. K., Anton I. A., Dunbar B., Coggins R. A.; 1994; The characterisation of the shikimate pathway enzyme dehydroquinase from *Pisum sativum*; *FEBS Letters*; 349, 397-402

Dell K. A., Frost J. W.; 1993; Identification and Removal of Impediments to Biocatalytic Synthesis of Aromatics from D-Glucose: Rate-Limiting Enzymes in the Common Pathway of Aromatic Amino Acid Biosynthesis; *J. Am. Chem. Soc.*; 115 (24), 11581-11589

Dennis A. W., Balinsky D.; 1972; The Effect of pH on the Kinetic Parameters of Shikimate Dehydrogenase from *Pisum sativum*; *Int. J. Biochem.*; 3, 93-102

Draths K. M., Knop D. R., Frost J. W.; 1999; Shikimic Acid and Quinic Acid: Replacing Isolation from Plant Sources with Recombinant Microbial Biocatalysis; *J. Am. Chem. Soc.*; 121 (7), 1603-1604

Durbin S. D., Feher G.; 1996; Protein Crystallization; *Annu. Rev. Phys. Chem.*; 47, 171-204

Elsemore D. A., Ornston L. N.; 1994; The *pca-pob* Supraoperonic Cluster of *Acinetobacter calcoaceticus* Contains *quiA*, the Structural Gene for Quinate-Shikimate Dehydrogenase; *J. Bacteriol.*; 176 (24), 7659-7666

Elsemore D. A., Ornston L. N.; 1995; Unusual Ancestry of Dehydratases Associated with Quinate Catabolism in *Acinetobacter calcoaceticus*; *J. Bacteriol.*; 177 (20), 5971-5978

Enserink M.; 2006; Oseltamivir Becomes Plentiful - But Still Not Cheap; *Science*; 312, 382-383

Fiedler E., Schultz G.; 1985; Localization, Purification, and Characterization of Shikimate Oxidoreductase-Dehydroquinone Hydrolase from Stroma of Spinach Chloroplasts; *Plant Physiol.*; 79, 212-218

Fischer H. O. L., Dangschat G.; 1932; Über die Konfiguration der Chinasäure (2. Mitteilung über Chinasäure und Derivate); *Helv. Chim. Acta*; 65 (6), 1009-1031

Fischer H. O. L., Dangschat G.; 1934; Konstitution der Shikimisäure (5. Mitteilung über Chinasäure und Derivate); *Helv. Chim. Acta*; 17 (1), 1200-1207

Fischer H. O. L., Dangschat G.; 1935; Zur Konfiguration der Shikimisäure (7. Mitteilung über Chinasäure und Derivate); *Helv. Chim. Acta*; 18 (1), 1206-1213

Floss H. G.; 1997; Natural products derived from unusual variants of the shikimate pathway; *Nat. Prod. Rep.*; 14 (5), 433-452

Gamborg O. L.; 1966; Aromatic metabolism in plants - III. Quinate dehydrogenase from mung bean cell suspension cultures; *Biochim. Biophys. Acta*; 128, 483-491

Gan J., Wu Y., Prabakaran P., Gu Y., Li Y., Andrykovitch M., Liu H., Gong Y., Yan H., Ji X.; 2007; Structural and Biochemical Analyses of Shikimate Dehydrogenase AroE from *Aquifex aeolicus*: Implications for the Catalytic Mechanism; *Biochem.*; 46, 9513-9522

Giles N. H., Case M. E., Baum J., Geever R., Huiet L., Patel V., Tyler B.; 1985; Gene Organization and Regulation in the *qa* (Quinic Acid) Gene Cluster of *Neurospora crassa*; *Microbiol Rev.*; 49 (3), 338-358

Giles N. H., Case M. E., Partridge C. W. H., Ahmed S. I.; 1967; A gene cluster in *Neurospora crassa* coding for an aggregate of five aromatic synthetic enzymes; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 58 (4), 1453-1460

Giles N. H., Partridge C. W. H., Ahmed S. I., Case M. E.; 1967; The occurrence of two dehydroquinases in *Neurospora crassa*, one constitutive and one inducible; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 58 (5), 1930-1937

Gordon M., Haskins F. A., Mitchell H. K.; 1950; The growth-promoting properties of quinic acid; *Biochemistry*; 36, 427-430

Gourley D. G., Shrive A. K., Polikarpov I., Krell T., Coggins J. R., Hawkins A. R., Isaacs N. W., Sawyer L.; 1999; The two types of 3-dehydroquinase have distinct structures but catalyze the same overall reaction; *Nat. Struct. Biol.*; 6 (6), 521-525

Graham L. D., Gillies F. M., Coggins J. R.; 1993; Overexpression of the yeast multifunctional *arom* protein; *Biochim. Biophys. Acta*; 1216, 417-424

Graziana A., Dillenschneider M., Ranjeva R.; 1984; A calcium-binding protein is a regulatory subunit of quinate : NAD⁺ oxidoreductase from dark-grown carrot cells; *Biochem. Biophys. Res. Comm.*; 125 (2), 774-783

Grund E., Kutzner H. J.; 1998; Utilization of quinate and *p*-hydroxybenzoate by actinomycetes: key enzymes and taxonomic relevance; *J. Basic Microbiol.*; 38 (4), 241-255

Han C., Wang L., Yu K., Chen L., Hu L., Chen K., Jiang H., Shen X.; 2006; Biochemical characterization and inhibitor discovery of shikimate dehydrogenase from *Helicobacter pylori*; *FEBS J.*; 272, 4682-4692

Harwood C. S., Parales R. E.; 1996; The β -Ketoacid Pathway and the Biology of Self-Identity; *Annu. Rev. Microbiol.*; 50, 553-590

Hawkins A. R., Da Silva A. J. F., Roberts C. F.; 1985; Cloning and characterization of the three enzyme structural genes *QUTB*, *QUTC* and *QUTE* from the quinic acid utilization gene cluster in *Aspergillus nidulans*; *Curr. Gen.*; 9, 305-311

Hawkins A. R., Giles N. H., Kinghorn J. R.; 1982; Genetical and Biochemical Aspects of Quinate Breakdown in the Filamentous Fungus *Aspergillus nidulans*; *Biochem. Genet.*; 20 (3/4), 271-286

Hawkins A. R., Lamb H. K., Roberts C. F.; 1992; Structure of the *Aspergillus nidulans* *QUT* repressor-encoding gene: implications for the regulation of transcription initiation; *Gene*; 110, 109-114

Hawkins A. R., Lamb H. K., Smith M., Keyte J. W., Roberts C. F.; 1988; Molecular organisation of the quinic acid utilization (*QUT*) gene cluster in *Aspergillus nidulans*; *Mol. Gen. Genet.*; 214, 224-231

Hawkins A. R., Moore J. D., Adeokun A. M.; 1993; Characterization of the 3-dehydroquinase domain of the pentafunctional AROM protein, and the quinate dehydrogenase from *Aspergillus nidulans*, and the overproduction of the type II 3-dehydroquinase from *Neurospora crassa*; *Biochem. J.*; 296, 451-457

Hawkins A. R., Smith M.; 1991; Domain structure and interaction within the pentafunctional *arom* polypeptide; *Eur. J. Biochem. (FEBS)*; 196, 717-724

Herrmann K. M.; 1995; The Shikimate Pathway: Early Steps in the Biosynthesis of Aromatic Compounds; *The Plant Cell*; 7, 907-919

Herrmann K. M.; 1995; The Shikimate Pathway as an Entry to Aromatic Secondary Metabolism; *Plant Physiol.*; 107, 7-12

Herrmann K. M., Weaver M. L.; 1999; The Shikimate Pathway; *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*; 50, 473-503

Ikeda M., Katsumata R.; 1992; Metabolic Engineering To Produce Tyrosine or Phenylalanine in a Tryptophane-Producing *Corynebacterium glutamicum* Strain; *Appl. Environ. Microbiol.*; 58 (3), 781-785

Ikeda M., Nakagawa S.; 2003; The *Corynebacterium glutamicum* genome: features and impacts on biotechnological processes; *Appl. Microbiol. Biotechnol.*; 62 (2-3), 99-109

Inoue T., Sunagawa M., Mori A., Imai C., Fukuda M., Takagi M., Yano K.; 1989; Cloning and Sequencing of the Gene Encoding the 72-Kilodalton Dehydrogenase Subunit of Alcohol Dehydrogenase from *Acetobacter aceti*; J. Bacteriol.; 171 (6), 3115-3122

Jacobson J. W., Hautala J. A., Case M. E., Giles N. H.; 1975; Effect of Mutations in the *qa* Gene Cluster of *Neurospora crassa* on the Enzyme Catabolic Dehydroquinase; J. Bacteriol.; 124 (1), 491-496

Jancarik J., Kim S.-H.; 1991; Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins; J. Appl. Cryst.; 24 (4), 409-411

Jones T.A., Zou J. Y., Cowan S. W., Kjeldgaard M.; 1991; Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models; Acta Cryst. A; 47 (2), 110-119

Jörnvall H., Persson M., Jeffery J.; 1981; Alcohol and polyol dehydrogenases are both divided into two protein types, and structural properties cross-relate the different enzyme activities within each type; Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 78 (7), 4226-4230

Kalinowski J., Bathe B., Bartels D., Bischoff N., Bott M., Burkovski A., Dusch N., Eggeling L., Eikmanns B. J., Gaigalat L., Goesmann A., Hartmann M., Huthmacher K., Krämer R., Linke B., McHardy A. C., Meyer F., Möckel B., Pfefferle W., Pühler A., Rey D. A., Rückert C., Rupp O., Sahl H., Wendisch V. F., Wieggräbe I., Tauch A.; 2003; The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins; J. Bacteriol.; 104, 5-25

Kang X., Scheibe R.; 1993; Purification and characterization of the quinate:oxidoreductase from *Phaseolus mungo* sprouts; Phytochem.; 33, 769-773

Kim C. U., Lew W., Williams M. A., Liu H., Zhang L., Swaminathan S., Bischofberger N., Chen M. S., Mendel D. B., Tai C. Y., Laver W. G., Stevens R. C.; 1997; Influenza Neuraminidase Inhibitors Possessing a Novel Hydrophobic Interaction in the Enzyme Active Site: Design, Synthesis, and Structural Analysis of Carbocyclic Sialic Acid Analogues with Potent Anti-Influenza Activity; J. Am. Chem. Soc.; 119 (4), 681-690

Kinoshita S., Udaka S., Shimono M.; 1957; Studies on the amino acid fermentation, Part 1 - Production of L-glutamic acid by various microorganisms; J. Gen. Appl. Microbiol.; 3 (3), 193-205

Kishore G. M., Shaw D. M.; 1988; Amino Acid Biosynthesis Inhibitors as Herbicides; Ann. Rev. Biochem.; 57, 627-663

- Knaggs A. R.; 2003; The biosynthesis of shikimate metabolites; *Nat. Prod. Rep.*; 20 (1), 119-136
- Krell T., Coggins R. A., Laphorn A. J.; 1998; The Three-dimensional Structure of Shikimate Kinase; *J. Mol. Biol.*; 278, 983-997
- Lamb H. K., Bagshaw C. R., Hawkins A. R.; 1991; *In vivo* overproduction of the pentafunctional *arom* polypeptide in *Aspergillus nidulans* affects metabolic flux in the quinate pathway; *Mol. Gen. Genet.*; 227, 187-196
- Lamb H. K., Hawkins A. R., Smith M., Harvey I. J., Brown J., Turner G., Roberts C. F.; 1990; Spatial and biological characterisation of the complete quinic acid utilisation gene cluster in *Aspergillus nidulans*; *Mol. Gen. Genet.*; 223, 17-23
- Lamb H. K., van den Homberch J. P. T. W., Newton G. H., Moore J. D., Roberts C. F., Hawkins A. R.; 1992; Differential flux through the quinate and shikimate pathways - Implications for the channelling hypothesis; *Biochem. J.*; 284, 181-187
- Laskowski R. A., MacArthur M. W., Moss D. S., Thornton J. M.; 1993; PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures; *J. Appl. Cryst.*; 26 (2), 283-291
- Lee Y.-A., Lo Y.-C., Yu P.-P.; 1999; A gene involved in quinate metabolism is specific to one DNA homology group of *Xanthomonas campestris*; *J. Appl. Microbiol.*; 87, 649-658
- Lesk A. M.; 1995; NAD-binding domains of dehydrogenases; *Curr. Opin. Struct. Biol.*; 5, 775-783
- Lindner H. A., Nadeau G., Matte A., Michel G., Ménard R., Cygler M.; 2005; Site-directed Mutagenesis of the Active Site Region in the Quinate/Shikimate 5-Dehydrogenase YdiB of *Escherichia coli*; *J. Biol. Chem.*; 280 (8), 7162-7169
- MacKintosh C., Coggins J., Cohen P.; 1991; Plant protein phosphatases - Subcellular distribution, detection of protein phosphatase 2C and identification of protein phosphatase 2A as the major dehydrogenase phosphatase; *Biochem. J.*; 273, 733-738
- Maclean J., Ali S.; 2003; The Structure of Chorismate Synthase Reveals a Novel Flavin Binding Site Fundamental to a Unique Chemical Reaction; *Structure*; 11, 1499-1511
- Maclean J., Campbell S. A., Pollock K., Chackrewarthy S., Coggins J. R., Laphorn A. J.; 2000; Crystallization and preliminary X-ray analysis of shikimate dehydrogenase from *Escherichia coli*; *Acta Cryst. D*; 56, 512-515

Matthews B. W.; 1968; Solvent content of protein crystals; *J. Mol. Biol.*; 33 (2), 491-497

Michel G., Roszak A. W., Sauvé V., Maclean J., Matte A., Coggins J. R., Cygler M., Lapthorn A. J.; 2003; Structure of Shikimate Dehydrogenase AroE and Its Paralog YdiB; *J. Biol. Chem.*; 278 (21), 19463-19472

Minor W., Tomchick D. R., Otwinowski Z.; 2000; Strategies for macromolecular synchrotron crystallography; *Structure*; 8 (5), R105-110

Mitsuhashi S., Davis B. D.; 1954; Aromatic biosynthesis - XIII. Conversion of quinic acid to 5-dehydroquinic acid by quinic dehydrogenase; *Biochim. Biophys. Acta*; 15, 268-280

Moore J. D., Coggins J. R., Virden R., Hawkins A. R.; 1994; Efficient independent activity of a monomeric, monofunctional dehydroquinase synthase derived from the N-terminus of the pentafunctional AROM protein of *Aspergillus nidulans*; *Biochem. J.*; 301, 297-304

Moore J. D., Lamb H. K., Garbe T., Servos S., Dougan G., Charles I. G., Hawkins A. R.; 1992; Inducible overproduction of the *Aspergillus nidulans* pentafunctional AROM protein and the type-I and -II 3-dehydroquinases from *Salmonella typhi* and *Mycobacterium tuberculosis*; *Biochem. J.*; 287, 173-181

Ossipov V., Bonner C., Ossipova S., Jensen R.; 2000; Broad-specificity quinate (shikimate) dehydrogenase from *Pinus taeda* needles; *Plant Physiol. Biochem.*; 38, 923-928

Otwinowski Z., Minor W.; 1997; Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode; *Methods Enzymol.*; 276, 307-326

Padyana A. K., Burley S. K.; 2003; Crystal Structure of Shikimate 5-Dehydrogenase (SDH) Bound to NADP: Insights into Function and Evolution; *Structure*; 11 (8), 1005-1013

Park A., Lamb H. K., Nichols C., Moore J. D., Brown K. A., Cooper A., Charles I. G., Stammers D. K., Hawkins A. R.; 2004; Biophysical and kinetic analysis of wild-type and site-directed mutants of the isolated and native dehydroquinase domain of the AROM protein; *Prot. Sci.*; 13, 2108-2119

Perrakis A., Harkiolaki M., Wilson K. S., Lamzin V. S.; 2001; ARP/wARP and molecular replacement; *Acta Cryst. D*; 57 (10), 1445-1450

Persson B., Krook M., Jörnvall H.; 1991; Characteristics of short-chain alcohol dehydrogenases and related enzymes; *Eur. J. Biochem. (FEBS)*; 200, 537-543

Pittard J., Wallace B. J.; 1966; Gene Controlling the Uptake of Shikimic Acid by *Escherichia coli*; *J. Bacteriol.*; 92 (4), 1070-1075

Ranjeva R., Refeno G., Boudet A. M., Marmé D.; 1983; Activation of plant quinate:NAD⁺ 3-oxido-reductase by Ca²⁺ and calmodulin; *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 80, 5222-5224

Ray J. M., Bauerle R.; 1991; Purification and Properties of Tryptophan-Sensitive 3-Deoxy-D-*arabino*-Heptulosonate-7-Phosphate Synthase from *Escherichia coli*; *J. Bacteriol.*; 173 (6), 1894-1901

Reinert W., Giles N. H.; 1977; Proof of the *de novo* synthesis of the *qa* enzymes of *Neurospora crassa* during induction; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 74 (10), 4256-4260

Reinert W., Patel V. B., Giles N. H.; 1981; Genetic Regulation of the *qa* Gene Cluster of *Neurospora crassa*: Induction of *qa* Messenger Ribonucleic Acid and Dependency on *qa-1* Function; *Mol. Cell. Biol.*; 1 (9), 829-835

Roberts C. W., Roberts F., Lyons R. E., Kirisits M. J., Mui E.J., Finnerty J., Johnson J.J., Ferguson D. J., Coggins J. R., Krell T., Coombs G. H., Milhous W. K., Kyle D.E., Tzipori S., Barnwell J., Dame J. B., Carlton J., McLeod R.; 2002; The Shikimate Pathway and Its Branches in Apicomplexan Parasites; *J. Inf. Dis.*; 185 (Suppl 1), 25-36

Roberts F., Roberts C. W., Johnson J.J., Kyle D.E., Krell T., Coggins J. R., Coombs G. H., Milhous W. K., Tzipori S., Ferguson D. J., Chakrabarti D., McLeod R.; 1998; Evidence for the shikimate pathway in apicomplexan parasites; *Nature*; 393, 801-805

Rohloff J. C., Kent K. M., Postich M. J., Becker M. W., Chapman H. H., Kelly D. E., Lew W., Louie M. S., McGee L. R., Prisbe E. J., Schultze L. M., Yu R. H., Zhang L.; 1998; Practical Total Synthesis of the Anti-Influenza Drug GS-4104; *J. Org. Chem.*; 63 (13), 4545-4550

Sahm H., Eggeling L., de Graaf A. A.; 2000; Pathway Analysis and Metabolic Engineering in *Corynebacterium glutamicum*; *Biol. Chem.*; 381, 899-910

Schlieben, N. H.; 2001; Die Kristallstruktur eines ternären Komplexes der R-spezifischen Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus brevis* in atomarer Auflösung; Aggregationsstudien und röntgenkristallographische Untersuchungen der thermoalkalophilen Lipase aus *Bacillus thermocatenulatus*; Dissertation 2001

Schoepe J.; 2006; Enzymkinetische und strukturelle Untersuchungen der drei Shikimat-Dehydrogenasen aus *Corynebacterium glutamicum*; Dissertation

Schoepe J., Niefind K., Chatterjee S., Schomburg D.; 2006; Cloning, expression, purification and preliminary crystallographic characterization of a shikimate dehydrogenase from *Corynebacterium glutamicum*; Acta Cryst. F; 62, 635-637

Schweizer M., Case M. E., Dykstra C. C., Giles N. H., Kushner S. R.; 1981; Cloning the quinic acid (*qa*) gene cluster from *Neurospora crassa*: identification of recombinant plasmids containing both *qa-2⁺* and *qa-3⁺*; Gene; 14, 23-32

Shumilin I. A., Kretsinger R. H., Bauerle R. H.; 1999; Crystal structure of phenylalanine-regulated 3-desoxy-D-*arabino*-heptulosonate-7-phosphate synthase from *Escherichia coli*; Structure; 7 (7), 865-875

Singh S. A., Christendat D.; 2007; The DHQ-dehydroshikimate-SDH-shikimate-NADP(H) Complex: Insights into Metabolite Transfer in the Shikimate Pathway; Cryst. Growth Des.; 7 (11), 2153-2160

Singh S. A., Christendat D.; 2006; Structure of *Arabidopsis* Dehydroquinase Dehydratase-Shikimate Dehydrogenase and Implications for Metabolic Channeling in the Shikimate Pathway; Biochem.; 45, 7787-7796

Singh S., Korolev S., Koroleva O., Zarembinski T., Collart F., Joachimiak A., Christendat D.; 2005; Crystal Structure of a Novel Shikimate Dehydrogenase from *Haemophilus influenzae*; J. Biol. Chem.; 280 (17), 17101-17108

Stallings W. C., Abdel-Meguid S. S., Lim L. W., Shieh H. S., Dayringer H. E., Leimgruber N. K., Stegeman R. A., Anderson K. S., Sikorski J. A., Padgett S. R., Kishore G. M.; 1991; Structure and topological symmetry of the glyphosate target 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase: a distinctive protein fold; Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 88, 5046-5050

Steinrücken H. C., Amrhein N.; 1980; The herbicide Glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvyl-shikimic acid-3-phosphate synthase; Biochem. Biophys. Res. Comm.; 94 (4), 1207-1212

Steinrücken H. C., Amrhein N.; 1984; 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase of *Klebsiella pneumoniae* - 2. Inhibition by glyphosate [N-(phosphonomethyl)glycine]; Eur. J. Biochem. (FEBS); 143, 351-357

Strasburger; 1998; Lehrbuch der Botanik; 34. Auflage; Gustav Fischer Verlag

Strøman P., Reinert W., Case M. E., Giles N. H.; 1979; Organization of the *qa* Gene Cluster in *Neurospora crassa*: Direction of transcription of the *qa-3* Gene; *Genetics*; 92, 67-74

Udaka S.; 1960; Screening method for microorganisms accumulating metabolites and its use in the isolation of *Micrococcus glutamicus*; *J. Bacteriol.*; 79, 754-755

Valone J. A. jr., Case M. E., Giles N. H.; 1971; Constitutive Mutants in a Regulatory Gene Exerting Positive Control of Quinic Acid Catabolism in *Neurospora crassa*; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 68 (7), 1555-1559

van den Hombergh J. P. T. W., Moore J. D., Charles I. G., Hawkins A. R.; 1992; Overproduction in *Escherichia coli* of the dehydroquinate synthase domain of the *Aspergillus nidulans* pentafunctional AROM protein; *Biochem. J.*; 284, 861-867

van Kleef M. A. G., Duine J. A.; 1988; Bacterial NAD(P)-independent quinate dehydrogenase is a quinoprotein; *Arch. Microbiol.*; 150, 32-36

Wheeler K. A., Lamb H. K., Hawkins A. R.; 1996; Control of metabolic flux through the quinate pathway in *Aspergillus nidulans*; *Biochem. J.*; 315, 195-205

Whipp M. J., Camakaris H., Pittard A. J.; 1998; Cloning and analysis of the *shiA* gene, which encodes the shikimate transport system of *Escherichia coli* K-12; *Gene*; 209, 185-192

Whiting G. C., Coggins R. A.; 1974; A New Nicotinamide-Adenine Dinucleotide-Dependent Hydroaromatic Dehydrogenase of *Lactobacillus plantarum* and its Role in Formation of (-)-3,4-Dihydroxycyclohexane-c-1-carboxylate; *Biochem. J.*; 141, 35-42

Whiting G. C., Coggins R. A.; 1967; The Oxidation of D-Quinate and Related Acids by *Acetomonas oxydans*; *Biochem. J.*; 102, 283-293

Whiting G. C., Coggins R. A.; 1971; The role of quinate and shikimate in the metabolism of lactobacilli; *Antonie van Leeuwenhoek*; 37, 33-49

Wierenga R. K., De Maeyer M. C. H., Hol W. G. J.; 1985; Interaction of Pyrophosphate Moieties with α -Helices in Dinucleotide Binding Proteins; *Biochemistry*; 24, 1346-1357

Wierenga R. K., Terpstra P., Hol W. G. J.; 1986; Prediction of the Occurrence of the ADP-binding $\beta\alpha\beta$ -fold in Proteins, Using an Amino Acid Sequence Fingerprint; J. Mol. Biol.; 187, 101-107

Yaniv H., Gilvarg C.; 1955; Aromatic Biosynthesis XIV. 5-Dehydroshikimic Reductase; J. Biol. Chem.; 213 (2), 787-795

Ye S., von Delft F., Brooun A., Knuth M. W., Swanson R. V., McRee D. E.; 2003; The Crystal Structure of Shikimate Dehydrogenase (AroE) Reveals a Unique NADPH Binding Mode; J. Bacteriol.; 185 (14), 4144-4151

Zhang M., Vogel H. J.; 1993; Determination of the Side Chain pKa Values of the Lysine Residues in Calmodulin; J. Biol. Chem.; 268 (30), 22420-22428

Zussman R. A., Vicher E. E., Lyon I.; 1970; Aromatic amino acid biosynthesis in *Trichophyton rubrum* - III. Exogenous studies: absence of the shikimic acid pathway; Mycopath. Mycol. appl.; 42, 1-8

VI. Anhang

VI.1. Kurzzusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Quinat-Dehydrogenase aus *Corynebacterium glutamicum* (*Cg*/QDH) enzymkinetisch charakterisiert und ihre Struktur in verschiedenen funktionellen Zuständen röntgenkristallographisch untersucht.

Die *Cg*/QDH gehört zu den NAD(H)-abhängigen Oxidoreduktasen. Sie ist im katabolen Quinat-Stoffwechsel lokalisiert und spielt eine wichtige Rolle bei der xenobiotischen Detoxifikation sowie beim Ligninabbau.

Die Quinat-Dehydrogenase katalysiert die NAD(P)-abhängige Oxidation von Quinat zu 3-Dehydroquinat über einen Hydridionen-Transfer, sowie die entsprechende Rückreaktion.

Durch die Ergebnisse der enzymkinetischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Quinat-Dehydrogenase sowohl unter optimalen pH-Bedingungen, als auch unter physiologischem pH eine deutlich höhere Affinität und katalytische Effizienz gegenüber Quinat verglichen mit Shikimat besitzt.

Des Weiteren ist sie strikt NAD⁺-abhängig, NADP⁺ kann nicht umgesetzt werden.

Die *Cg*/QDH konnte darüber hinaus im binären Komplex mit NAD⁺ und in zwei verschiedenen ternären Komplexen (Quinat und NADH bzw. Shikimat und NADH) kristallisiert und mit einer hohen Auflösung aufgeklärt werden (1,0 Å bzw. 1,16 Å). Diese Strukturinformationen ermöglichen erstmalig Aussagen zur Substrat- und Cofaktor-Bindung bzw. -Diskriminierung sowie dem möglichen Katalysemechanismus bei einer Quinat-Dehydrogenase.

Im Vergleich zur Apostruktur der *Cg*/QDH (2nlo, Dissertation Jan Schoepe) zeigen die Domänen der Quinat-Dehydrogenase nach der Substrat- und Cofaktor-Bindung eine offene Konformation. Durch den Vergleich der Aminosäurezusammensetzung und der Architektur des aktiven Zentrums der *Cg*/QDH mit eng verwandten Enzymen kann sowohl die strikte NAD-Abhängigkeit, als auch der schlechtere Shikimat-Umsatz dieses Enzyms erklärt werden.

Alle Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bekräftigen den für den Hydridtransfer postulierten Reaktionsmechanismus der katalytischen Dyade, bei der ein Lysin (Lys92) als Protonenakzeptor agiert, während ein benachbartes Aspartat (Asp129) diesen Protonenabzug vom Substrat und den anschließenden Hydridionen-Transfer auf den Cofaktor erleichtert.

VI.2. Abstract

The quinate dehydrogenase from *Corynebacterium glutamicum* (*Cg*/QDH) was kinetically characterized and its structure was determined by x-ray crystallographic analysis in three different functional states.

Cg/QDH belongs to the NAD(H) dependent oxidoreductases and is localized in the catabolic quinate metabolism. It plays an important role for xenobiotic detoxification as well as for the degradation of lignin.

Quinate dehydrogenase catalyzes the NAD(P) dependent oxidation of quinic acid to 3-dehydroquinic acid by the transfer of a hydride, as well as its reverse.

The results of the kinetic measurements exhibit a clearly higher affinity and catalytical efficiency of the *Cg*/QDH relating to quinate compared to shikimate, not only under optimal pH conditions but also at physiological pH.

Furthermore the QDH is strictly NAD⁺ dependent, it is unable to convert NADP⁺.

In addition we have determined several crystal structures of *Cg*/QDH with a maximum resolution of 1,0 Å or 1,16 Å, including its binary complex with cofactor NAD⁺ and two different ternary complexes with both its substrate quinate and cofactor NADH or shikimate and NADH, respectively. These structure based information enable first insights into substrate and cofactor binding and discrimination as well as into the likely catalytic mechanism of a quinate dehydrogenase.

Compared to the structure of the *Cg*/QDH apoenzyme (2nlo, PhD thesis Jan Schoepe, 2006) the quinate dehydrogenase domains exhibit an open conformation after substrate and cofactor binding.

By analysis of both the amino acid composition and architecture of the *Cg*/QDH active side and those of closely related enzymes we were able to explain the strict NAD dependence as well as the poorer shikimate turnover of this enzyme.

All results presented here confirm the postulated reaction mechanism of hydride transfer by a catalytic dyad, in which a lysine acts as a proton acceptor, while a neighbouring aspartate facilitate both proton abstraction of the substrate and subsequent hydride transfer to the cofactor.

VI.3. Abbildungsverzeichnis

Abb. I.1.: Licht- und elektronenmikroskopische Aufnahmen von *Corynebacterium glutamicum*.

Abb. I.2.1.1.: Schematische Übersicht über die Reaktionen des biosynthetischen Shikimat-Stoffwechsels und seine Verzweigung zum katabolen Quinat-Stoffwechsel.

Abb. I.2.1.2.: Schematische Übersicht des *arom*-Genclusters in *Neurospora crassa*.

Abb. I.3.1.: Schematische Darstellung von Chorismat als Vorstufe der verschiedenen primären und sekundären Pflanzenstoffe.

Abb. I.4.1.1.: Schematische Übersicht der Stoffwechselwege ausgehend von den beiden Intermediaten des Shikimat-Stoffwechsels, Dehydroquinat und Dehydroshikimat.

Abb. I.4.1.2.: Schematische Darstellung der Beziehungen der Gene und Enzyme des Quinat-/Shikimat-Stoffwechsels in *Neurospora crassa*.

Abb. I.4.2.1.: Schematische Darstellung der *pca-qui-pob*-Genregion von *Acinetobacter* sp. Stamm ADP1.

Abb. I.4.2.2.: Schematische Darstellung des Clusters der an der Quinat-Verwertung beteiligten Gene von *Aspergillus nidulans*.

Abb. I.4.2.3.: Schematische Übersicht des *qa*-Genclusters sowie angrenzenden Bereichen in *Neurospora crassa*.

Abb. III.1.1.: SDS-Gelelektrophorese der einzelnen Reinigungsfractionen der QDH.

Abb. III.2.1.: ESI-MS-Spektren der Quinat-Dehydrogenase vor (A) und nach (B) der Abspaltung des N-terminalen His₆-tags.

Abb. III.3.1.: Chemische Strukturen der Cofaktoren NAD⁺ (links) und NADP⁺ (rechts).

Abb. III.3.1.1.: pH-Optima der Quinat-Dehydrogenase gegenüber Quinat (A) und Shikimat (B).

Abb. III.3.2.1.: Strukturen der beiden Substrate Quinat (links) und Shikimat (rechts).

Abb. III.3.2.2.: Umsatzkurven der QDH von Quinat (links) und Shikimat (rechts), gezeigt anhand der Zunahme des reduzierten Cofaktors NADH.

Abb. II.4.1.1.: Verschiedene Kristallformen der QDH im Komplex mit NAD⁺.

Abb. III.4.1.2.: Verschiedene Kristallformen der QDH im Komplex mit NADH und Quinat (links) bzw. NADH und Shikimat (rechts).

Abb. III.5.1.1.: Diffraktionsaufnahme eines monoklinen QDH/NAD⁺-Komplekxkristalles bis zu einer Auflösung von 0,98 Å.

Abb. III.5.1.2.: Diffraktionsaufnahme eines monoklinen Kristalls des QDH/Quinat/NADH-Komplexes bis zu einer Auflösung von 1,16 Å.

Abb. III.5.1.3.: Diffraktionsaufnahme eines monoklinen Kristalls des QDH/Shikimat/NADH-Komplexes bis zu einer Auflösung von 1,16 Å.

Abb. III.8.1.a: Ramachandran-Plot der QDH im Komplex mit NAD⁺.

Abb. III.8.1.b: Ramachandran-Plot der QDH im Komplex mit NADH und Quinat.

Abb. III.8.1.c: Ramachandran-Plot der QDH im Komplex mit NADH und Shikimat.

Abb. III.8.2.: Ausschnitt aus der Elektronendichtekarte der QDH im ternären Komplex mit NADH und Quinat.

Abb. III.8.3.: Alternative Seitenkettenkonformationen am Beispiel von Asp118 (links) und Met137 (rechts).

Abb. III.8.4.: Ausschnitt aus der Elektronendichtekarte des Cofaktors der QDH im ternären Komplex mit NADH und Quinat.

Abb. III.8.5.: Elektronendichtekarten der Substrate Quinat (links) und Shikimat (rechts) der QDH in den ternären Komplexen.

Abb. III.9.1.: Schematische Darstellung der Faltung des Apoenzyms der QDH (2nlo) als Monomer.

Abb. III.9.2.: Schematische Darstellung der Faltung der QDH mit gebundenem NADH und Quinat als Stereodiagramm.

Abb. III.10.1.1.: Schematischer Vergleich der Hauptkettenverläufe im QDH-Apoenzym (schwarz) und im QDH-Komplex mit NAD⁺ (blau).

Abb. III.10.1.2.: Positionsänderungen der an der Cofaktor-Bindung beteiligten Aminosäuren.

Abb. III.10.1.3.: Veränderung der Hauptkettentorsionswinkel Φ und Ψ nach der NAD⁺-Bindung.

Abb. III.10.2.1.: Schematischer Vergleich der Hauptkettenverläufe im QDH-Apoenzym (schwarz), im QDH-Komplex mit NAD⁺ (blau) und im ternären Komplex mit NADH und Quinat (rot).

Abb. III.10.2.2.: Veränderung der Hauptkettentorsionswinkel Φ und Ψ nach der Quinat-Bindung.

Abb. III.11.1.1.: Polare Wechselwirkungen des Cofaktors NAD⁺ mit dem Protein.

Abb. III.11.1.2.: Konformations- und Positionsänderungen der an der Cofaktor-Bindung beteiligten Aminosäuren nach der NAD⁺-Bindung.

Abb. III.11.2.1.: Polare Wechselwirkungen des Substrats Quinat mit dem Protein.

Abb. III.11.2.2.: Konformations- und Positionsänderungen der an der Substrat-Bindung beteiligten Aminosäuren nach der NADH- und Quinat-Bindung.

Abb. III.11.2.3.: Positionsänderungen der an der Substrat- und Cofaktor-Bindung beteiligten Aminosäuren nach der Quinat-Bindung.

Abb. III.11.2.4.: Veränderung der Position des NADH-Moleküls nach der Substratbindung.

Abb. III.11.3.1.: Polare Wechselwirkungen des Substrats Shikimat mit dem Protein.

Abb. III.11.4.1.: Vergleich der Wechselwirkungen des Proteins mit den Substraten Quinat (hellgrau) und Shikimat (grün).

Abb. III.11.4.2.: Abstand zwischen dem Cofaktor NADH und den Substraten Quinat (hellgrau) bzw. Shikimat (grün).

Abb. III.11.4.3.: Abstand des NADH-Moleküls zum Substrat nach der Shikimatbindung.

Abb. IV.2.1.: Vergleich der Tertiärstrukturen verschiedener Shikimat-Dehydrogenasen.

Abb. IV.2.2.: Die Quartärstruktur der *Cg*/QDH.

Abb. IV.2.3.: Vergleich der Quartärstruktur der *Cg*/QDH mit denen verwandter Enzyme.

Abb. IV.2.4.: Die Quartärstruktur der *TthSDH* (2ev9).

Abb. IV.2.1.1.: Konformelle Unterschiede zwischen dem *Cg/QDH*-Apoenzym (schwarz) und dem *Cg/QDH*-Komplex nach NAD^+ -Bindung (blau).

Abb. IV.2.1.2.: Konformelle Unterschiede zwischen dem *Cg/QDH/NAD*⁺-Komplex (blau) und dem ternären QDH-Komplex (rot).

Abb. IV.2.1.3.: Konformelle Unterschiede zwischen den beiden Protomeren A (grün) und B (orange) des *TthSDH*-Apoenzym (1wxd).

Abb. IV.2.1.4.: Abstand zwischen dem Cofaktor NADP(H) und dem Substratmolekül Shikimat im Protomer A des ternären Komplexes der *TthSDH* (1ev9).

Abb. IV.2.1.5.: Konformelle Unterschiede zwischen den beiden Monomeren F des Apoenzym (rot) und D des ternären Komplexes (grün) der *AaeSDH* (1hk8 und 1hk9).

Abb. IV.2.1.6.: Abstand zwischen dem Cofaktor NADP^+ und dem Substratmolekül Shikimat im Monomer D des ternären Komplexes der *AaeSDH* (1hk9).

Abb. IV.2.1.7.: Übereinanderlagerung der *AthSDH*-Domänen des Komplexes mit Shikimat (rot, 2gtp) und des ternären Komplexes mit Dehydroshikimat und NADP^+ (schwarz, 2o7s).

Abb. IV.2.1.8.: Übereinanderlagerung der *AthSDH*-Domänen des Komplexes mit Dehydroshikimat (hellgrün, 2o7q) und des ternären Komplexes mit Dehydroshikimat und NADP^+ (schwarz, 2o7s).

Abb. IV.2.1.9.: Abstand zwischen dem Cofaktor NADP^+ und dem Substratmolekül Dehydroshikimat in der SDH-Domäne des ternären Komplexes der *AthDHQD/SDH* (2o7s).

Abb. IV.2.1.10.: Vergleich der Tertiärstruktur der *Cg/QDH* im ternären Komplex (schwarz) bzw. des Apoenzym (2nlo, violett) mit den im Text beschriebenen verwandten Strukturen.

Abb. IV.2.1.11.: Vergleich der Tertiärstruktur der *Cg/QDH* im ternären Komplex (schwarz) mit der des Monomers F des SDH-Apoenzym aus *A. aeolicus* (orange, 2hk8).

Abb. IV.3.1.: Polare Kontakte der *Cg/QDH* mit dem Cofaktor NADH und dem Substrat Quinat (beide in schwarz-bunt).

Abb. IV.3.2.: Vergleich der Proteinsequenz der Quinat-Dehydrogenase aus *C. glutamicum* (*Cgl*-QDH) mit denen verwandter Enzyme.

Abb. IV.3.1.1.: Katalytisches Zentrum der *Tth*AroE (Protomer A, 2ev9) mit gebundenem NADP⁺ und Shikimat (beide in schwarz-bunt).

Abb. IV.3.1.2.: Katalytisches Zentrum der *Aae*AroE (Domäne D, 2hk9) mit gebundenem NADP⁺ und Shikimat (beide in schwarz-bunt).

Abb. IV.3.1.3.: Katalytisches Zentrum der *Eco*AroE (Domäne A, 1nyt) mit gebundenem NADP⁺ (schwarz-bunt).

Abb. IV.3.1.4.: Katalytisches Zentrum der *Cg*/QDH mit gebundenem NAD⁺ (schwarz-bunt).

Abb. IV.3.1.5.: Katalytisches Zentrum der *Eco*Ydib (Domäne A, 1o9b) mit gebundenem NAD⁺ (schwarz-bunt).

Abb. IV.3.1.6.: Katalytisches Zentrum der *Eco*Ydib (Domäne A, 1npd) mit gebundenem NAD⁺ (schwarz-bunt).

Abb. IV.3.2.1.: Ausschnitt des katalytischen Zentrums der *Cg*/QDH im Komplex mit NADH und Quinat (beide in schwarz-bunt).

Abb. IV.3.2.2.: Ausschnitt des katalytischen Zentrums der *Cg*/QDH im Komplex mit NADH und Shikimat (beide in schwarz-bunt).

Abb. IV.3.2.3.: Ausschnitt der Elektronendichte um die Aminosäure Lys92 im katalytischen Zentrum der *Cg*/QDH im Komplex mit NADH und Shikimat.

VI.4. Tabellenverzeichnis

Tab. III.1.2.: Reinigungstabelle der Quinat-Dehydrogenase aus *C. glutamicum*, exprimiert in *E. coli*.

Tab. III.3.2.1.: Kinetische Parameter der Quinat-Dehydrogenase gegenüber Quinat und NAD⁺.

Tab. III.3.2.2.: Kinetische Parameter der Quinat-Dehydrogenase gegenüber Shikimat und NAD⁺.

Tab. III.5.1.1.: Ausgewählte kristallographische Parameter des Datensatzes des QDH/NAD⁺-Komplexes.

Tab. III.5.1.2.: Ausgewählte kristallographische Parameter des Datensatzes des QDH/Quinat/NADH-Komplexes.

Tab. III.5.1.3.: Ausgewählte kristallographische Parameter des Datensatzes des QDH/Shikimat/NADH-Komplexes.

Tab. III.6.1.: Packungsdichte der QDH-Kristalle.

Tab. III.7.1.: Statistische Parameter der verfeinerten QDH-Strukturen.

Tab. VI.1.1.1.: Kinetische Parameter der Quinat-Dehydrogenase gegenüber Quinat und NAD⁺.

Tab. IV.1.1.2.: Kinetische Parameter der Quinat-Dehydrogenase gegenüber Shikimat und NAD⁺.

Tab. IV.1.1.3.: k_{cat}/K_M -Verhältnisse der Quinat-Dehydrogenase gegenüber Quinat, Shikimat und NAD⁺.

Tab. IV.1.2.1.: Vergleich der kinetischen Parameter der QDH aus *C. glutamicum* mit vergleichbaren Enzymen aus anderen Organismen.

Tab. IV.1.2.2.: Vergleich der kinetischen Parameter der SDHs aus verschiedenen Organismen.

VI.5. Lebenslauf

■ Persönliche Daten

Name Astrid Höppner
Geburtsdatum 18.10.1974
Geburtsort Bergisch Gladbach

■ Schulbildung

1985 – 1994 Nicolaus-Cusanus-Gymnasium in Bergisch Gladbach
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

■ Berufsausbildung

1995 – 1997 Ausbildung zur Biologisch-technischen Assistentin an der Rheinischen Akademie e.V. in Köln
Abschluss: Staatlich geprüfte Biologisch-technische Assistentin

■ Studium

1997 – 2004 Studium der Biologie an der Universität zu Köln
Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung in Köln
„Klonierung, Expression und enzymkinetische Charakterisierung von Varianten der 4-Cumarat:CoA Ligase 2 (4CL2) aus *Arabidopsis thaliana* sowie Experimente zur Proteinkristallisation“
Abschluss: Diplom-Biologin

■ Promotion

2004 – 2008 Promotion in Biochemie
Universität zu Köln, Institut für Biochemie
Arbeitsgruppe Prof. Dr. D. Schomburg
„Enzym-Substratkomplexe der Quinat-Dehydrogenase aus *Corynebacterium glutamicum* – Strukturen, Katalyse und Spezifitäten“

■ Sonstige Tätigkeiten

seit 1987 Ehrenamtliche Tätigkeit in der Pfarrbücherei Hl. Drei Könige in Bergisch Gladbach

VI.6. Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Dietmar Schomburg betreut worden.

Astrid Höppner

VI.7. Danksagung

Viele Personen haben die Durchführung dieser Arbeit erst ermöglicht und mich während dieser Zeit in vielfältiger Weise unterstützt. Bei allen möchte ich mich ganz herzlich bedanken, insbesondere:

Bei Herrn Prof. Dr. Dietmar Schomburg für das spannende und herausfordernde Projekt und das mir stets entgegengebrachte Vertrauen. Die mir eingeräumten Freiheiten bei der Planung und Durchführung dieses Projekts sowie die hervorragenden Arbeitsbedingungen am Institut haben mir immer den Spaß an der Arbeit bewahrt.

Bei Herrn Prof. Dr. Günter Schwarz für die freundliche und sehr spontane Übernahme des Coreferats.

Bei Herrn Dr. Karsten Niefind für die Einführung in die theoretischen Hintergründe der Proteinkristallographie, die praktischen Hilfen bei der Durchführung von Röntgenmessungen und im Umgang mit diversen Programmen. Die konstruktiven Gespräche mit Dir zur Interpretation und Einordnung meiner Ergebnisse sowie Deine sorgfältige Durchsicht meiner Arbeit waren sehr hilfreich.

Bei Herrn Dr. Jan Schoepe für die freundliche Überlassung des *Cg/QDH*-Vektor-Plasmids sowie für erste Informationen bezüglich des Enzyms.

Bei Frau Sabine Lohmer für die bereitwillige und exzellente Unterstützung bei der Proteinreinigung und –Expression, den Kristallisationsexperimenten sowie den enzymkinetischen Messungen. Die Zusammenarbeit mit Dir hat mir immer sehr viel Spaß gemacht. Ich werde die „Luftschnapp-Pausen“ mit Dir und Deinen aufbauenden Optimismus sehr vermissen!

Herrn Michael Zimmermann, meinem Büromitbewohner, danke ich ganz herzlich für die immer umgehende Hilfe und seine Geduld bei Computer- und sonstigen Problemen. Deine hilfsbereite, verständnisvolle Art und Dein Humor haben mir den nicht immer lustigen Laboralltag stets erleichtert. Mein Schreibtisch hätte nirgendwo besser stehen können.

Bei Frau Anja Hochheiser für ihre freundliche und unkomplizierte Durchführung der Analysen meiner Proben am ESI-MS.

Bei Frau Claudia Beumers für ihre immer unbürokratische Hilfe bei bürokratischen Angelegenheiten.

Bei allen Betreuern der EMBL-Außenstation am DESY, vor allem Dr. Paul Tucker für seine Hilfestellungen und Tipps während der Röntgenmessungen.

Bei allen Leidensgenossen im Labor, besonders bei Jennifer Raaf und Karsten Knopffleisch, für ihre Hilfsbereitschaft und die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre.

Sabine Gründler danke ich ganz herzlich für die akribische Durchsicht meiner Arbeit, um es dem Fehlerteufel schwer zu machen.

Meinem Bruder Uli schulde ich besonders großen Dank für die Engelsgeduld und investierte Freizeit bzw. Schlafenszeit beim Setzen dieser Arbeit. Du warst wirklich großartig!

Die moralische und verständnisvolle Unterstützung meiner Freunde und ganz besonders meiner Familie hat mich bei Misserfolgen im Laboralltag und in den teilweise nervenzehrenden Zeiten während dieser Arbeit immer aufgebaut und wieder angespornt. Mama, Papa, Carsten und Uli, ich danke Euch, dass Ihr immer an mich geglaubt habt und ich immer und in jeder Hinsicht auf Euch zählen konnte!

Zuletzt, aber nicht als Unwichtigstem, möchte ich mich bei Olaf Port bedanken, dem besten Golfpartner der Welt. Ohne Dich hätte ich in meiner Freizeit nicht so abschalten und neue Kraft sammeln können. Ich danke Dir für alles, was Du für mich getan und was Du mir ermöglicht hast! Dein sensationeller Support rund ums Drucken hat mir die letzten stressigen Tage sehr erleichtert. Du hast mein Leben bereichert.