

**Enzymkinetische und strukturelle Untersuchungen  
der drei Shikimat/Quinat-Dehydrogenasen aus  
*Corynebacterium glutamicum***

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Jan Schoepe

aus Preetz (Holstein)

Köln 2006

Berichterstatter:

Prof. Dr. Dietmar Schomburg  
Prof. Dr. Sabine Waffenschmidt

Tag der mündlichen Prüfung:

3. Juli 2006





# Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bedanken bei

Prof. Dr. Dietmar Schomburg für das faszinierende Thema sowie das mir entgegengebrachte Vertrauen, dass mir sämtliche Freiheiten bei der Ausrichtung der Arbeit einräumte,

Prof. Dr. Sabine Waffenschmidt für die Übernahme des Coreferates,

Dr. habil. Karsten Niefind vor allem für die Hilfen bei der Kristallisation und bei dem Umgang mit den zahllosen Computerprogrammen bei der Datenauswertung,

den Spezialisten Dr. Christian Brüx, Dr. Annette Faust, Dr. Guido Hansen und Astrid Höppner für so manche Expertise zur Röntgenstrukturanalyse,

Bold Sharnod für die (vielen?) Jahre, die wir am Institut verbracht und uns so manches Mal gegenseitig im Labor geholfen haben („Bao, bleibst Du heute zufällig etwas länger?“),

Dr. Sebastian Buchinger für die vielfältige vor allem mentale Unterstützung, z.B. im Kampf gegen Nitratbill, wenn wir auch am Ende eine Niederlage einstecken mussten,

Michael Zimmermann für die unbürokratische Hilfe bei diversen Computerproblemen,

Stefan Obenauer, der mich mit seinem Computerknowhow am Anfang meiner Arbeit enorm profitieren ließ,

Dr. Shivani Chatterjee, Sabine Lohmer und Anja Hochheiser für die Unterstützung im Laboralltag

dem Mensastammtisch, dessen harter Kern nun bald nur noch aus den BRENDA-Men Christian Ebeling und Jens Barthelmes besteht,

dem gesamten Arbeitskreis für die angenehme Arbeitsatmosphäre,

und schließlich natürlich dem RPG-Team, das mir wöchentlich gezeigt hat, dass sich das wahre Leben nicht im Labor oder hinter dem Computer abspielt.

Nochmals vielen Dank!

# Inhaltsverzeichnis

Danksagung.....	I
Inhaltsverzeichnis.....	III
Abkürzungsverzeichnis.....	VII

## 1 Einleitung ..... 1

1.1 Der Modellorganismus <i>Corynebacterium glutamicum</i> .....	1
1.2 Der Shikimatstoffwechselweg.....	3
1.2.1 Vorkommen und Bedeutung .....	3
1.2.2 Entdeckung.....	4
1.2.3 Beschreibung.....	6
1.2.4 Regulation .....	9
1.3 Der Quinatstoffwechselweg .....	12
1.3.1 Vorkommen und Bedeutung .....	12
1.3.2 Entdeckung.....	12
1.3.3 Beschreibung.....	12
1.3.4 Regulation .....	13
1.4 Shikimat/Quinat-Dehydrogenasen .....	14
1.4.1 Reaktionen und Metabolite .....	14
1.4.1.1 Shikimisäure/Shikimat .....	15
1.4.1.2 Dehydroshikimisäure/Dehydroshikimat.....	16
1.4.1.3 Chinasäure/Quinat.....	16
1.4.1.4 Dehydrochinasäure/Dehydroquinat.....	17
1.4.1.5 Die Cosubstrate NAD und NADP.....	17
1.4.2 Einteilung der Shikimat/Quinat-Dehydrogenasen .....	18
1.4.3 Verteilung der Gene im Genom von <i>C. glutamicum</i> .....	21
1.4.4 Monomere, Dimere, .....	22
1.4.5 Supersekundär- und Tertiärstruktur .....	22
1.4.6 Bindungsmodus von NAD(P) .....	24

1.4.7 Bindungsmodus des Shikimates.....	25
1.4.8 Nur eine scheinbare Enzymredundanz? .....	28
1.5 Zielsetzung der Arbeit .....	29
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>31</b>
2.1 Verwendete Chemikalien, Materialien, Geräte und EDV-Systeme .....	31
2.1.1 Chemikalien .....	31
2.1.2 Mikroorganismen, Bakteriennährmedien, Pufferlösungen und Oligonukleotide ....	31
2.1.3 Materialien, Geräte und EDV-Systeme.....	34
2.2 Molekularbiologie .....	37
2.2.1 Klonierungsstrategie.....	37
2.2.2 Herstellung des His <sub>6</sub> -rTEV-Adapters .....	37
2.2.3 Herstellung kompetenter Zellen .....	38
2.2.4 Hitzeschock-Transformation .....	38
2.2.5 Präparation der Vektor-DNA aus <i>Escherichia coli</i> .....	38
2.2.5.1 DNA-Präparation aus 3 ml-Bakterienkultur („Minipräparation“) .....	38
2.2.5.2 DNA-Präparation aus 250 ml-Bakterienkultur („Midipräparation“) .....	39
2.2.6 Präparation von genomischer DNA aus <i>C. glutamicum</i> .....	40
2.2.7 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der DNA .....	40
2.2.8 DNA-Restriktionsspaltungen .....	41
2.2.9 Ligationsreaktionen .....	41
2.2.9.1 Ligation des His <sub>6</sub> -rTEV-Adapters in pET-3d.....	41
2.2.9.2 Ligation der Enzyme in den Expressionsvektor pNHis .....	41
2.2.10 PCR-Mutagenese.....	41
2.2.11 DNA-Sequenzierung .....	42
2.3 Proteinüberexpression und –reinigung.....	43
2.3.1 Proteinüberexpression .....	43
2.3.1.1 rTEV-Protease .....	43
2.3.1.2 Shikimat/Quinat-Dehydrogenasen .....	42
2.3.2 Zellaufschluss.....	44
2.3.2.1 rTEV-Protease .....	44
2.3.2.2 Shikimat/Quinat-Dehydrogenasen .....	44

2.3.3 Proteinreinigung .....	44
2.3.3.1 rTEV-Protease .....	44
2.3.3.2 Shikimat/Quinat-Dehydrogenasen .....	45
2.4 Proteinanalytik .....	46
2.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration .....	46
2.4.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	46
2.4.3 ESI-Massenspektrometrie .....	46
2.4.4 Abspaltung des His <sub>6</sub> -Tags .....	47
2.4.5 Kinetikversuche .....	47
2.4.5.1 Bestimmung der kinetischen Parameter .....	47
2.4.5.2 Bestimmung der Enzymspezifitäten .....	48
2.4.5.3 Untersuchung der pH-Optima .....	48
2.4.5.4 Suche nach Enzyminhibitoren .....	49
2.4.6 Analytische Gelfiltration .....	49
2.5 Proteinkristallisation .....	50
2.6 Diffraktionsexperimente .....	51
2.6.1 Allgemeines .....	51
2.6.2 Der Datensatz der <i>Cgl</i> QDH .....	51
2.7 Datenreduktion .....	52
2.8 Strukturlösung der <i>Cgl</i> QDH .....	52
2.9 Modellbau und Verfeinerung .....	53
2.10 Homologe Modellierung der <i>Cgl</i> AroE und der <i>Cgl</i> SDH-L .....	54
2.11 Modellierung der ternären Komplexe .....	55
2.12 Validierung und Darstellung der Modelle .....	56
<b>3 Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>57</b>
3.1 Modifikation des Expressionsvektors .....	57
3.2 Klonierung der Shikimat/Quinat-Dehydrogenase-Gene .....	57
3.3 Proteinüberexpression und –reinigung .....	59
3.3.1 rTEV-Protease .....	59
3.3.2 Shikimat/Quinat-Dehydrogenasen aus dem Lysat .....	59
3.3.3 Shikimat/Quinat-Dehydrogenasen aus dem Spaltungsansatz .....	60

3.4 Enzymkinetik .....	62
3.4.1 Kinetische Parameter.....	62
3.4.2 Spezifitäten der Enzyme.....	64
3.4.2.1 Substratspezifitäten .....	64
3.4.2.2 Cosubstratspezifitäten .....	65
3.4.3 pH-Optima.....	66
3.4.4 Inhibitorensuche .....	68
3.5 Analytische Gelfiltration .....	69
3.6 Kristallisation .....	70
3.6.1 <i>Cgl</i> QDH .....	70
3.6.2 <i>Cgl</i> AroE .....	71
3.6.3 <i>Cgl</i> SDH-L .....	71
3.7 Diffraktionsmessungen.....	73
3.7.1 Diffraktionsmessung der <i>Cgl</i> QDH.....	73
3.7.2 Diffraktionsmessung der <i>Cgl</i> SDH-L.....	74
3.8 Strukturlösung & Verfeinerung.....	76
3.8.1 Kreuzrotationssuche .....	76
3.8.2 Translationssuche .....	77
3.8.3 Starre-Körper-Verfeinerung .....	77
3.8.4 Modellbau.....	77
3.8.5 Letzte Verfeinerungen und Wassereinbau .....	78
3.9 Validierung der Modelle .....	79
3.9.1 interne Validierung.....	79
3.9.2 externe Validierung .....	83
3.9.3 Vollständigkeit der Modelle.....	86
3.9.4 abschließende Bewertung der Validierung .....	86
3.10 Homodimere Struktur der <i>Cgl</i> QDH .....	87
3.11 Worin liegen strukturelle Gemeinsamkeiten und Unterschiede der S/QDH?.....	88
3.11.1 Geringe Sequenzidentität, hohe strukturelle Konservierung.....	88
3.11.2 Bindung von NAD(P).....	90
3.11.3 Bindung von Quinat und Shikimat.....	91
3.11.4 Welcher Reaktionsmechanismus ist wahrscheinlich?.....	93
3.11.5 Wie wird die Substratspezifität gewährleistet? .....	93

3.12 Lassen sich die verschiedenen Subfamilien der S/QDH mit bioinformatischen Methoden voneinander unterscheiden? .....	95
3.12.1 Unterscheidung per Cosubstratspezifität.....	95
3.12.2 Unterscheidung von AroE und SDH-L .....	96
3.13 Welche Verwandtschaftsverhältnisse bestehen zwischen den S/QDH? .....	98
3.14 Ausblick .....	100
<b>4 Zusammenfassung.....</b>	<b>102</b>
<b>5 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>104</b>
<b>6 Anhang .....</b>	<b>113</b>
Kurzzusammenfassung.....	113
Abstract .....	114
Vorabveröffentlichungen .....	115
Abbildungsverzeichnis .....	116
Tabellenverzeichnis.....	118
Erklärung.....	119
Lebenslauf .....	121

# Abkürzungsverzeichnis

## 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
Valin	Val	V
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y

## Sonstige Abkürzungen

$\alpha, \beta, \gamma$	Winkel zwischen den Gitterachsen
$\lambda$	Lambda (Wellenlänge)
$\sigma(I)$	Standardabweichung der Intensität
$\mu_{\max}$	maximale Zellteilungsrate
Å	Ångström ( $1 \text{ Å} = 0,1 \text{ nm} = 10^{-10} \text{ m}$ )
a, b, c	Gittervektoren im realen Raum
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
ANT	Anthranilat
AroE	„klassische“ Shikimat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.25)
ATCC	Stammsammlung (engl. <i>American Type Culture Collection</i> )
AU	asymmetrische Einheit der Elementarzelle eines Kristalls
bla	$\beta$ -Lactamase (ein Ampicillinresistenzgen)
bp	Basenpaar/e
BSA	Rinderserumalbumin (engl. <i>bovine serum albumine</i> )
c	Konzentration einer Probe
<i>C. glutamicum</i>	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
<i>CglAroE</i>	AroE-ähnliches Enzym aus <i>C. glutamicum</i>
<i>CglQDH</i>	NAD-abhängige Quinat-Dehydrogenase aus <i>C. glutamicum</i>
<i>CglSDH-L</i>	SDH-L-ähnliches Enzym aus <i>C. glutamicum</i>
CHA	Chorismat
DDJB	eine Genom-Datenbank ( <i>DNA Data Bank of Japan</i> )
DEAE	Diethylaminoethanol
DHAP	3-Desoxyarabinoheptulosonat-7-Phosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
dsDNA	doppelsträngige DNA
DESY	Deutsches Elektronensynchrotron
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
DTT	Dithiothreitol
E	Extinktion
EC	<i>enzyme catalogue</i>
E4P	Erythrose-4-Phosphat

$E'_0$	Standard-Reduktionspotential
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC	engl. <i>enzyme catalogue</i>
EDTA	Dinatriumsalz der Ethylendiamintetraessigsäure
EMBL	<i>European Molecular Biology Laboratory</i>
<i>et al.</i>	und andere (lat. <i>et alii</i> )
ESI	engl. <i>electrospray ionisation</i>
EthBr	Ethidiumbromid
$F_c$	berechnete Strukturfaktoramplituden
$F_o$	gemessene Strukturfaktoramplituden
FPLC	engl. <i>Fast Performance Liquid Chromatography</i>
h	Stunde/n
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
I	Intensität
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
K	Kelvin
KFZ	Kernforschungszentrum
$k_{cat}$	katalytische Konstante
$K_M$	Michaelis-Menten-Konstante
kb	Kilobasenpaar/e
LB	Luria-Bertani-Medium
MCS	multiple Klonierungsstelle (engl. <i>multiple cloning site</i> )
min	Minuten/n
MPD	2-Methyl-2,4-pentandiol
MW	Molekulargewicht (engl. <i>molecular weight</i> )
NAD	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
$NAD^+$	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid, oxidierte Form
NADH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid, reduzierte Form
NADP	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotidphosphat
$NADP^+$	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotidphosphat, oxidierte Form
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotidphosphat, reduzierte Form
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotetraacetat
nm	Nanometer (1 nm = $10^{-9}$ m)
NMR	kernmagnetische Resonanz (engl. <i>nuclear magnetic resonance</i> )

OD	optische Dichte
ORF	offenes Leseraster (engl. <i>open reading frame</i> )
ori	Replikationsursprung (engl. <i>origin of replication</i> )
p.a.	zur Analyse (lat. <i>pro analysi</i> )
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
P/C/I	50% v/v Phenol / 49% v/v Chloroform / 1% v/v Isoamylalkohol
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i> )
PDB	Proteindatenbank ( <i>Protein Data Bank</i> )
PEP	Phosphoenolpyruvat
pET	engl. <i>plasmid for expression by T7-RNA-polymerase</i>
pH	Säuregehalt (lat. <i>pondus hydrogenii</i> )
PHP	Phenylpyruvat
PIPES	Piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonsäure)
PRE	Prephenat
p.s.i.	engl. <i>pounds per square inch</i> (1 p.s.i.=1,05 kg cm <sup>2</sup> )
PTY	Prätyrosin
QDH	Quinat-Dehydrogenase
R <sub>free</sub>	freier R-Wert
R <sub>merge</sub>	linearer R-Wert beim Zusammenfassen von Röntgendatensätzen
R <sub>work</sub>	R-Wert des Arbeitsdatensatzes
REM	Rasterelektronenmikroskop
RMSD	Quadratwurzel der mittleren quadratischen Abweichung (engl. <i>root square mean deviation</i> )
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. <i>revolutions per minute</i> )
rTEV	engl. <i>recombinant tobacco etch virus</i>
SCOP	<i>Structural Classification of Proteins</i>
SDH	Shikimat-Dehydrogenase
SDH-L	SDH-ähnlich (engl. <i>shikimate dehydrogenase-like</i> )
SDS	Natriumdodecylsulfat
S/QDH	Shikimat- bzw. Quinat-Dehydrogenase/n aus Prokaryoten und Archaen
sek	Sekunde/n
STE	Zucker, Tris, EDTA (engl. <i>sugar, tris, EDTA</i> )
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
V	Volt

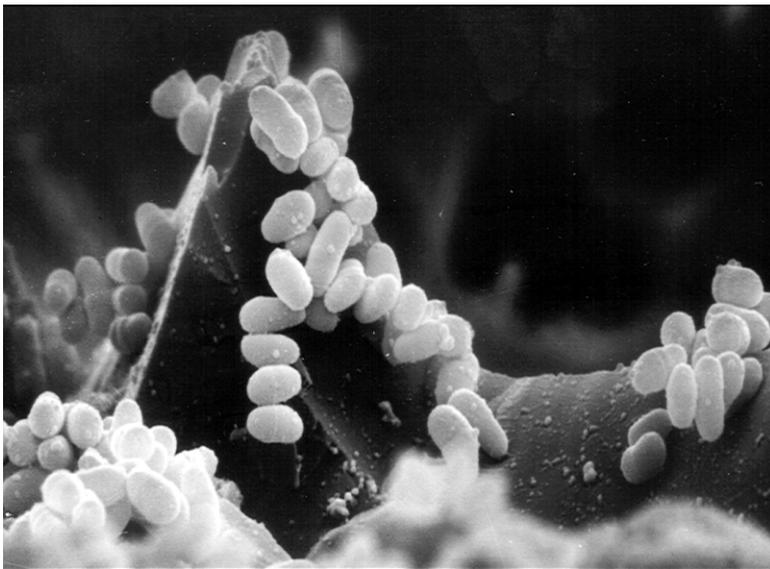
v/v            Volumen pro Volumen (“Volumenprozent”)  
w/v            Masse pro Volumen



# 1 Einleitung

## 1.1 Der Modellorganismus *Corynebacterium glutamicum*

Bei dem Mikroorganismus *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*) handelt es sich um ein gram-positives, nichtpathogenes, nichtsporulierendes, unbewegliches sowie schnell- und aerob wachsendes Bodenbakterium. Es gehört zum Stamm der *Actinobacteria* und ist u.a. nahe verwandt mit den Tier- und Humanpathogenen *Corynebacterium diphtheriae*, *Mycobacterium leprae* und *Mycobacterium tuberculosis*. Verantwortlich für den Gattungsnamen „*Corynebacterium*“ (*coryne* griech.: Keule) ist die äußere Form des Prokaryoten, die in der Literatur als leicht gekrümmtes Stäbchen mit spitz zulaufenden Enden beschrieben worden ist (Schlegel 1992).



**Abb. 1.1**  
REM-Aufnahme des Bakteriums *C. glutamicum* (KFZ Jülich)

Der Mikroorganismus wurde 1956 in Japan bei einer Suche nach Glutamat-produzierenden Spezies entdeckt (Kinoshita *et al.* 1957), woraus sich der Artname „*C. glutamicum*“ ableitet. Hierbei handelte es sich hier um eine der ersten gezielten Suche im Bereich der Lebensmitteltechnologie. L-Glutamat musste für industrielle Anwendungen fortan nicht mehr zwangsläufig aus Soja oder Algen isoliert, sondern konnte nun in großen Mengen fermentativ hergestellt werden. Die Produktion beträgt heute weltweit ungefähr  $1 \times 10^6$  Tonnen pro Jahr (Sahm *et al.* 2000). Glutamat wird heute vor allem als Geschmacksverstärker verwendet.

## 1 Einleitung

---

Daneben wird auch L-Lysin in außerordentlich großen Mengen hergestellt. Die Weltproduktion dieser Aminosäure beträgt ca.  $3 \times 10^5$  Tonnen pro Jahr (Sahm *et al.* 2000). Sie spielt in der Nahrungsmittel- und Futterproduktion eine besondere Rolle, da pflanzliche Proteine zumeist arm an Lysin sind. Inzwischen werden nahezu alle proteinogenen Aminosäuren sowie eine Reihe weiterer Substanzen wie Vitamine und Nukleotide mittels fermentativer Prozesse mit Hilfe von *C. glutamicum* und nahe verwandten Mikroorganismen hergestellt (<http://www.genetik.uni-bielefeld.de/coryne/>).

*C. glutamicum* hat sich bei der industriellen Fermentation in den meisten Fällen gegenüber anderen Mikroorganismen durchgesetzt, da das Bakterium in Flüssigkultur zu einer ausgesprochen hohen optischen Dichte ( $OD_{600}=100$ ) heranwachsen kann, einen vielfältigen anaplerotischen Stoffwechsel aufweist und viele Metabolite sowohl wachstumsgekoppelt als auch entkoppelt produziert. Darüber hinaus kann *C. glutamicum* auf preiswerten Kohlenstoffquellen wie z.B. Melassen oder Rückständen aus der Papierindustrie wachsen, die auf viele andere Mikroorganismen toxisch wirken (Ikeda 2003).

Die außerordentlich große Bedeutung des Bakteriums für industrielle Anwendungen stellt eine enorme Motivation für die weitere Untersuchung dieses Bodenbakteriums dar. In der Vergangenheit hat man sich vor allem auf die angewandte Forschung konzentriert, denn es stand zunächst im Vordergrund, die Ausbeute der synthetisierten Aminosäuren zu erhöhen (Reinscheid *et al.* 1991).

Nachdem das Genom des *C. glutamicum*-Wildtypstammes ATCC 13032 vollständig sequenziert worden ist (Ikeda & Nakagawa 2003, Kalinowski *et al.* 2003), hat sich das Bakterium nun auch endgültig in der Grundlagenforschung etabliert. Nach Annotation der offenen Leseraster (ORFs) gilt es jetzt, den Organismus ausgehend vom Transkriptom über das Proteom bis hin zum Metabolom zu entschlüsseln, um eines Tages die Funktionsweise der gesamten Zelle verstehen zu können. Auf Grund der geringen Genomgröße von ca. 3000 ORFs (*Escherichia coli*: ~ 4500 ORFs) ist der Mikroorganismus hierfür bestens geeignet.

Schließlich liegen eine Vielzahl von Informationen über Plasmide, genregulatorische Elemente und Proteinexpression des nicht pathogenen Bakteriums vor. Da seine proteolytische Aktivität zudem vergleichsweise gering ist und es in kurzer Zeit ( $\mu_{\max} \sim 0,35 \text{h}^{-1}$ ) zu hohen Dichten anwachsen kann, ohne dabei Sporen zu bilden oder zu verklumpen, eignet es sich als System zur heterologen Genexpression (Srivastava & Deb 2005).

### 1.2 Der Shikimatstoffwechselweg

Wie in der Folge ersichtlich, sind die in dieser Arbeit behandelten Shikimat/Quinat-Dehydrogenasen (S/QDH) an den gleichnamigen Stoffwechselwegen beteiligt.

#### 1.2.1 Vorkommen und Bedeutung des Shikimatstoffwechselweges

Der anabole Shikimatstoffwechselweg (kurz Shikimatweg) kommt in Pflanzen, Pilzen, Bakterien (Herrmann & Weaver 1999) sowie einigen wichtigen pathogenen eukaryotischen einzelligen Parasiten wie z.B. dem Malaria-Erreger *Plasmodium* vor (Roberts *et al.* 1998). Dieser Stoffwechselweg ist bei allen genannten Organismen essentiell. Jedoch findet man ihn nicht in mehrzelligen tierischen Lebewesen, den *Metazoa* (Roberts *et al.* 1998).

Die cDNAs von höheren Pflanzen kodieren Proteine des Shikimatweges mit N-terminalen Signalsequenzen für den Plastidimport. Es wird folglich angenommen, dass dieser Stoffwechselweg zumindest bis zur Bildung des Schlüsselmetaboliten Chorismat (siehe Abb. 1.2) in den Plastiden stattfindet (Herrmann & Weaver 1999). In Mikroorganismen und Pilzen geschieht dies im Cytoplasma (Roberts *et al.* 2002).

Da der Shikimatweg nicht in höheren tierischen Organismen anzutreffen ist, leiten sich vielversprechende Anwendungen ab. Enzyme aus diesem Stoffwechselweg sind interessante Ziele für die Entwicklung von Herbiziden (Kishore & Shah 1988) sowie antimikrobiellen (Davies *et al.* 1994) und antiparasitären (Roberts *et al.* 1998) Agenzien. Für ein Enzym aus dem Shikimatweg, der 5-Enolpyruvylshikimat-3-Phosphat-Synthase, ist bereits erfolgreich ein Inhibitor, das Glyphosat, entwickelt worden. Es handelt sich hierbei um ein Herbizid mit breitem Anwendungsspektrum (Steinrücken & Arnheim 1980), das gegenüber Fischen, Vögeln und Säugetieren praktisch keinerlei Toxizität aufweist (Smith & Oehme 1992). Nach über zwanzig Jahren extensiver Verwendung dieses Herbizids sind jedoch resistente Gräser aufgetreten. Deshalb gibt es das Bestreben, die Vielfalt der in diesen Stoffwechsel eingreifenden Substanzen zu erhöhen (Bearson *et al.* 2002). In Mäusen konnte eine auch für den Menschen gefährliche Infektion des Parasiten *Toxoplasma gondii*, die zur sogenannten Toxoplasmose führt, mit Glyphosat kombiniert mit Pyrimethamin erfolgreich behandelt werden (Roberts *et al.* 1998).

## 1 Einleitung

---

Ein potentielles Zielenzym für die Entwicklung eines Inhibitors des Shikimatweges ist die Shikimat-Dehydrogenase. Bisherigen Untersuchungen zu Folge ist die Struktur dieses Enzymes und hier besonders das aktive Zentrum hoch konserviert (Lindner *et al.* 2005). Da *C. glutamicum* eine nahe Verwandtschaft zu pathogenen Mikroorganismen besitzt (siehe Abschnitt 1.1), sind seine Proteine für ein strukturbasiertes Wirkstoffdesign besonders geeignet.

Die aromatischen Aminosäuren werden in erster Linie über den Shikimatweg synthetisiert (siehe Abschnitt 1.2.3). Es gibt dabei ein beträchtliches Interesse, die Details des Aminosäure-Metabolismus von *C. glutamicum* zu verstehen, da dieser Organismus in industriellem Maßstab vor allem für die Synthese von Proteinbausteinen verwendet wird.

### 1.2.2 Entdeckung des Shikimatstoffwechselweges

Anfang der 50er Jahre wurde gezeigt, dass Shikimat eine zentrale Rolle bei der Biosynthese aromatischer Aminosäuren spielt (Davies 1951). Für dafür erforderliche Experimente wurden eine Vielzahl mittels UV-Licht erzeugter auxotropher *E. coli*-Mutanten verwendet. Eine Gruppe von Mutanten, zu deren Wachstum scheinbar sowohl die Zugabe von Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan, p-Aminobenzoesäure und zu einem gewissen Maße auch p-Hydroxybenzoesäure zwingend erforderlich war, konnten allein nach Zugabe von Shikimat in einer Lösung aus Minimalmedium kultiviert werden. Es wurde darüber hinaus beobachtet, dass Mutanten, bei denen die Synthese aromatischer Verbindungen in späteren Schritten des Stoffwechselweges blockiert ist, Shikimisäure anreichern. Wenig später wurden auch die metabolische Vorläufer Dehydroshikimat (Davies 1952) und Dehydroquinat (Davies 1953) identifiziert. Mit Hilfe von enzymatischen Studien wurde bestätigt, dass alle drei Substanzen metabolische Intermediate darstellen (Mitsuhashi *et al.* 1954, Yaniv & Gilvarg 1955) und somit auch erstmalig Shikimat-Dehydrogenase-Aktivität festgestellt. 1956 wurden erstmals auch Untersuchungen zu früheren Reaktionen im Shikimatweg veröffentlicht (Srinivasan *et al.* 1956). Anhand von Experimenten mit radioaktiv markierten Metaboliten (<sup>14</sup>C-Methode) konnte gezeigt werden, dass Shikimat aus Molekülen, die bei der Glykolyse und dem Pentosephosphatweg entstehen, hervorgeht. Endgültig aufgeklärt wurde der Shikimatweg ausgehend von Phosphoenolpyruvat und Erythrose-4-Phosphat zu den aromatischen Aminosäuren aber erst 1965 in *E. coli* (Sprecher *et al.* 1965, Pittard & Wallace 1965). Es konnte auch gezeigt werden, dass Shikimat von einigen Pilzen als alleinige Kohlenstoff- und

## 1 Einleitung

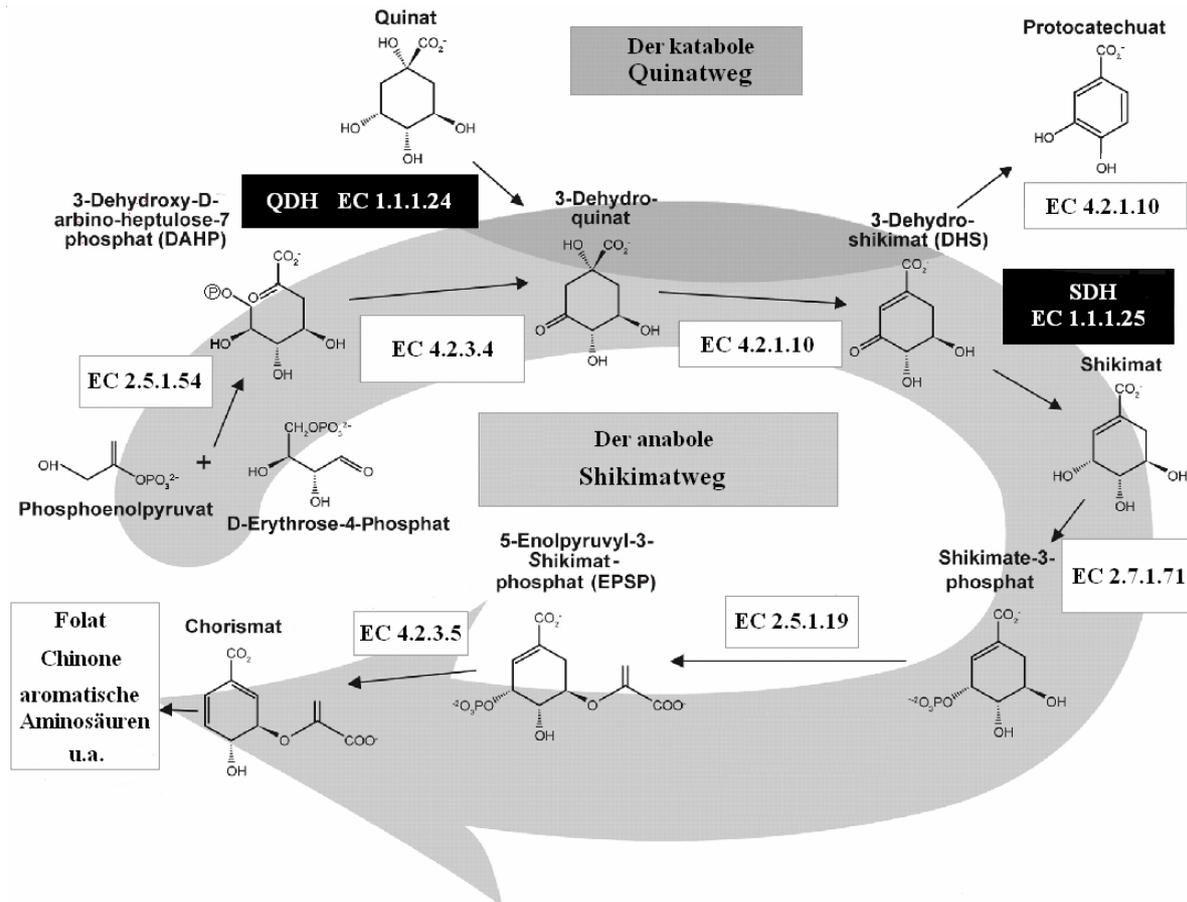
---

Energiequelle genutzt werden kann (Cain *et al.* 1968, Ahmed & Giles 1969). Hierfür benötigen die Organismen entsprechende Dehydrogenasen für Shikimat und Quinat, welche 1972 für den Schwarzschiimmel *Aspergillus niger* beschrieben worden sind (Cain 1972). Es war sehr naheliegend, dass man neben Bakterien und Pilzen auch in Pflanzen nach dem Shikimatweg suchte, da Shikimat und auch das chemisch ähnliche Quinat zuerst in Pflanzen entdeckt worden sind. Es wurde vielfach bis in die 80er Jahre angenommen, dass der Shikimatweg lediglich einen „Block“ zur Bildung aromatischer Aminosäuren darstellt. Allerdings wurde bereits 1955 entdeckt, dass Shikimat in Pflanzen ein Vorläufer in der Lignin-Biosynthese ist (Brown & Neish 1955). Etwa 15 Jahre später zeigten Dewick und Haslam (1969), auf welche Weise Gallussäure aus Shikimat hervorgehen kann. Daraufhin wurde in zahlreichen weiteren Arbeiten gezeigt, dass eine Vielzahl von Metaboliten mit Hilfe des Shikimatweges produziert werden kann.

# 1 Einleitung

## 1.2.3 Beschreibung des Shikimatstoffwechselweges

Der „Shikimatweg im engeren Sinne“ beschreibt die Reaktionsabfolge ausgehend von Phosphoenolpyruvat (PEP) und Erythrose-4-Phosphat (E4P) in sieben Schritten über Shikimat zu Chorismat (siehe Abb. 1.2).



**Abb. 1.2**

Der anabole Shikimatweg im engeren Sinne und der teilweise überlappende katabole Quinatweg. Im Shikimatweg werden Phosphoenolpyruvat und D-Erythrose-4-Phosphat in sieben enzymatischen Schritten zu Chorismat umgewandelt. Die Shikimat-Dehydrogenase (SDH) katalysiert den vierten Schritt. Quinat wird von der Quinat-Dehydrogenase (QDH) oxidiert und in zwei weiteren Schritten zu Protocatechuat transformiert. Im sogenannten  $\beta$ -Ketoadipatweg wird dieser Metabolit dann zu Acetyl-CoA und Succinyl-CoA abgebaut. (Abb. nach Lindner *et al.* 2005)

## 1 Einleitung

---

### *Schritt 1: PEP + E4P → DAHP*

Der erste Schritt des Shikimatweges, die praktisch irreversible „Schrittmacherreaktion“ (engl. *committed step*), besteht aus der Aldol-artigen Kondensation von Phosphoenolpyruvat und Erythrose-4-Phosphat. Dabei entsteht 3-desoxy-D-arabino-heptulose-7-Phosphat (DAHP). Als Grund für die Irreversibilität dürfte das hohe Phosphorylierungspotential von PEP mit  $\Delta G^\circ = -61,9 \text{ kJ mol}^{-1}$  (zum Vergleich:  $\text{ATP} \rightarrow \text{ADP} \Delta G^\circ = -30,5 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) beträchtlich beitragen (Streyer 1996). Katalysiert wird die Kondensation durch die DAHP-Synthase (EC 2.5.1.54, früher EC 4.1.2.1.15).

### *Schritt 2: DAHP → DHQ*

Im zweiten Schritt reagiert DAHP unter Abspaltung von Orthophosphat und  $\text{NAD}^+$ -Verbrauch zu der cyclischen Verbindung Dehydroquinat (DHQ). Dies erfordert eine spezifische Oxidation, eine  $\beta$ -Eliminierung, eine Reduktion und schließlich eine intramolekulare Aldolkondensation. Die Reaktion wird durch die 3-Dehydroquinat-Synthase (AroB, EC 4.6.1.3) katalysiert.

### *Schritt 3: DHQ → DHS*

Das Enzym Dehydroquinat-Dehydratase (AroD, EC 4.2.1.10, veraltet: Dehydroquinase) spaltet von DHQ Wasser ab, so dass Dehydroshikimat (DHS) entsteht. Das Enzym ist somit verantwortlich für die Initiierung der Aromatenbildung, indem sie die erste der drei erforderlichen Doppelbindungen einführt.

### *Schritt 4: DHS → SHK*

Der vierte Schritt besteht aus der reversiblen Hydrierung von DHS zu Shikimat (SHK). Das hierfür verantwortliche Enzym ist die Shikimat-Dehydrogenase (AroE, EC 1.1.1.25). Als Cosubstrat wird gewöhnlich NADPH verwendet. Da diese Enzyme zusammen mit den NAD-abhängigen Quinat-Dehydrogenasen den Schwerpunkt dieser Arbeit bilden, werden sie gesondert betrachtet (siehe Abschnitt 1.4).

### *Schritt 5: SHK + ATP → S3P + ADP*

Im fünften Schritt wird die Phosphorylierung von Shikimat unter ATP-Verbrauch zu Shikimat-3-Phosphat katalysiert.

## 1 Einleitung

---

### *Schritt 6: S3P + PEP → EPSP*

Im sechsten Schritt verbindet sich Shikimat-3-Phosphat mit Phosphoenolpyruvat unter Abspaltung von Orthophosphat zu 5-Enolpyruvylshikimat-3-Phosphat (EPSP). Diese Reaktion wird durch die EPSP-Synthase (AroA, EC 2.5.1.19) katalysiert.

### *Schritt 7: EPSP → CHA*

Durch die formale 1,4-Eliminierung von Orthophosphat am EPSP entsteht Chorismat (CHA). Diese Reaktion wird durch die CHA-Synthase (EC 4.6.1.4) katalysiert. Dieses Enzym führt damit die zweite Doppelbindung in die hydroaromatische Verbindung ein. Der Name „Chorismat“ leitet sich von dem griechischen Ausdruck „Gabel“ ab. Ausgehend von dieser Verbindung schließen sich verschiedenen Organismen eine große Vielzahl von möglichen Folgereaktionen an (Bentley 1990).

Der „Shikimatweg im weiteren Sinne“ führt ausgehend vom Phosphoenolpyruvat und Erythrose-4-Phosphat über Chorismat zu den „Endprodukten“ Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan, Chinonen, Fولات, Vitamin E und K, etc. Er ist kaum eindeutig definierbar, da die verschiedenen Organismen, in denen der Stoffwechselweg anzutreffen ist, hierüber die unterschiedlichsten Metaboliten synthetisieren. Hierzu zählen z.B. diverse sekundäre Pflanzenmetabolite, Mykotoxine oder Moleküle von Bakterien, die für die Speicherung und Transport von Eisenionen verantwortlich sind (Siderophoren). Man definiert daher den Shikimatweg in der Literatur häufig auch als „Rumpf“ (engl. *main trunk*) ausgehend von Phosphoenolpyruvat und Erythrose-4-Phosphat zu den aromatischen Aminosäuren (siehe Abb. 1.3). Dabei verzweigt sich der Syntheseweg erstmalig hinter dem Chorismat; es werden Prephenat und Anthranilat gebildet. Die Synthese von Phenylalanin und Tyrosin verläuft über die Prephenatroute, wobei eine weitere Verzweigung auftritt. Tryptophan wird dagegen über die Anthranilatroute gebildet.

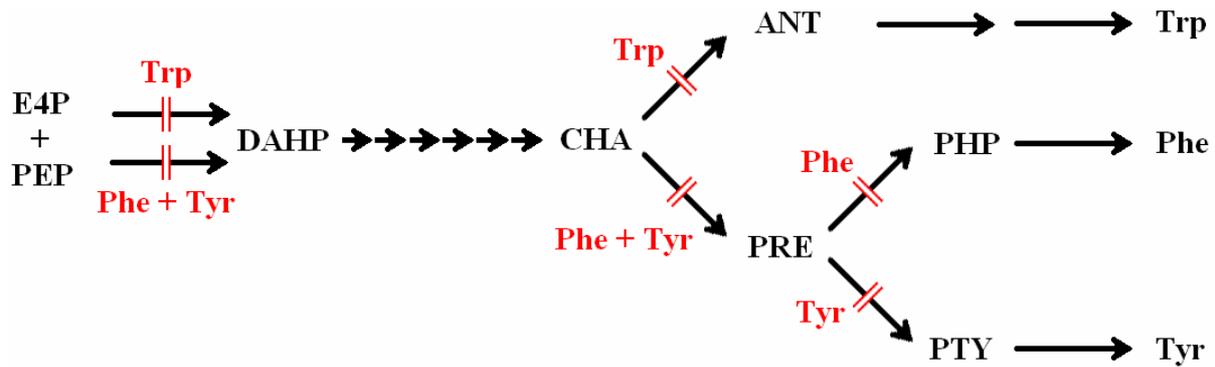
### 1.2.4 Regulation des Shikimatstoffwechselweges

Der Shikimatweg ist stark verzweigt und es ist offensichtlich, dass in den entsprechenden Organismen kein permanenter Bedarf an allen Endprodukte in konstantem Mengenverhältnis bestehen kann. Eine selektive Kontrolle der einzelnen Abzweigungen ist somit erforderlich, um eine Vergeudung von Material und Stoffwechselenergie zu verhindern. Dies gilt besonders für den Shikimatweg, denn die Synthese von 1 mol Tryptophan erfordert 78 mol ATP; bei Phenylalanin und Tyrosin sind es immerhin noch 65 bzw. 62 mol ATP. Dies ist etwa doppelt so viel Energie wie für die Synthese aller anderen Aminosäuren aufgewandt werden muss (Atkinson 1977). Hinzu kommt, dass Aminosäuren Stickstoff enthalten, der für Organismen – außer den „Stickstoff-Fixierern“ - in der Natur in biologisch verwertbarer Form nur in geringen Mengen vorhanden ist.

Zwar ist die Abfolge der Metabolite zumindest bei der Synthese der aromatischen Aminosäuren des Shikimatweges bei allen bisher in der Literatur beschriebenen Organismen gleich, jedoch gibt es zwischen Pro- und Eukaryoten große Unterschiede bezüglich der Regulation. So findet man in höheren Pflanzen fast ausschließlich Kontrolle auf transkriptioneller Ebene, wohingegen dieser Weg bei Mikroorganismen vor allem durch Enzyminhibition reguliert wird (Herrmann & Weaver 1999).

In *C. glutamicum* hemmt Tryptophan den ersten spezifischen Schritt seiner Synthese wie auch Phenylalanin und Tyrosin (siehe Abb. 1.3). Zusätzlich hemmen die beiden letztgenannten Aminosäuren gemeinsam ebenfalls die Synthese ihres ersten spezifischen Schrittes und eines von zwei Schrittmacherenzymen, eine DAHP-Synthase (Ikeda & Katsumata 1992). Es wurde eine weitere DAHP-Synthase annotiert (DDBJ) Diese Enzym gewährleistet möglicherweise, dass er Shikimatweg bei überschüssigem Phenylalanin und Tyrosin nicht vollständig zum Erliegen kommt. Eine *Feedback*-Regulation dieses Enzymes durch Tryptophan ist zwar bisher nicht nachgewiesen worden, sie ist jedoch naheliegend.

## 1 Einleitung



**Abb. 1.3**

Idealisiertes Schema zur Rückkopplungshemmung des doppelt verzweigten Rumpfes des Shikimatweges in *C. glutamicum*. Die aromatischen Aminosäuren können selektiv synthetisiert werden, indem der Mechanismus der kooperativen Rückkopplungshemmung und der der Inhibition multipler Enzyme koordiniert wird. Es gibt zwei DAHP-Synthasen, die die Schrittmacherreaktion katalysieren. Sie werden auf unterschiedliche Weise inhibiert. Weitere Erklärungen siehe Text. Neben den Standardabkürzungen für die aromatischen Aminosäuren wurden folgende Abkürzungen verwendet: ANT für Anthranilat, CHA für Chorismat, E4P für Erythrose-4-Phosphat, PEP für Phosphoenolpyruvat, PHP für Phenylpyruvat, PRE für Prephenat und PTY für Prätyrosin.

Die DAHP-Synthase in *E. coli* ist bezogen auf ihre Kontrollmechanismen im Shikimatweg das mit Abstand am besten charakterisierte Enzym. Im Wildtyp findet man anders als in *C. glutamicum* drei verschiedenen DAHP-Synthasen AroA, AroF und AroG. Jedes dieser Isoenzyme wird durch eine andere aromatische Aminosäure in Form einer negativen Rückkopplung allosterisch inhibiert (Akowski & Bauerle 1997, Ray & Bauerle 1991). AroF ist tyrosin-, AroG phenylalanin- und AroA tryptophansensitiv. Zudem inhibiert Tryptophan in beispielsweise *E. coli* die Anthranilat-Synthase, EC 4.1.3.27 (Baker & Crawford 1966), Phenylalanin in vielen Mikroorganismen die Arogenat-Dehydratase, EC 4.2.1.91, und in beispielsweise auch *C. glutamicum* Tyrosin die Prephenat-Dehydrogenase, EC 1.3.1.12 (Hagino & Nakayama 1974). Mit Hilfe eines solchen Inhibitionssystemes können Abzweigungen im Metabolismus bei der Synthese der aromatischen Aminosäuren selektiv abgeschaltet werden, ohne dass es zu einer größeren Anreicherung von Intermediaten kommt. Allerdings kann Tryptophan die AroA in *E. coli* nicht vollständig deaktivieren. Der Grund hierfür besteht möglicherweise darin, dass die Zelle sicherstellen muss, dass auch bei überschüssigen aromatischen Aminosäuren genügend Chorismat entstehen kann, um die Synthese anderer Metaboliten aus dem Shikimatweg zu gewährleisten (Hermann & Weaver 1999). In *Bacillus subtilis* wird die Synthese über den Mechanismus der sequentiellen *Feedback*-Kontrolle reguliert. Es werden dabei nur die ersten getrennten Schritte der Phenylalanin-, Tyrosin- bzw. Tryptophansynthese durch die entsprechenden Aminosäuren inhibiert. Sind alle drei Metabolite im Überschuss vorhanden, häufen sich Prephenat und

## 1 Einleitung

---

Chorismat an. Diese inhibieren wiederum die erste gemeinsame Reaktion und somit die DAHP-Synthase, wodurch der Shikimatweg schließlich vollständig abgeschaltet wird (Streyer 1996).

Es ist somit offenbar, dass sich in Bakterien unterschiedliche Mechanismen zur Lösung des Regulationsproblems, das bei verzweigten Stoffwechselwegen auftritt, evolutiv durchgesetzt haben.

Da aus Chorismat nicht nur die aromatischen Aminosäuren, sondern je nach Organismus noch eine Vielzahl weiterer Metaboliten synthetisiert werden, lässt sich vermuten, dass es weitere Regulierungsmöglichkeiten geben muss. Tatsächlich wurde in *E. coli* eine komplexe Transkriptionskontrolle für die Expression der drei Gene der DAHP-Synthasen beschrieben. Dennoch stellt die Rückkopplungshemmung quantitativ den Hauptregulierungsmechanismus *in vivo* dar (Ogino *et al.* 1982).

Schließlich soll noch erwähnt werden, dass die Aktivität der Enzyme des Shikimatweges, die die ersten beiden Schritte katalysieren, von divalente Kationen abhängt. (Baasov & Knowles 1989). Experimente mit dem Chelatbildner EDTA haben zumindest bei der Dehydroquinat-Synthase gezeigt, dass das Absinken des Enzymes bei niedriger Ionenkonzentration reversibel ist (Bender *et al.* 1989). Dieses Enzym wird zudem von einem Reaktionsprodukt, Orthophosphat, stimuliert (positive Rückkopplung) und es benötigt katalytische Mengen NAD (Herrmann & Weaver 1999).

Es lässt sich somit abschließend feststellen, dass die Regulation ausgesprochen komplex ist und möglicherweise noch nicht alle Regulationsmechanismen aufgeklärt worden sind.

### 1.3 Der Quinatstoffwechselweg

#### 1.3.1 Vorkommen und Bedeutung des Quinatstoffwechselweges

Der katabole Quinatstoffwechselweg (kurz Quinatweg) wurde bisher in diversen Bakterien und einigen Pilzen wie z.B. Hefen und anderen *Ascomyceta* beobachtet.

Der mikrobielle Abbau von aromatischen und hydroaromatischen Molekülen besitzt eine enorme praktische Bedeutung. Hierbei spielen nicht nur giftige Substanzen eine Rolle, die durch Kontamination in die Umwelt gelangen (z.B. Erdöl), sondern auch das komplexe Pflanzenpolymer Lignin, welches etwa 25% der Landbiomasse ausmacht. Wenn sich das Makromolekül zersetzt, entstehen auch Quinat bzw. Derivate, welche die Ausgangssubstanzen des Quinatweges darstellen. Die Verwertung dieses Zellwandstoffes und anderer pflanzlicher Aromaten macht daher eine entscheidende Komponente des Kohlenstoffkreislaufes auf der Erde aus (Harwood & Parales 1996).

#### 1.3.2 Entdeckung des Quinatstoffwechselweges

Der Abbau von Quinat hat schon seit Beginn des 20. Jahrhunderts das Interesse von Mikrobiologen erregt, lange bevor man begann, Untersuchungen über den Metabolismus organischer Verbindungen durchzuführen. 1911 listete Beijerinck mehrere Bakterien auf, die Quinat als alleinige Kohlenstoffquelle nutzen können. Er beobachtete ebenso die Bildung von Protocatechuat (3,4-Dihydroxybenzoat), die mit der Verfärbung des Eisen(III)-haltigen Bakterienmediums zu einem tiefen Rot oder Schwarz einher ging. Das von Beijerinck beobachtete Phänomen wurde seither vielfach beobachtet und man geht seitdem davon aus, dass Quinat zu Protocatechuat abgebaut wird (Kieslich 1976, Grund & Kutzner 1998).

#### 1.3.3 Beschreibung des Quinatstoffwechselweges

Die Abfolge der Metaboliten im Quinatweg ist relativ einfach und unverzweigt. Im ersten Schritt wird die Ausgangssubstanz Quinat von der NAD-abhängigen Quinat-Dehydrogenase (EC1.1.1.24) an der 3-Hydroxylgruppe dehydriert, so dass Dehydroquinat

## 1 Einleitung

---

entsteht (siehe Abb. 1.2). Neben der NAD-abhängigen Quinat-Dehydrogenase wurden auch sogenannte Quinoproteine (EC 1.1.99.25) beschrieben, die zwar ebenfalls Quinat oxidieren, aber Pyrrolochinolin-Chinon als Cosubstrat benötigen und membrangebunden sind (z.B. Kleef & Duine 1988). Der zweite Schritt im Quinat- ist mit dem dritten des Shikimatwegs identisch: Durch Wasserabspaltung am C1-Atom durch die Dehydroquinat-Dehydratase wird die erste Doppelbindung in das Ringsystem eingeführt. Schließlich trennen sich die beiden Stoffwechselwege wieder; Dehydroquinat wird am C5-Atom dehydriert; dies ist bei *C. glutamicum* vermutlich das gleiche Enzym. Um zum Endprodukt des Quinatweges zu gelangen, muss das Dehydroshikimat am C3-Atom hydriert werden. Wahrscheinlich geschieht dies durch eine nichtenzymatische Reaktion, eine Keto-Enol-Tautomerie, wobei das Gleichgewicht hier auf der Seite des Aromaten liegt. Ein entsprechendes Enzym lässt sich in *C. glutamicum* (Februar 2006) mittels bioinformatischer Annotation nicht finden (DDBJ, persönliche Mitteilung Dr. Jens Warfsmann).

Schließlich soll noch die seit über 100 Jahren bekannte Tatsache erwähnt werden, dass Altweltaffen (*Catarrhini*) einschließlich des Menschen Quinat zur Hippursäure transformieren können. Experimente mit Rhesusaffen, deren Darmbakterien mit Antibiotika supprimiert worden sind, zeigen einen Abbau von Quinat via Dehydroquinat, Dehydroshikimat, Shikimat, zu schließlich Benzoat und Hippurat (Bentley 1990).

### 1.3.4 Regulation des Quinatstoffwechselweges

Obwohl Quinat in der Natur vielfach in großer Menge vorhanden ist, kann die Substanzmenge wegen des gehäufteten Auftretens im Laub und vielen Früchten stark von der Jahreszeit abhängen und somit deutlich variieren. Zumindest für das Bodenbakterium *C. glutamicum* gibt es offenbar Substrate, die ein schnelles Wachstum stärker begünstigen als Quinat (Choorapoikayil 2006). Es mag für den Organismus daher sinnvoll erscheinen, die Gene für die Enzyme, die den Abbau von Quinat codieren, auf einem Operon zu organisieren (siehe auch Abschnitt 1.4.3), das sowohl negativ als auch positiv kontrolliert wird. Somit drängt sich ein Vergleich mit dem *lac*-Operon auf (Jacob & Monod 1961)

Am besten ist die Regulation des Quinatwegs in gram-negativen Bakterien der Gattung der *Acinetobacteriae* untersucht. Die Gene, welche die Enzyme für die ersten drei Schritte des Quinatwegs codieren (*qui*-Gene), wurden hier in der Nähe eines Genes charakterisiert, welches möglicherweise ein Porin codiert (Elsemore & Ornston 1995). Zusammen mit den

## 1 Einleitung

---

Genen für die  $\beta$ -Oxidation geradkettiger Dicarboxylsäuren (*dca*-Gene), den Genen für den Protocatechuat-Abbau zu Succinyl- und Acetyl-CoA (*pca*-Gene), den Genen, die an der Umwandlung von p-Hydroxybenzoat zu Protocatechuat beteiligt sind (*pob*-Gene) und den Genen für den Hydroxycinnamat bilden sie einen chromosomalen *dca-pca-qui-pob-hca*-Supraoperongcluster. Dieser besitzt die Kapazität, diverse Pflanzenprodukte abzubauen, welche hauptsächlich in den  $\beta$ -Ketoacidstoffwechselweg eingeschleust werden (Kowalchuk *et al.* 1994, Parke & Ornston 2003, Smith *et al.* 2003).

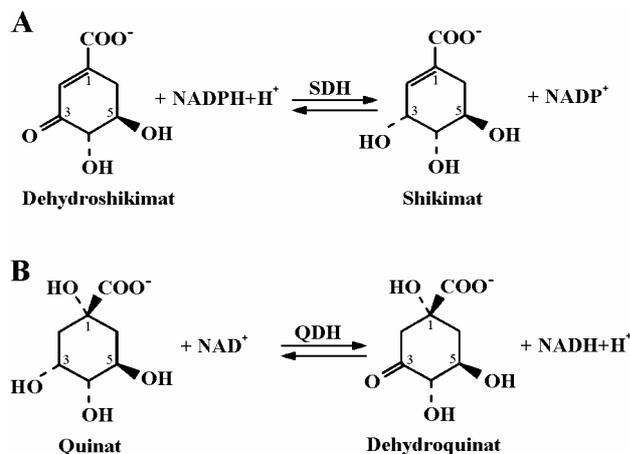
Innerhalb der offenen Leseraster der Shikimat/Quinat-Dehydrogenasen von *C. glutamicum* lässt sich aber ein derartiger Gencluster nicht finden (DDBJ), womit offensichtlich ist, dass es nicht nur beim Shikimat-, sondern auch beim Quinatweg unterschiedliche Regulationsmechanismen innerhalb der Prokaryota geben muss.

### 1.4 Shikimat/Quinat-Dehydrogenasen

Verschiedene Arbeitsgruppen (z.B. DDBJ, hauseigene Annotationen) haben mit bioinformatischen Methoden drei offene Leseraster in *C. glutamicum* ausgemacht, die vermutlich Shikimat-Dehydrogenasen bzw. Shikimat/Quinat-Dehydrogenasen (S/QDH) kodieren. Die Bezeichnung für die potentiellen offenen Leseraster aus der DDBJ wird durch eine eigene Nomenklatur ersetzt bzw. ergänzt: *Cgl0424* kodiert *CglQDH*, *Cgl1629* kodiert *CglAroE* und *Cgl1132* kodiert *CglSDH-L*.

#### 1.4.1 Reaktionen & Metabolite

Shikimat-Dehydrogenasen katalysieren unter NADPH-Verbrauch die stereospezifische Hydrierung von 3-Dehydroshikimat zu Shikimat (siehe Abb. 1.4A). Dagegen katalysieren Quinat-Dehydrogenasen (QDH) die Dehydrierung von Quinat zu 3-Dehydroquinat, wobei sie  $\text{NAD}^+$  verbrauchen (siehe Abb. 1.4B). Auf die zu diesen Enzymen gehörigen Metabolite wird in den folgenden Kapiteln näher eingegangen.



**Abb. 1.4**

Die Metabolite der S/QDH.

(A) Die Shikimat-Dehydrogenase (SDH) reduziert *in vivo* Dehydroshikimat stereospezifisch zu Shikimat unter NADPH-Verbrauch.

(B) Die Quinat-Dehydrogenase (QDH) oxidiert *in vivo* Quinat zu Dehydroquinat unter  $\text{NAD}^+$ -Verbrauch.

Beide Reaktionen sind reversibel.

## 1.4.1.1 Shikimisäure / Shikimat

Die Shikimisäure (3R, 4S, 5R-Trihydroxy-1-cyclohexen-1-carbonsäure) wurde erstmalig im Jahre 1885 aus den giftigen Früchten des Japanischen Sternanis (*Illicium religiosum*, synonym *Illicium anisatum*, japanisch: *shikimi-no-ki*) isoliert und identifiziert (Eykmann 1891). Ihre Konfiguration und Konstitution wurde in den 30er Jahren von Fischer und Dangschat (1934, 1935, 1937) aufgeklärt. Später zeigen Kernresonanzspektroskopie-Experimente (NMR), dass das Molekül eine Halbsesselkonformation besitzt (Hall 1964). Genauere Untersuchungen bezüglich der Koordinaten der Atome und somit auch der Bindungslängen und  $\angle$ -Winkel wurden von Abell und Mitarbeitern 1988 mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse durchgeführt.

Die Säure besitzt einen  $\text{pK}_\text{S}$ -Wert von 4,15 bei 14,1°C (Römpp Naturstofflexikon). Die Salze der Shikimisäure werden als Shikimate bezeichnet. Heute verwendet man die Shikimisäure vor allem zur Synthese von Pharmazeutika wie z.B. der Neuraminidase-Inhibitor Oseltamivirphosphat (Tamiflu<sup>®</sup>). Die Shikimisäure wird heute in erster Linie aus der chinesischen Sternanisart *Illicium verum*, einer ungiftigen Gewürzpflanze, isoliert. 30 kg dieser Pflanze liefern 1 kg Shikimisäure. Da diese Pflanze jedoch nur in bestimmten Hochlandregionen Chinas wächst und sehr schwer zu kultivieren ist, wird diese Substanz beispielsweise von dem Unternehmen Roche nicht nur importiert, sondern zusätzlich fermentativ mittels gentechnisch veränderten *E. coli*-Zellen produziert. Die Shikimisäure kommt auch in Fichten- und Kiefernadeln in größeren Mengen vor; das kanadische Unternehmen Biolyse Pharma Corporation plant, sie aus alten Weihnachtsbäumen zu isolieren

## 1 Einleitung

---

(Stern Shortnews 2.1.2006, Email-Mitteilung von John R. Fulton, Vizepräsident der Biolyse Pharma Corporation).

### 1.4.1.2 Dehydroshikimisäure / Dehydroshikimat

Die Dehydroshikimisäure ((4S)-trans-4,5-Dihydroxy-3-oxo-1-cyclohexencarbonsäure) wurde erstmals 1952 von Davies aus Kulturfiltraten von *E. coli*-Mutanten isoliert. Die Struktur war durch die Ähnlichkeit zur Shikimisäure bereits bekannt. Mit Hilfe der NMR-Spektroskopie wurde 20 Jahre später die Halbsesselkonformation des Moleküls gezeigt (Thompson & Haslam 1974). Die Atomkoordinaten wurden mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse bestimmt. Die Dehydroshikimisäure ist bis heute aus diversen Bakterien, Pilzen und Pflanzen isoliert worden.

### 1.4.1.3 Chinasäure / Quinat

Die Chinasäure (1 $\alpha$ , 3 $\alpha$ , 4 $\alpha$ , 5 $\beta$ -Tetrahydroxycyclohexan-1-carbonsäure) wurde als eines der ersten organischen Pflanzenprodukte bereits im Jahre 1790 von Hofman entdeckt (Abell 1988). Sie kommt in Pflanzen hauptsächlich als freie Säure oder in veresterter Form vor; bei höheren Pflanzen (*Spermatophyta*) besteht die Trockenmasse von Laub zu ca. 2% bis 10% aus Quinat bzw. Quinatderivaten (Bentley 1990).

Die Molekülstruktur einschließlich der absoluten Konfiguration wurde in den 30er Jahren aufgeklärt (Fischer & Dangschat 1932, 1937). Haslam & Turner (1971) zeigten, dass das Molekül in Lösung eine Sesselkonformation besitzt. Kristallographische Analysen wurden schließlich durchgeführt, um die einzelnen Atomkoordinaten exakt zu bestimmen. (Abell *et al.* 1988b)

Bei 25°C beträgt der pK<sub>S</sub>-Wert 3,58. Die Chinasäure wird heutzutage gelegentlich zur Racemattrennung verwendet (Römpp-Naturstofflexikon).

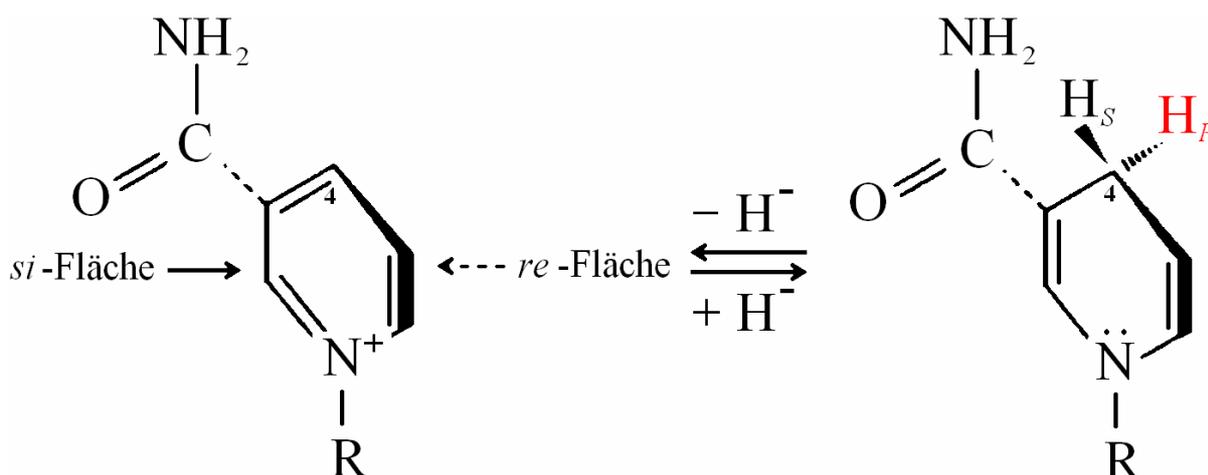
## 1.4.1.4 Dehydrochinasäure / Dehydroquinat

Die Dehydrochinasäure ((1R)-(1 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,4 $\alpha$ )-1,3,4-Trihydroxy-3-oxo-cyclohexan-carbonsäure) wurde kurz nach der Entdeckung von Dehydroshikimat von Davis und Mingioli (1953) in Kulturfiltraten von *E. coli* gefunden. Sie besitzt eine molekulare Masse von 190,15 Da.

Im folgenden werden die vier Metaboliten nur noch als Basen bezeichnet (Shikimat, Quinat, etc.).

## 1.4.1.5 Die Cosubstrate NAD und NADP

Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid (NAD) ist ein wichtiger Elektronenakzeptor bei oxidativen Prozessen im Zellstoffwechsel. Er besitzt somit – von einigen Ausnahmen abgesehen – katabole Funktion. Der reaktive Teil des NAD ist das C4-Atom des Nicotinamidringsystems. Bei der Oxidation eines Substrates nimmt es stereospezifisch ein Proton und zwei Elektronen auf, was einem Hydridion entspricht, wodurch NADH entsteht (siehe Abb. 1.5).



**Abb. 1.5**

Der Nikotinsäureamidring des NAD(P)s. Er besitzt zwei mögliche Angriffsflächen für ein Substrat: die *si*- und die *re*-Fläche. Die beiden Wasserstoffatome am C4-Atom der reduzierten Form des Ringes sind diastereotop. Bei der enzymatischen Katalyse der Shikimat/Quinat-Dehydrogenasen greift das Substrat jeweils die *re*-Fläche an. Das H<sub>R</sub>-Atom wird entweder vom NAD<sup>+</sup>-Ion aufgenommen (mit Quinat als Substrat) bzw. vom NADPH abgegeben (mit Dehydroshikimat als Substrat).

## 1 Einleitung

---

Bei dieser Dehydrogenierung wird brutto ein Hydridion direkt von dem zu oxidierenden Substrat entfernt; das Proton der Hydroxylgruppe wird an die Umgebung abgegeben.

In anabolen Prozessen sind die Ausgangs- und Zwischenprodukte meist höher oxidiert als ihre Folge- und Endprodukte. Daher wird bei Biosynthesen in der Regel neben einem energieliefernden Molekül, meistens ATP, oft auch ein schnell verfügbares Reduktionsäquivalent benötigt, welches oft Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotidphosphat (NADPH) ist. Die zusätzliche Phosphatgruppe, die mit der Hydroxylgruppe am C2'-Atom der Adenosylgruppe verestert ist, stellt einen Marker dar, der das Molekül zu anabolen Reaktionen dirigiert.

Obgleich sich NAD und NADP rein chemisch nur geringfügig voneinander unterscheiden und ihr Standard-Redoxpotential,  $E^{\circ}$ , demnach auch gleich ist ( $\text{NAD(P)}^+ + \text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightleftharpoons \text{NAD(P)H}$ ,  $E^{\circ} = -0,32 \text{ V}$ ), kommen ihnen doch *in vivo* meistens vollkommen unterschiedliche Funktionen zu (Streyer 1996).

In der Zelle liegt ein labiles Fließgleichgewicht zwischen den beiden Cosubstraten vor. Dies wird durch die NAD(P)-Transhydrogenase gewährleistet. Dieses integrale Membranprotein katalysiert den stereospezifischen Transfer eines Hydridions von NAD zu NADP:



Die Aktivität des Enzymes ist zumeist an die protonenmotorische Kraft der Zelle gekoppelt. Je größer die Potentialdifferenz des Protonengradienten ist, desto schneller werden Hydridionen vom NADH auf das  $\text{NADP}^+$  übertragen (Hatefi & Yamaguchi 1996).

### 1.4.2 Einteilung der Shikimat/Quinat-Dehydrogenasen

S/QDH zählen zur Superfamilie der Oxidoreduktasen, die NAD oder NADP als Cosubstrat benötigen (EC 1.1.1.x). Diese Superfamilie wird in verschiedene Gruppen unterteilt. Hierzu zählen die kurzkettigen (Persson *et al.* 1991), die mittellangkettigen (Jörnvall *et al.* 1981), die langkettigen (Inoue *et al.* 1989), die eisenaktivierten Alkohol-Dehydrogenasen sowie die Aldoketoreduktasen (Wilson *et al.* 1992). Zumindest die bakteriellen S/QDH lassen sich

## 1 Einleitung

---

jedoch in keine dieser Familien problemlos einordnen, so dass es sinnvoll erscheint, ihnen eine eigene zuzuteilen.

Die bekannten bakteriellen S/QDH unterscheiden sich bezüglich ihrer kinetischen Eigenschaften. Es sind in der Literatur bisher mindestens drei verschiedene Formen beschrieben worden:

### **I. Shikimat-Dehydrogenase oder AroE (EC 1.1.1.25)**

Diese „klassische“ Shikimat-Dehydrogenase besitzt eine hohe Substrat- und Cosubstratspezifität, d.h., es werden praktisch nur Shikimat und  $\text{NADP}^+$  bzw. Dehydroshikimat und  $\text{NADPH}$  umgesetzt.

### **II. Shikimat-Dehydrogenaseartige oder SDH-L (EC 1.1.1.25)**

Die SDH-L (engl. *shikimate dehydrogenase-like*) aus dem Mikroorganismus *Haemophilus influenzae* unterscheidet sich bezüglich ihrer kinetischen Eigenschaften lediglich von der AroE dadurch, dass sie einige Größenordnungen langsamer ist (siehe Tab. 1.1). Nach Meinung von Singh *et al.* (2005) ist es nicht auszuschließen, dass Dehydroshikimat nicht das natürliche Substrat darstellt.

### **III. Shikimat/Quinat-Dehydrogenase oder YdiB (EC 1.1.1.282)**

Bei YdiB aus *E. coli* wurde sowohl eine signifikante enzymatische Aktivität mit Shikimat als auch mit Quinat bzw mit  $\text{NADP}^+$  als auch mit  $\text{NAD}^+$  gemessen (Benach *et al.* 2003, siehe Tab. 1.1).

### **IV. Quinat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.24)**

Die einzige bakterielle  $\text{NAD}^-$  abhängige Quinat-Dehydrogenase wurde in einer Mutante von *Klebsiella aerogenes* (früher auch *Aerobacter aerogenes*) beschrieben. Das Enzym war sowohl spezifisch für Quinat als auch für  $\text{NAD}^+$ . Es ließ sich aber keine Oxidation von Shikimat oder Reduktion von  $\text{NADP}^+$  nachweisen (Davis *et al.* 1955). Da die Primär- und die Tertiärstruktur unbekannt sind, können keine weiteren Aussagen über die etwaige 3D-Struktur

## 1 Einleitung

dieses Enzymes gemacht und somit auch nicht die Zugehörigkeit zur S/QDH-Familie eindeutig festgestellt werden.

In Eukaryota sind Quinat-Dehydrogenasen beschrieben worden, die neben Quinat auch Shikimat dehydrieren können (Cain 1972, Barea & Giles 1978).

**Tab. 1.1:** Kinetische Parameter S/QDH aus Prokaryoten und Archeen. Es wurden folgende Abkürzungen verwendet: *Eco* für *Escherichia coli*, *Afu* für *Archaeoglobus fulgidus*, *Mtu* für *Mycobacterium tuberculosis*, *Hin* für *Haemophilus influenzae* und *Kae* für *Klebsiella aerogenes*. Substrate, die in Klammern angegeben sind, wurden im Überschuss eingesetzt.

Organismus Enzym	Substrat	$k_{cat}$ [s <sup>-1</sup> ]	$K_M$ [μM]	$k_{cat}/K_M$ [s <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> ]
<i>Eco</i> AroE	Shikimat	237	65	3646
<i>Eco</i> AroE	NADP <sup>+</sup>	237	56	4232
<i>Afu</i> AroE	Shikimat	323	170 ± 0,03	1900
<i>Afu</i> AroE	NADP <sup>+</sup>	361	190 ± 0,01	1900
<i>Afu</i> AroE	NAD <sup>+</sup>	0,718	11400 ± 0,40	63,0 x 10 <sup>-6</sup>
<i>Mtu</i> AroE	Dehydroshikimat	41,5 ± 2,0	31 ± 2	1340
<i>Mtu</i> AroE	NADPH	45,0 ± 2,0	10 ± 1	4500
<i>Mtu</i> AroE	Shikimat	8,20 ± 0,50	50 ± 0	164
<i>Mtu</i> AroE	NADP <sup>+</sup>	22,0 ± 0,30	22 ± 2	1000
<i>Eco</i> YdiB	Shikimat (NADP <sup>+</sup> )	0,167	120	1,39
<i>Eco</i> YdiB	Shikimat (NAD <sup>+</sup> )	0,050	20	2,50
<i>Eco</i> YdiB	Quinat (NADP <sup>+</sup> )	0,050	555	0,909
<i>Eco</i> YdiB	Quinat (NAD <sup>+</sup> )	0,050	41	12,2
<i>Eco</i> YdiB	NADP <sup>+</sup> (Quinat)	0,167	100	1,67
<i>Eco</i> YdiB	NADP <sup>+</sup> (Shikimat)	0,050	500	0,100
<i>Eco</i> YdiB	NAD <sup>+</sup> (Quinat)	0,050	87	0,575
<i>Eco</i> YdiB	NAD <sup>+</sup> (Shikimat)	0,050	116	0,431
<i>Hin</i> SDH-L	Shikimat	0,2	234 ± 14	0,855
<i>Hin</i> SDH-L	NADP <sup>+</sup>	0,2	37 ± 6	5,40
<i>Kae</i> QDH	Quinat	X	490	X
<i>Kae</i> QDH	NAD <sup>+</sup>	X	14	X

## 1 Einleitung

### 1.4.3 Verteilung der Gene im Genom von *C. glutamicum*

Die Gene der S/QDH von *C. glutamicum* sind über das gesamte Bakterienchromosom verteilt (siehe Tab. 1.2).

**Tab. 1.2:** Lage der drei S/QDH-Gene im Chromosom von *C. glutamicum*. Es wurde die Annotation der DDBJ verwendet. Das Gen der *Cg*/QDH liegt offensichtlich auf einem Operon. Bei den beiden anderen S/QDH ist dies nicht so eindeutig.

Protein-bezeichnung	Kategorie	Genom-position
Transkriptionsregulator	regulatorisches Protein	442482-441598 -
Permease	Transport-/Bindeprotein	442758-444161 +
Zuckerphosphat-Epimerase	DNA-Metabolismus	444185-446041 +
Dehydroquinat-Dehydratase	Aminosäuresynthese	446075-446524 +
<b><i>Cg</i>/QDH</b>	<b>Aminosäuresynthese</b>	<b>446538-447389 +</b>
?	hypothetisches Protein	447670-447395 -
?	Zellmembran	1171206-1171874 +
?	hypothetisches Protein	1172462-1171866 -
Pyruvat-/ 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase	Energiemetabolismus	1176271-1172498 -
ABC-Transporter	Transport- und Bindeprotein	1180048-1176305 -
hypothet. Membranprotein	hypothetisches Protein	1180837-1180118 -
<b><i>Cg</i>/SDH-L</b>	<b>Aminosäurebiosynthese</b>	<b>1181675-1180869 -</b>
Carboxylesterase Typ B	Fettsäure- & Phospholipid-Metabolismus	1181993-1183606 +
ABC-Transporter Typ II	Transport- und Bindeprotein	1723826-1724581 +
<b><i>Cg</i>/AroE</b>	<b>Aminosäurebiosynthese</b>	<b>1725439-1724609 -</b>
periplasmalösliches Bindeprotein?	hypothetisches Protein	1726625-1725456 -
Resolvase ?	hypothetisches Protein	1727170-1726622 -
Alanyl-tRNA-Synthetase	Proteinbiosynthese	1730048-1727382 -
ATPase ?	unbekannte Funktion	1731542-1730163 -
?	hypothetisches Protein	1732822-1731596 -
Aspartyl-tRNA-Synthetase	Proteinbiosynthese	1734811-1732985 -
Metalloprotease ?	hypothetisches Protein	1735056-1735949 +

Das offene Leseraster der *Cg*/QDH liegt unmittelbar in der Nähe eines Dehydroquinat-Dehydratase Gens. Beide sind von einer kurzen, 13 Basenpaare (bp) umfassenden intergenischen Region getrennt. Sie verlaufen zudem in die gleiche Richtung. Zwar sind die Orientierung der ORFs und die Größe der intergenischen Region nicht allein entscheidende Parameter für die Zugehörigkeit zu einem Operon, jedoch die Tatsache, dass S/QDHs und Dehydroquinat-Dehydratasen an dem/den gleichen Stoffwechselweg/en beteiligt ist/sind, macht es sehr wahrscheinlich, dass die beiden ORFs auf einem Operon liegen.

Bei dem einer weiteren *Cg*/SDH-L-ORF lässt sich kaum eine Voraussage machen, ob es Teil eines Operons ist. Die intergenische Region zu einem in gleicher Richtung positioniertem ORF, das eventuell ein Membranprotein codiert, beträgt immerhin 33 bp.

## 1 Einleitung

---

Der Abstand des *CglAroE*-Gens und des benachbarten auf dem gleichen DNA-Strang beträgt nur 18 bp. Wird berücksichtigt, dass auch DNA-kodierende Sequenzen in Bakterien mit Promotorsequenzen überlappen können, ist eine Organisation der Gene in einem Operon möglich.

### 1.4.4 Monomere, Dimere, ...

In den Schlauchpilzen (*Ascomyceta*) *Neurospora crassa* und Hefen sind fünf der sieben an der Synthese vom Chorismat beteiligten Enzyme als Multienzymkomplex, dem AROM-Enzymkomplex, organisiert (AroB, AroD, AroE, AroK und AroA). Er besteht aus zwei identischen, pentafunktionalen Polypeptidketten mit einem Molekulargewicht von etwa 165 kDa (Coggins *et al.* 1987). In Pflanzen findet man die „klassische“ Shikimat-Dehydrogenase, AroE in einem bifunktionalen Enzymkomplex zusammen mit der Dehydroquinat-Dehydratase (Coggins *et al.* 1985). In Bakterien und Archaea liegen S/QDH als Monomere oder Homodimere vor (z.B. Singh *et al.* 2003, Chaudhuri & Coggins 1985).

### 1.4.5 Supersekundär- und Tertiärstruktur

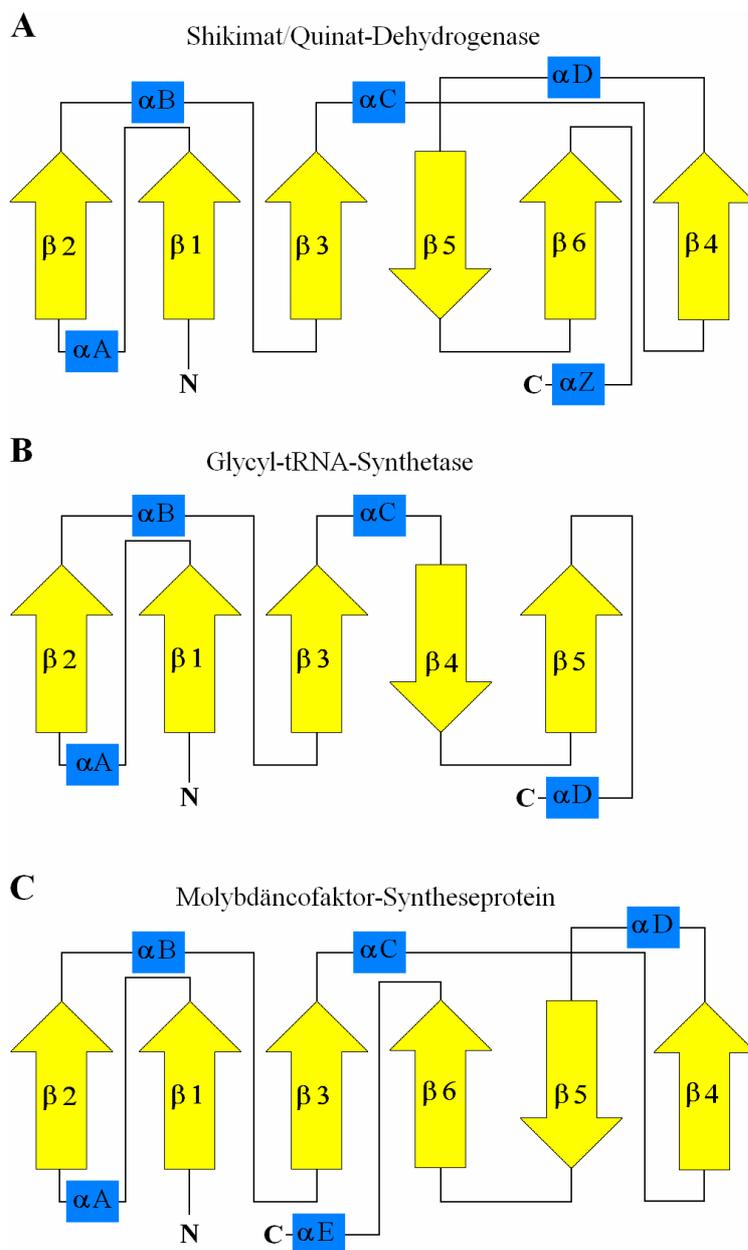
Die Enzyme dieser Strukturfamilie bestehen aus einer N- und einer C-terminalen Strukturdomäne. Sie werden von zwei  $\alpha$ -Helices miteinander verbunden. Zwischen den Domänen klafft eine tiefe Furche, die das aktive Zentrum beinhaltet (Benach *et al.* 2003).

Die N-terminale Domäne ist verantwortlich für die Katalyse und, falls das Protein als Homodimer vorliegt, auch für die Dimerisierung. Die Domäne besteht aus zwei Abschnitten auf der Polypeptidkette; der erste besteht aus N-terminalen Residuen, das zweite aus einigen Aminosäureresten am Carboxylende. Im Zentrum der Domäne befinden sich sechs  $\beta$ -Faltblätter mit der Strangordnung  $\beta_2$ - $\beta_1$ - $\beta_3$ - $\beta_5$ - $\beta_6$ - $\beta_4$ . Nur  $\beta_5$  verläuft antiparallel zu den anderen  $\beta$ -Faltblättern. Umgeben werden sie von  $\alpha$ -Helices und bei einigen Proteinen auch von einer  $3_{10}$ -Helix. Die Domäne bildet ein offenes  $\alpha$ - $\beta$ - $\alpha$ -Sandwich, das sich in dieser Form bisher als einzigartig herausgestellt hat. Ähnliche Faltungsmotive wurden bisher nur in der Glycyl-tRNA-Synthetase (PDB-Code 1ATI) und in einem Enzym, das an der Synthese eines Molybdän-Cofaktors (MogA, PDB-Code 1DI6) beteiligt ist (siehe Abb. 1.6).

# 1 Einleitung

Die C-terminale oder Cosubstratbindungsdomäne besteht aus sechs parallelen  $\beta$ -Faltblättern, der Strangordnung  $\beta 9$ -  $\beta 8$ -  $\beta 7$ -  $\beta 10$ -  $\beta 11$ -  $\beta 12$ . Sie sind so von vier  $\alpha$ -Helices und bei manchen Enzymen auch  $3_{10}$ -Helices umgeben, dass sich wiederum eine *Sandwich*-artige  $\alpha$ - $\beta$ - $\alpha$ -Struktur ergibt. Gemäß Definition der SCOP-Datenbank handelt es sich hier um eine klassische Rossmann-Faltung.

Auf Grund der beiden ähnlichen Faltungsdomänen kann man bei dieser Proteinfamilie auch von einer intramolekularen Pseudosymmetrie sprechen.



**Abb. 1.6**

Topologievergleiche

A) N-terminale Substrat-Bindungsdomäne der S/QDH.

B) C-terminale Domäne der glycyl-tRNA-Synthetase.

C) Molybdän-Cofaktor-Biosyntheseprotein MogA

$\beta$ -Faltblätter sind in gelb und  $\alpha$ -Helices in blau dargestellt. Etwaige  $3_{10}$ -Helices sind nicht gezeigt, da sie in den S/QDH mit unterschiedlichen Häufigkeiten auftreten und somit nicht als charakteristische Elemente betrachtet werden können.

### 1.4.6. Bindungsmodus von NAD(P)

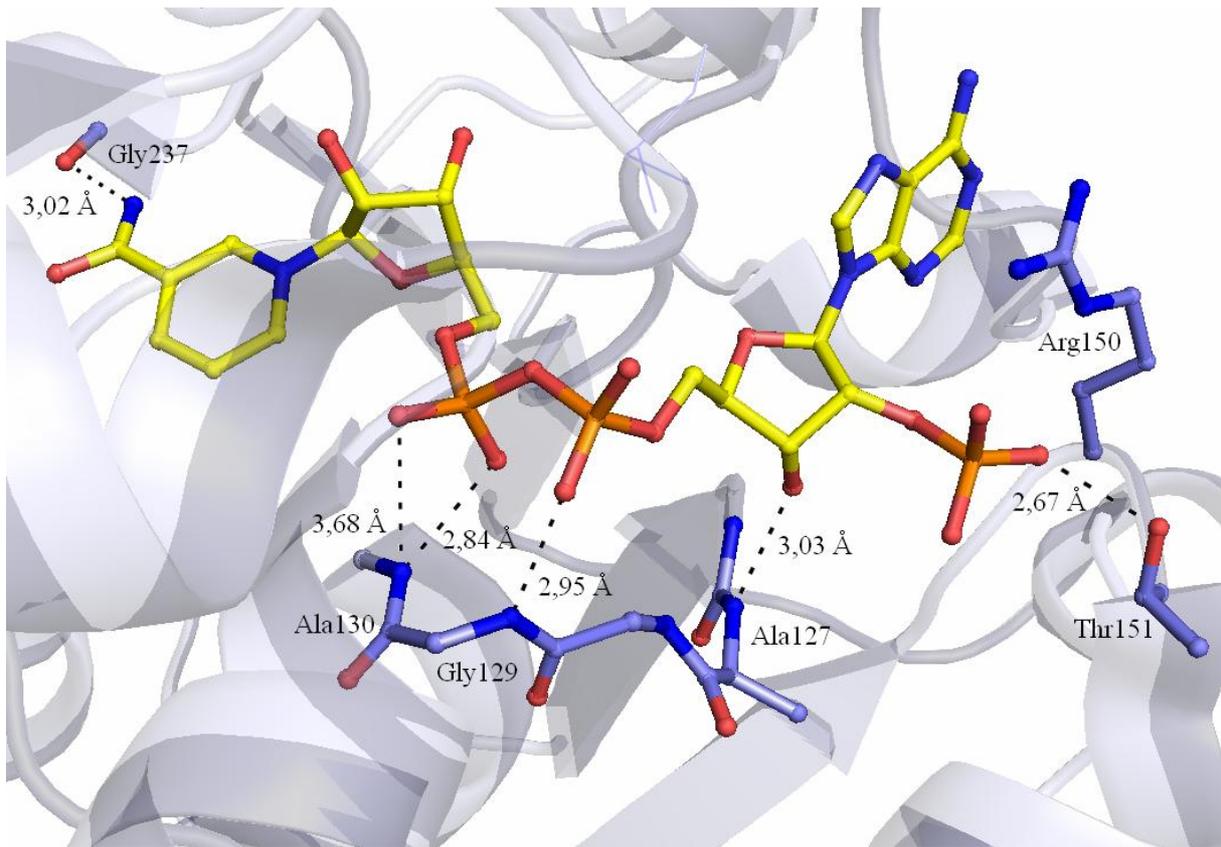
Die Positionierung des Cosubstrates scheint bei allen Proteinen aus der S/QDH-Familie analog abzulaufen (Ye *et al.* 2003). Alle NAD(P)s in S/QDH zeigten anti-Konformation. Das Cosubstrat wird vom Protein so gebunden, dass die Hydridübertragung R-stereospezifisch abläuft (siehe Abb. 1.5) (Benach *et al.* 2003, Michel *et al.* 2003, Ye *et al.* 2003).

Der Hauptketten-Sauerstoff eines hochkonservierten Glycins im C-terminalen Bereich der Proteine bildet eine Wasserstoffbrücke mit der Aminogruppe des Nikotinsäurerings aus und trägt so zur richtigen Orientierung desselben bei (siehe Abb. 1.7).

Die Erkennung des richtigen Cosubstrates erfolgt bei NADP-abhängigen Dehydrogenasen im allgemeinen mit Hilfe eines konservierten Arginins, dessen Seitenkette mit den Elektronen im Ringsystem des Adenosins interagiert sowie einem Serin oder Threonin, das die Phosphorylgruppe am C2'-Atom der Adenosylribose bindet (Lesk 1995). Diese Verallgemeinerung gilt auch für die Enzyme AroE und SDH-L (Michel *et al.* 2003, Singh *et al.* 2005). Dagegen ist bei YdiB, die sowohl NADP als auch NAD binden kann, das Serin bzw. Threonin durch einen Aspartatrest substituiert. Die geladene Seitenkette kann Wasserstoffbrückenbindungen zu der 2'- und der 3'-Hydroxylgruppe der Adenosylribose ausbilden und so NAD stabil binden. Damit YdiB NADP binden kann, reicht offenbar die Interaktion des Arginins mit dem Adeninring aus. NAD-abhängige Dehydrogenasen binden ihr Cosubstrat im allgemeinen mit Hilfe eines konservierten Aspartats (Lesk 1995). Eine Proteinstruktur einer solchen S/QDH ist bisher nicht bekannt, so dass noch nicht geklärt werden konnte, ob diese Verallgemeinerung auch für diese Proteinfamilie gilt.

Man findet in S/QDH eine charakteristische Schlaufe mit der Aminosäuresequenz GX/AGGX/A. Sie interagiert mit dem Diphosphat des Cosubstrates und sorgt für eine leichte Krümmung, was für NAD(P)-abhängige Dehydrogenasen unüblich ist (Ye *et al.* 2003).

Schließlich findet man ein konserviertes Threonin und ein semikonserviertes Methionin in der C-terminalen Domäne, die vermutlich mit der Ribose des Nikotinamidmononukleotids interagieren.



**Abb. 1.7**

Bindung von NADP (gelb) an die AroE von *E. coli* (blau). Das konservierte Glycin237 geht eine Wasserstoffbrückenbindung mit der Carbonsäureamidgruppe des Proteins ein und trägt dazu bei, den Nikotinamidringes optimal zu positionieren. Die glycinreiche Schlaufe des Enzyms bindet das Diphosphat und sorgt für eine Biegung des NADPs. Das Threonin151 bindet die Phosphorylgruppe am C2'-Atom der Adenosylribose und trägt somit zur Differenzierung zwischen NADP und NAD bei. Die Seitenkette des Arginins150 interagiert mit den  $\pi$ -Elektronen des Purinrings.

## 1.4.7 Bindungsmodus des Shikimates

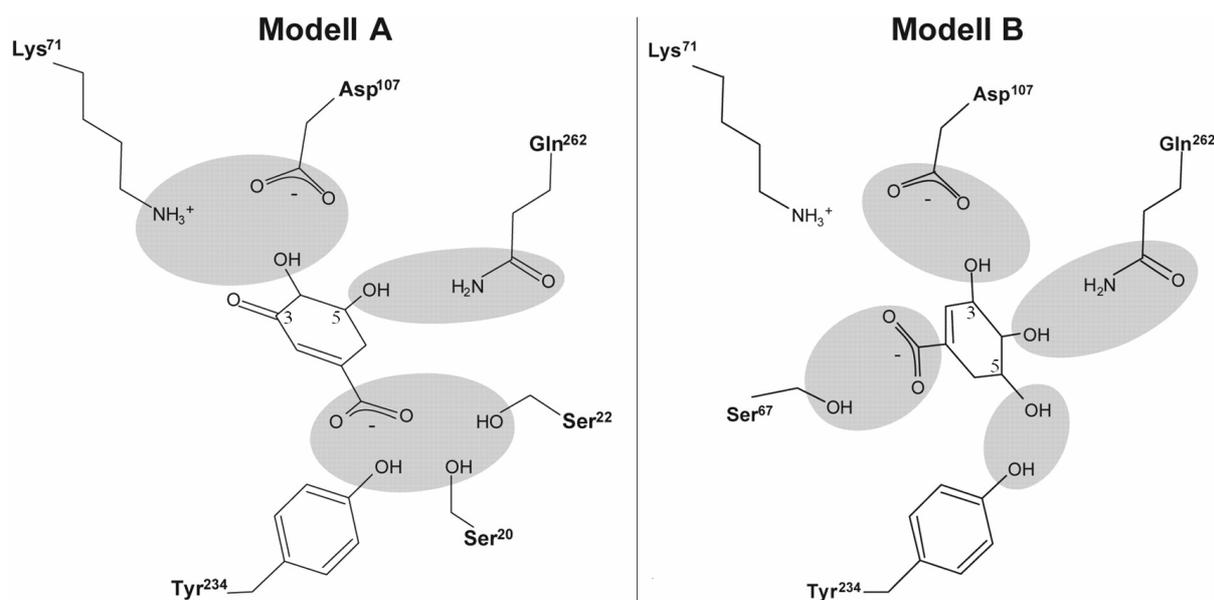
Bisher liegen noch keine strukturbasierten Messdaten vor, die darauf hindeuten könnten, wie das Quinat oder Dehydroshikimat von den Enzymen gebunden werden könnte.

Es wurden jedoch mit Hilfe von Modellierungsstudien zwei Hypothesen entwickelt, wie das Shikimat/Dehydroshikimat binden könnte (siehe Abb. 1.8), wobei davon ausgegangen wird, dass das Substratmolekül in etwa eine Halbsesselkonformation annimmt. Um das Modell A zu erstellen (Michel *et al.* 2003), wurden ferner Enzymkinetik-Versuche berücksichtigt, die mit Hilfe von substratähnlichen Inhibitormolekülen an Erbsen-Keimlingen (*Pisum sativum*) durchgeführt worden sind. Demnach ist die Hydroxylgruppe am C4-Atom des Substrates entscheidend für eine starke Bindung an das Enzym (Balinsky & Davies 1961);

## 1 Einleitung

wahrscheinlich interagiert die Hydroxylgruppe mit einer geladenen Seitenkette (Bugg *et al.* 1988). Ferner ist für eine feste Bindung des Substrates an das Protein entweder eine Interaktion der Carboxylatgruppe des Substrates oder der Hydroxylgruppe am C5-Atom notwendig. Letztere Gruppe scheint aber kaum Auswirkungen auf die Substratspezifität zu haben (Balinsky & Davies 1961).

Um das Modell B zu entwickeln, haben Benach *et al.* (2003) das Shikimat gemäß bereits etablierter Erkenntnisse über ternäre Komplexe anderer Oxidoreduktasen (Ramaswamy *et al.* 1994) in das Enzym YdiB von *E. coli* modelliert. Es wurde dabei vor allem darauf Wert gelegt, dass das „reaktive“ Hydridion des Substrates in die Nähe des C4-Atoms des Nikotinsäureamidringes des NAD(P)s gelangt.



### Abb. 1.8

Vermutete Bindungsmodi von 3-Dehydroshikimat in der AroE (Modell A) und von Shikimat in YdiB (Modell B) jeweils in *E. coli*. Es wird in beiden Modellen die Numerierung der YdiB aus der PDB verwendet. Die angenommenen Substrat-Enzym-Interaktionen sind grauschattiert dargestellt. Im Modell A binden die Hydroxylgruppen vom C4- und C5-Atom des Dehydroshikimates die Seitenketten von Lys71, Asp107 und Gln262. Die Seitenketten von Ser20, Gln262 und Tyr234 interagieren mit der Carboxylatgruppe des Substrates. Im Modell B bilden die Hydroxylgruppen der C3-, C4- und C5-Atome des Shikimates Wasserstoffbrücken zu Asp107, Gln262 und Tyr 234 aus (nach Lindner *et al.* 2005).

## 1 Einleitung

---

Da die Bindungsmodi der Substrate an das Enzym noch nicht eindeutig geklärt sind, haben Aussagen über den detaillierten Reaktionsmechanismus einen spekulativen Charakter. Dennoch sind hierzu bereits Überlegungen angestellt und entsprechende Experimente durchgeführt worden.

Die Identität und räumliche Verteilung der Residuen, die im aktiven Zentrum vermutet werden, weichen deutlich von denen bereits bekannter Oxidoreduktasen ab. Folglich kann man davon ausgehen, dass sich der Reaktionsmechanismus der S/QDH von dem anderer NADP(H)-abhängigen Enzyme im Detail unterscheidet.

Beim NAD(P)-Reaktionsmechanismus wird nicht nur ein Hydridion übertragen, sondern es muss auch ein Proton „verschoben“ werden. Um diesen Vorgang zu erleichtern, kommen besonders Residuen in Betracht, deren Seitenketten-pK<sub>S</sub>-Werte im Idealfall im Bereich des pH-Optimums des Enzyms liegen. Es muss allerdings berücksichtigt werden, dass die Umgebung des Proteins den pK<sub>S</sub>-Wert stark beeinflussen kann und dass der pH-Wert auf die Enzymaktivität auch auf andere Weise wirken kann. Es könnte z.B. das Protein in alkalischer Umgebung denaturieren oder sich die Substrate zersetzen.

Das Aktivitätsmaximum einiger S/QDH liegt in etwa im neutralen Bereich. Dies könnte dafür sprechen, dass ein Histidin am Reaktionsmechanismus beteiligt ist. Tatsächlich haben Histidin-spezifische chemische Modifikationen mit Diethylpyrocarbonat eine Inaktivierung der AroE von *E. coli* zur Folge (Krell *et al.* 1998). Zwei dieser Histidine konnten durch Zugabe von Shikimat vor der Modifikation bewahrt werden, allerdings sind beide zu weit vom aktiven Zentrum entfernt, selbst falls es zu einer starken Domänenbewegung kommen sollte. Außerdem sind die entsprechenden Histidine in der S/QDH-Familie nur mäßig konserviert (Chackrewarthy 1996, Benach *et al.* 2003).

Es ist auch davon auszugehen, dass das pH-Optimum der meisten dieser Enzyme im basischen liegt (z.B. Yaniv & Gilvarg 1955, diese Dissertation). Die bevorzugte alkalische Umgebung der S/QDH deutet zwar darauf hin, dass die Residuen Lysin und Histidin an der Katalyse beteiligt sein könnten, jedoch kommen auch noch andere wie z.B. Aspartat je nach Umgebung in Frage (Christendat *et al.* 1998). Tatsächlich kommen im vermuteten aktiven Zentrum ein hochkonserviertes Aspartat und Lysin vor. Der Austausch eines dieser Aminosäuren führt zu einem vollständigen Funktionsverlust (Linder *et al.* 2005). Eine katalytische Dyade bestehend aus diesen beiden Aminosäuren scheint somit wahrscheinlich zu sein (Singh *et al.* 2005).

### 1.4.8 Nur eine scheinbare Enzymredundanz?

Gemäß bioinformatischer Untersuchungen diverser Genome von Mikroorganismen (DDBJ) treten S/QDH in den verschiedenen Organismen mit unterschiedlicher Häufigkeit auf. So findet man beispielsweise in *Methano(caldo)coccus jannaschii* nur eine, im Wildtyp von *E. coli* zwei, in *C. glutamicum* drei und in *Pseudomonas putida* sogar fünf dieser Enzyme. Mit der Entdeckung von YdiB (Benach *et al.* 2003) und SDH-L (Singh *et al.* 2003) zeigte sich, dass es Subtypen in der Familie der S/QDH gibt. Ihre Funktion *in vivo* ist noch nicht eindeutig bestimmt und es stellt sich die Frage, ob noch mehr Subtypen dieser Enzyme existieren. Somit ist auch nicht bekannt, ob es eine tatsächliche Enzymredundanz in einigen Mikroorganismen gibt oder jedes dieser „Isoformen“ eine andere Funktion in der Zelle zu erfüllen hat.

### 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit besteht zunächst in der Klonierung, Expression und Reinigung der drei als Shikimat/Quinat-Dehydrogenasen bioinformatisch annotierten offenen Leseraster bzw. Enzyme aus *Corynebacterium glutamicum*. Besonders steht hier aber die biochemische Charakterisierung mittels enzymkinetischer *in vitro*-Methoden sowie die strukturelle Analyse der Enzyme im Vordergrund. Die Untersuchung der möglicherweise nur scheinbaren Redundanz bildet den Schwerpunkt. Hieraus ergeben sich drei naheliegende Szenarien:

1.) Möglich wäre es, dass die Enzyme zwar dieselben Reaktionen im Shikimatweg katalysieren, sie aber durch unterschiedliche metabolische Endprodukte inhibiert werden. In diesem Fall würde sich die Frage stellen, warum ausgerechnet Enzyme, die inmitten eines einseitig verlaufenden Stoffwechselweges liegen, auf diese Weise reguliert werden. Man müsste in diesem Fall vermuten, dass der Shikimatweg von einem noch unbekanntem Stoffwechselweg gekreuzt wird, den es zu entdecken gilt. Ferner wäre dann natürlich zu untersuchen, ob sich nicht entsprechende Enzyminhibitoren finden ließen. Daran schlosse sich eine strukturelle Untersuchung der Proteine an, v.a. um den Mechanismus der Inhibition näher zu untersuchen.

2.) Bereits während dieser Promotionsarbeit haben andere Arbeitsgruppen gezeigt, dass es nicht nur die „klassische“ Shikimat-Dehydrogenase AroE gibt, sondern darüber hinaus die deutlich langsamere SDH-L und die vermutlich bifunktionale YdiB. Daher ist es naheliegend, dass das scheinbar dreifache Auftreten der Enzyme auch darauf zurückzuführen sein könnte, dass sie tatsächlich unterschiedliche Funktionen im Metabolismus der Zelle übernehmen und daher die vermutete Redundanz nur auf Fehler bzw. Ungenauigkeiten der bioinformatischen Vorhersage zurückzuführen ist. In diesem Fall wäre es wünschenswert, die tatsächliche Funktion im Stoffwechselweg zu identifizieren und Kriterien zu finden, mit deren Hilfe die bioinformatische Annotation präzisiert werden könnte. Hierfür kämen dann v.a. Untersuchungen der Primärstrukturen in Betracht, um charakteristische, konservierte Aminosäurereste zu identifizieren, mit deren Hilfe die einzelnen Subtypen voneinander unterschieden werden können. Denkbar ist allerdings auch, dass nicht (nur) die Seitenketten einzelner Aminosäuren eine Rolle spielen, sondern dass die kinetischen Unterschiede der verschiedenen Subtypen (zusätzlich) in der räumlichen Struktur begründet sind. Um dies zu untersuchen, muss eine Technik verwendet werden, mit deren Hilfe die Strukturen möglichst

## 1 Einleitung

---

bis zur atomaren Auflösung gelöst werden können. Hierfür sollen in dieser Arbeit vor allem die Röntgenstrukturanalyse und bioinformatische Methoden genutzt werden.

3.) Es ist auch möglich, dass eine zweifache Redundanz vorliegt, während das dritte Enzym andere Aufgaben im Stoffwechsel zu erfüllen hat. In diesem Fall ergeben sich Zielsetzungen, die den Szenarien 1) und 2) entsprechen.

Da Shikimat/Quinat-Dehydrogenasen eine bis dahin noch unbekannte Faltungsdomäne im Bereich des aktiven Zentrums besitzen und die dort konservierten Aminosäuren von denen bekannter NAD(P)-Dehydrogenasen abweichen, ist es durchaus möglich, dass ein noch unbekannter Reaktionsmechanismus bei den Shikimat/Quinat-Dehydrogenasen vorliegt.

# 2 Material und Methoden

## 2.1 Verwendete Chemikalien, Materialien, Geräte und EDV-Systeme

### 2.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien hatten *p.a.*-Qualität und wurden von den Herstellern Sigma, Roth, Merck, Biomol oder Fluka bezogen. Die Komponenten für die Bakterienmedien stammen von Roth und Sigma

Das benötigte Wasser wurde von einer Reinstwasseranlage aufbereitet und hatte eine Leitfähigkeit von höchstens  $50 \mu\text{S cm}^{-1}$ . Sämtliche Lösungen wurden durch eine  $0,2 \mu\text{m}$ -Membran (Sartorius, Göttingen) filtriert.

### 2.1.2 Mikroorganismen, Bakteriennährmedien, Pufferlösungen und Oligonukleotide

#### Mikroorganismen

<i>C. glutamicum</i> ATCC13032	Arbeitsgruppe Prof. Dr. Krämer, Universität zu Köln
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Novagen, Madison, USA
	$F^- ompT hsdS_B (r_B^- m_B^-) gal(DE3) dcm$
<i>E. coli</i> XL1-Blue	Stratagene, Heidelberg
	$recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17(rK^-, mK^+), supE44, relA1, l, lac^-, [F' proAB, lacIqZD M15, Tn19(Tetr)]$

#### Bakteriennährmedien

BHI-Medium	37 g <i>Brain Heart Infusion</i> ad 1 Liter $\text{H}_2\text{O}$ ; autoklaviert
LB-Medium	10 g Trypton; 5 g Hefeextrakt; 10 g NaCl ad 1 Liter $\text{H}_2\text{O}$ pH=7,0; autoklaviert



## 2 Material und Methoden

---

### Proteinüberexpression und -reinigung

#### *Tev-Protease*

Äquilibriumspuffer	6 M Harnstoff; 100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 10 mM Tris/HCl pH=8,0
Resuspensionspuffer	6 M Guanidinium-HCl; 100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 10 mM Tris-HCl pH=8,0
Waschpuffer	6 M Harnstoff; 100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 10 mM Tris/HCl pH=6,3
Elutionspuffer	6 M Harnstoff; 100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 10 mM Tris/HCl pH=4,5
Dialysepuffer	100 mM Tris/HCl pH=8,5; 500 mM NaCl; 5 mM DTT; 0,5 mM EDTA; 50% v/v Glycerin

#### *Shikimat/Quinat-Dehydrogenasen*

Lysispuffer	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 300 mM NaCl; 10 mM Imidazol; pH=8,0
Waschpuffer	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 300 mM NaCl; 20 mM Imidazol; pH=8,0
Elutionspuffer	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 300 mM NaCl; 250 mM Imidazol; pH=8,0
Einengungspuffer	50 mM Tris/HCl pH=7,5; 500 mM NaCl; 20% Glycerin
Gelfiltrationspuffer	100 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA pH=7,5

### Enzymkinetik

Reaktionspuffer A: 100 mM NaHCO<sub>3</sub> pH=10,0

Reaktionspuffer B: 500 mM Tris/HCl pH= 8,6

Reaktionspuffer C: 500 mM Tris/HCl pH= 9,0

### **Oligonukleotide**

#### Oligonukleotide für den Adaptereinbau

NHis1	5'-CATGAGCGGCCATCACCATCACCATCACGGCTCTGAAAAC CTGTATTTCCAGGGTGCCATGGCCCCGGGGTTAACG-3'
NHis2	5'-GATCCGTTAACCCCGGGCCATGGCACCCTGGAAATACAGG TTTTTCAGAGCCGTGATGGTGATGGTGATGGCCGCT-3'

## 2 Material und Methoden

---

### Oligonukleotide für PCR-Mutagenese

QDHNHis1	5'-GTAGAAAGCCCAAATCATGAACGACAGTATTCTCCTCGG-3'
QDHNHis2	5'-GAAGCGTCGAGGTTTTACGGATCCTTTTAGAGGGACAGG-3'
SDH276NHis1	5'-GATAAGGATCAGCGAATAACCATGGGTTCTCACATCACTC-3'
SDH276NHis2	5'-GTTGAGGAGGTGGCGGATCCTTAGTGTTCTTCTGAGATG-3'
SDH268NHis1	5'-GCATGAGTATAAAATCACTGTCATGATCAACTACGTCGAC-3'
SDH268NHis2	5'-CTAAAATAGGGGTGATCAATTTACTTGGAGAACTCCTC-3'

### Oligonukleotide für die DNA-Sequenzierung

T7-Promotor	5'-TAATACGACTCACTATAGG-3'
T7-Terminator	5'-GCTAGTTATTGCTCAGCG-3'

### **Plasmide**

pET-3d	Novagen, Madison, USA
pTPSN	Prof. Jennifer Doudna, Universität Yale, USA

### **2.1.3 Materialien, Geräte und EDV-Systeme**

Die wichtigsten Geräte, Materialien und EDV-Systeme sind in den folgenden Tabellen 2.1, 2.2 und 2.3 zusammengefasst.

**Tab. 2.1:** Verwendete Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Brutschrank Function line	Heraeus, Hanau
Cryostream Cooler	Oxford Cryosystems, Oxford, England
Dynamische Lichtstreuung DynaPro-801	Protein Solutions, Charlottesville VA, USA
EDV-Systeme	
Octane mit Irix 6.5	Silicon Graphics, München
PC mit SuSE-Linux 9.2	Novell, Berlin
PC mit Windows XP	Microsoft, USA
Elektrophorese	
Powerpac 300 Power Supply	BioRad, München
Flächendetektoren	
DIP-2030H	MAC Science, Yokohama, Japan
MAR 345	MAR Research, Norderstedt
FPLC-System	Pharmacia, Uppsala, Schweden
French Press Aminco	SLM-Instruments, Rochester, USA

## 2 Material und Methoden

---

Inkubationsschüttler	
Certomat BS-1	Braun, Melsungen
Kupferdrehanoden	
FR 591	Nonius, Delft
Rotaflex RU-200 B	Rigaku, Düsseldorf
Massenspektrometrie	
MALDI_MS Biflex III (ToF)	Bruker, Bremen
Mikroskope	
Stemi 2000-C	Zeiss, Jena
Leica MZ 125	Leica, Solms
PCR-Mastercycler 5330	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter 766 Calimatic	Knick, Berlin
Reinstwasseranlage SeralpurDELTA	SERAL, Ransbach-Baumbach
Spektralphotometer Ultrospec 2000	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Spiegelreflexkamera EOS 500N	Canon, Tokyo, Japan
Sterilbank HERAsafe	Heraeus, Hanau
UV-Flächenstrahler	Faust, Köln
Waagen	
Analysenwaage FA-210-4	Faust, Köln
Laborwaage SBA 52	Scaltec, Heiligenstadt
Vortex REAX 2000 und REAX top	Heidolph, Schwabach
Wasserbad WB7	Memmert, Schwabach
Zentrifugen	
RC 3B Plus und RC 5B Plus	Sorvall, Newtown CT, USA
5417 C und 5810 R	Eppendorf, Hamburg

**Tab. 2.2:** Sonstige Materialien

Bezeichnung	Hersteller
Bradford Proteinassay	BioRad, München
Cryoloops	Hampton Research, Laguna Niguel CA, USA
sonstige Cryowerkzeuge	Hampton Research, Laguna Niguel CA, USA
Crychem-Platten	Hampton Research, Laguna Niguel CA, USA
Gelelektrophorese	
NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gele	Invitrogen, Karlsruhe
Gen Elute™ Minus EtBr Spin Columns	Sigma-Aldrich, Hamburg
Goniometerköpfe	Stoe, Darmstadt
Linbro-Schalen	Hampton Research, Laguna Niguel CA, USA
Proteinreinigungssäulen	
Ni-NTA-Säulen ( <i>gravity flow</i> )	Qiagen, Hilden
Hi Load™ 16/60 Superdex™	
200 Prep Grade 60cm	Amersham-Pharmacia, Uppsala, Schweden
Plasmid Midi Kit (25)	Qiagen, Hilden
Ultrafiltration	
Amicon® Ultra-15 (10kDa)	Millipore, Eschborn

## 2 Material und Methoden

---

**Tab. 2.3:** Computerprogramme

Programm (-Paket)	Referenz
Klonierung	
Clone Manager	Scientific & Educational Software, Cary, North Carolina, USA
Enzymkinetik	
SWIFT 1.05	Bunnage 1992, Pharmacia Biotech Ltd.
Sequenz- & Strukturalignments	
BLASTp	Altschul <i>et al.</i> (1990)
MAMMOTH	Olmea <i>et al.</i> (2002)
T-COFFEE	Notredame <i>et al.</i> (2000)
Phylogenetische Analyse	
PHYLP	Felsenstein (1989)
Auswertung von Röntgendaten	
CCP4-suite	CCP4 (1994)
CNS-suite	Brunger <i>et al.</i> (1998)
DSSP	Kabsch & Sander (1983)
DSSP2PDB	Stroud (2002)
HKL-suite	Otwinowski & Minor (1997)
MOLEMAN	Kleywegt (1992-2004), Uppsala, Schweden
Modellierung	
AMBER 8	Case <i>et al.</i> (2004)
MOE	Chemical Computing Group, Köln
PREDATOR	Frishman & Argos (1997)
SCWRL	Bower <i>et al.</i> (1997)
Grafikprogramme	
BRAGI	Schomburg & Reichelt (1988)
O	Jones <i>et al.</i> (1991)
PyMOL	DeLano (2002)
Proteinstrukturevaluierung	
ERRATv2	Colovos & Yeates (1993)
PROCHECK v3.5.4	Laskowski <i>et al.</i> (1993)
VERIFY3D	Eisenberg <i>et al.</i> (1997)

## 2.2 Molekularbiologie

### 2.2.1 Klonierungsstrategie

In dieser Arbeit wurde ein *His<sub>6</sub>-Tag* verwendet, um die Proteinreinigungsprozedur zu vereinfachen. Da ein solches Fusionspeptid aber auch die Aktivität der Shikimat/Quinat-Dehydrogenasen aus *C. glutamicum* beeinflussen könnte, ist es vorteilhaft, wenn der *Tag* bei Bedarf wieder abgespalten werden kann. Daher sollte zwischen der *Tag*-codierenden Sequenz und der multiplen Klonierungsstelle (MCS) eine Nukleotidsequenz vorhanden sein, die eine spezifische Schnittstelle für eine entsprechende Protease codiert. Um einen solchen Expressionsvektor zu konstruieren, wurde in das Plasmid pET-3d in 5'-Richtung zur MCS ein Adapter ligiert, der einen *His<sub>6</sub>-Tag* gefolgt von der für die spezifische Protease rTEV Schnittstelle codiert (*His<sub>6</sub>-rTev-Adapter*):

S-G-H-H-H-H-H-H-G-S-E-N-L-Y-F-Q-G-A-native Proteinsequenz

grün: flexible Aminosäuren

blau: *His<sub>6</sub>-Tag*

rot: spezifische Erkennungsstelle für die Protease rTEV

Die Protease spaltet die Erkennungssequenz hinter dem Glutamin, so dass auch nach der Abspaltung des *Tags* die beiden Aminosäurereste GA als Klonierungsartefakte N-terminal von der natürlichen Proteinsequenz erhalten bleiben.

### 2.2.2 Herstellung des *His<sub>6</sub>-rTEV-Adapters*

Bevor der *His<sub>6</sub>-rTEV-Adapter* in den Expressionsvektor ligiert werden konnte, mussten die beiden einzelsträngigen Oligonukleotide NHis1 und NHis2 hybridisiert werden. Hierzu wurden 4 µl 1M NaCl, 15 µl H<sub>2</sub>O und 3,8 µl beider je 100 µM Oligonukleotidlösungen gemischt. Der Ansatz wurde 2 min lang bei 95°C erhitzt und langsam bei Raumtemperatur abgekühlt.

### 2.2.3 Herstellung kompetenter Zellen

Etwa 20 µl von *E. coli*-Bakterien der Stammes BL21(DE3) oder XL1-Blue einer Glycerin-Dauerkultur wurden auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 30°C (BL21(DE3)-Zellen) bzw. 37°C (XL1-Blue-Zellen) inkubiert. Es wurde eine 20 ml-LB-Vorkultur mit einer Bakterienkolonie angeimpft und bei 30°C, 200 rpm 12 h lang inkubiert. Eine 250 ml-LB-Hauptkultur wurde mit 1 ml der Vorkultur angeimpft, bei 30°C, 200 rpm zu einer OD<sub>600</sub>=0,5 angezogen, 5 min auf Eis abgekühlt, die Zellen 15 min bei 2500 g, 4°C 15 min lang zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde in 20 ml eiskaltem Inoue-Puffer aufgenommen, 10 min auf Eis gekühlt und erneut 15 min bei 2500 g, 4°C 15 min lang zentrifugiert. Das Sediment wurde in 20 ml kaltem Inoue-Puffer aufgenommen, bis zu einer Endkonzentration von 7% v/v mit DMSO versetzt, 10 min auf Eis inkubiert, in 100 µl-Fractionen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei minus 80°C gelagert.

### 2.2.4 Hitzeschock-Transformation

Ein 100 µl-Aliquot von kompetenten Zellen wurde kurz bei 30°C aufgetaut, auf Eis abgekühlt und mit ca. 100 ng Plasmid-DNA 20 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42°C für 90 sek wurde der Ansatz etwa eine Minute auf Eis abgekühlt und mit 270 µl LB versetzt, das auf 37°C temperiert worden ist. Der Transformationsansatz wird 45 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Bakterienzellen auf einer LB/Amp-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die gewachsenen Kolonien wurden daraufhin in Flüssigmedium überführt, wofür zunächst 3 ml-Starterkulturen verwendet wurden.

### 2.2.5 Präparation der Vektor-DNA aus *E. coli*

#### 2.2.5.1 DNA-Präparation aus 3 ml-Bakterienkultur („Minipräparation“)

Die Plasmid-DNA, die mittels Minipräparation isoliert worden ist, diente ausschließlich analytischen Zwecken. Daher konnte auf Reinigungsschritte mittels Anionenaustauschersäulen oder auf Phenol-Extraktionen verzichtet werden.

## 2 Material und Methoden

---

Es wurde eine Bakterienkolonie von einer LB/Amp-Agarplatte gepickt und in 3 ml LB/Amp übergeführt. Die Bakterien wurden ca. 16 h bei 37°C inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen. Das Pellet wurde mit 100 µl Resuspensionspuffer (50 mM Tris, 10mM EDTA, 100 µg/ml RNaseA, pH=8,0) resuspendiert. Nach Zugabe von 100 µl Lysispuffer wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und 250 µl Neutralisationspuffer dazu gegeben. Der Zelldebris wurde durch Zentrifugieren abgetrennt (14000 rpm, 6°C) und die DNA aus dem Überstand mittels Ethanolpräzipitation gefällt. Hierfür wurden der Lösung 40µl 3 M Natriumacetat-Puffer pH=4,6 und 1 ml absolutem Ethanol beigefügt. Der Überstand wurde 15 min bei 20000 g, 6°C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 300 µl 70%igem v/v Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet.

### 2.2.5.2 DNA-Präparation aus 250 ml-Bakterienkultur („Midipräparation“)

Die Plasmid-DNA wurde mit Hilfe eines *Kits* der Firma Qiagen entsprechend des „QIAGEN® Plasmid Purification Handbook“ gereinigt.

Es wurde eine Kolonie von einer LB/Amp-Agarplatte gepickt und in 3 ml LB/Amp übergeführt. Diese Starterkultur wurde ca. 10 h bei 37°C, 220 rpm inkubiert. Sie wurde verwendet, um eine 250 ml LB/Amp-Hauptkultur anzuzüpfen, die ungefähr 14 h bei 37°C, 220 rpm inkubiert worden ist. Die Zellen wurden bei 5900 g, 4°C zentrifugiert und in 4 ml P1-Puffer resuspendiert. Die Lyse wurde durch Zugabe von 4 ml P2-Puffer eingeleitet. Es wurde fünf mal vorsichtig invertiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Neutralisation erfolgte durch Zugabe von 4 ml gekühltem P3-Puffer. Es wurde erneut fünf mal vorsichtig invertiert und ca. 15 min auf Eis inkubiert. Der Zelldebris wurde durch Zentrifugation bei 27000 g, 4°C 1 h entfernt. Die DEAE-Anionenaustauschersäulen *QIAGEN-tip 100* wurden mit 4 ml QBT-Puffer äquilibriert. Es erfolgte die Beladung der Säulen mit dem Überstand aus der Zentrifugation. Die Säule wurde zweimal mit je 10 ml QC-Puffer gewaschen. Anschließend wurde die Plasmid-DNA mit 5 ml QF-Puffer eluiert. Zur Nukleinsäurelösung wurde 3,5 ml Isopropanol hinzugegeben und 30 min bei 27000 g, 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig verworfen und zwei mal mit 70%igem v/v Ethanol gewaschen, wobei jeweils bei 27000 g, 4°C für 15 min zentrifugiert worden ist. Das DNA-Pellet wurde an der Luft getrocknet und in einer geeigneten Menge Wasser aufgenommen.

### 2.2.6 Präparation von genomischer DNA aus *C. glutamicum*

Es wurde eine Kultur von einer BHI-Agarplatte gepickt und in einen 100 ml-Erlenmeyerkolben mit 20 ml BHI-Flüssigmedium übergeführt. Die Zellen wurden ca. 15 bis 16 h bei 30°C, 150 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 8 bis 9 inkubiert. Anschließend wurden die Bakterienzellen 20 min abzentrifugiert (5900 g, 4°C) und mit 4 ml gekühltem STE-Puffer gewaschen. Die Zellen wurden in 4 ml gekühltem STE-Puffer durch starkes Schütteln resuspendiert. Es wurden 50 mg Lysozym (Böhringer, Mannheim) in 1 ml STE-Puffer gelöst, 50 µl RNaseA (10 mg/ml) zugegeben und 4h bei 37°C unter vorsichtigem Schwenken bei 37°C inkubiert. Es wurden 2 µl 5% (w/v) SDS und 7 µl Proteinase K (Roche) hinzu gegeben und 1 h bei 37°C unter leichtem Schwenken (150 rpm) inkubiert. Mittels 7 ml P/C/I wurde die Nukleinsäure durch leichtes Invertieren emulgiert. Durch sich anschließende Zentrifugation bei 7200 g, 6°C wurde die wässrige (obere) von der organischen Phase getrennt. Durch Abnahme der wässrigen Phase wurde die DNA von den verbleibenden Proteinen abgetrennt. Um die Nukleinsäure aufzukonzentrieren und von P/C/I-Resten zu reinigen, wurde die DNA-Lösung mit 15 ml 100% Ethanol und 500 µl 3 M Natriumacetat-Puffer (pH=4,6) versetzt, bei 17000 g, 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und zweimal mit 3 ml kaltem 70%igem v/v Ethanol gewaschen. Das DNA-Pellet wurde an der Luft getrocknet und in 3 ml Wasser unter leichtem Schwenken bei 4°C für etwa 10 h gelöst.

### 2.2.7 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der DNA

Die Konzentrationsbestimmung beruht auf einem Absorptionsmaximum bei 260 nm, wofür die aromatischen Ringe der Nukleobasen verantwortlich sind. Eine Extinktion von 1,0 entspricht einer Massenkonzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA (dsDNA). Daraus ergibt sich folgende Formel für die Berechnung der Konzentration einer dsDNA-Probe:

$$c = E_{260} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor} [\mu\text{g/ml}]$$

Die Reinheit der DNA berechnet sich durch den Quotienten der Extinktion bei 260 nm und 280 nm ( $E_{260}/E_{280}$ ). Bei einer reinen DNA-Probe liegt dieser Wert zwischen 1,8 und 2,0. Geringere Werte weisen auf Verunreinigungen mit Protein oder Phenol, höhere auf RNA-Kontaminationen hin.

### 2.2.8 DNA-Restriktionsspaltungen

Die für die Subklonierung notwendigen Restriktionsspaltungen erfolgten nach Herstellerangaben (New England Biolabs, Ipswich, England). Für analytische Gele wurden ca. 1 µg und für präparative Gele ca. 10 µg DNA verwendet.

### 2.2.9 Ligationsreaktionen

#### 2.2.9.1 Ligation des His<sub>6</sub>-rTEV-Adapters in pET-3d

Es wurde zu 5 µl 14 µM Adapterlösung 4 µl geschnittenes pET-3d (insges. 1,4 mg Plasmid), 1,5 µl 10x-T4-DNA-Ligase-Reaktionspuffer und 1 µl T4-DNA-Ligase (400 NEB-Units) in einem Gesamtvolumen von 15 µl gegeben. Puffer und Ligase stammen von der Firma New England Biolabs, Ipswich, England. Der Ligationsansatz wurde ca. 12 h bei Raumtemperatur inkubiert.

#### 2.2.9.2 Ligation der Enzyme in den Expressionsvektor pNHis

Um das mit Restriktionsendonukleasen entsprechend geschnittene PCR-Produkt in den Expressionsvektor zu ligieren, wurden 0,5 µl geschnittene Vektor-DNA (ca. 1 ng), 10 µl PCR-Produkt (ca. 20 ng), 1,3 µl 10x-T4-DNA-Ligase-Reaktionspuffer und 1 µl T4-DNA-Ligase (400 NEB-Units) gemischt und ca. 8 h bei 16°C inkubiert. Der Ligationsansatz wurde anschließend in XL1-Blue-Zellen transformiert.

### 2.2.10 PCR-Mutagenese

Um die Gene der drei Shikimat/Quinat-Dehydrogenasen aus der genomischen DNA zu amplifizieren und für die Subklonierung passende Restriktionsschnittstellen einzuführen, wurden jeweils analoge Reaktionsansätze und das gleiche PCR-Programm verwendet. Der PCR-Ansatz enthielt 2 pmol der jeweiligen Primer, 2,5 µg gDNA, 20 nmol dNTPs, 2,5 U Pfu Turbo DNA-Polymerase (Stratagene) und 1x Pfu-Reaktionspuffer (Stratagene).

## 2 Material und Methoden

---

Die PCR wurde mit folgendem Programm durchgeführt:

---

zunächst	2 min 95°C	(init. Denaturierung)
30 Zyklen	40 sek 95°C	(Denaturierung)
	20 sek 64°C	(Hybridisierung)
	1 min 60°C	(Elongation)
anschließend	Kühlung bei 4°C	

---

### 2.2.11 DNA-Sequenzierung

Es wurden 4 µg Plasmid-DNA, jeweils 10 pmol der Sequenzierungsprimer T7-Promotor und T7-Terminator und 4 µl Big Dye-Mix (Big Dye Reaction Terminator Cycle Sequencing Kit, PE Applied Biosystems, Weiterstadt) in einem Gesamtvolumen von 15 µl gemischt. Die PCR wurde mit folgendem Programm durchgeführt:

---

zunächst	4 min 95°C	(init. Denaturierung)
30 Zyklen	15 sek 95°C	(Denaturierung)
	15 sek 55°C	(Hybridisierung)
	4 min 60°C	(Elongation)
anschließend	Kühlung bei 4°C	

---

Der PCR-Ansatz wurde durch Ethanol-fällung gereinigt. Er wurde mit 85 µl H<sub>2</sub>O, 10 µl 3 M Natriumacetatpuffer pH=5,2) und 250µl absolutem Ethanol gemischt, 30 min bei 23000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das DNA-Pellet mit 300 µl 70%igem v/v Ethanol versetzt und erneut 5 min bei 23000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das Pellet an der Luft getrocknet, in 25 µl H<sub>2</sub>O gelöst und in Sequenziergefäße überführt.

Die Untersuchung der unterschiedlichen Größen der farbstoffmarkierten DNA-Fragmente erfolgte am Zentrum für Molekulare Medizin Köln (ZMMK) der Universität zu Köln mittels Kapillarelektrophorese.

### 2.3 Proteinüberexpression und -reinigung

#### 2.3.1 Proteinüberexpression

Sowohl die spezifische Proteinase rTEV als auch die Shikimat/Quinat-Dehydrogenasen aus *C. glutamicum* wurden heterolog im *E. coli*-Stamm BL21(DE3) überexprimiert.

##### 2.3.1.1 Expression rTEV-Protease

Es wurde eine entsprechend transformierte Bakterienkolonie des *E. coli*-Stammes BL21(DE3) von einer LB/Amp-Agarplatte gepickt und in 3 ml LB/Amp-Flüssigmedium überführt. Diese Starterkultur wurde ca. 15 h bei 30°C, 120 rpm inkubiert. Sie wurde zum Animpfen einer 1Liter-LB/Amp-Hauptkultur verwendet, welche bei 37°C und 220 rpm bis zu einer  $OD_{600}=0,5$  inkubiert worden ist. Es schloss sich die Induktion der Proteinexpression mit 500 µl 1 M IPTG an. Nach 4 h wurde die Inkubation beendet; die Bakteriensuspension wurde 30 min bei 5900 g, 4°C zentrifugiert und in 25 ml 50 mM Tris/HCl pH=8,0; 300 mM NaCl resuspendiert. Es folgte die Zugabe einer Proteaseinhibitor-Tablette der Firma Roche, die zuvor in 2 ml Wasser gelöst worden ist. Die Suspension wurde 1,5 h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei -80°C eingefroren.

##### 2.3.1.2 Expression der Shikimat/Quinat-Dehydrogenasen

Es wurde eine Bakterienkolonie von einer Agarplatte gepickt und in 3 ml LB/Amp Starterkultur überführt. Sie wurde ca. 15 h bei 30°C, 120 rpm inkubiert und daraufhin zum Animpfen einer 1Liter-LB/Amp-Hauptkultur verwendet, die bei 37°C, 220 rpm zu einer  $OD_{600}=0,6$  inkubiert worden ist. Daraufhin wurde die Induktion der Proteinexpression durch Zugabe von 1 ml 1 M IPTG induziert. Die Zellernte erfolgte bei einer  $OD_{600}=1,2$  für die *CglQDH* und die *CglSDH276*, bzw.  $OD_{600}=1,0$  für die *SDH268*. Die Bakterien wurden 30 min bei 5900 g, 4°C zentrifugiert und das Sediment bei -80°C eingefroren.

### 2.3.2 Zellaufschluss

#### 2.3.2.1 Lyse der rTEV-Protease

Eine eingefrorene Bakteriensuspension, die zuvor mit dem Vektor pTPSN transformiert worden war, wurde auf in einem Eis-Wasser-Gemisch aufgetaut und die Zellen mit der *French press* bei einem Druck von ca. 170 MPa in der Druckzelle aufgeschlossen, wobei dreimal passagiert wurde. Nach der Zugabe von 200 µl Tween20 wurde 1 min stark geschüttelt. Das Rohlysat wurde 30 min bei 10000 g, 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen.

#### 2.3.2.2 Lyse der Shikimat/Quinat-Dehydrogenasen

Die bei -80°C eingefrorenen Zellen wurden auf Eis aufgetaut und in 20 ml Lysispuffer resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in der *French press* bei einem Druck von ca. 170 MPa lysiert. Der Vorgang wurde jeweils dreimal wiederholt.

### 2.3.3 Proteinreinigung

#### 2.3.3.1 Reinigung der rTEV-Protease

Zum unlöslichen Anteil aus dem Rohlysat wurden 10 ml des Resuspensionspuffers gegeben. Durch starkes Schütteln gefolgt von einer Inkubation bei 65°C, 45 min wurde die Protease vollständig resuspendiert. Um unlösliche Bestandteile abzutrennen, wurde 20 min bei 15000 g, 4°C zentrifugiert. Mit dem Überstand wurde eine Ni-NTA-Gravitationsäule (3 ml Säulenvolumen) beladen, die zuvor mit 30 ml Äquilibrierungspuffer gespült worden ist. Danach wurde die Säule zunächst vier mal jeweils mit 10 ml Äquilibrierungspuffer und danach sechs mal mit Waschpuffer gespült. Danach wurde die rTEV-Protease mit einmal mit 0,3 ml Elutions- und schließlich mit vier mal mit 1 ml Elutionspuffer von der Säule gespült. Nach Überprüfung der Fraktionen mittels SDS-PAGE wurden die ausgewählten Fraktionen mit der rTEV vereinigt und bei 4°C gegen 600 ml Dialysepuffer über Nacht renaturiert. Das Dialysat wurde 20 min bei 15000 g, 4°C zentrifugiert und unlösliche Bestandteile erneut wie

## 2 Material und Methoden

---

oben dialysiert. Beide Dialysate wurden vereinigt mit NaOH auf pH=8,0 eingestellt und bei minus 80°C eingefroren.

### 2.3.3.2 Shikimat/Quinat-Dehydrogenasen

Das Rohlysat wurde mindestens 1 h bei ca. 27000 g, 4°C zentrifugiert. Die Ni-NTA-Gravitationsssäule (2 ml Säulenvolumen) wurde mit 10 ml Lysispuffer äquilibriert und anschließend mit dem klaren Lysat beladen. Die Säule wurde drei mal mit 10 ml Waschpuffer gespült. Durch Zugabe von je zwei mal 10 ml Elutionspuffer konnten die Enzyme von der Säule gewaschen werden. Die Ausbeute und Reinheit der isolierten Enzyme ließ sich mittels photometrisch bzw. SDS-PAGE abschätzen.

Bei ungenügender Reinheit des Proteins schloss sich an die Affinitätschromatographie die Gelpermeationschromatographie an. Hierfür wurde eine XK 70/16-Säule mit Superdex 200 prep grade als Säulenmaterial verwendet. Die Säule wurde mit Gelfiltrationspuffer äquilibriert und 1 ml der Proteinprobe (ca. 3 bis 7 mg Protein pro ml Einengungspuffer) bei einer Flussrate von 0,5 ml/min aufgetrennt.

### 2.4 Proteinanalytik

#### 2.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentrationen wurden mit Hilfe von zwei verschiedenen Verfahren bestimmt. Die photometrische Bestimmung des Proteingehaltes bei einer Wellenlänge von 280 nm wurde mit Hilfe eines berechneten Extinktionskoeffizienten durchgeführt (Gasteiger *et al.* 2005). Zusätzlich wurde das Verfahren nach Bradford durchgeführt (Bradford Proteinassay; BioRad, München). Als Proteinstandard wurde BSA verwendet.

#### 2.4.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde mit Hilfe des Criterion Gelelektrophoresesystems von BioRad (München) und Nu-PAGE<sup>®</sup> 4-12% Bis-Tris-Gelen (Invitrogen, Karlsruhe) durchgeführt. Falls erforderlich wurden die zu analysierenden Proteinlösungen mit Wasser verdünnt. Die Proben wurden nach Herstellerangaben mit SDS-Auftragspuffer (BioRad, München) versetzt und bei 95°C für 5 min inkubiert. Die Elektrophorese wurde mit MES/Tris-Puffer nach Angaben des Herstellers (Invitrogen, Karlsruhe) durchgeführt. Die aufgetrennten Proteine wurden durch Färbung mit Coomassie-Reagenz (Rotiphorese Blau R; Karlsruhe) sichtbar gemacht. Um das Molekulargewicht grob zu bestimmen, wurde der Größenmarker Roti<sup>®</sup>-Mark 10-150 (Roth, Karlsruhe) verwendet. Er enthält Proteine der Größe 10 kDa, 20 kDa, 30 kDa, 40 kDa, 60 kDa, 80 kDa, 100 kDa und 150 kDa.

#### 2.4.3 ESI-Massenspektrometrie

Um die Proteinproben in einem ESI-Massenspektrometer (Finnigan LCQ MS) vermessen zu können, wurden sie in 10 mM Natriumphosphat pH=7,0 umgepuffert und zu einer Massenkonzentration von 10 pmol/µl mit demselben Puffer verdünnt. 100 µl der Probe wurden gegen ein Methanol-Wasser-Gemisch 1:1 v/v mit 0,1%iger v/v Essigsäure dialysiert.

### 2.4.4 Abspaltung des His<sub>6</sub>-Tags

Der Spaltungsansatz hat folgende Zusammensetzung:

ca. 0,8 mg einer der Shikimat/Quinat-Dehydrogenasen  
40 µg rTEV-Protease  
1 mM DTT  
50 mM Tris/HCl pH=8,0  
0,5 mM EDTA pH=8,0  
ad 750 µl Wasser

Der Spaltungsansatz wurde 24 h bei 4°C inkubiert und anschließend mit 50 µl Ni-NTA-Matrix (Qiagen) versetzt. Es wurde unter vorsichtigem Invertieren 15 min lang bei Raumtemperatur inkubiert und bei 7000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und für analytische Versuche verwendet.

### 2.4.5 Kinetikversuche

Die Bestimmung der Enzymaktivitäten erfolgte photometrisch bei 30°C. Gemessen wurde die Reduktion von NAD<sup>+</sup> bzw. NADP<sup>+</sup> bei einer Wellenlänge von 340 nm in Quarzküvetten mit einem Gesamtvolumen von 1 ml. Der molare Extinktionskoeffizient  $\epsilon_{\text{NAD(P)H}}$  beträgt  $6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Bei den Kinetikversuchen, die die Dauer von einer Minute nicht überschritten haben, wurde der Extinktionswert jeweils nach 5 sek direkt vom Photometer abgelesen. Bei den anderen Messungen wurde das Programm *Reaction Kinetics* aus dem Programmpaket *Swift* Version 1.05 verwendet.

Es wurden jeweils die Anfangsgeschwindigkeiten vom linearen Teil der Umsatzkurve verwendet. Für die *CglQDH* wurde Reaktionspuffer A, für *CglAroE* Reaktionspuffer B und für *CglSDH-L* Reaktionspuffer C verwendet. Die verwendeten Enzymkonzentrationen betragen ca. 5 nM für die *CglQDH* und die *CglAroE* sowie 2 µM für die *CglSDH-L*.

#### 2.4.5.1 Bestimmung der kinetischen Parameter

Die NAD(P)<sup>+</sup>-Konzentrationen betragen bei der Bestimmung der kinetischen Parameter der drei Enzyme bezüglich der Substrate Shikimat und Quinat mindestens 1 mM, so dass eine

## 2 Material und Methoden

---

Reaktion pseudo-erster Ordnung vorgelegen hat. Auf Grund von beobachteter Substratüberschusshemmung konnten die Maximalgeschwindigkeiten ( $V_{\max}$ ) der Enzyme nicht gemessen, sondern mussten berechnet werden. Die verwendeten Substratkonzentrationen lagen daher unterhalb der jeweiligen Michaelis-Konstanten der Enzyme. Sie betragen 0,4 bis 8 mM für *CglQDH* (*Cgl0424*), 0,4 bis 12 mM für *CglAroE* (*Cgl1629*) und 0,4 bis 20 mM für *CglSDH-L* (*Cgl1132*). Um die kinetischen Konstanten der Cosubstrate zu bestimmen, wurden die Reaktionsgeschwindigkeiten im Konzentrationsbereich von 1  $\mu$ M bis 1 mM gemessen. Die Konzentration der Substrate betrug 8 mM Shikimat bzw. Quinat für *CglQDH*, 12 mM für *CglAroE* und 20 mM für *CglSDH-L*.

### 2.4.5.2 Bestimmung der Enzymspezifitäten

Bei der Bestimmung der Spezifitäten wurden die Substrate Shikimat, Quinat und L-Lactat verwendet. Dem Substrat, bei welchem die jeweilige enzymatische Aktivität am höchsten war, wurde der Wert 100% zugeordnet. Analog wurde bei der Bestimmung der Cosubstratspezifität vorgegangen.

### 2.4.5.3 Untersuchung der pH-Optima

Die Standardreaktionspuffer A, B und C wurden durch 500 mM Tris- und 100 mM Carbonatpuffer mit unterschiedlichen pH-Werten ergänzt. Indem auch die Aktivitäten der Enzyme in sowohl im Tris- als auch im Carbonatpuffer bei gleichem pH-Wert gemessen worden ist, wurde berücksichtigt, dass die Proteine generell in diesen Lösungen unterschiedliche Aktivitäten besitzen. Aus den Aktivitätsdifferenzen wurde ein Korrekturfaktor errechnet, der bei der Aktivitätsbestimmung berücksichtigt worden ist. Es wurden jeweils die „relativen Aktivitäten“ bestimmt, d.h., die Wechselzahlen bei den entsprechenden pH-Werten. Der höchste Wert wurde bei jedem Enzym auf 100% gesetzt.

### 2.4.5.4 Suche nach Enzyminhibitoren

Es wurden folgende Verbindungen auf ihre hemmenden Eigenschaften bezüglich der drei zu untersuchenden Enzyme hin untersucht: Chorismat, Prephenat, Protokatechuat, Anthranilat, Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan und Tyrosin in Kombination sowie Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan in Kombination. Die Konzentrationen dieser Metabolite lagen zwischen 5 mM und 10 mM.

### 2.4.6 Analytische Gelfiltration

Die analytische Gelfiltration wurde ebenso wie die präparative durchgeführt mit dem einzigen Unterschied, dass Dextranblau zugesetzt worden ist, um das Totvolumen der Säule zu bestimmen. Für die Erstellung Eichkurve wurden folgende Proteine verwendet:

RNase A (12 kDa), BSA (66 kDa), Katalyse (240 kDa) und Ferritin (440 kDa).

### 2.5 Proteinkristallisation

Die Kristallisationsversuche wurden nach der Dampfdiffusionsmethode des sitzenden Tropfens durchgeführt. Hierfür wurden *Cryscem*-Kristallisationsschalen mit integrierten Kristallisationsbrücken verwendet (Hampton Research, Laguna Niguel, USA).

Die konzentrierten Proteinproben wurden jeweils auf ca. 4 mg/ml verdünnt (Messung mit der Methode Bradfords). Die Lösungen wurden ständig auf Eis gelagert oder im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt. Es wurde dabei stets versucht, die Proteine dem Licht so kurz wie möglich auszusetzen.

Kristallisationstropfen wurden manuell aus Protein- und Reservoirlösung im Volumenverhältnis 1:1 gemischt. Additivlösungen wurden in einigen Fällen dem Tropfen zugesetzt, jedoch wurden an der Reservoirlösung während eines Versuches keine Veränderungen vorgenommen. Die Kristallisationsansätze wurden bei 4°C oder 20°C inkubiert. Die Ergebnisse der Experimente wurden in regelmäßigen Abständen unter dem Stereomikroskop untersucht, protokolliert und gegebenenfalls photographisch dokumentiert.

Initiale Kristallisationsexperimente wurden nach dem Schema der unvollständigen faktoriellen Suche (engl. *sparse matrix screen*; Jancarik & Kim 1991) mit kommerziell erhältlichen Lösungen, den sogenannten Kristallisationsscreens (Hampton Research, Laguna Niguel, USA; Jena Bioscience, Jena) durchgeführt. Wurde eine Bedingung identifiziert, bei der kristallines Protein beobachtet werden konnten, erfolgte eine Optimierung durch systematische Variation der Kristallisationsparameter.

Da die Kristalle der *Cg/QDH* unter Bedingungen hergestellt werden konnten, die einen hohen Anteil sowohl an Glycerin als auch an MPD enthielten, war die Zugabe von Cryoprotektant nicht erforderlich. Dagegen mussten die Kristalle der *Cg/SDH-L* in einen sogenannten Cryopuffer (0,5 M HEPES pH=7,4, 0,25M Tris/HCl pH=7,5, 60 mM NaCl, 75 mM MgCl<sub>2</sub>, 12% v/v Glycerin, 10% PEG400) übergeführt werden, wo sie auf Grund ihrer Instabilität in dieser Lösung allerdings nur wenige Sekunden in nicht-eingefrorenem Zustand verbleiben durften.

Die Kristalle wurden mit einer feinen Nylonschleife, dem sogenannten *Loop*, aus der Mutterlauge bzw. aus der Cryolösung herausgefischt und in flüssigen Stickstoff getaucht. Somit wurden sie bei 100 K schockgefroren und standen für sich anschließende Tieftemperaturmessungen zur Verfügung.

### 2.6 Diffraktionsexperimente

#### 2.6.1 Allgemeines

Sämtliche Kristalle wurden an einer der beiden institutseigenen Röntgenanlagen „Nonius“ oder „Rigaku“ mit Kupfer-K $\alpha$ -Strahlung vorläufig charakterisiert und auf ihr Diffraktionsverhalten hin untersucht.

#### 2.6.2 Der Datensatz der *CglQDH*

Es wurde ein vollständiger Datensatz eines *CglQDH*-Kristalls am DORIS-Speicherring des Deutschen Elektronen Synchrotrons (DESY) an der Messstation BW7B der *European Molecular Biology Laboratory* (EMBL) der Außenstation Hamburg gemessen. Dieser Platz verfügt über die stärkste Strahlungsquelle des EMBL. Er ist ausgestattet mit einem MAR IP 345 mm-Flächenzähldetektor (Mar Research GmbH, Norderstedt).

Eine geeignete Messstrategie wurde mit dem Programm *best* (Popov & Bourenkov 2003) ermittelt, d.h., der Kristall-Detektor-Abstand und der Rotationswinkel pro Aufnahme wurden den Vorschlägen der Software entsprechend angepasst. Die einzelnen Messparameter können der Tabelle 2.4 entnommen werden. Das Diffraktionsexperiment wurde bei einer Temperatur von 100 K mit Hilfe von flüssigem Stickstoff durchgeführt.

**Tab. 2.4:** Messparameter für den Datensatz der *CglQDH*

Raumgruppe	C2
Wellenlänge	0,843 Å
Kristall-Detektor-Abstand	299,73 mm
Anzahl der Diffraktionsbilder	150
Rotation pro Bild	1,2°
Gesamtrotation	180°

### 2.7 Datenreduktion

Die Röntgendiffraktionbilder des gemessenen *CglQDH*-Datensatzes wurden mit den Programmen DENZO und SCALEPACK aus dem HKL-Programmpaket (Otwinowski & Minor 1997) indiziert, integriert und skaliert. Die Datei, die nach dem Skalieren ausgegeben wurde, ist mit dem Programm SCALEPACK2MTZ aus dem CCP4-Programmpaket konvertiert worden. Die Packungsdichte wurde mit MATTHEWS\_COEFF (Kantardjieff & Rupp 2003) berechnet.

### 2.8 Strukturlösung der *CglQDH*

Nachdem der native Datensatz ausgewertet worden ist, musste das Phasenproblem gelöst werden. Die Struktur der *CglQDH* wurde mit Hilfe des Molekularen Ersatzes gelöst. Als Suchmodell diente die Struktur der Shikimat-Dehydrogenase aus *Methanococcus jannaschii* (PDB-Code 1NVT). Es wurde mit Hilfe des Programmes MOLEMAN (Kleywegt *et al.* 2001) in ein Polyalaninmodell überführt, wobei die Glycinreste jedoch erhalten blieben. Die Wassermoleküle und das NADP wurden gelöscht. Die Berechnungen zur Suche der Rotationswinkel (im realen Raum) und Translationsvektoren (im reziproken Raum) wurden mit dem Programm CNS (Brunger *et al.* 1998) in einem Auflösungsbereich von 6,0 Å bis 10,0 Å durchgeführt.

Die Aminosäuresequenzidentität zwischen der *CglQDH* und der Shikimat-Dehydrogenase aus *Methanococcus jannaschii* beträgt ca. 32%.

### 2.9 Modellbau und Verfeinerung

Das erste Modell der *Cgl*QDH wurde mit Hilfe von Methoden des Molekularen Ersatzes erhalten. Es basierte auf einem Datensatz mit einer Auflösung von bis zu 1,6 Å. Es ergab sich eine physikalisch mögliche Kristallpackung.

Der eigentliche Modellbau einschließlich Aminosäureaustausch geschah durch Kombination eines automatisierten Modellbaus mit dem Programm ARP/wARP (Perrakis *et al.* 1999) und manuellen Modellbautechniken mit Hilfe des Graphikprogramms O (Jones *et al.* 1991).

Um das Modell zu verfeinern, wurden iterative Zyklen von manueller Anpassung mit dem Programm O (Jones *et al.* 1991) und molekulare Verfeinerungstechniken mit dem Programm REFMAC5 (CCP4 1994) durchgeführt. Während der letzten Phasen des Verfeinerungsprozesses wurden Wassermoleküle mit ARP/wARP (Perrakis *et al.* 1999) eingefügt.

### 2.10 Homologe Modellierung der *CglAroE* und der *CglSDH-L*

Um die Modelle der Tertiärstrukturen der *CglAroE* und der *CglSDH-L* zu erstellen, wurde die Methode der vergleichenden Proteinstrukturmodellierung (Homologe Modellierung, *Homology Modelling*) verwendet. Als Vorlage (*Template*) dienten für die *CglAroE* die Shikimat-Dehydrogenase (AroE) aus *E. coli* (PDB-Code 1NYT) und für die *CglSDH-L* die Röntgenstruktur der *CglQDH*. Als Entscheidungsparameter für die Auswahl eines geeigneten Templates dienten neben der Sequenzidentität zum Zielmolekül (*Target*) auch die Qualität des Templates (u.a. R-Wert, Auflösung, Ramachandran-Plot), die Anzahl an „Deletionen“ und „Insertionen“, die sich beim Sequenzvergleich mit dem *Target* ergeben und eine vergleichbare Kettenlänge von Ziel- und Vorlagemolekül. Ferner wurde die Abfolge der Sekundärstrukturen des *Templates* mit der vermeintlichen des *Targets* berücksichtigt. Letztere wurde mit dem Programm PREDATOR (Frishman & Argos 1997) berechnet. Aus dem Zielmolekül 1NYT wurden alle Polypeptidketten bis auf diejenige, welche den niedrigsten Gesamttemperaturfaktor von allen besaß, gelöscht: Kette A. Es wurden alle Wasser- und andere Heteromoleküle aus beiden *Targets* entfernt.

Die vorhandenen Insertionen und Deletionen wurden durch den Austausch von Strukturen bestimmter Aminosäuresequenzen (*Loops*) mit Hilfe des Programmes BRAGI (Schomburg & Reichelt 1988) ausgeglichen. Die Kettenlängen wurde der des *Targets* angepasst. Mit dem Programm SCWRL (Bower *et al.* 1997) wurden die Seitenketten des Modells entfernt und durch diejenigen des *Targets* ausgetauscht.

Die beiden entstandenen Modelle wurden mit Hilfe des Programmpakets AMBER8 auf ein energetisch niedrigeres Niveau gebracht. Hierfür wurden ihnen Wasserstoffatome zugefügt, welche von einer Wasserbox (WATBOX216 5) umgeben wurden. Für alle Berechnungen mit AMBER8 wurde das Kraftfeld *ff99* (Cornell *et al.* 1995) verwendet. Die Proteine wurden fixiert und mit den Wassermolekülen eine Energieminimierung durchgeführt. An diesen Äquilibrierungsschritt schloss sich eine Energieminimierung des Protein/Wasser-Komplexes mit 2000 Zyklen an. Es folgte eine Molekulardynamikrechnung (10000 Zyklen bei 300 K) und eine erneute Energieminimierung, wie bereits beschrieben.

### 2.11 Modellierung der ternären Komplexe

Die Cosubstrate wurden in die drei Tertiärstrukturen der *CglQDH*, der *CglAroE* und der *CglSDH-L* modelliert, indem sie mit einer homologen Tertiärstruktur (*Template*), bei der die Lage des NADPs experimentell bestimmt worden ist, mit dem Programm PyMOL (DeLano 2002) überlagert worden sind. Für die *CglQDH* wurde die Shikimat-Dehydrogenase aus *Methanococcus jannaschii* (PDB-Code 1NVT) und für die *CglAroE* sowie die *CglSDH-L* die Shikimat-Dehydrogenase AroE aus *E. coli* (PDB-Code 1NYT) als Vorlage verwendet. Zunächst wurden die Wassermoleküle aus den *Templates* manuell entfernt. Da 1NVT und 1NYT als Tetramer bzw. Dimer in der asymmetrischen Einheit kristallisiert wurden, sind alle Polypeptidketten bis auf eine ebenfalls manuell entfernt worden. Die übrig gebliebene wies nach Begutachtung mit den Graphikprogrammen PyMOL (DeLano 2002) und BRAGI (Schomburg & Reichelt 1988) verglichen mit den gelöschten Ketten jeweils die beste Übereinstimmung zum Zielmolekül im Bereich der Cosubstratbindung auf. Nach der Überlagerung (*Superposition*) jedes der drei Modelle mit dem jeweiligen Template wurden diese gelöscht, wobei aber das Cosubstrat erhalten blieb. Bei dem *CglQDH/NADP*-Modell wurde die Phosphorylgruppe am C2'-Atom der Adenosylribose gelöscht, so dass ein *CglQDH/NAD*-Modell generiert worden ist.

Das Substrat Quinat wurde in der Sesselkonformation mit dem Programm MOE der *Chemical Computing Group*, Köln erstellt. Die halbsesselartigen Idealgeometrien der Metabolite Shikimat und Dehydroshikimat wurden der HIC-Up (*Hetero-compound Information Centre – Uppsala*)-Datenbank entnommen.

Die Substrate (Quinat und Shikimat bei der *CglQDH* und Shikimat bei der *CglAroE* und *CglSDH-L*) wurden manuell in die Protein/NAD(P)-Modelle mit Hilfe der Programme PyMOL (DeLano 2002) und O (Jones *et al.* 1991) gelegt.

In Arbeiten, die sich auf diese Dissertation anschließenden, wurden mit dem dimeren *CglQDH/NAD*- sowie den tertiären *Cgl/NAD/Quinat*- und *Cgl/NAD/Shikimat*-Komplexen mit dem AMBER-Programmpaket Molekulardynamiken und Energieminimierungen durchgeführt (unpublizierte Daten).

### 2.12 Validierung und Darstellung der Modelle

Während der Verfeinerung der Struktur der *CglQDH* wurde das jeweils aktuelle Modell durch die Validierungsroutinen der verwendeten Programme auf ihre stereochemische Validität hin überprüft. Insbesondere um die Qualität der drei Endmodelle der Apostrukturen und der Komplexe zu bewerten, wurden die Programme PROCHECK (Laskowski *et al.* 1993), ERRAT und VERIFY-3D verwendet. Die Sekundärstrukturen der drei finalen Modelle wurden mit dem Programm DSSP (Kabsch & Sander 1983) berechnet und mit dem Skript DSSP2PDB (Stroud 2002) reduziert und in ein für Graphikprogramme lesbares Format konvertiert. Die entsprechenden Ausgabedateien wurden manuell in die Strukturdateien der Proteine („pdb-Files“) kopiert.

Die Abbildungen der Molekülmodelle wurden mit dem Programm PyMOL (DeLano 2002) erstellt.

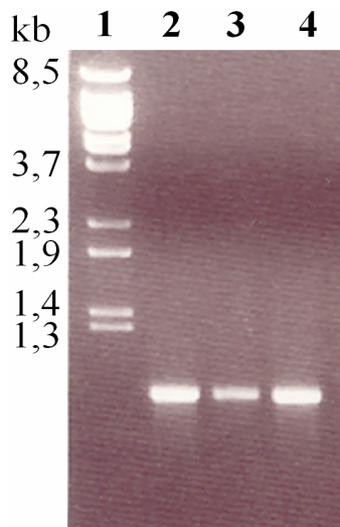
# 3 Ergebnisse und Diskussion

## 3.1 Modifikation des Expressionsvektors

Die erfolgreiche Insertion des His<sub>6</sub>-rTev-Adapters in den Expressionsvektor pET-3d wurde mittels DNA-Sequenzierung überprüft. Der Vektor erhielt die Bezeichnung pNHis (Chatterjee *et al.* 2005).

## 3.2 Klonierung der Shikimat/Quinat-Dehydrogenase-Gene

Um die drei Expressionsvektoren zu komplettieren, wurde zunächst die genomische DNA aus *C. glutamicum* isoliert. Die Ausbeute betrug ca. 0,2 µg DNA pro 50 ml Bakteriensuspension bzw. pro 0,35 g Feuchtmasse der Zellen. Der Reinheitskoeffizient E<sub>260</sub>/E<sub>280</sub> hatte ungefähr den Wert 1,8. Die Gene der S/QDH wurden mittels PCR-Mutagenese amplifiziert (siehe Abb. 3.1).

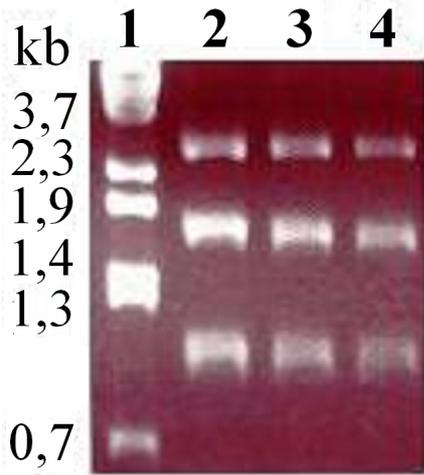


**Abb. 3.1**

Agarose-DNA-Gel der drei PCR-Produkte. Spur 1: DNA Größenmarker  $\lambda$  DNA *BstE II Digest* (NEB), Spur 2: *CglQDH*-Gen, Spur 3. *CglAroE*-Gen, Spur 4: *CglSDH-L*-Gen. Die erwarteten Bandengrößen betragen 894 bp (Spur 2), 852 bp (Spur 3) und 849 bp (Spur 4). Die DNA wurde mit Ethidiumbromid gefärbt.

Die PCR-Produkte wurden mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen verdaut und in den ebenfalls geschnittenen Vektor pNHis ligiert. *E. coli*-Zellen, die mit Hilfe des Inoue-Protokolls „ultrakompetent“ gemacht worden waren, wurden mit den Ligationsansätzen transformiert. Durch Anziehen der Bakterienzellen wurden nicht nur diese vermehrt, sondern auch die transformierten Expressionsvektoren, welche mittels DNA-Gelelektrophorese analysiert wurden (siehe Abb. 3.2).

### 3 Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 3.2**

Analytisches Agarose-DNA-Gel der drei Expressionsvektoren. Sie wurden mit dem Restriktionsenzym *BspHI* gespalten. Spur 1: DNA Größenmarker  $\lambda$  DNA *BstE II Digest* (NEB), Spur 2: *CglQDH*-Vektor, Spur 3: *CglAroE*-Vektor, Spur 4: *CglSDH-L*-Vektor. Die erwarteten DNA-Fragmente haben jeweils eine Größe von 0,1 kb, 1,0 kb und 2,7 kb. Zusätzlich tritt bei dem *CglQDH*-Vektor das Fragment der Größe 1695 bp, bei *CglAroE* 1672 bp und bei *CglSDH-L* 1647 bp auf. Die DNA wurde mit Ethidiumbromid gefärbt.

Bei erfolgreicher Insertion des PCR-Produktes wurden die Expressionsvektoren durch DNA-Sequenzierung auf etwaige Mutationen, die während der PCR-Reaktion aufgetreten sein könnten, hin untersucht. Obwohl die verwendete DNA-Polymerase eine Korrekturlesefunktion (*proof reading function*) besaß, musste die Ligation in einigen Fällen wiederholt werden. Die Sequenzierung der S/QDH führte zu den Proteinsequenzen, die in Abbildung 3.3 dargestellt sind.

```

1  MSGHHHHHHG SENLYFQGAM NDSILLGLIG  QGLDLSRTPA  MHEAEGLAQG
51  RATVYRRIDT  LGSRASGQDL  KTL LDAALYL  GFNGLNITHP  YKQAVLPLLD
101 EVSEQATQLG  AVNTVVIDAT  GHTTGHNTDV  SGFGRGMEEG  LPNAKLDSV
151 QVGAGGVGNA  VAYALVTHGV  QKLQVADLDT  SRAQALADVI  NNAVGREAVV
201 GVDARGIEDV  IAAADGVVNA  TPMGM PAHPG  TAFDV SCLTK  DHWVG DVVYM
251 PIETELLKAA  RALGCETLDG  TRMAIHQAVD  AFRLFTGLEP  DVSRMRETF
301 SL

```

```

1  MSGHHHHHHG SENLYFQGAM GSHITHRAAV  LGSPIEHSKS  PVLHNTGYKA
51  LGLDQWEYDR  FECTGDMLPG  IVSGADETYC  GFSVTMPSKF  AALEFADEV
101 ERACAIGSAN  TLLRTATGWR  ADNTD VDGIR  GALGELLGGA  SLAGKHAIVI
151 GSGGTARPAI  WALIEAGVAR  ITVLNRSRDT  AELQTLFDET  PTTLAYAPLE
201 HLHIEADV VV  STVPSAAIAG  LEDTLAIAPV  LDVIYDPWPT  PLVEVTRAKG
251 LKAVGGHVML  AHQSYGQFEQ  FTGMDAPRDA  MREALEESLG  ISEEH

```

```

1  MSGHHHHHHG SENLYFQGAM NYVDRETTLC  ISLAARPSNH  GVRFHNWLYA
51  ELGLNYLYKA  VAPADITAAV  AGIRGLNIRG  AGVSMPYKSD  VIPLIDELHP
101 SAERIRSVNT  IVNNDGHLVG  YNTDYTAVYH  LLEEHRVNP  ARVAIKGSGG
151 MANAVVAALA  EYGLSGTVVA  RNHTTGSALA  SRYGWEYSAT  VPEDAKILVN
201 VTPMGMNGPD  QDVVSFGEDE  VDRADVIFDC  VAFPVETPLI  KLAKEKGKQT
251 IDGGEVAALQ  AAQFHLYTGT  VLP TNDQIIA  AEEFSK

```

**Abb. 3.3**

Primärstrukturen der drei gentechnisch veränderten Enzyme. Von oben nach unten: *CglQDH*, *CglAroE* und *CglSDH-L*. Die von den Fusionstags kodierte Aminosäuren sind fett gedruckt.

## 3.3 Proteinüberexpression und -reinigung

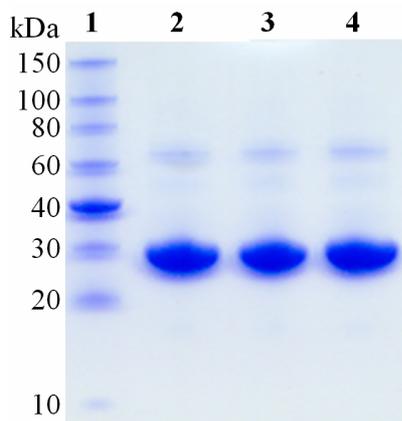
### 3.3.1 rTEV-Protease

1 Liter Bakteriensuspension lieferte eine Zellfeuchtmasse von ca. 6 g. Trotz verhältnismäßig geringer Reinheit der rTev-Protease war sie geeignet für weitergehende Experimente, da sich die zu schneidenden S/QDH leicht aus dem Spaltungsansatz reinigen ließen (siehe Abschnitt 3.3.3). Die Ausbeute der vereinigten Fraktionen betrug etwa 12 mg Protein pro Liter Bakteriensuspension.

Es wurden Expressions- und Reinigungsanleitungen aus der Literatur verwendet (Lucast *et al.* 2001). Es war somit davon auszugehen, dass die beiden Protokolle schon optimiert worden sind. Hierfür spricht auch, dass es sich um eine denaturierende Reinigung gehandelt hat, was generell eine hohe Ausbeute und Reinheit an Protein ermöglicht. Durch Zugabe von Glycerin (Endkonzentration 50% v/v) in den Dialysepuffer konnte jedoch die Aktivität der Protease zusätzlich positiv beeinflusst werden, was mit einem „Testsubstrat“, einer L-2-Hydroxyisocaproat-Dehydrogenase, gezeigt werden konnte (Chatterjee *et al.* 2005).

### 3.3.2 Shikimat/Quinat-Dehydrogenasen aus dem Lysat

1 Liter Bakteriensuspension lieferte eine Zellfeuchtmasse von ca. 2,5 bis 3 g (für *Cgl*QDH und *Cgl*AroE) bzw. ca. 1,3 bis 1,8 g (für *Cgl*SDH-L). Nachdem die Zellen aufgeschlossen und unlösliche Bestandteile aus dem Rohlysat durch Zentrifugieren entfernt wurden, ließen sich drei Dehydrogenasen mittels Nickel-Affinitätschromatographie reinigen. Sie wurden mittels SDS-PAGE auf ihre Reinheit hin untersucht (siehe Abb. 3.4).



**Abb. 3.4**

SDS-PAGE der drei S/QDH nach der Ni-Affinitätschromatographie. Die Spuren wurden ein wenig mit der Proteinprobe überladen, um etwaige Verunreinigungen besser erkennen zu können.

Spur 1: Größenmarker Roti-Mark 10-150, Roth

Spur 2: 10 µg *Cgl*QDH (MW 31862 Da)

Spur 3: 10 µg *Cgl*AroE (MW 31471 Da)

Spur 4: 10 µg *Cgl*SDH-L (MW 31051 Da)

Um die Massenkonzentration der Proteine zu bestimmen, wurde die Bradford-Methode verwendet.

### 3 Ergebnisse und Diskussion

---

In den meisten Fällen konnte für kinetische Experimente auf weitere Reinigungsschritte verzichtet werden. Um Kristallisationsversuche durchzuführen, schloss sich in einigen Fällen an die Affinitätschromatographie eine Gelfiltration an, wonach die Reinheit der Enzyme in jedem Fall auch für die Kristallisation ausreichend gewesen ist. Schließlich führte 1 Liter Bakteriensuspension zu ca. 4 bis 6 mg (für *CglQDH* und *CglAroE*) bzw. 2 bis 3 mg (für *CglSDH-L*) reinem Protein.

An dieser Stelle muss bemerkt werden, dass das Expressions- und Reinigungsprotokoll möglicherweise noch verbessert werden kann. Die Bearbeitung der *S/QDH* aus *C. glutamicum* ist auf ein Vorgehen, das auf einen „Medium-Durchsatz“ basiert, zurückzuführen. Aus zeitlichen Gründen konnte daher nicht jeder einzelne Schritt von der Klonierung der DNA-Sequenzen bis hin zur Bestimmung der Proteinstrukturen vollständig optimiert werden. Tatsächlich konnte nachträglich bei der *CglQDH* beobachtet werden, dass eine Inkubationstemperatur der Bakterien von 20°C nach der Induktion der Proteinexpression zu einer höheren Ausbeute an aktivem Enzym führt (Daten nicht gezeigt).

#### 3.3.3 Shikimat/Quinat-Dehydrogenasen aus dem Spaltungsansatz

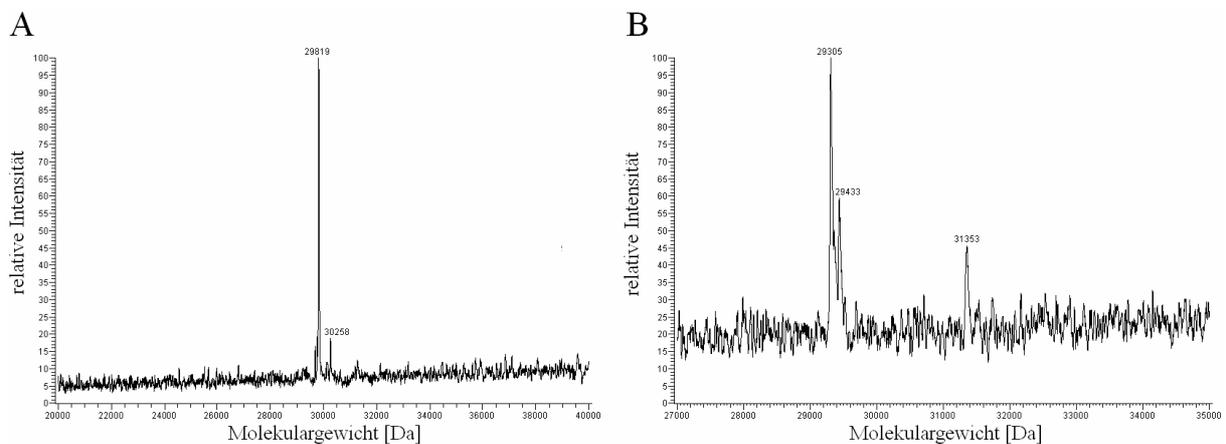
Nachdem die Fusionstags der *S/QDH* durch die rTEV-Protease entfernt worden waren, wurden die Dehydrogenasen aus dem Spaltungsansatz gereinigt. Durch SDS-PAGE konnte gezeigt werden, dass die drei Enzyme für weitere Experimente ausreichend rein gewesen sind (Daten nicht gezeigt). Es wurden ferner Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie-Experimente (ESI-MS) durchgeführt, um neben der Reinheit auch die Effizienz der Protease zu analysieren. Es hat sich dabei gezeigt, dass die gentechnisch veränderte *CglQDH* relativ spezifisch gespalten wurde, d.h., vor allem die erwarteten Klonierungsartefakte GA N-terminal vor der nativen Proteinsequenz blieben erhalten (siehe Abb. 3.5). Ein weiterer Peak, der sich aus dem Rauschsignal nur unmerklich absetzte, konnte identifiziert werden. Es handelt sich dabei aller Wahrscheinlichkeit nach um die *CglQDH* mit den N-terminalen Klonierungsartefakten YFQGA.

Bei der *CglAroE* fand man neben dem erwarteten Spaltungsprodukt (siehe Abschnitt 2.2.1) zwei weitere Produkte: die *CglAroE* ohne artifizielle Aminosäuren und das Enzym, bei dem nur das Methionin des Fusionstags abgespalten worden ist (siehe Abb 3.5).

### 3 Ergebnisse und Diskussion

Die Spaltungseffizienz der *Cgl*SDH-L ließ sich nicht untersuchen, da sie in einem für die Massenspektrometrie erforderlichen Nidrigsalz-Puffer außerordentlich schlecht löslich ist und somit nicht auf die für derartige Experimente erforderliche Konzentration angereichert werden konnte.

Aus den Spaltungsversuchen mit den beiden S/QDH geht hervor, dass die Spezifität der rTEV-Protease deutlich von ihrem Substratmolekül abhängt. Dabei spielt offenbar nicht nur die Aminosäure-Erkennungssequenz eine Rolle, sondern auch andere Faktoren wie z.B. die Zugänglichkeit zu dieser Sequenz.



**Abb. 3.5**

ESI-MS Monomere der *Cgl*QDH (A) und der *Cgl*AroE (B) nach Spaltung mit der rTEV-Protease. Die gespaltene *Cgl*QDH besitzt mit den erwarteten Klonierungsartefakten GA ein Molekulargewicht von 29825 Da. Kaum merklich aus den Rauschsignalen erhebt sich ein Peak bei 30258 Da. Es handelt sich dabei höchstwahrscheinlich um die *Cgl*QDH mit den artifiziellen Residuen YFQGA. Die abweichenden Massen von je ca. 5 bis 6 Da liegen innerhalb der Fehlergrenzen. Weniger spezifisch als die *Cgl*QDH wurde die *Cgl*AroE gespalten. Es sind neben dem erwarteten Spaltungsprodukt (29333 Da), das man nur in ~25% des Molekülpools findet, zwei weitere Produkte auszumachen. Das erste kommt mit einer Häufigkeit von ~60% vor; es sind hier sämtliche Residuen des Fusionstags abgespalten (29305 Da) und in ~15% der Fälle wurde nur ein Methionin entfernt (31353 Da). Die bestimmten Molekulargewichte der *Cgl*AroE stimmen exakt mit den theoretisch ermittelten überein.

### 3.4 Enzymkinetik

Bisher konnten drei Proteine aus *C. glutamicum* exprimiert werden, von denen aber noch nicht geklärt ist, ob es sich tatsächlich um S/QDH handelt. Daher mussten geeignete Bedingungen gefunden werden, mit denen die drei Proteine enzymkinetisch untersucht werden konnten.

Da die exakten Versuchsbedingungen der enzymatischen *Assays* für die drei S/QDH aus *C. glutamicum* noch nicht ausgearbeitet waren, musste auch untersucht werden, ob die Zugabe diverser Additive in den Reaktionsansatz Einfluss auf die Enzymaktivität besitzt. Hier kamen vor allem divalente Kationen wie z.B. Zink in Frage. Es hat sich aber herausgestellt, dass die Zugabe solcher Metallionen die Aktivität nicht erhöht und ferner, dass EDTA nicht inhibitorisch wirkt.

Anhand von zunächst qualitativen Analysen mit verschiedenen (Co)-Substraten konnte gezeigt werden, dass tatsächlich Shikimat-Dehydrogenasen bzw. funktional verwandte Enzyme vorliegen, so dass die entsprechenden kinetischen Parameter bestimmt werden konnten.

#### 3.4.1 Kinetische Parameter

Der Fusionstag könnte unter Umständen die enzymatische Aktivität beeinflussen, z.B. indem er das aktive Zentrum blockiert. Deshalb wurde er für die Bestimmung der kinetischen Parameter mit der rTEV-Protease abgespalten. Es hat sich aber gezeigt, dass die enzymatische Aktivität durch den Tag praktisch nicht (*Cgl*QDH und *Cgl*SDH-L) bzw. nur gering (*Cgl*AroE, ca. 90% Aktivität mit Fusionstag) beeinträchtigt wird.

Die *Cgl*QDH besitzt sowohl eine deutliche Affinität zu Quinat als auch zu Shikimat. Mit Shikimat als Substrat besitzt sie eine höhere Wechselzahl als mit Quinat, jedoch ist mit diesem auf Grund der niedrigeren Michaelis-Konstante die katalytische Effizienz etwa um den Faktor 3,3 höher (vergleiche Tab. 3.1). Anhand der kinetischen Parameter kann man feststellen, dass es sich hier um eine NAD-abhängige Quinat-Dehydrogenase mit ebenfalls deutlicher Affinität zu Shikimat handelt. Ein solches Enzym ist in Prokaryoten bisher noch nicht beschrieben worden.

### 3 Ergebnisse und Diskussion

---

Das Enzym *CglAroE* besitzt mit Shikimat die höchste katalytische Effizienz aller drei Enzyme mit diesem Substrat. Sie ist aber um den Faktor vier bis fünf geringer als bei der *AroE* von *Mycobacterium tuberculosis* und um den Faktor 50 bis 100 langsamer als bei *Aeroglobus fulgidus* bzw. *E. coli* (siehe Tab. 1.1 und Tab. 3.1).

Die *CglSDH-L* weist einen extrem niedrigen  $k_{\text{cat}}$ -Wert auf (siehe Tab. 3.1). Gemäß einem Abgleich mit der BRENDA (Schomburg *et al.* 2002) lässt sie sich kaum mit Wechselzahlen, die dieser Datenbank zu entnehmen sind, vergleichen. Es liegt in diesem Fall nahe, dass das Enzym bei der Expression und/oder der Proteinreinigung dramatisch an Aktivität verliert. Auffällig ist auch die schlechte Löslichkeit des Proteins in Puffern mit geringer Salz- oder Glycerinkonzentration. Man muss dem jedoch gegenüberstellen, dass das Protein, nachdem es gereinigt worden ist, seine enzymatische Aktivität beibehält, wenn man es über einen längeren Zeitraum bei 4°C lagert oder umpuffert. Wie später noch ausführlich erläutert wird, besitzt das Protein außerordentlich gute Kristallisationseigenschaften (siehe Kapitel 3.6), was ebenfalls gegen ein Denaturieren oder zu schnellem Präzipitieren in einem geeigneten Puffer spricht.

Leider ist es bisher schwer möglich, die Aktivität der Shikimat-Dehydrogenasen ausgehend vom Dehydroshikimat (Richtung der *in vivo*-Reaktion) zu messen, da dieser Metabolit kommerziell nicht erhältlich ist. Man findet in der Literatur gelegentlich den Hinweis, dass die kinetischen Konstanten beider Reaktionsrichtungen der Shikimat-Dehydrogenasen ähnlich sind (z.B. Singh *et al.* 2005). Auch wenn sich die katalytischen Effizienzen der *in vitro*-Reaktionen der *AroE* von *Haemophilus influenzae* bei Shikimat und Dehydroshikimat um beinahe Faktor 10 unterscheiden (siehe Tab. 1.1), ist kaum davon auszugehen, dass die kinetischen Parameter der *SDH-L* ausgehend vom Dehydroshikimat mit denen der *AroE*-Enzyme vergleichbar sein könnten, da hier mehrere Größenordnungen eine Rolle spielen.

Es könnte natürlich auch so sein, dass das Protein ein anderes Substrat oder Cosubstrat benötigt als die „echten“ Shikimat-Dehydrogenasen (siehe Abschnitt 3.4.2).

### 3 Ergebnisse und Diskussion

**Tab. 3.1:** Kinetische Parameter der drei Shikimat/Quinat-Dehydrogenasen aus *C. glutamicum*. Um die enzymatische Aktivität der *CglQDH* in Abhängigkeit von der  $\text{NAD}^+$ -Konzentration zu messen, wurde Quinat als Substrat eingesetzt.

Enzym	Substrat	$k_{\text{cat}}$	$K_M$	$k_{\text{cat}}/K_M$
<i>CglQDH</i>	Shikimat	$85,2 \pm 15,6 \text{ s}^{-1}$	$46,6 \pm 10,7 \text{ mM}$	$1,83 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$
	Quinat	$61,9 \pm 4,2 \text{ s}^{-1}$	$10,2 \pm 2,0 \text{ mM}$	$6,07 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$
	$\text{NAD}^+$	$85,2 \pm 15,6 \text{ s}^{-1}$	$99,7 \pm 17,3 \text{ }\mu\text{M}$	$854,56 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$
<i>CglAroE</i>	Shikimat	$9,56 \pm 0,11 \text{ s}^{-1}$	$259,6 \pm 2,2 \text{ }\mu\text{M}$	$36,83 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$
	$\text{NADP}^+$	$9,56 \pm 0,11 \text{ s}^{-1}$	$18,3 \pm 2,6 \text{ }\mu\text{M}$	$522,40 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$
<i>CglSDH-L</i>	Shikimat	$(26,0 \pm 2,6) \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$	$30,18 \pm 9,10 \text{ mM}$	$8,61 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$
	$\text{NADP}^+$	$(26,0 \pm 2,6) \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$	$1,88 \pm 0,82 \text{ }\mu\text{M}$	$13,83 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$

#### 3.4.2 Spezifitäten der Enzyme

Nachdem die Substratspezifitäten für die Entwicklung der Enzymassays erst qualitativ untersucht worden waren, sollten sie anschließend quantitativ bestimmt werden.

##### 3.4.2.1 Substratspezifitäten

Quinat ist dem Metaboliten Shikimat chemisch sehr ähnlich (siehe Abb. 1.4), so dass es sich für Spezifitätsversuche gut eignet. Allerdings ist Quinat v.a. auf Grund seiner zusätzlichen Hydroxylgruppe ein wenig größer als Shikimat. Möglich wäre daher, dass Quinat für das aktive Zentrum der Shikimat-Dehydrogenasen zu groß ist, weshalb sich keine Aktivität nachweisen ließe. Es ist daher notwendig, die Spezifität der Enzyme gegenüber kleineren Substraten zu untersuchen, weshalb das Molekül L-Lactat für die anstehenden Versuche verwendet wurde.

Jedes der Enzyme besitzt die höchste Aktivität mit Shikimat als Substrat (siehe Tab. 3.2). Bei der Verwendung von Quinat als Substrat ist bei der *CglQDH* aber noch eine deutliche Aktivität zu verzeichnen. Mit L-Lactat wurde eine vernachlässigbare bzw. keine Aktivität gemessen.

### 3 Ergebnisse und Diskussion

**Tab. 3.2:** Substratspezifitäten der drei S/QDH aus *C. glutamicum*. Bei gegebenem Enzym wurde jeweils der höchsten Aktivität (gemessen als  $k_{cat}$ ) der Wert 100 zugeordnet. Jede Messung wurde mindestens zweimal wiederholt und hieraus das arithmetische Mittel sowie die Standardabweichung bestimmt. Wenn keine Aktivität gemessen wurde, sind in der Tabelle die Detektionsgrenzen angegeben, was durch das Symbol „<“ angezeigt wird.

Enzym	Shikimat	Quinat	L-Lactat
<i>Cgl</i> QDH	100,0 ± 18,3	72,6 ± 6,7	$1,26 \times 10^{-3} \pm 0,21 \times 10^{-3}$
<i>Cgl</i> AroE	100,0 ± 4,7	0,023 ± 0,001	< $6,4 \times 10^{-5}$
<i>Cgl</i> SDH-L	100,0 ± 3,2	0,025 ± 0,007	< $9,8 \times 10^{-5}$

Auffällig ist, dass die *Cgl*QDH nicht nur mit Quinat deutlich aktiv ist, sondern auch dass sie eine (wenn auch nur rudimentäre) enzymatische Aktivität mit L-Lactat zeigt. Ihre Spezifität gegenüber Substraten scheint, verglichen mit anderen Mitgliedern der S/QDH-Familie, generell ein wenig herabgesetzt zu sein. Eine mögliche Erklärung für die relativ geringe Substratspezifität der *Cgl*QDH mag darin bestehen, dass ihre Aktivität gegenüber Dehydroshikimat in der Zelle keine Rolle spielt: Wenn der Zelle durch die Verfügbarkeit großer Mengen an Quinat viel Energie zur Verfügung steht, dann ist es auch sinnvoll, dass sie sich vermehrt und hierfür Aminosäuren produziert. Tatsächlich weist die Entdeckung des Enzyms YdiB in *E. coli* darauf hin, dass hier die vermutliche Bifunktionalität (sowohl anabol als auch katabol) nicht unbedingt schädlich für den Organismus sein muss.

Die hohe Substratspezifität der *Cgl*AroE ist charakteristisch für AroE-Enzyme, aber dasselbe Verhalten der SDH-L weist darauf hin, dass sie tatsächlich eine Shikimat-Dehydrogenase ist.

#### 3.4.2.2 Cosubstratspezifitäten

Da Stoffwechselwege in Organismen im Regelfall streng reguliert werden müssen, gibt es beispielsweise das Phänomen, dass chemisch extrem ähnliche Cosubstrate in zellulären Redoxreaktionen vollkommen unterschiedliche Funktionen übernehmen (siehe Abschnitt 1.4.1.5). Daher war es erforderlich, die Spezifitäten der Enzyme bezüglich ihrer Cosubstrate näher zu untersuchen. Wegen des bereits bekannten Bindungsmodus von NAD(P) der S/QDH-Familie (Michel *et al.* 2003) genügt es, sich dabei auf diese beiden Moleküle zu beschränken.

### 3 Ergebnisse und Diskussion

Alle drei Enzyme sind hoch spezifisch gegenüber ihrem Cosubstrat (siehe Tab. 3.3). Dies ist für die AroE und die SDH-L charakteristisch. Es zeigte sich endgültig, dass die *Cgl*QDH kein YdiB-Enzym (siehe Abschnitt 1.4.2) ist, sondern eine NAD-abhängige Quinat-Dehydrogenase. Ein solches Enzym mit gleichzeitiger Affinität zu Shikimat wurde bisher noch nicht in Prokaryoten beschrieben.

**Tab. 3.3:** Cosubstratspezifitäten der drei S/QDH aus *C. glutamicum*. Es wurde in allen Fällen Shikimat als Substrat gewählt. Die angegebenen relativen Werte wurden aus Wechselzahlen berechnet. Jede Messung wurde mindestens zweimal wiederholt und das arithmetische Mittel sowie die Standardabweichung bestimmt.

Enzym	NADP <sup>+</sup>	NAD <sup>+</sup>
<i>Cgl</i> QDH	0,36 ± 0,04	100,0 ± 3,3
<i>Cgl</i> AroE	100,0 ± 7,1	0,32 ± 0,01
<i>Cgl</i> SDH-L	100,0 ± 5,0	0,13 ± 0,02

#### 3.4.3 pH-Optima

Es wurden die pH-Optima der Enzyme nicht nur bestimmt, um optimale Bedingungen für die Bestimmung der kinetischen Parameter zu erhalten o.ä., sondern auch, um nach Lösung der Strukturen möglicherweise Aussagen über den Reaktionsmechanismus treffen zu können und bei der *Cgl*QDH abzuschätzen, welches Substrat *in vivo* eine größere Rolle spielt: (Dehydro-) Shikimat oder Quinat.

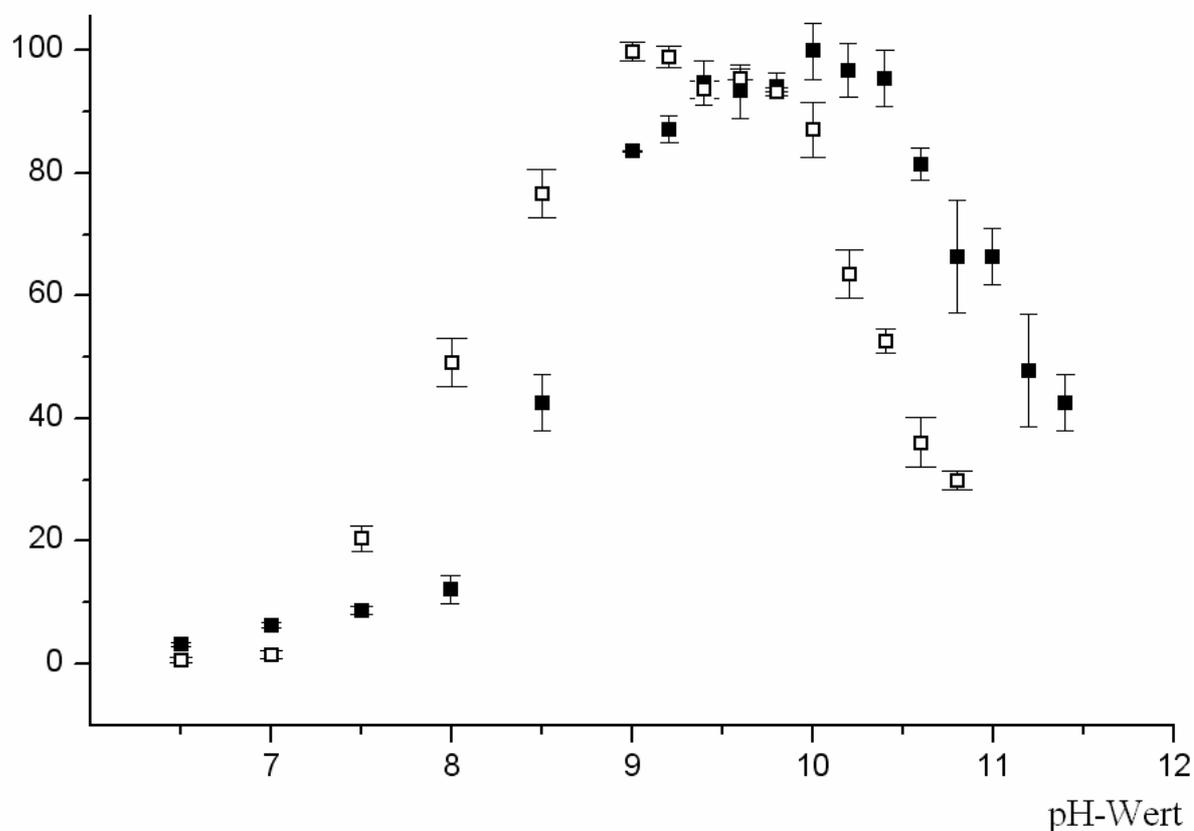
Alle drei Enzyme besitzen ein pH-Optimum im alkalischen Milieu (siehe Tab. 3.4). Auffällig ist, dass die Aktivitätskurve der *Cgl*QDH mit Shikimat gegenüber der mit Quinat in Richtung basischer pH-Werte verschoben ist (siehe Abb. 3.6). Dies führt dazu, dass die relative Aktivität mit Quinat in leicht alkalischer Umgebung höher ist als mit Shikimat und da der pH-Wert im Cytoplasma von Mikroorganismen je nach Umgebung ca. 7,5 beträgt, spricht dies neben den kinetischen Parametern und der Cosubstratspezifität dafür, dass die *Cgl*QDH Quinat *in vivo* als natürliches Substrat bevorzugt.

### 3 Ergebnisse und Diskussion

**Tab. 3.4:** pH-Optima der drei S/QDH aus *C. glutamicum*. Jede Messung wurde mindestens zweimal wiederholt und das arithmetische Mittel bestimmt.

Enzym	pH-Optimum	Substrat	Cosubstrat
<i>Cgl</i> QDH	9,0	Quinat	NAD <sup>+</sup>
	10,0	Shikimat	NAD <sup>+</sup>
<i>Cgl</i> AroE	8,6	Shikimat	NADP <sup>+</sup>
<i>Cgl</i> SDH-L	9,0	Shikimat	NADP <sup>+</sup>

relative Aktivität



**Abb. 3.6**

pH-Optimumskurven der *Cgl*QDH. Die gefüllten Kästchen geben die relative Aktivität mit Shikimat als Substrat und die hohlen die mit Quinat an. Die Fehlerbalken repräsentieren den 1 $\sigma$ -Bereich.

### 3.4.4 Inhibitorensuche

Sollten die *CglAroE* und die SDH-L tatsächlich an der gleichen Stelle im Shikimatweg liegen, dann wäre es naheliegend, dass zumindest die hochaktive AroE reguliert wird. Tatsächlich ist es kaum auszuschließen, dass ihr Gen auf einem Operon liegt (siehe Abschnitt 1.4.3). Dagegen stellt sich bei der geringen katalytischen Effizienz der SDH-L die Frage, ob eine Regulierung hier überhaupt notwendig ist. Ihre Aktivität sollte den Metabolismus der Zelle kaum nachhaltig stören können. Immerhin könnte die Inhibition ihrer Synthese dazu beitragen, Aminosäuren zu sparen.

Die Suche nach Inhibitoren ist in allen Fällen erfolglos geblieben: Die S/QDH werden nicht durch aromatische Aminosäuren (auch nicht durch Kombination dieser) gehemmt. Die Metaboliten Protocatechuat und Anthranilat und die *Branchpoint*-Substrate Chorismat und Prephenat inhibierten ebenfalls nicht.

S/QDH liegen in der Mitte des Shikimatweges (siehe Abb. 1.2). Es macht somit zunächst keinen Sinn, wenn diese reguliert werden, es sei denn, es liegt eine noch unbekannte Abzweigung von diesem Stoffwechselweg vor, bei dem sie die Schrittmacherenzyme (siehe Abschnitt 1.2.3, *Schritt 1*) darstellen sollten. Hierzu muss aber festgestellt werden, dass S/QDHs reversible Reaktionen katalysieren. Dies ist jedoch für Schrittmacherenzyme atypisch (Streyer 1996).

Es erscheint insgesamt unwahrscheinlich zu sein, dass eine Enzymredundanz vorliegt, die durch Feedbackinhibition begründet ist. In diesem Fall wäre es naheliegend, wenn die „Hauptshikimat-Dehydrogenase“ *CglAroE* durch aromatische Aminosäuren inhibierbar wird, was aber nicht der Fall ist. Zudem müsste das Enzym praktisch vollständig abgeschaltet werden können, damit die Aktivität der SDH-L irgendwelche Auswirkungen haben kann. In diesem Fall wäre aber die Synthese der aromatischen Aminosäuren nicht mehr möglich. Da *C. glutamicum* keine Dauersporen bilden kann, ist es unwahrscheinlich, dass der Organismus einen solchen Zustand anstrebt.

Allein mit Hilfe von kinetischen *in vitro*-Versuchen und Strukturanalysen lässt sich die Frage nicht beantworten, welche Funktion die SDH-L besitzt. Hierfür ist die totale Abschaltung des Gens in Verbindung mit Untersuchungen des Metabolismus erforderlich. Solche Experimente sind bereits durchgeführt worden (Choorapoikayil 2006), wobei eine abschließende Auswertung noch nicht stattgefunden hat.

## 3.5 Analytische Gelfiltration

Analytische Gelfiltrationsexperimente liefern relativ ungenaue Ergebnisse bezüglich der zu untersuchenden Proteinmasse, denn es muss beispielsweise postuliert werden, dass zwischen den zu untersuchenden Molekülen und dem Säulenmaterial keine physikalischen Wechselwirkungen auftreten, was aber nur im Idealfall auch zutrifft. Sie haben jedoch gegenüber einer Größenbestimmung mittels SDS-PAGE oder Massenspektrometrie den Vorteil, dass das Protein in nativem Zustand vermessen werden kann. Daher ist die Methode gut geeignet, wenn Proteine auf ihre (etwaige) Quartärstruktur hin untersucht werden sollen.

Um das Molekulargewicht der drei S/QDH zu bestimmen, wurde der Fusionstag mit der rTEV-Protease abgespalten. Es wurden drei Eichläufe durchgeführt und daraus eine Regressionsgerade berechnet. Zwischen dem Zehnerlogarithmus des Molekulargewichts ( $\log_{10}$  MW) und dem Retentionsvolumen besteht ein linearer Zusammenhang, so dass die molekularen Massen der drei Enzyme im nativen Zustand bestimmt werden können.

**Tab. 3.5:** Molekulargewichte der drei S/QDH aus *C. glutamicum*. Sie wurden sowohl mittels Gelfiltration ( $MW_{\text{exp}}$ ) bestimmt als auch aus den Primärstruktur berechnet ( $MW_{\text{theo}}$ ).

Enzym	$MW_{\text{exp}}$	$MW_{\text{theo}}$
<i>Cgl</i> QDH	58,7 kDa	59,7 kDa (Dimer)
<i>Cgl</i> AroE	36,1 kDa	29,4 kDa (Monomer)
<i>Cgl</i> SDH-L	68,4 kDa	58,0 kDa (Dimer)

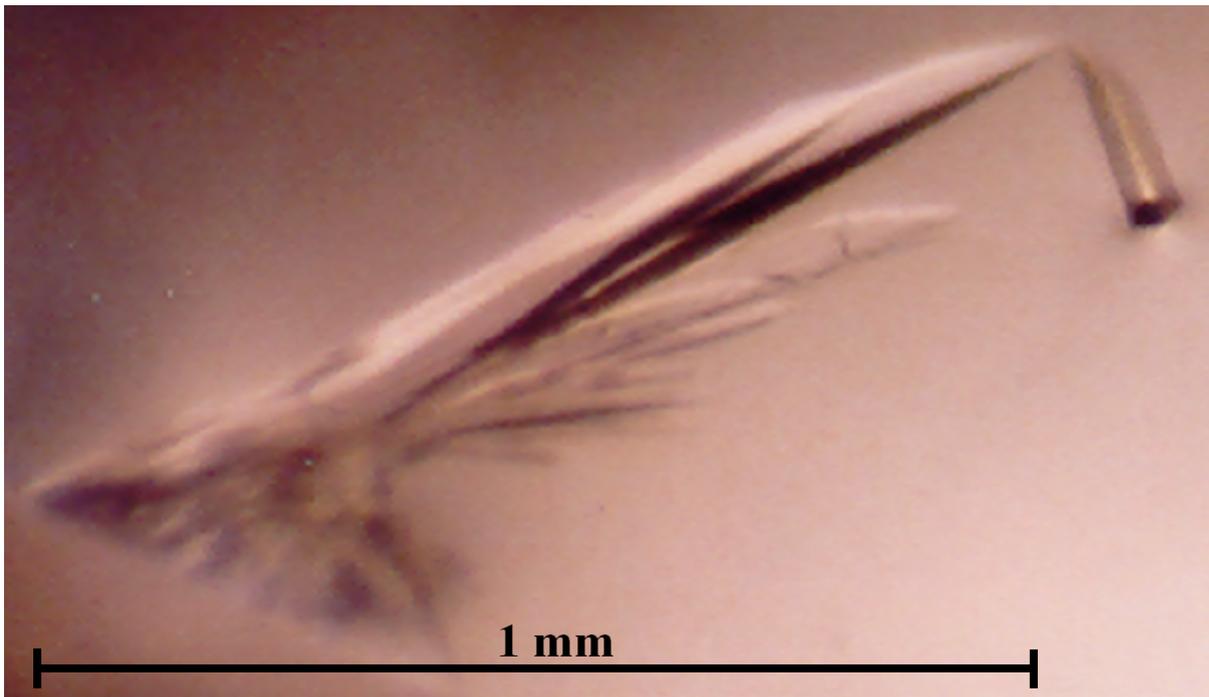
Es ergibt sich aus den Gelfiltrationsexperimenten, dass die *Cgl*QDH sowie die *Cgl*SDH-L Homodimere sind, während die *Cgl*AroE ein Monomer darstellt. Gegenüber früheren Annahmen (Chaudhuri & Coggins 1985) scheint sich abzuzeichnen, dass Proteine aus der S/QDH-Familie zumeist als Homodimere und nicht als Monomere vorliegen. Auffällig dabei ist, dass die vier in der Literatur beschriebenen Proteine dieser Familie, die keine AroE-Enzyme sind, ausschließlich in dimerer Form vorliegen (Michel *et al.* 2003, Singh *et al.* 2003, diese Dissertation). Die bisher beschriebenen „echten Shikimat-Dehydrogenasen“ sind entweder mono- oder dimere Proteine.

Abschließend muss aber festgestellt werden, dass noch nicht genügend Daten vorliegen, um aus dieser Beobachtung zur zunehmenden (bei AroEs) bzw. vollständigen Homodimerisierung (bei nicht-AroE-Shikimat-Dehydrogenasen) eine allgemein gültige Tendenz abzuleiten.

### 3.6 Kristallisation

#### 3.6.1 Kristallisation der *Cgl*QDH

Es konnten Einkristalle der *Cgl*QDH bei 20°C gewonnen werden, die sich für Diffraktionsmessungen eignen. Die Reserviörlösung enthielt 100 mM Na-Acetat pH=4,6; 200 mM NaCl; 20% v/v MPD. Es handelt sich dabei um eine optimierte Bedingung aus der kommerziell erhältlichen Kristallisationslösung Nr. 10 des Crystal Screen 2™ der Firma Hampton Research, Laguna Niguel, USA. Der Kristallisationstropfen setzte sich nach dem Pipettieren aus 2 µl NADH (2 µg/ml), 2 µl Reserviörlösung und 2 µl Proteinlösung (50 mM Tris/HCl; 500 mM NaCl; 1 mM NaN<sub>3</sub>; 20% v/v Glycerin pH=7,5 und 3,8 mg/ml Protein) zusammen. Nach ca. fünf Monaten wurde ein großer Proteinkristall sowie mehrere kleinere entdeckt (siehe Abb. 3.7). Der große Kristall erreichte Kantenlängen von ungefähr 1,1 x 0,1 x 0,1 mm.



**Abb. 3.7**

Großer, verwachsener Kristall der *Cgl*QDH (ca. 1,1 x 0,1 x 0,1 mm) und ein kleiner benachbarter. Ein Splitter des großen Kristalls wurde verwendet, um die Proteinstruktur zu bestimmen.

### 3.6.2 Kristallisation der *CglAroE*

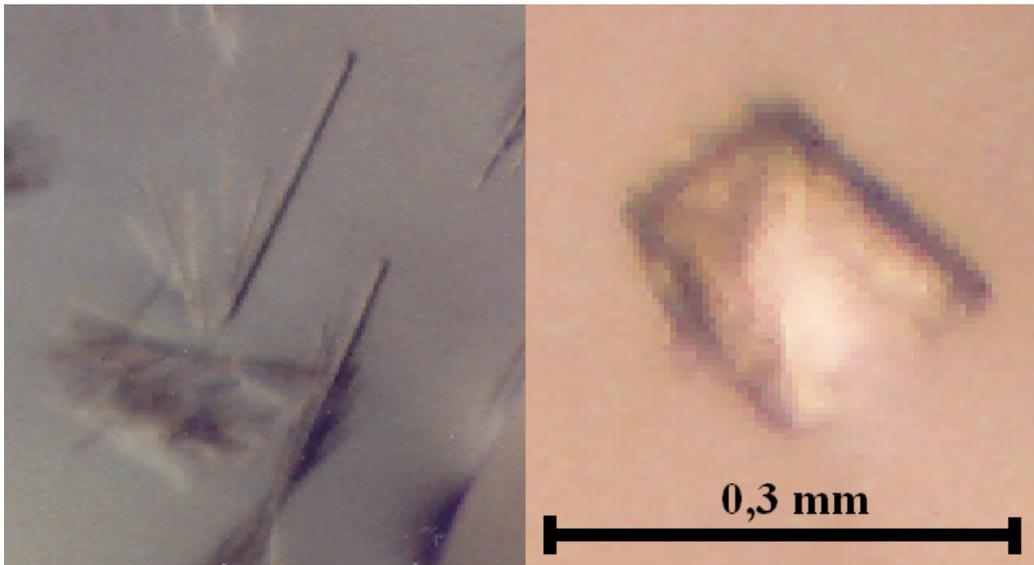
Das Kristallisationsverhalten der *CglAroE* ist außerordentlich schlecht. Es konnte mit keiner der verwendeten kommerziellen Kristallisationslösungen Strukturen beobachtet werden, die auf eine Kristallbildung hätten schließen lassen können. Daher lag der Schwerpunkt der Bemühungen an dieser Stelle auf den anderen beiden Proteinen.

### 3.6.3 Kristallisation der *CglSDH-L*

Die *CglQDH* zeigte ein außerordentlich gutes Kristallisationsverhalten. Jedoch neigte sie praktisch nur zur Bildung von zumeist verzweigten faserartigen bzw. nadelförmigen Strukturen. Schließlich war es bei 20°C möglich, aus den Nadeln reproduzierbar kleine, teilweise solitäre stäbchenförmige Kristalle mit einem Durchmesser von etwa 0,01 mm zu züchten, die innerhalb weniger Tage heranwachsen (siehe Abb.3.8, links). Hierfür wurde 1 ml Reservoirlösung eingesetzt, die 250 mM HEPES pH=7,4; 150 mM MgCl<sub>2</sub>; 13% v/v PEG400 enthielt. Der Kristallisationstropfen bestand zu Versuchsbeginn aus 2 µl Reservoirlösung und 2 µl Proteinlösung bestehend aus 50 mM Tris/HCl pH=7,5; 100 mM NaCl; 20% v/v Glycerol und 3,9 mg/ml Protein.

Aus zeitlichen Gründen konnte dieser vielversprechende Ansatz nicht weiter verfolgt werden. Für weitere Optimierungen bieten sich hier vor allem sogenannte Makroseed-Experimente an.

Unter ähnlichen Versuchsbedingungen ließen sich Kristalle züchten, die groß genug waren, um sie vermessen zu können. Sie unterscheiden sich durch die vorangegangenen nur dadurch, dass 0,3 ml Reservoirlösung aus 100 mM HEPES pH=7,4; 150 mM MgCl<sub>2</sub>; 13% v/v PEG400 verwendet wurde (siehe Abb. 3.7, rechts).



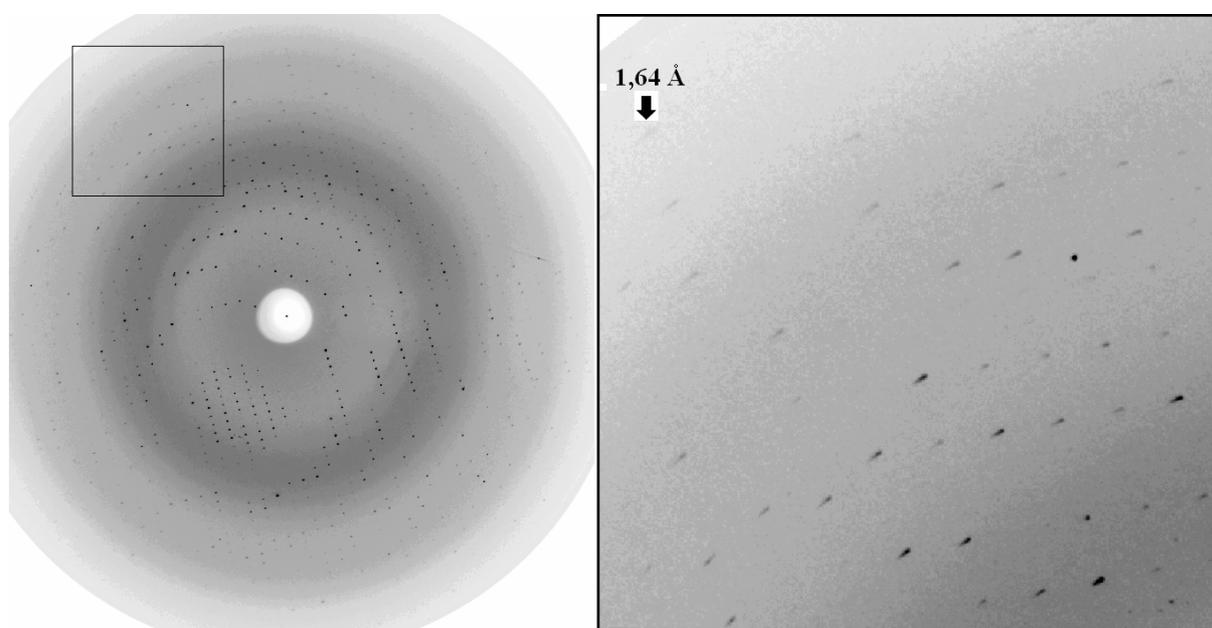
**Abb. 3.8**

Kristalline Strukturen der *Cg/SDH-L*. Links: Neben sehr feinen, faserartigen Strukturen sind stäbchenförmige Kristalle zu erkennen. Sie haben einen Durchmesser von ca. 0,01 mm. Rechts: Kleiner Kristall von ca. 0,2 x 0,1 x 0,1 mm Größe.

## 3.7 Diffraktionsmessungen

### 3.7.1 Diffraktionsmessung eines Kristalls der *Cgl*QDH

Bereits Testmessungen an der hauseigenen „Rigaku-Anlage“ zeigten, dass die Kristalle der *Cgl*QDH die Röntgenstrahlung außerordentlich gut streuten. Es wurde ein Datensatz am Messplatz BW7B am DESY in Hamburg aufgenommen. Die Abbildung 3.9 zeigt exemplarisch eine Aufnahme der Messungen.



**Abb. 3.9**

Eine typische Diffraktionsaufnahme der *Cgl*QDH. In der Vergrößerung (rechtes Bild) ist zu erkennen, dass einige Röntgenreflexe einen „Schweif“ bilden, was vermutlich auf die relativ hohe Mosaizität ( $0,9^\circ$ ) des Kristalles zurückzuführen ist. Der Datensatz wurde am Messplatz der BW7B am Deutschen Elektronen-Synchrotron (DESY) in Hamburg gemessen.

Die Indizierung mit dem Programm DENZO ergab, dass der Kristall zur monoklinen Raumgruppe (C2) mit den Parametern  $a=118.77 \text{ \AA}$ ,  $b=63.17 \text{ \AA}$ ,  $c=35.67 \text{ \AA}$ ,  $\beta=92.26^\circ$  der Einheitszelle gehört. Hieraus errechnete sich eine mögliche Packungsdichte von  $V_M = 2,08 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$ , was einem Solvensgehalt von etwa 41% entspricht. Das Signal/Rausch-Verhältnisse ( $I/\sigma$ ), die Vollständigkeits und die fusionierten R-Werte ( $R_{\text{merge}}$ ) aller Auflösungsschalen ist in sind in Tab. 3.6 angegeben.

### 3 Ergebnisse und Diskussion

**Tab. 3.6:** Statistik zu den einzelnen Auflösungsschalen des nativen Datensatzes der *Cgl*QDH. Der Datensatz beinhaltet 262272 Röntgenreflexe, von denen 32327 *unique* sind, was einer Redundanz von ca. 8,1 entspricht.

Auflösungsschalen [ $\text{\AA}$ ]	$I/\sigma$	Vollständigkeit	$R_{\text{merge}}$
99,00-3,53	34,1	98,9	6,1
3,53-2,80	27,7	98,8	6,9
2,80-2,45	19,5	98,6	9,6
2,45-2,22	15,4	98,5	11,7
2,22-2,06	11,8	98,4	14,4
2,06-1,94	8,0	98,8	18,0
1,94-1,84	5,5	97,7	24,3
1,84-1,76	3,8	97,9	29,7
1,76-1,70	2,8	97,4	37,3
1,70-1,64	1,7	74,5	59,1
alle	17,5	95,9	9,5

#### 3.7.2 Diffraktionsmessung eines Kristalls der *Cgl*SDH-L

Die Kristalle der *Cgl*SDH-L zeigten an der institutseigenen Röntgenanlage „Nonius“ ein sehr schlechtes Diffraktionsverhalten (siehe Abb. 3.10). Die gemachte Testaufnahme ließ sich bis etwa 7  $\text{\AA}$  prozessieren. Ein Grund hierfür mag in der Größe der Einheitszelle des Kristalls bestehen; sie besitzt die Zellparameter  $a=62,34 \text{ \AA}$ ,  $b=153,75 \text{ \AA}$ ,  $c=244,37 \text{ \AA}$ ,  $\alpha=94,16^\circ$ ,  $\beta=88,72^\circ$ ,  $\gamma=84,67^\circ$ . Das dazugehörige Bravais-Gitter ist vermutlich primitiv orthorhombisch.

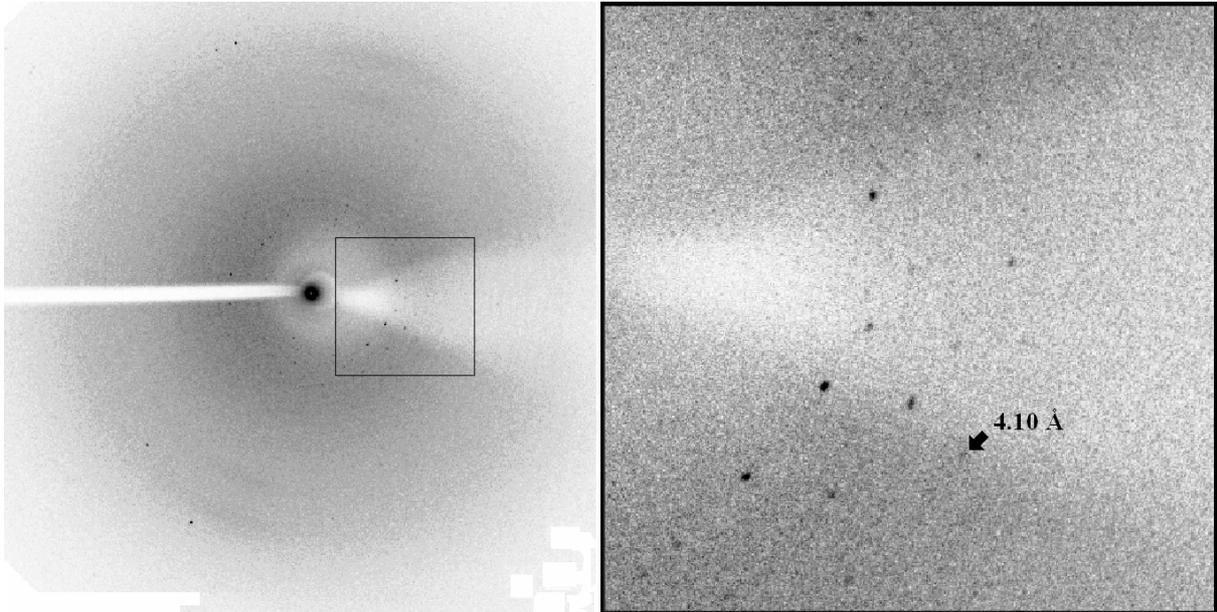
Es ist fraglich, ob der vermessene Kristall selbst an einem sehr leistungsfähigen Synchrotron wie z.B. dem in Grenoble Daten liefern kann, die zu einer strukturellen Auflösung von mindestens 3  $\text{\AA}$  führen. Es lassen sich folgende Schlussfolgerungen ziehen:

- 1.) Der Kristall besteht aus Protein.
- 2.) Der Cryopuffer hat die Bildung von Eisringen verhindert und den Kristall nicht zerstört.
- 3.) Der Kristall beugt die Röntgenstrahlen, wenn auch nur schwach.

### 3 Ergebnisse und Diskussion

---

Mitunter ist es möglich, das Diffraktionsverhalten von Proteinkristallen deutlich zu verbessern, indem man sie dehydratisiert (Haebel *et al.* 2001). Ein solches Experiment könnte sich hier anschließen.



**Abb. 3.10**

Eine Diffraktionsaufnahme der *CglSDH-L*. Der Kristall streut sehr schwach. Die Aufnahme wurde an der hauseigenen „Nonius-Anlage“ durchgeführt. Sie ließ sich nur bis knapp 7 Å prozessieren.

## 3.8 Strukturlösung und Verfeinerung

Es wurde ein vollständiger Datensatz der *Cgl*QDH erhalten, der mit Hilfe des Molekularen Ersatzes gelöst werden konnte. Als Suchmodell wurde ein Polyalaninmodell der Shikimat-Dehydrogenase von *Methanococcus jannaschii* (PDB-Code 1NVT) mit einer Sequenzidentität von ca. 32% verwendet.

### 3.8.1 Kreuzrotationssuche

Die Kreuzrotationssuche wurde erfolgreich im Auflösungsbereich 15 Å bis 6 Å im realen Raum mit Hilfe des Programmes CNS (Brunger *et al.* 1998) durchgeführt. Die besten fünf Lösungen, die das Programm vorgeschlagen hat, sind in der Tabelle 3.7 aufgelistet.

**Tab. 3.7:** Die besten fünf Ergebnisse der Kreuzrotationssuche des Datensatzes der *Cgl*QDH mit dem Suchmodell 1NVT. Die Lösung Nr.1 setzt sich mit einem deutlich höheren RF-Wert von den anderen ab. Für die Berechnung des RF-Wertes erhielt die Konstante „EPSILON“ den Wert 0,25.

Lösung Nr.	theta1	theta2	theta3	RF-Wert
1	100,880°	50,000°	269,630°	1,0249
2	129,921°	85,000°	165,215°	0,8745
3	130,089°	60,000°	207,927°	0,8479
4	107,658°	60,000°	263,334°	0,8212
5	131,995°	70,000°	198,972°	0,8186

## 3 Ergebnisse und Diskussion

### 3.8.2 Translationsuche

Die Translationsuche wurde im Auflösungsbereich 15 Å bis 6 Å im reziproken Raum ausgehend von den Eulerwinkeln  $\theta_1 = 100,880^\circ$ ,  $\theta_2 = 50,000^\circ$  und  $\theta_3 = 269,630^\circ$  mit Hilfe des Programms CNS durchgeführt. Die fünf besten Ergebnisse dieser Suche sind in der Tabelle 3.8 aufgelistet.

**Tab. 3.8:** Die ersten fünf Ergebnisse der Translationsuche. Der Korrelationskoeffizient gibt an, wie hoch die Übereinstimmung zwischen den Messdaten und dem Suchmodell ist. Eine hohe Packungsdichte bedeutet, dass eine minimale Überlappung des Proteins mit sich selbst stattfindet.

Lösung Nr.	theta1 [°]	theta2 [°]	theta3 [°]	transx [Å]	transy [Å]	transz [Å]	Korrelationskoeffizient	Packungsdichte
1	100,88	50,00	269,63	25,43	0,00	7,89	0,235	0,5009
2	29,92	85,00	165,22	1,36	0,00	15,78	0,162	0,3839
3	130,09	60,00	207,93	33,42	0,00	5,92	0,162	0,4354
4	107,66	60,00	263,33	11,72	0,00	3,94	0,185	0,3981
5	131,99	70,00	198,97	37,31	0,00	7,89	0,150	0,4113

### 3.8.3 Starre-Körper-Verfeinerung

Die Lösung Nr. 1 aus der Translationsuche (siehe Abschnitt 3.8.2) wurde für die anschließende starre-Körper-Verfeinerung mit dem Programm CNS verwendet. Dabei sank der R-Wert ( $R_{\text{work}}$ ) von 54,4% auf 52,8% und der freie R-Wert ( $R_{\text{free}}$ ) von 54,7% auf 53,46%.

### 3.8.4 Modellbau

Der Modellbau erfolgte mit dem Programm ARP/wARP (Perrakis *et al.* 1999) parallel wurde mit dem Programm REFMAC5 (CCP4 1994) verfeinert (*restrained refinement*). Es wurden insgesamt 350 iterative Zyklen durchlaufen, hierbei sanken der  $R_{\text{work}}$  auf 15,9% und der  $R_{\text{free}}$  auf 20,3%. ARP/wARP hat alle Atome unterhalb 1,0 sigma in der 2mFoDFc-Elektronendichtekarte gelöscht und alle oberhalb von 3,2 sigma in der mFoDFc-Karte eingefügt.

#### 3.8.5 Letzte Verfeinerungen und Wassereinbau

Weitere Verfeinerungen wurden manuell mit den Programmen O und REFMAC5 (CCP4 1994) iterativ durchgeführt. Jeder Verfeinerungsschritt mit REFMAC5 umfasste 10 Zyklen. Schließlich wurden die Wassermoleküle eingebaut. Dies geschah wiederum mit REFMAC5 (10 Zyklen) und ARP/wARP (5 Zyklen).

Offenbar sind die Positionen der N- und der C-Termini der *Cgl*QDH nicht gut definiert, denn die Aminosäurereste 1 bis 21 sowie der letzte, 302 sind nicht in der Elektronendichte zu erkennen. Die Residuen 1 bis 19 gehören zum Fusionstag. Ebenfalls nicht auszumachen war das NADH, was aber auf Grund des geringen molaren Verhältnisses NAD zu Protein (0,025:1) auch nicht zu erwarten gewesen ist. Die statistischen Parameter der verfeinerten *Cgl*QDH-Struktur ist in der Tabelle 3.9 zusammengefasst.

**Tab. 3.9:** Statistische Parameter der verfeinerten *Cgl*QDH-Struktur.

---

Raumgruppe	C2
Moleküle pro asymmetrischer Einheit	1
Anzahl der Atome (ohne Wasserstoffatome)	2058
Anzahl der Wassermoleküle	180
fehlende Residuen	1-21, 302
Auflösungsbereich [Å]	7,99 – 1,64
R-Werte [%]	
$R_{\text{work}}$	17,4
$R_{\text{free}}$	20,1
isotroper Gesamt-B-Faktor [Å <sup>2</sup> ]	17,44
RMS-Abweichungen von Idealwerten	
Bindungslängen [Å]	0,028
Bindungswinkel [°]	2,713
Korrelationskoeffizienten [%]	
$ F_o - F_c $	96,4
$ F_o - F_c _{\text{free}}$	94,8

---

### 3.9 Validierung der 3D-Modelle

Nachdem die Tertiärstrukturmodelle der drei S/QDH aus *C. glutamicum* erstellt worden sind, ist es notwendig, ihre Qualität zu bewerten. Da die 3D-Struktur der *CglQDH* kristallographisch bestimmt worden ist, liegen hierzu bereits Statistiken vor (siehe Tab. 3.9).

Generell gibt es zwei Möglichkeiten, eine Proteinstruktur zu validieren: „intern“ oder „extern“ (Fiser & Sali 2003). Bei der internen Validierung spielt die Selbstbeschaffenheit des Moleküls die Hauptrolle. Neben der Auswertung der Messdaten werden beispielsweise sterische Konflikte oder Idealgeometrien betrachtet. Oft spielen dabei statistische Erwägungen eine Rolle. Dabei werden bei der externen Validierung Informationen hinzu gezogen, die sich nicht aus der Berechnung des Modells ergeben. Es wird dann beispielsweise untersucht, ob ein zum Protein gehöriger Ligand seine Funktion erfüllen kann, etc.

Fehler in der Stereochemie sind generell selten und weniger informativ als Fehler, die man aus der externen Validierung erhält. Diese sind allerdings schwer zu definieren und erfordern oft biochemisches Hintergrundwissen bezüglich des betrachteten Proteinmoleküls.

#### 3.9.1 interne Validierung

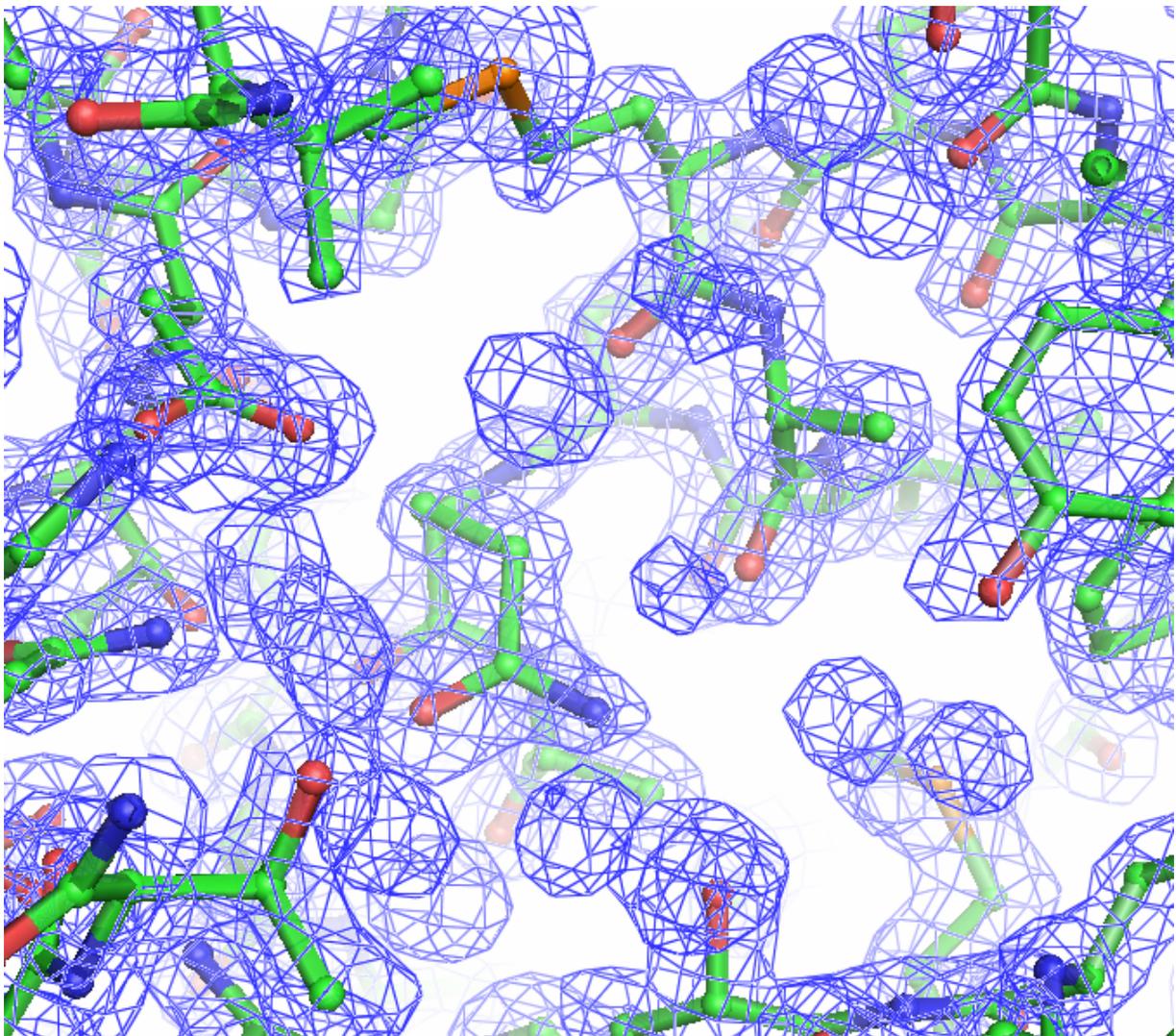
Die kristallographischen Statistiken aus der Verfeinerung (siehe Tab. 3.9) deuten bereits auf die hohe Qualität der berechneten Elektronendichtekarten der *CglQDH* hin. Solche Karten zu untersuchen, ist ausgesprochen nützlich, um die Qualität des „Röntgenmodells“ eingehender bewerten zu können. Ein Ausschnitt einer 2FoFc-Elektronendichte ist exemplarisch in Abb.3.11 dargestellt. Derartige Dichten haben allerdings den Nachteil, dass sie sich schlecht zu statistisch leicht erfassbaren Größen zusammenfassen lassen. Wenn die Elektronendichtekarten unvollständig sind oder sich nur schwer interpretieren lassen, ist es vielfach nützlich, die interne Validierung mit Hilfe entsprechender Programme auszuweiten. Dagegen müssen derartige Programme für die Validierung modellierter Proteinstrukturen zwangsläufig verwendet werden, weil Messdaten fehlen.

Um die Qualität der Hauptketten der drei Proteine zu untersuchen, wurde der Ramachandran-Plot mit dem Programm PROCHECK (Laskowski *et al.* 1993) berechnet (siehe Abb. 3.12). Diese Methode der Validierung beruht auf Statistiken und es kann durchaus vorkommen, dass einzelne Aminosäurereste sich nicht in den „bevorzugten“ oder „erweitert erlaubten“ Regionen befinden. Dennoch kann ein gehäuftes Auftreten einzelner Residuen in

### 3 Ergebnisse und Diskussion

den „freigebig“ und „nicht erlaubten“ Bereichen darauf hinweisen, dass (noch) Fehler im Modell vorliegen. Die Qualität des Peptidrückgrades der *Cgl*QDH macht einen ausgezeichneten Eindruck, während die der anderen beiden Enzyme zwar geringer aber immer noch sehr gut zu sein scheint.

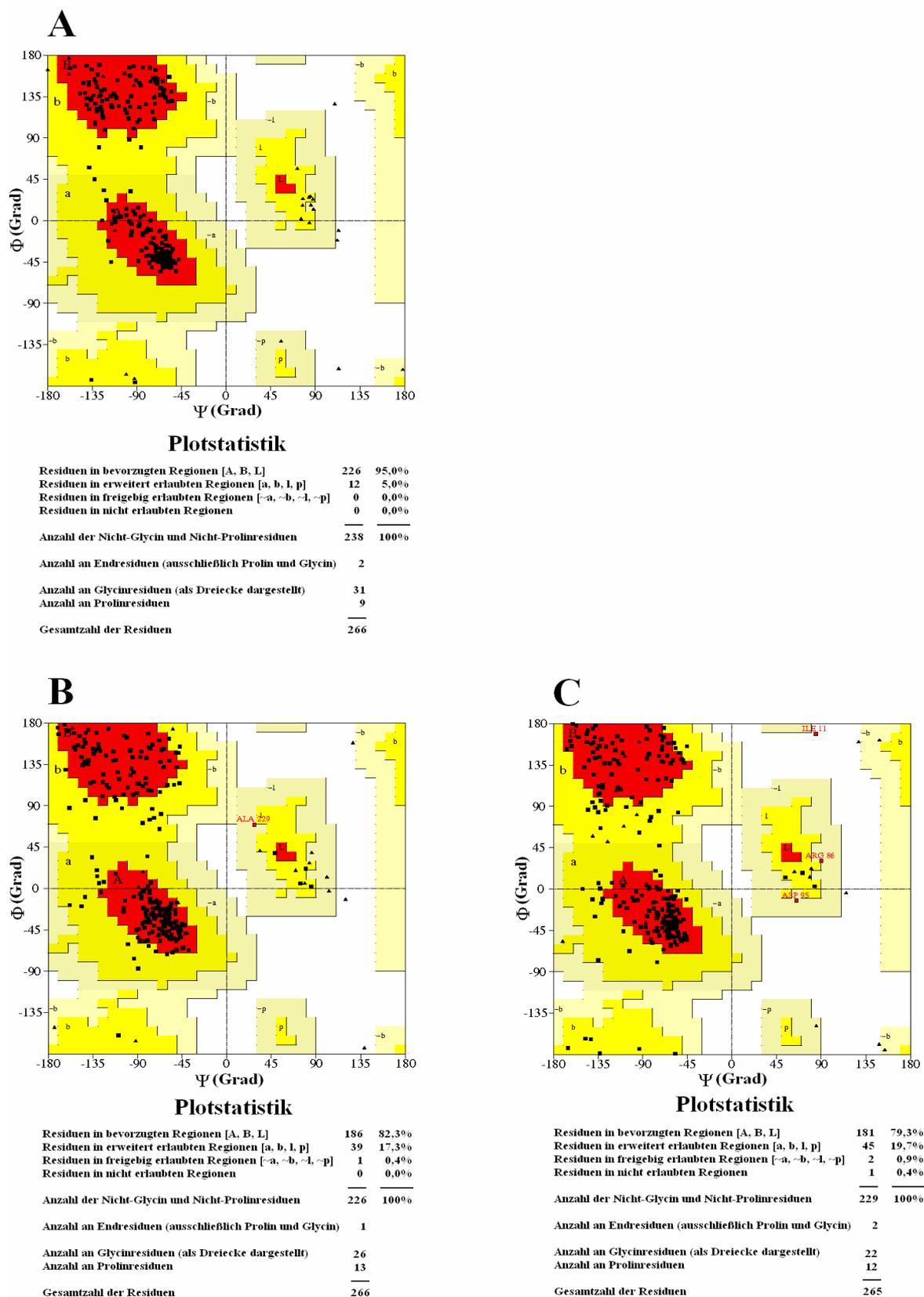
Das Programm ERRATv2 berechnet charakteristische atomare Wechselwirkungen innerhalb von Proteinstrukturen (Colovos & Yeates 1993). Die Untersuchung der drei Proteinmodelle bestätigte das Ergebnis des Ramachandran-Plots. Auch hier ist die Qualität der Kristallstruktur deutlich höher als die der beiden anderen Modelle (siehe Abb. 3.13).



**Abb. 3.11**

$2F_oF_c$ -Elektronendichte (blau) im Bereich des aktiven Zentrums der *Cgl*QDH. Neben den scharf definierten Dichten des Proteins sind auch „leere Kugeln“ zu erkennen. Sie gehören zu Sauerstoffatomen von gebundenem Wasser. Der sigma-Wert der  $2F_oF_c$ -Dichte wurde hier auf 1,5 gesetzt.

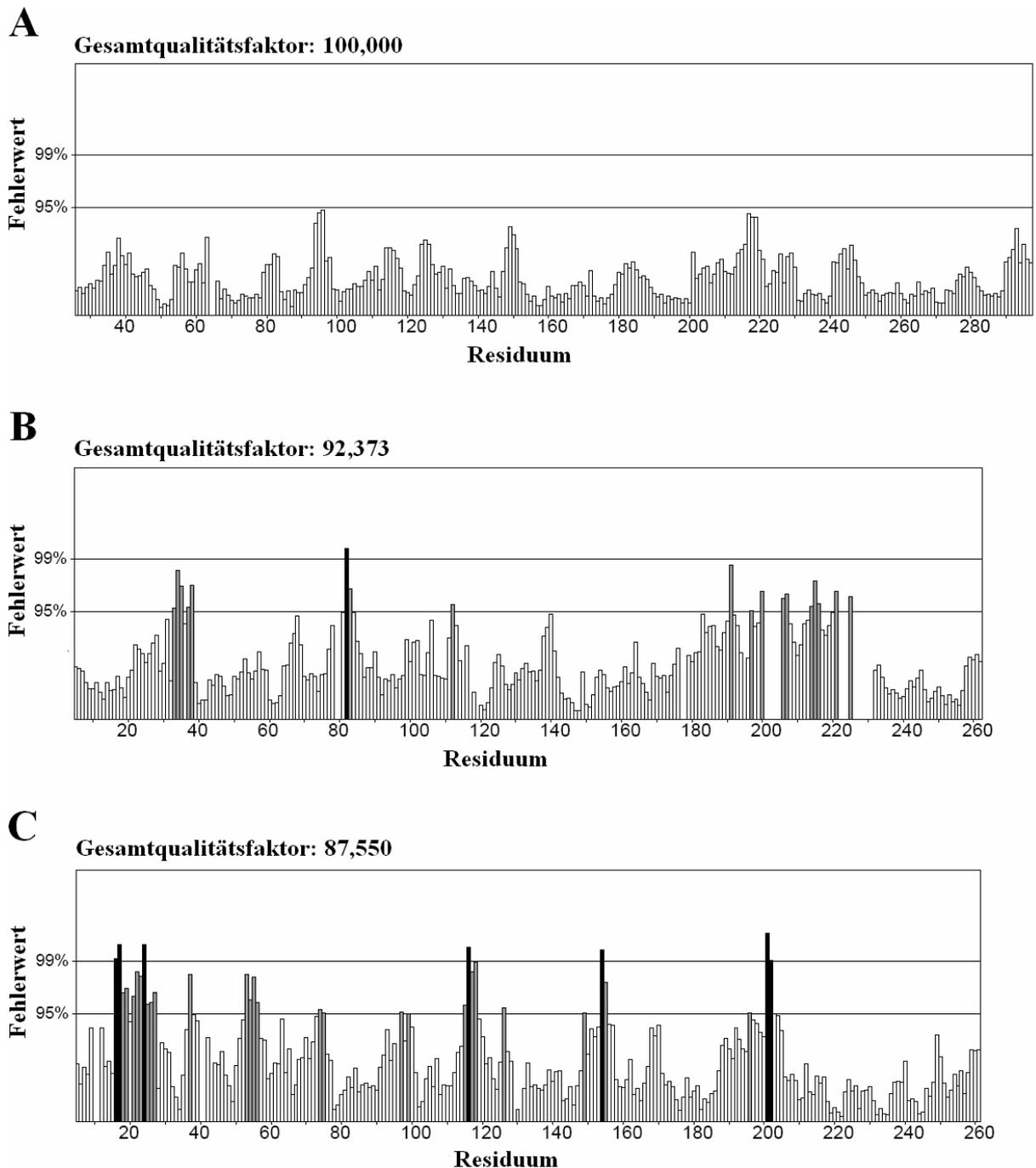
### 3 Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 3.12**

Ramachandran-Plots der drei Strukturmodelle der *CglQDH* (A), *CglAroE* (B) und *CglSDH-L* (C).

### 3 Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 3.13**

ERRATv2-Plots der drei Strukturmodelle: *CglQDH* (A), *CglAroE* (B) und *CglSDH-L* (C). Demnach besitzt die Kristallstruktur die mit Abstand beste Qualität. Das Modell *CglAroE* besitzt einen geringeren Fehler als das Modell *CglSDH-L*. Diese Ergebnisse sind mit dem Ramachandran-Plot in Einklang zu bringen.

#### 3.9.2 externe Validierung der *CglAroE* und der *CglSDH-L*

Wegen der hohen Qualität der Elektronendichtekarten und der guten Verfeinerungsstatistiken wurde die *CglQDH* fortan nicht mehr als zu validierendes Modell angesehen, sondern als zusätzliche Schablone für die Betrachtung der 3D-Strukturen von *CglAroE* und *CglSDH-L* verwendet.

Für die externe Validierung wurden Qualitätskriterien definiert, die an die folgenden Bedingungen für jedes der zwei Modelle geknüpft worden sind:

- 1.) Es muss ein Protein mit zwei Domänen vorliegen, welche durch eine tiefe Spalte voneinander getrennt werden. Verbunden werden die beiden Domänen durch zwei  $\alpha$ -Helices.
- 2.) Der Aminoterminus des Modells muss die für S/QDH typische Supersekundärstruktur besitzen (siehe Abschnitt 1.4.5).
- 3.) Der Carboxyterminus des Modells muss eine Rossman-Faltung nach der Definition der SCOP-Datenbank besitzen.
- 4.) Bei einem multiplen Proteinstrukturalignment mit allen bekannten bakteriellen (einschließlich Archea) S/QDH müssen die konservierten Residuen der Modelle mit denen der experimentell aufgeklärten Strukturen übereinstimmen (siehe Abb.3.14).

Um zu überprüfen, ob die Bedingungen 3 und 4 erfüllt werden konnten, wurde das „Referenzprogramm“ DSSP (Kabsch & Sander 1983) verwendet.

##### *CglAroE*

zu 1.: Bedingung Nr. 1 wurde erfüllt (siehe Abb. 3.13).

zu 2.: Es fehlt das  $\beta$ -Faltblatt Nr. 4 (siehe Abb. 1.6 & Abb. 3.13). Das nicht erkannte Faltblatt Nr.4 ist verhältnismäßig schwer zu modellieren, da es nur aus ein bis zwei Aminosäureresten besteht und bereits leichte Änderungen der Hauptkette dazu führen, dass es nicht mehr vom Programm DSSP (Kabsch & Sander 1983) erkannt werden kann. Die betreffenden Aminosäuren liegen zudem so weit außerhalb des aktiven Zentrums, dass beispielsweise Betrachtungen einer etwaigen Substratbindung kaum beeinträchtigt sein sollten.

zu 3.: Das dem Carboxyterminus zugewandte  $\beta$ -Faltblatt sowie eine  $\alpha$ -Helix fehlen in der Rossman-Faltung (siehe Abb. 3.14)

### 3 Ergebnisse und Diskussion

---

zu 4.: Die konservierten Residuen nehmen mit zwei Ausnahmen die richtigen Stellen im Protein ein. Zum einen ist die Position eines Tyrosins um eine Position in Richtung C-Terminus verschoben (siehe Abb. 3.21). Dies scheint aber nicht so kritisch zu sein, da die Residue vom vermeintlichen aktiven Zentrum ca. 6 bis 7 Å entfernt sein dürfte (nicht gezeigt). Des weiteren ist die hoch konservierte Residuenabfolge „NTD“ um zwei Positionen in Richtung N-Terminus gerückt (siehe Abb. 3.21). Im Bereich 240 bis 250 scheint es einen deutlichen Fehler zu geben, da hier mehrere – eigentlich konservierte Residuen – fehlen, wobei sich das Alignment durch Verschieben einer „Deletionsregion“ leicht zur Deckung bringen ließe.

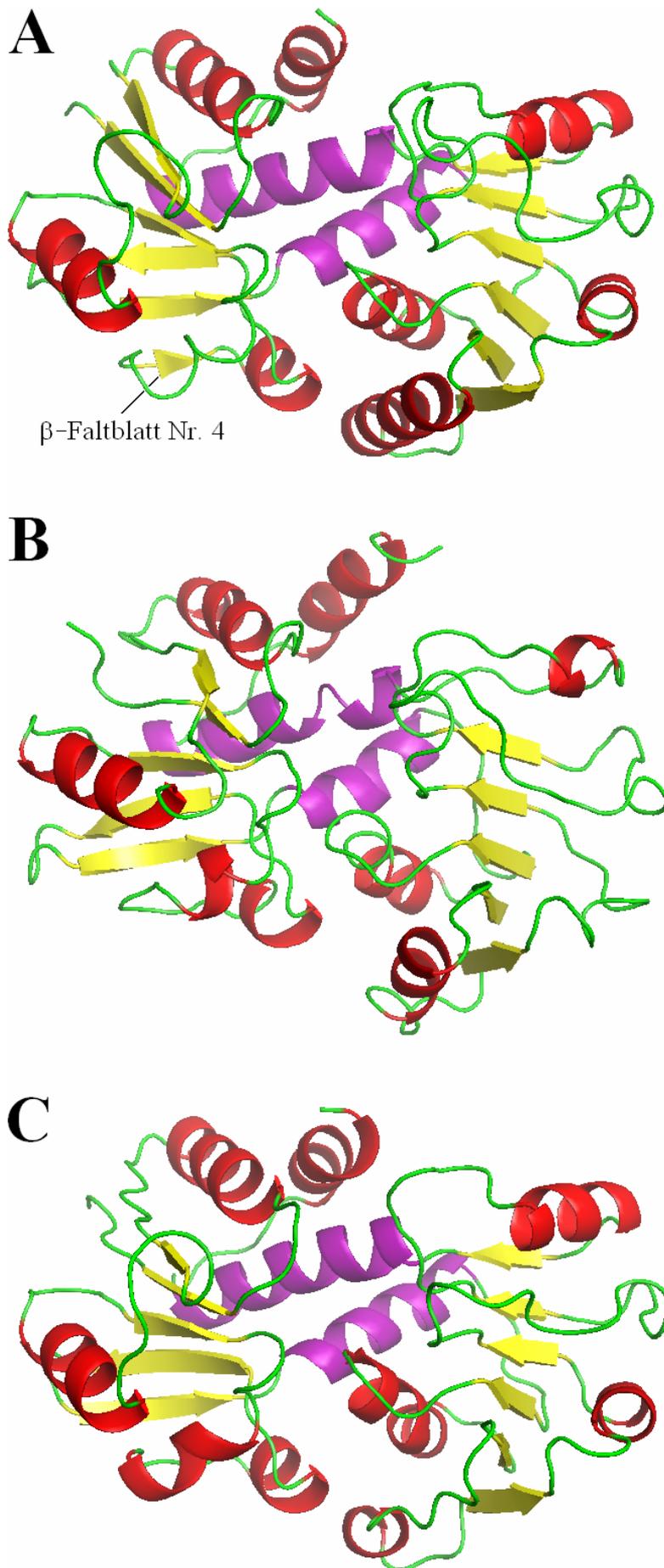
#### CglSDH-L

zu 1.: Bedingung Nr. 1 wurde erfüllt (siehe Abb 3.14).

zu 2.: Es fehlt das  $\beta$ -Faltblatt Nr. 4 (siehe Abb. 1.6 & Abb. 3.14). Das für die *CglAroE* bemerkte gilt hier ebenfalls.

zu 3.: Die Rossmann-Faltung ist intakt (siehe Abb. 3.14).

zu 4.: Die konservierten Residuen sind an den richtigen Stellen im Protein lokalisiert (siehe Abb. 3.21).



**Abb. 3.14**

Übersicht über die Sekundärstrukturen der *CglQDH* (A), der *CglAroE* (B) und der *CglSDH-L* (C).  $\beta$ -Faltblätter sind in gelb und  $\alpha$ -Helices in rot oder violett dargestellt. Der linke Teil jedes Modells stellt den N-Terminus mit dem typischen S/QDH-Motiv und der rechte den C-Terminus mit der Rossman-Faltung dar. Verbunden werden die beiden Domänen durch zwei  $\alpha$ -Helices (violett). Bei der *CglAroE* ist eine Helix kurz unterbrochen. Zudem fehlt eine Helix in der Rossman-Faltung. Beiden theoretischen Modellen fehlt ein  $\beta$ -Faltblatt des S/QDH-typischen Motivs.

#### 3.9.3 Vollständigkeit der Modelle

Es wurden die Modelle auf ihre Vollständigkeit (fehlende Aminosäurereste) hin untersucht. Das Ergebnis ist der Tabelle 3.9 zu entnehmen.

**Tab. 3.10:** Fehlende Residuen der drei Modelle. Es wurde jeweils die Aminosäuresequenz betrachtet, die sich unmittelbar aus dem genetischen Code der dazugehörigen Gene ergibt.

Modell	Residuenanzahl	fehlende Residuen	Anzahl fehlender Residuen
<i>Cgl</i> QDH	283	1-2, 283	3
<i>Cgl</i> AroE	276	1-5, 272-276	10
<i>Cgl</i> SDH-L	268	1-2, 268	3

Fehlende Aminosäurereste spielen bei den drei Modellen kaum eine Rolle, da die endständigen Residuen der S/QDHs frei beweglich sind und kaum Einfluss auf die enzymatische Aktivität haben dürften. Dies wird auch dadurch belegt, dass das Abspalten der Fusionstags der drei in dieser Arbeit untersuchten Proteine kaum zu einem Aktivitätsverlust geführt hat (siehe Abschnitt 3.4.1).

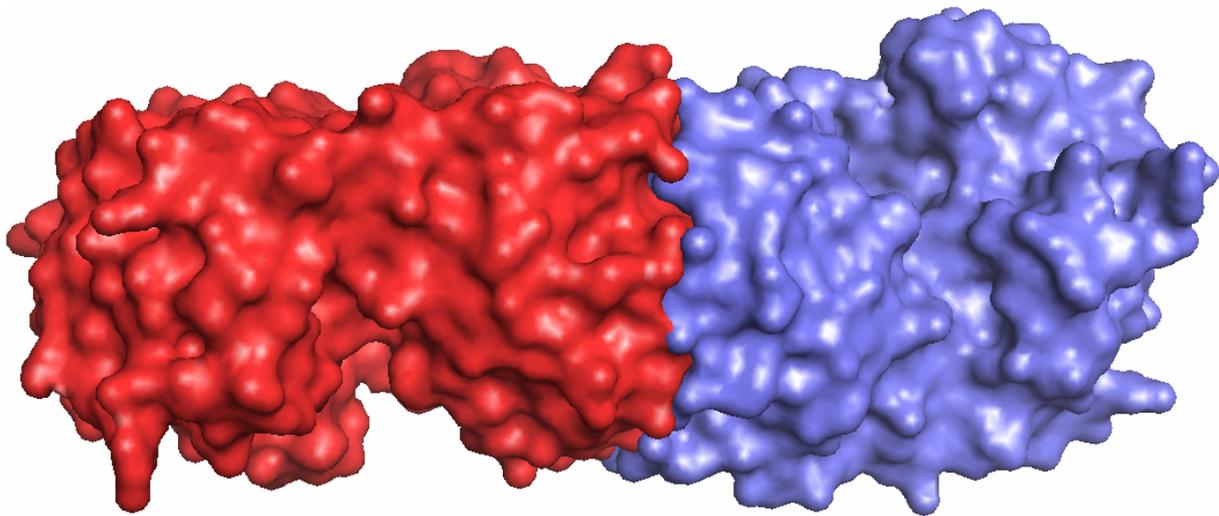
#### 3.10.4 abschließende Bewertung der Validierung

Die Qualität der Röntgenstruktur der *Cgl*QDH ist ausgezeichnet, während die der beiden anderen Modelle wesentlich geringer ist. Letzlich sind aber auch sie immerhin weitgehend ausreichend, um sie für ein multiples Strukturalignment zu verwenden (siehe Kapitel 3.11). Für detailliertere Substratmodellierungsstudien reicht ihre Qualität allerdings nicht aus.

Es ist auffällig, dass die Bewertungen der internen und die externen Validierung bei den beiden modellierten Strukturen *Cgl*AroE und *Cgl*SDH-L gegensätzlich sind. Auch wenn die externe Validierung bei theoretischen Strukturen außerordentlich wichtig ist, muss verhindert werden, dass sie Wunschmodellen angenähert werden und dabei energetische (und entropische) Betrachtungen aus dem Blickfeld geraten.

### 3.10 Die Homodimere Struktur der *Cgl*QDH

Wie aus den analytischen Gelfiltrationsversuchen hervorgeht (siehe Kapitel 3.5), ist die *Cgl*QDH ein Homodimer. Dies steht nicht im Widerspruch zu der Tatsache, dass das Protein als Monomer in der asymmetrischen Einheit kristallisiert. Wenn man die Symmetrieäquivalente mit einbezieht, ergibt sich ein Dimer. Die Kontaktfläche zwischen beiden Polypeptidketten wurde mit dem Programm PISA (Krissinel & Henrick 2005) berechnet; sie beträgt 1208,0 Å<sup>2</sup>.



**Abb. 3.15**

Die Quartärstruktur der *Cgl*QDH. Zwei Polypeptidketten (rot und blau) bilden ein Homodimer, wobei sich die Kontaktflächen im Bereich der N-Domänen befinden.

### 3.11 Worin liegen strukturelle Gemeinsamkeiten und Unterschiede der S/QDH?

Bisher lässt sich folgern, dass die Enzyme der S/QDH-Familie zwar charakteristische Supersekundär- und Tertiärstrukturen besitzen (siehe Abschnitt 1.4.5), es jedoch dramatische Unterschiede bezüglich der enzymatischen Aktivität (Substrat- und Cosubstratspezifität sowie katalytische Effizienz) zwischen den einzelnen Subfamilien gibt (siehe Abschnitt 1.4.2, Kapitel 3.4), was auf vollkommen unterschiedliche Funktionen in *C. glutamicum* schließen lässt. Ziel dieses Kapitel ist es, die strukturellen Unterschiede näher zu analysieren, um die Ursachen für diese Aktivitätsunterschiede erklären zu können.

#### 3.11.1 Geringe Sequenzidentität, hohe strukturelle Konservierung

Wenn man bedenkt, wie sehr sich die Faltungsmotive der S/QDH ähneln und wie gering die Positionen der  $\alpha$ -Kohlenstoffatome voneinander abweichen, dann ist es bemerkenswert, wie unterschiedlich die Primärstrukturen der Enzyme sind (siehe Tab. 3.11). Die S/QDH-Familie ist ein hervorragendes Beispiel für das Axiom, dass Proteinstrukturen im allgemeinen stärker konserviert sind als ihre Sequenzen. Es muss dabei natürlich beachtet werden, dass auf den Molekülen ein hoher Selektionsdruck lastet und ein Aminosäureaustausch während der Evolution damit keinesfalls „statistisch“ erfolgt.

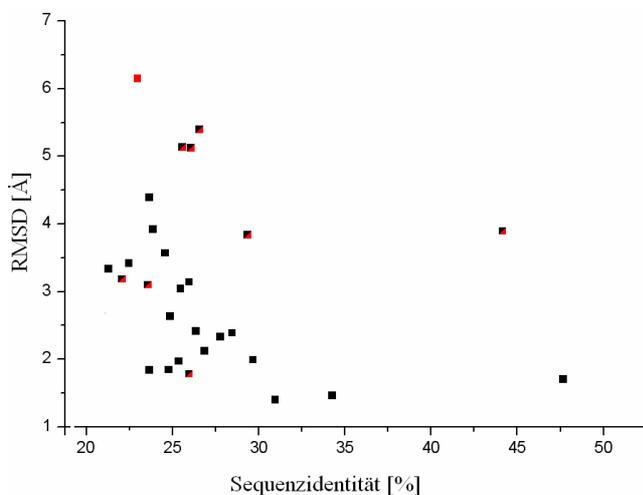
Es ist aus Tab. 3.11 klar ersichtlich, dass die Sequenzidentität zwischen den paralogen Proteinen im Mittel nicht höher ist als die zwischen zwei beliebigen Mitgliedern der S/QDH-Familie. Dasselbe scheint aber mit Ausnahme der beiden SDH-L für Orthologe ebenfalls zu gelten. Es gibt folglich weder einen deutlichen Zusammenhang zwischen Sequenzidentität und phylogenetischer Verwandtschaft noch zwischen Sequenzidentität und Zugehörigkeit zur jeweiligen funktionalen Subfamilie.

Es ergibt sich aus dem Sequenzidentität/Struktur-Vergleich ferner, dass es einen „normalen“ Zusammenhang gibt, d.h., je höher die Sequenzidentität desto höher ist auch die strukturelle Ähnlichkeit (siehe Abb. 3.16). Daraus lässt sich folgern, dass sich die verschiedenen Subtypen der S/QDH bezüglich ihrer Faltung höchstens im Detail voneinander unterscheiden können.

### 3 Ergebnisse und Diskussion

**Tab. 3.11:** Vergleich der Primär- und Tertiärstrukturen verschiedener S/QDH. Die Sequenzidentitäten (Seq. Id.) betragen im Durchschnitt  $28,6\% \pm 0,6\%$ , die Abweichungen der alignierten  $C_{\alpha}$ -Atome der Peptidkette mit Mittel (RMSD-Werte)  $3,1 \text{ \AA} \pm 1,6 \text{ \AA}$ . Bei Röntgenstrukturen wurden – sofern vorhanden – auch die strukturellen Unterschiede verschiedener S/QDH-Ketten innerhalb einer asymmetrischen Einheit betrachtet. Dort betrug der RMSD bereits im Durchschnitt  $0,9 \text{ \AA}$ . Die in der Tabelle angegebenen Werte sind somit als ziemlich gering anzusehen. Die RMSD-Werte wurden mit dem Programm PyMOL (DeLano 2002) erstellt. Es wurden die Abkürzungen *Cgl* für *C. glutamicum*, *Eco* für *E. coli*, *Hin* für *Haemophilus influenzae* und *Mja* für *Methanococcus jannaschii* verwendet. Weitere Erklärungen siehe Text gegeben.

Seq.-Id. RMSD	<i>Cgl</i> QDH	<i>Eco</i> YdiB	<i>Cgl</i> AroE	<i>Eco</i> AroE	<i>Mja</i> AroE	<i>Hin</i> AroE	<i>Cgl</i> SDH-L	<i>Hin</i> SDH-L
<i>Cgl</i> QDH	<b>X</b>							
<i>Eco</i> YdiB	26,0 % 1,84 Å	<b>X</b>						
<i>Cgl</i> AroE	27,3 % 5,13 Å	26,8 % 5,14 Å	<b>X</b>					
<i>Eco</i> AroE	26,1 % 2,63 Å	27,2 % 3,14 Å	24,9 % 1,84 Å	<b>X</b>				
<i>Mja</i> AroE	32,2 % 1,40 Å	35,5 % 1,46 Å	25,8 % 3,57 Å	30,9 % 1,99 Å	<b>X</b>			
<i>Hin</i> AroE	26,7 % 3,04 Å	27,6 % 2,42 Å	23,7 % 3,42 Å	48,9 % 1,70 Å	29,7 % 2,39 Å	<b>X</b>		
<i>Cgl</i> SDH-L	27,2 % 1,79 Å	27,8 % 5,40 Å	24,2 % 6,15 Å	23,3 % 3,18 Å	30,6 % 3,84 Å	24,8 % 3,10 Å	<b>X</b>	
<i>Hin</i> SDH-L	26,6 % 1,97 Å	28,1 % 2,12 Å	24,9 % 4,39 Å	22,5 % 3,34 Å	29,0 % 2,33 Å	25,1 % 3,92 Å	45,4 % 3,89 Å	<b>X</b>



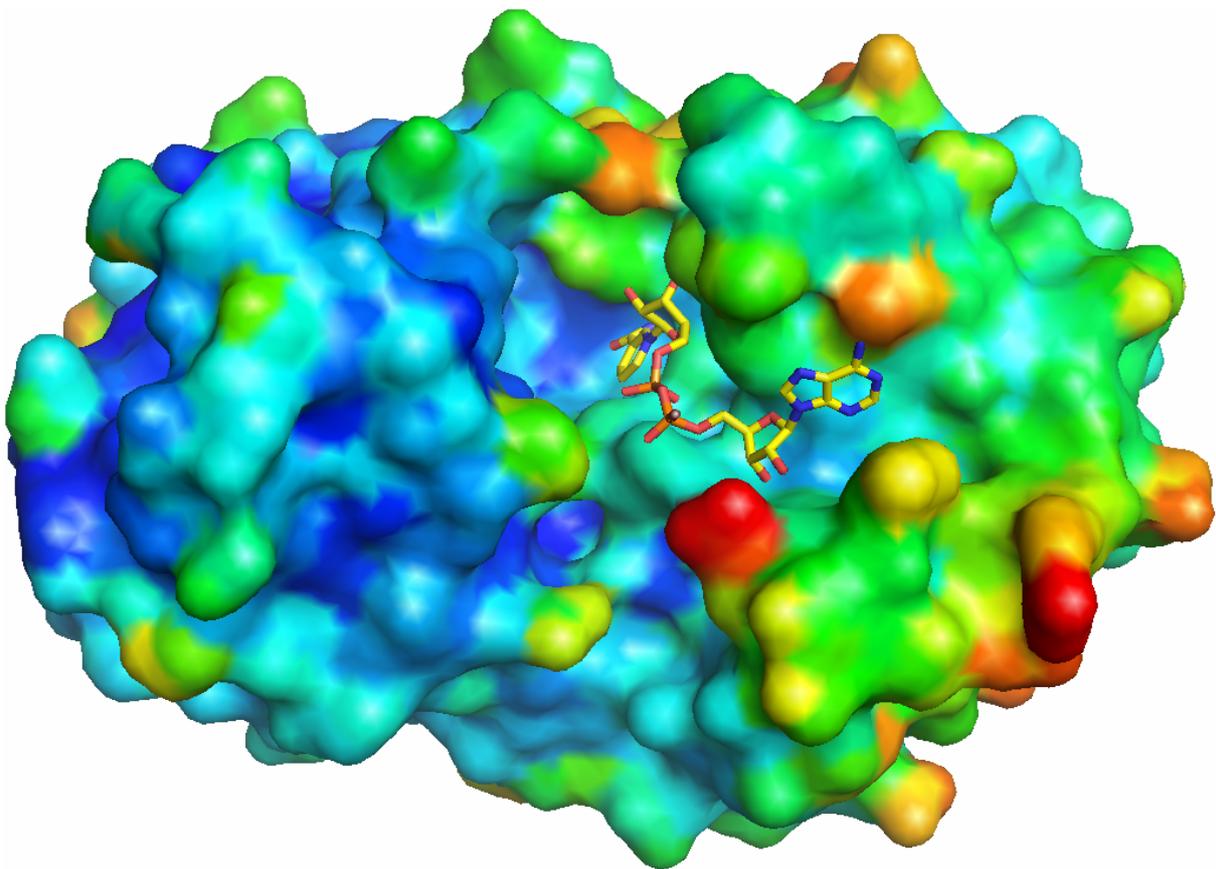
**Abb. 3.16**

Abhängigkeit der Konservierung der  $C_{\alpha}$ -Atome von der Aminosäuresequenzidentität bei den S/QDH. Diese Abbildung ergibt sich direkt aus der Tabelle 3.11. Im Bereich zwischen ca. 25% und 30% scheint es eine exponentielle Zunahme der strukturellen Konservierung bei steigender Sequenzidentität zu geben. Dieser Bereich ist generell für die Suche eines geeigneten Molekülvorlagemodells (*Template*) sowohl beim Molekularen Ersatz als auch bei der Homologen Modellierung kritisch. Schwarze

Kästchen bedeuten, dass zwei Röntgenstrukturen miteinander verglichen wurden und rote, dass es sich um zwei theoretische Modelle gehandelt hat. Im letzteren Fall ist davon auszugehen, dass der RMSD-Wert auf Grund von Modellierungsfehlern etwas höher ist.

#### 3.11.2 Bindung von NAD(P)

Das NAD ließ sich gemäß den Kriterien Abschnitt 1.4.6 problemlos in die Apostruktur der *Cgl*QDH modellieren (siehe Abb. 3.17). Mehr Schwierigkeiten ergaben sich mit den beiden theoretischen Modellen. Bei der *Cgl*AroE traten schwächere van-der-Waals-Abstoßungen im Bereich der Säureamidgruppe und bei der *Cgl*SDH-L wesentlich stärkere in der Region des Pyrophosphats und des Nikotinsäureamids auf. Dies war insbesondere der Fall, wenn die typische S/QDH-Konformation des NADPs (vergleiche Abb. 1.5) streng eingehalten wurde (Daten nicht gezeigt).

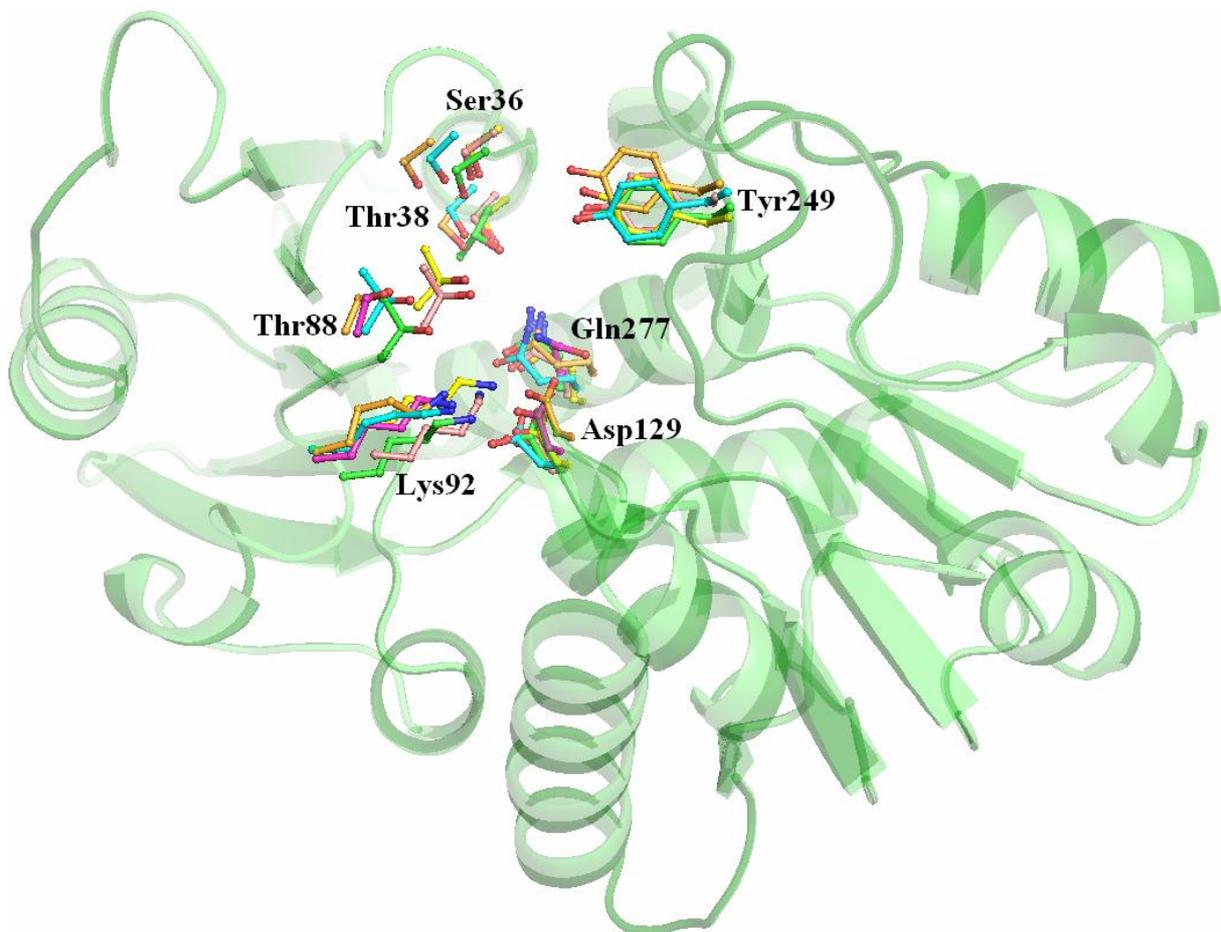


**Abb. 3.17**

Tertiärstruktur der *Cgl*QDH mit modelliertem NAD. Der linke Teil des Proteins stellt den N-Terminus und der rechte den C-Terminus des Proteins dar. Der Nikotinsäureamidring des Cosubstrates ragt tief in das aktive Zentrum hinein. Rechts davon ist die Substratbindungsstelle. Die verschiedenen Farben des Proteinmoleküls geben die sogenannten Temperaturfaktoren einzelner Atome wieder. Blau bedeutet in diesem Fall, dass die betreffenden Atome unbeweglich („kalt“) sind. Über die Farbpalette grün, gelb, orange und rot nimmt die Beweglichkeit der Atome zu.

#### 3.11.3 Bindung von Quinat und Shikimat

Es wurden bisher zwar noch nie Elektronendichten eines Substrates in einer S/QDH beobachtet, jedoch gibt es eine Reihe von experimentellen Ergebnissen, die Hinweise darauf geben, wie es im Enzym positioniert ist (siehe Abschnitt 1.4.7). Die Überlagerung von Proteinstrukturen dieser Familie zeigt, dass die Lage einiger Aminosäureseitenketten im aktiven Zentrum konserviert ist (siehe Abb. 3.18).



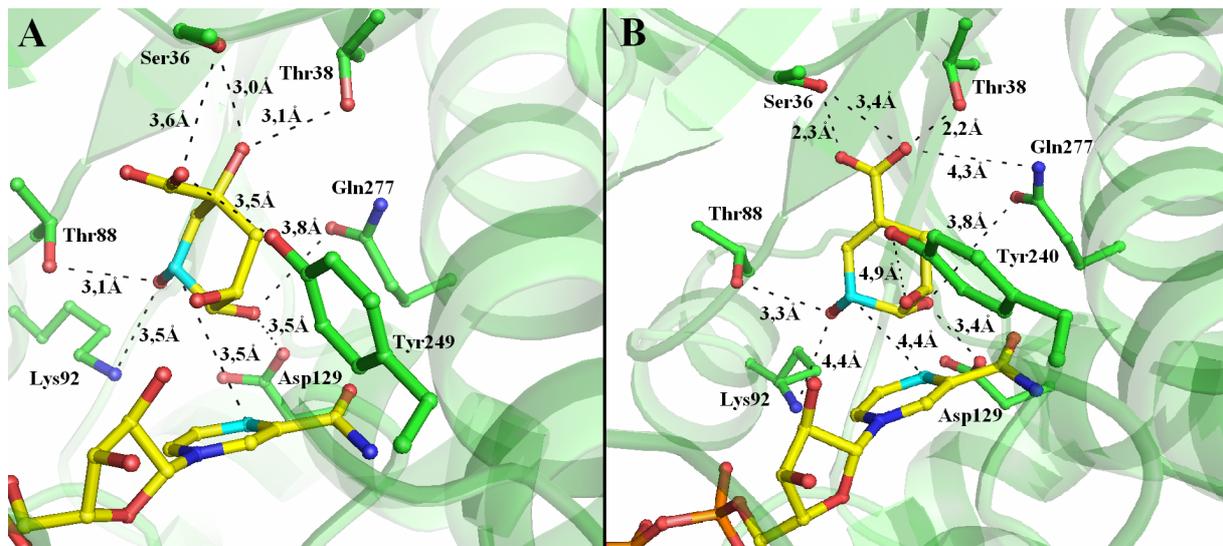
**Abb. 3.18**

Konservierung von Seitenketten des aktiven Zentrums der S/QDH. Es ist naheliegend, dass diese an der Substratbindung beteiligt sind. Es wurden die Farben grün für *CglQDH*, cyan für *Methanococcus jannaschii*, orange für *E. coli* YdiB bzw. fleischfarben für AroE und gelb für *Haemophilus influenzae* AroE bzw. violett für SDH-L verwendet. Die Numerierung der Residuen bezieht sich auf die *CglQDH*.

### 3 Ergebnisse und Diskussion

Die Konservierung der Seitenkette der S/QDH im aktiven Zentrum führt zwangsläufig zur Annahme, dass Shikimat und das chemisch sehr ähnliche Quinat durch die gleichen Residuen auf analoge Weise gebunden werden. Die beiden Liganden wurden auf Grund der in Abschnitt 1.4.7 angegebenen Experimente in das aktive Zentrum modelliert, wobei sich in beiden Fällen näherungsweise das dort diskutierte „Modell A“ ergab (siehe Abb. 1.8 & Abb. 3.19).

Das Quinat ist auf Grund seiner zusätzlichen Hydroxylgruppe am C1-Atom sperriger als das Shikimat. Die in Abb. 3.19A gezeigte Bindungsmöglichkeit für dieses Substrat ist so jedoch für Shikimat nicht möglich, weil es dort zu van-der-Waals-Abstoßungen der Carboxylatgruppe dieses Substrates mit der Seitenkette des Serins 36 geben würde. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass das Shikimat etwas „tiefer“ in dem aktiven Zentrum gebunden wird. Auch wenn vermutlich die gleichen konservierten Residuen die analogen funktionellen Gruppen beider Substrate binden, muss man folglich davon ausgehen, dass Shikimat im Enzym gegenüber Quinat verschoben und/oder verdreht ist.



**Abb. 3.19**

Potentielle Bindungsmodi von Quinat (A) und Shikimat (B) in der *CglQDH*, die sich im Detail unterscheiden. Die Substrate und der Nikotinsäureamidteil des NADs sind jeweils hauptsächlich in gelb und das Protein in grün dargestellt. Das Kohlenstoffatome des Substrates und des NAD, an welchen die Reaktionen stattfinden, sind cyan gefärbt. Die gestrichelten Linien repräsentieren die Abstände zwischen den Atomen; eine Bindung muss nicht zwangsläufig eingegangen werden. Da eine Domänenbewegung nicht ausgeschlossen werden kann, ist es vorstellbar, dass es bei Entfernungen zwischen den Atomen, die zu lang für eine potentielle Bindung zu sein scheinen, im Holoenzym doch zu einer anziehenden Wechselwirkung kommt. Weitere Erklärungen sind im Text gegeben.

Wie Singh *et al.* (2005) vermuten, ist es wahrscheinlich, dass zwischen der N- und C-terminalen Domäne der S/QDH Flexibilität besteht und es zwei Scharnierregionen gibt. Somit ist es vorstellbar, dass sich die Größe des aktiven Zentrums durch die Bindung von Substrat und Cosubstrat verändert, wodurch sich die Atomabstände zwischen Enzym und Ligand noch (ein wenig) verändern würden.

#### 3.11.4 Welcher Reaktionsmechanismus ist wahrscheinlich?

Unter der Annahme, dass Quinat in der Sesselkonformation gebunden wird, erscheint folgender Reaktionsmechanismus für die *Cgl*QDH wahrscheinlich: Nach der Bindung des Substrates und  $\text{NAD}^+$  bildet der Sauerstoff der 3'-Hydroxylgruppe des Quinates eine Wasserstoffbrückenbindung zur Seitenkette des konservierten Threonins88 aus. Hierdurch wird die Bindung des Wasserstoffatoms der 3'-Hydroxylgruppe geschwächt und somit die Abstraktion eines Protons erleichtert. Die deprotonierte Aminogruppe der hochkonservierten Lysin92-Seitenkette fungiert dabei als Protonenakzeptor. Gleichzeitig nimmt das  $\text{NAD}^+$  ein Hydridion von der H-C3-Bindung des Quinates auf.

Ebenso sollte dieser Mechanismus bei dem Enzym YdiB funktionieren, wenn es Quinat oxidiert und in umgekehrter Richtung bei den Shikimat-Dehydrogenasen, wobei dann davon auszugehen ist, dass das Dehydroshikimat in halbsesselartiger Konformation gebunden wird.

#### 3.11.5 Wie wird die Substratspezifität gewährleistet?

Die unterschiedlichen Substratspezifitäten zwischen den Mitgliedern der S/QDH-Familie ist bemerkenswert. Bei der AroE und SDH-L wurde praktisch keine enzymatische Aktivität beobachtet, wenn Quinat als Substrat verwendet wurde. Jedoch bei YdiB und besonders bei der QDH ändert sich dies vollständig. Die katalytische Effizienz mit Quinat ist deutlich höher als mit Shikimat (siehe Abschnitt 1.4.2, Tab. 3.1).

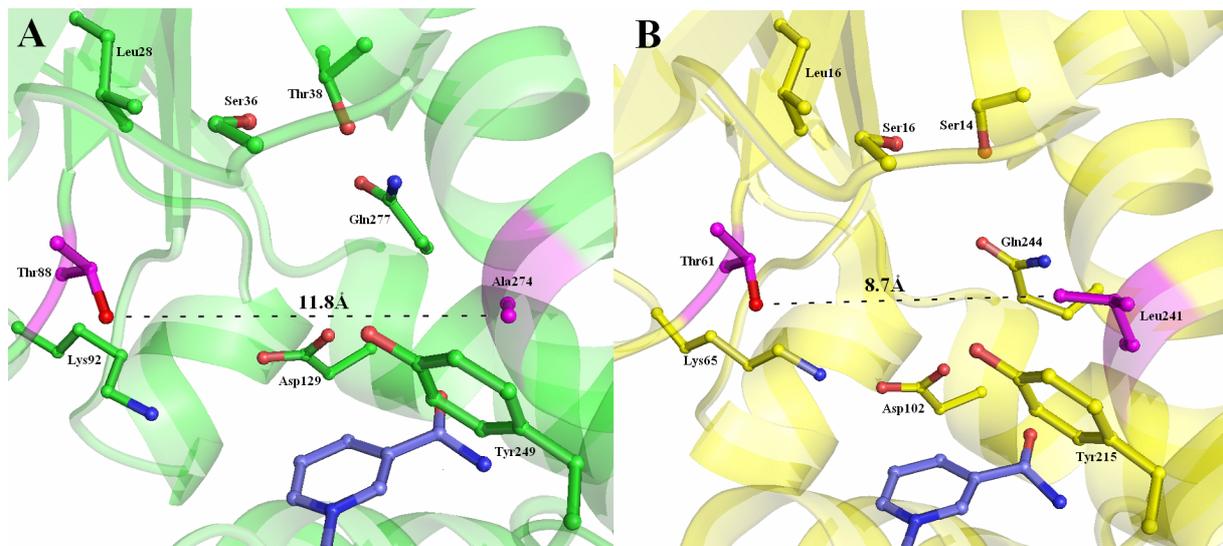
Insbesondere wegen der zusätzlichen Hydroxylgruppe am C1-Atom des Ringes ist Quinat ein wenig größer als Shikimat und somit auch „sperriger“. Es ist somit naheliegend, dass die Substratspezifität des Enzymes mit der Größe bzw. dem Volumen des aktiven Zentrums zusammenhängt. Diese Vermutung bestätigt sich, wenn man die konservierten

### 3 Ergebnisse und Diskussion

Aminosäureseitenketten der verschiedenen S/QDH übereinanderlagert. AroE-Analoga der Threonin 88-Seitenkette von *Cgl*QDH ragen wesentlich tiefer in das aktive Zentrum hinein, wodurch sich das Volumen verringert (siehe Abb. 3.20). Gegenüber dieser Residue ist in der *Cgl*QDH die kleine Aminosäure Alanin 274 zu finden. Bei spezifischeren S/QDH befinden sich dort größere, hydrophobe Aminosäuren wie Isoleucin oder Phenylalanin (siehe Abb. 3.20), wodurch wiederum das Volumen des aktiven Zentrums reduziert wird.

Das relativ breite aktive Zentrum der *Cgl*QDH könnte dazu führen, dass die Bindungen der Seitenketten im aktiven Zentrum zum Shikimat ein wenig länger und somit schwächer sind als bei den anderen S/QDH. Hierdurch könnte sich die Affinität verringern, was sich durch den verhältnismäßig hohen  $K_M$ -Wert bemerkbar macht.

Schließlich muss wiederum berücksichtigt werden, dass eine Domänenbewegung möglich ist (Singh *et al.* 2005), wodurch sich die Breite des aktiven Zentrums ändern könnte. Es erscheint aber auch dann unwahrscheinlich, dass sich an der Tendenz innerhalb der Größenabstufung der aktiven Zentren „QDH > YdiB > SDH-L > AroE“ etwas ändern würde.



**Abb. 3.20**

Vermutete Ursachen für die verschiedenen Substratspezifitäten der *Cgl*QDH (A) und der AroE von *E. coli* (B). Der Abstand zwischen dem jeweils begrenzenden Threonin und der gegenüberliegenden Aminosäure Alanin bzw. Leucin (Darstellung der Residuen in magenta) ist bei der AroE deutlich geringer. Die analogen Abstände in YdiB betragen durchschnittlich 9,9 Å und in SDH-L 9,6 Å.

## 3.12 Lassen sich die verschiedenen Subfamilien der S/QDH mit bioinformatischen Methoden voneinander unterscheiden?

Ein multipler Abgleich verschiedener Primärstrukturen von Proteinen (multiples Sequenzalignment) eignet sich, um den Grad der Konservierung von Aminosäureresten zu untersuchen. Es ist allgemein bekannt, dass einer hohen Konservierung eine besondere Bedeutung zukommt. Diese kann allein in der Faltung des Proteins begründet sein; in einigen Fällen sind (andere) biologische Eigenschaften des Proteins dafür verantwortlich wie z.B. der erforderliche Reaktionsmechanismus von Enzymen. Ein multiples Sequenzalignment ist somit ein wichtiges Hilfsmittel, um Proteine zu untersuchen.

Sind bereits die 3D-Strukturen zu vergleichender Sequenzen bekannt, ist es möglich, einen multiplen strukturbasierten Abgleich vorzunehmen, welcher wesentlich präziser als ein gewöhnliches Sequenzalignment ist. Dies wurde bei den S/QDH mit Hilfe des Programmes MAMMOTH (Olmea *et al.* 2002) durchgeführt. Es ließen sich eine Reihe von konservierten Residuen ausmachen. Diese ließen sich nicht nur für die externe Validierung der *CglAroE* und *CglSDH-L* nutzen; das Alignment eignete sich auch hervorragend zur Unterscheidung der einzelnen Mitglieder der S/QDH-Familie.

### 3.12.1 Unterscheidung per Cosubstratspezifität

Wenn die Enzyme mit bioinformatischen Methoden auf ihre Cosubstratspezifität hin unterschieden werden können, ist es möglich, die QDH und YdiB aus der S/QDH-Familie vorherzusagen. Wenn in einem bestimmten Bereich die Residuenabfolge DXD auftritt (siehe Abb. 3.21), ist dies ein deutliches Zeichen dafür, dass das Enzym NAD als Cosubstrat benötigt und somit katabole Funktion besitzt. Ein Aspartatrest bindet dabei die 2'- und/oder 3'-Hydroxylgruppe der Adenosylribose. Sollte es sich bei dem Cosubstrat um NADP handeln, käme es zur Coulombschen Abstoßung zwischen der Phosphorylgruppe des NADP und der Carboxylatgruppe des Aspartats. Das Vorhandensein dieser Aminosäure bedeutet, dass das betreffende Enzym eine NAD-abhängige Quinat-Dehydrogenase ist.

Die Abfolge RD in dieser Erkennungsregion ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass das Enzym sowohl NAD als auch NADP binden kann. Das Arginin interagiert mit den  $\pi$ -

### 3 Ergebnisse und Diskussion

---

Elektronen des Adenosylrings des Cosubstrates (siehe Abschnitt 1.4.6) in jedem Fall derart, dass auch eine elektrostatische Abstoßung bei NADP-Bindung überkompensiert werden kann. NAD wird dagegen ohnehin gebunden.

Die Abfolge RT oder seltener RS in dem Erkennungsbereich deutet darauf hin, dass das Enzym NADP als Cofaktor benötigt und somit entweder zur AroE- oder zur SDH-L-Subfamilie zählt. Von dieser Regel gibt es jedoch offensichtlich Ausnahmen; so ist bei der SDH-L von *Haemophilus influenzae* das Serin, welches cosubstratbindend ist, im „Fingerprintbereich“ zu finden. Dagegen ist gemäß der Modellierungsstudien das Serin der *CglAroE* und der *CglSDH-L* in der glycinreichen Schlaufe nicht an der Bindung von NADP beteiligt.

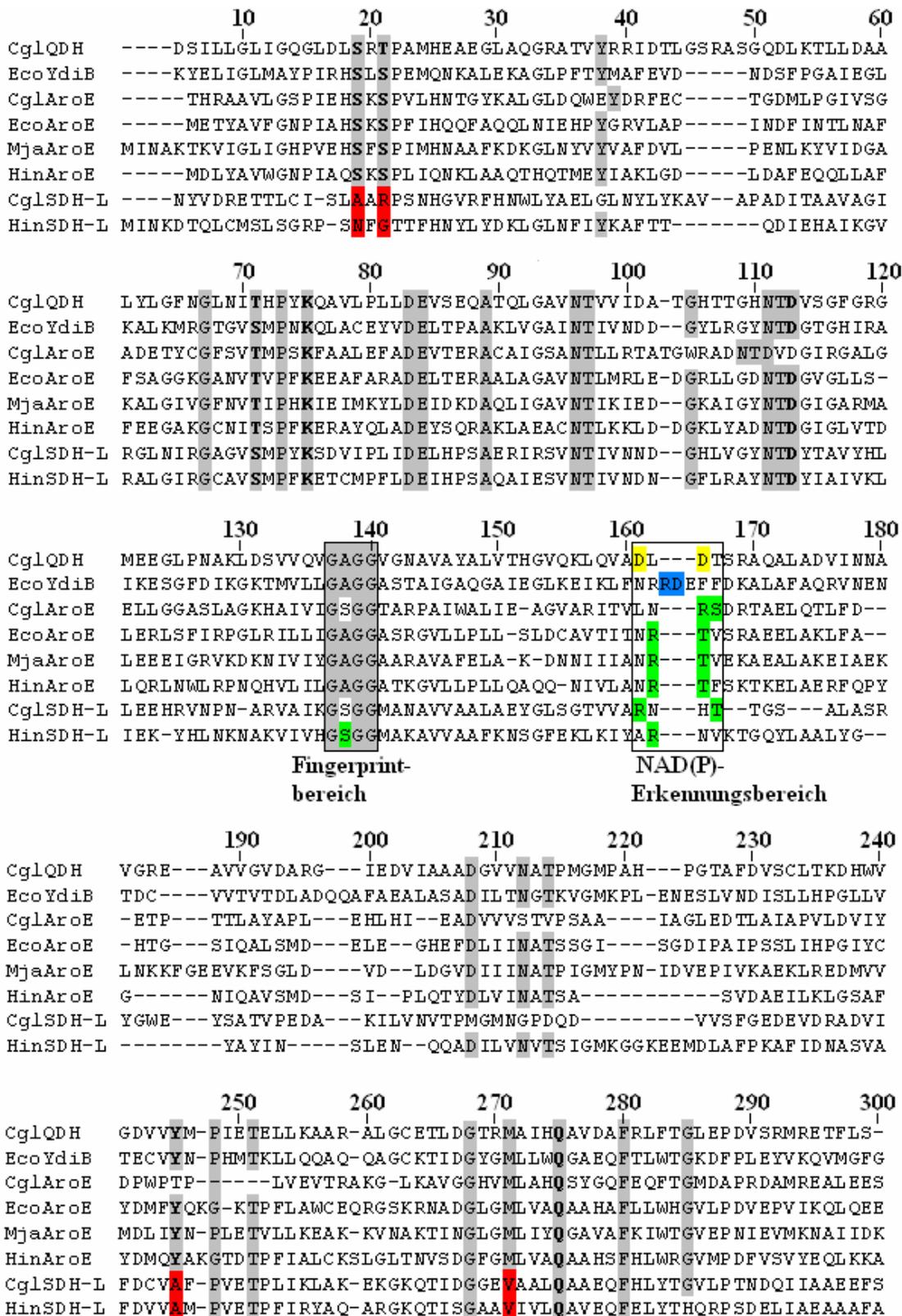
Es ist somit davon auszugehen, dass die Cosubstratspezifität nur von wenigen Aminosäureresten abhängt. Diese Annahme ließe sich mittels ortsgerichteter Mutagenese überprüfen. Ein analoges Experiment wurde bereits durchgeführt, indem eine NADP-abhängige Lactat-Dehydrogenase in ein NAD-abhängiges Enzym umgewandelt werden konnte (Luyten *et al.* 1989). Ferner wurde eine NADP-abhängige Alkohol-Dehydrogenase durch Austausch von einem Alanin zu einem Aspartat in ein Enzym mit dualer Cosubstratspezifität transformiert (Schlieben *et al.* 2005).

#### 3.12.2 Unterscheidung von AroE und SDH-L

Anhand der unterschiedlichen Cosubstratbindungsmuster ist es möglich, alle S/QDH-Familienmitglieder zu unterscheiden bis auf AroE und SDH-L, die beide NADP benötigen. Der SDH-L fehlen jedoch bestimmte Aminosäurereste im aktiven Zentrum, die bei allen anderen S/QDH vorhanden sind (siehe Abb. 3.21). Diese Residuen besitzen alle Hydroxylgruppen, welche mit hoher Wahrscheinlichkeit Wasserstoffbrückenbindungen zur Carboxylatgruppe und bei Quinat auch zu der zusätzlichen Hydroxylgruppe am C1-Atom ausbilden. Die Affinität der Substrate zur SDH-L muss somit deutlich herabgesetzt sein.

Den beiden betrachteten SDH-L fehlt ein Methionin, welches jedoch generell nur mäßig konserviert, aber sofern in den Enzymen vorhanden, an der Cosubstratbindung beteiligt sein sollte.

### 3 Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 3.21**

Multiples strukturelles Alignment der S/QDHs. Konservierte Aminosäurereste sind grau schattiert oder farbig dargestellt. Fettgedruckte Residuen (S19, S/T21, S/T71, K75, D113, Y245, Q275) dürften an der Substratbindung beteiligt sein. Gelb markierte Reste sind in dem entsprechenden Bereich charakteristisch für Quinat-Dehydrogenasen (QDH), blau für YdiB, grüne für AroE oder SDH-L und rote für SDH-L. Es wurden maximal drei Residuen vom C-Terminus entfernt. Weitere Erläuterungen sind im Text gegeben.

### 3.13 Welche Verwandtschaftsverhältnisse bestehen zwischen den S/QDH?

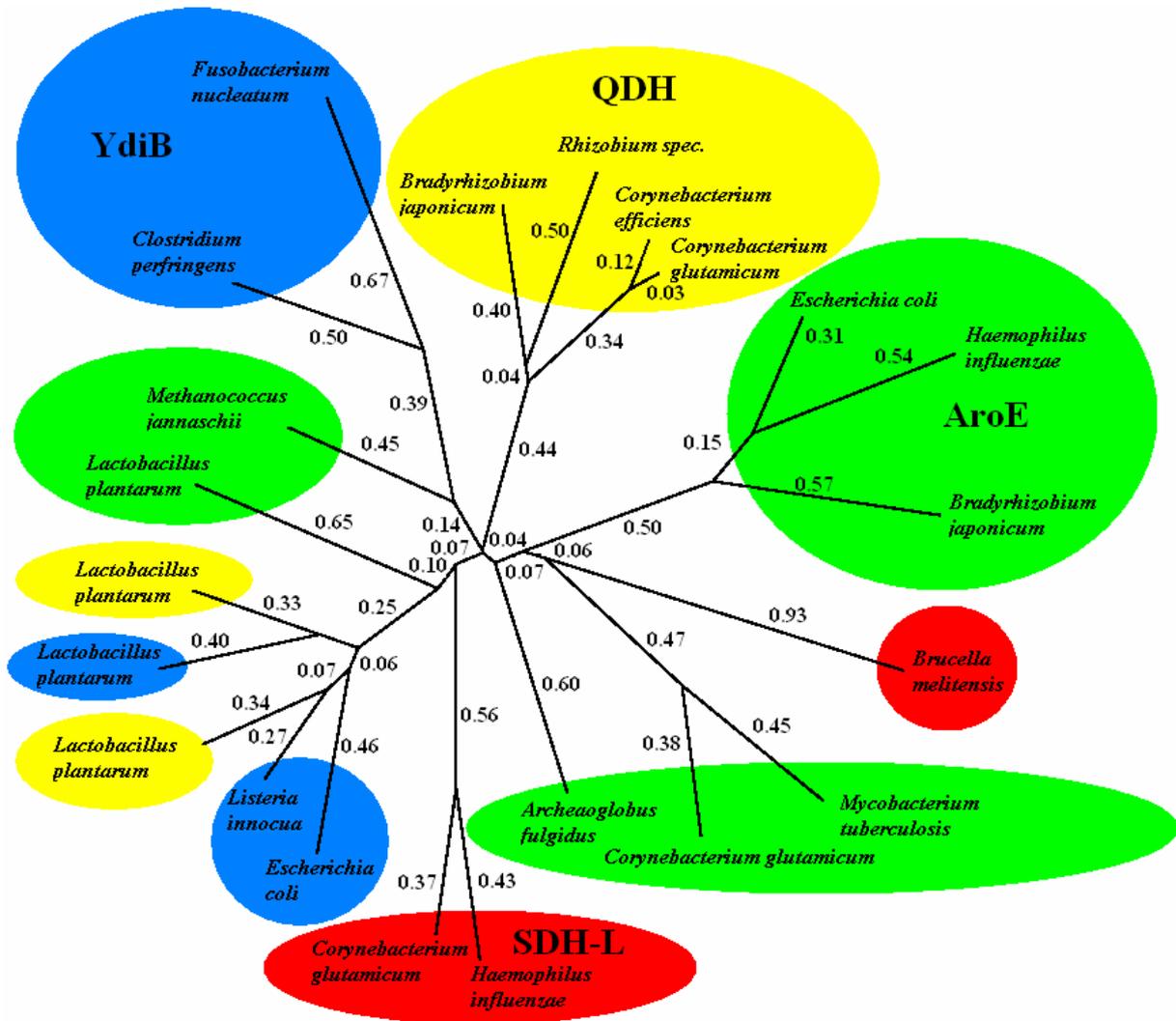
Da es möglich ist, die verschiedenen Subfamilien der S/QDH mittels multiplem Sequenzalignment voneinander zu unterscheiden (siehe Kapitel 3.12), ist man nicht allein auf kinetische Daten angewiesen und kann somit auf eine Vielzahl von DNA- und Proteinsequenzen zurückgreifen, um die Enzyme phylogenetisch zu untersuchen.

Wenn man die hohe strukturelle Konservierung dieser Enzymfamilie betrachtet (siehe Tab. 3.11 & Abb. 3.18), ist zu vermuten, dass es einen gemeinsamen Vorfahr für alle diese Enzyme gibt. Da der Shikimatweg den Hauptsynthesepfad für die Synthese der aromatischen Aminosäuren darstellt, ist davon auszugehen, dass er sehr alt ist. Quinat hingegen als Zersetzungsprodukt höherer Pflanzen dürfte sich wie sein gleichnamiger Stoffwechselweg deutlich später in der Evolution entwickelt haben. Man könnte also vermuten, dass die QDH und auch YdiB aus den SDH hervorgegangen sind. Mit dem Programm PHYLIP (Felsenstein 1989) wurde ein unverwurzelter phylogenetischer Baum, der auf der Analyse von Proteinsequenzen eines multiplen Alignments basiert, erstellt. Es ist danach nicht davon auszugehen, dass die Trennung der einzelnen S/QDH-Subfamilien vom Hauptpfad der SDH im Laufe der Evolution nur einmal erfolgt ist (siehe Abb. 3.22). Im Extremfall scheint neben einer relativ geringfügigen Variation der Größe des aktiven Zentrums (siehe Abschnitt 3.11.4) nur der Austausch weniger Aminosäuren auszureichen, um die Funktionalität des Enzyms vollkommen zu verändern (anabol D katabol). Da folglich trotz hoher Sequenzverwandtschaft eine unterschiedliche Funktionalität möglich ist, ist davon auszugehen, dass diese Enzyme im Laufe der Evolution schnell von einer S/QDH-Subfamilie zu einer anderen wechseln können.

Es wurde ein multiples Sequenzalignment mit den Primärstrukturen der S/QDH-Familie, die aus der BRENDA (Schomburg *et al.* 2002) verfügbar gewesen sind, durchgeführt. Es wurden daraus ca. 100 Proteinsequenzen gemäß den „Regeln“ der Abschnitte 3.12.1 und 3.12.2 annotiert. Hieraus ging hervor, dass die Gruppe der AroE-Enzyme mit einer Häufigkeit von ca. 86% gegenüber den anderen Enzymen klar dominiert. Es folgen weit abgeschlagen die QDH mit ~6%, YdiB mit ~5% und SDH-L mit ~3%. Diese Zahlen können jedoch nur eine grobe Tendenz angeben, weil in den Datenbanken oft mehrere Organismen vorkommen, die untereinander eng verwandt sind. Dadurch kommt es zu einer gewissen Verzerrung, wenn man die Häufigkeit des Auftretens bestimmter Enzyme auf die Gesamtheit aller Prokaryoten und Archaea extrapoliert. Dieses Problem wurde zum Teil dadurch verringert, dass von

### 3 Ergebnisse und Diskussion

extrem verwandten Organismen nur ein Vertreter für die Analyse der Primärsequenzen ausgewählt worden ist.



**Abb. 3.22**

Unverwurzelter phylogenetischer Baum mit Mitgliedern der S/QDH-Familie. Die Klasse AroE ist grün, die der SDH-L rot, die von YdiB blau und die der QDH gelb dargestellt. Eine sich eindeutig abzeichnende Clusterung ist nicht zu erkennen. Die Zahlenwerte geben die relativen Abstände der Sequenzunterschiede wieder und entsprechen der Länge der einzelnen Äste. Die Mengenverhältnisse sind verzerrt dargestellt. AroE tritt wesentlich häufiger auf als die anderen S/QDH-Subfamilien. Die für diese Abbildung verwendeten Enzyme lagen entweder kinetische Daten vor oder sie wurden gemäß der oben beschriebenen Weise annotiert.

### 3.14 Ausblick

Während dieser Arbeit wurden zwei Shikimat- und eine NAD-abhängige Quinat-Dehydrogenase enzymkinetisch charakterisiert und die 3D-Strukturen mittels Homologer Modellierung vorhergesagt bzw. durch Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt. Die sich aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ergebenden neuen Fragestellungen sollen hier noch einmal herausgestellt werden.

#### ***in vitro*-Evolution**

Es hat den Anschein, als ob die unterschiedliche Funktionalität der verschiedenen S/QDH-Subfamilien hauptsächlich durch einige wenige Unterschiede in ihrer Aminosäuresequenz zu erklären ist. Es sollte beispielsweise möglich sein, eine SDH-L mittels ortsgerichteter Mutagenese in eine AroE umzuwandeln. Es könnte auch die Cosubstratspezifität der Enzyme verändert werden, um aus einem Biokatalysator mit anaboler Funktion einen mit kataboler herzustellen und umgekehrt. Die Substratspezifität spielt bei dieser Enzymfamilie eine entscheidende Rolle bezüglich der Funktion *in vivo*. Beispielsweise könnte die Größe des aktiven Zentrums der *Cgl*QDH durch Austausch eines Alanins (Nr. 274) durch eine größere hydrophobe Aminosäure wie z.B. Leucin oder Isoleucin verkleinert werden, wodurch die Affinität zum Quinat sinken sollte.

#### **Reaktionsmechanismus**

Über den Reaktionsmechanismus bei der S/QDH-Familie lassen sich noch keine exakten Angaben machen. Wünschenswert wären strukturelle Messdaten bezüglich der Substratbindung. Auf Grund der hohen  $K_M$ -Werte der *Cgl*QDH bezüglich Quinat und Shikimat dürfte die *Cgl*SDH-L für derartige Experimente geeigneter sein, wobei für dieses Enzym noch geeignete Kristallisationsbedingungen gefunden bzw. diese optimiert werden müssen. Alternativ könnte man auch eine S/QDH mit bereits vorhandenem Kristallisationsprotokoll nehmen, bei welcher der  $K_M$ -Wert ebenfalls wesentlich niedriger als bei der *Cgl*QDH ist, wie z.B. YdiB aus *E. coli*. Neben Elektronendichten von Substraten im aktiven Zentrum wären solche von Analoga des Übergangszustandes wünschenswert. Eine ortsgerichtete Mutagenese erscheint dagegen zu diesem Zeitpunkt für die Untersuchung des Reaktionsmechanismus wenig sinnvoll.

### 3 Ergebnisse und Diskussion

---

#### **Funktion der Dehydrogenasen *in vivo***

Die in dieser Arbeit bestimmten kinetischen Parameter beziehen sich auf *in vitro*-Experimente. Es wäre sinnvoll, die dazugehörigen Gene in *C. glutamicum* auszuschalten und den daraus resultierenden Phänotyp mit dem Wildtyp ausführlich zu vergleichen. Es könnte ebenfalls versucht werden, einen Phänotyp, der durch einen S/QDH-*Knock out* hervorgerufen worden ist, durch Zugabe spezieller Additiva ins Medium zu revidieren. Es sind bereits die Gene der *CglAroE* und *CglSDH-L* ausgeschaltet worden und die ersten Auswertungen eines solchen *Knock out*-Experiments (Choorapoikayil 2005) decken sich mit den *in vitro*-Kinetikexperimenten: Das Metabolomprofil der AroE-Mutante variiert wesentlich stärker vom Wildtyp als das der SDH-L-Mutante. Letztere sind in ihrem Wachstum im Vergleich zum Wildtyp zudem nicht beeinträchtigt, wohingegen die AroE-Mutante nur noch ein marginales Wachstum aufweist.

Somit erscheint die AroE bzw. deren Mutante für weitergehende Analysen geeigneter („aussagekräftiger“) zu sein. Allerdings könnte die „unscheinbare“ SDH-L aber an einem bisher noch unbekanntem Stoffwechselweg beteiligt sein, so dass die Untersuchung dieses Gens/Enzyms sehr vielversprechend sein könnte.

### 4 Zusammenfassung

Es wurden die drei als Shikimat-Dehydrogenasen annotierten offenen Leseraster aus *C. glutamicum* in einen *E. coli*-Expressionsvektor kloniert, die Proteine heterolog exprimiert, gereinigt und enzymkinetisch charakterisiert. Das durch das Gen *cgl0424* codierte Protein wurde kristallisiert und die Röntgenstruktur bis zu einer Auflösung von 1,6 Å gelöst. Die Tertiärstrukturen der anderen beiden Proteine wurden mittels bioinformatischer Methoden (*Homology Modelling*) vorhergesagt.

Es zeigte sich, dass von einer Enzymredundanz, wie sie beispielsweise bei den DAHP-Synthasen in *E. coli* auftreten, nicht die Rede sein kann. Bei einem der vermeintlichen Shikimat-Dehydrogenasen handelt es sich um eine NAD-abhängige Quinat-Dehydrogenase, d.h. um ein Enzym, welches am Abbau von zyklischen Verbindungen beteiligt ist, anstatt an ihrer Synthese mitzuwirken. Ein solches Protein, das neben der Affinität zum Quinat auch eine zum Shikimat aufweist, wurde bisher ausschließlich in Eukaryoten beschrieben. Bei den anderen beiden Enzymen handelt es sich um ein AroE- und um ein SDH-L-analoges Protein. Da die Funktion der SDH-L *in vivo* bisher unklar ist, konnte nicht mit letzter Sicherheit festgestellt werden, ob hier eine zweifache Enzymredundanz vorliegt. Metabolite, die inhibitorisch auf die AroE oder die SDH-L wirken, wurden nicht gefunden. Auf Grund der geringen katalytischen Effizienz der SDH-L wird spekuliert, dass sie eine andere Funktion im Stoffwechselweg einnimmt. Dem muss man jedoch gegenüberstellen, dass sie sich topologisch von den anderen bakteriellen Shikimat/Quinat-Dehydrogenasen kaum unterscheidet und das Enzym eine hohe Substratspezifität besitzt, was für eine Shikimat-Dehydrogenase-Funktion spricht. In diesem Fall ist das Vorhandensein einer unbekanntenen Abweigung vom Shikimatweg naheliegend.

Aus der Analyse der drei Strukturen und der bereits bekannter Shikimat/Quinat-Dehydrogenasen ergab sich, dass die „Breite“ des aktiven Zentrums für die Substratspezifität verantwortlich sein dürfte.

Zusammen mit der Identifizierung konservierter Residuen der nunmehr vier bekannten Subtypen der bakteriellen Shikimat/Quinat-Dehydrogenasefamilie konnten die jeweils für die Funktion charakteristischen Aminosäuren ausfindig gemacht werden. Damit sind diese Enzyme nun mittels bioinformatischer Annotation voneinander zu unterscheiden.

Modellierungen unterstützen bei der Quinat-Dehydrogenase das bisher in der Literatur bevorzugte „Modell A“ der Substratbindung. Shikimat und Quinat sollten auf analoge Weise gebunden werden. Beim Reaktionsmechanismus dürfte dem hochkonservierten Lysin im

#### **4 Zusammenfassung**

---

Bereich des aktiven Zentrums eine Schlüsselfunktion zukommen, indem es für die Verschiebung eines Protons verantwortlich ist, welches neben einem Hydridion auf das Dehydroshikimat übertragen bzw. vom Quinat entfernt wird.

---

## 5 Literatuur

- Abell, C., Allen, F.H., Bugg, T. H. D., Doyle, M. J., Raithby, P. R. (1988). "Structure of (--) -Quinic acid." *Acta Cryst. C* **44**: 1204-7.
- 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**: 1204-7.
- Abell, C, Allen, F.H., Bugg, T. D. H., Doyle, M. J., Raithby, P. R. (1988). "Structure of (--) -3-Dehydroshikimic Acid Monohydrate." *Acta Cryst. C* **44**: 1290-2.
- 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): 2124-31.
- Akowski, J. P., Bauerle, R. (1997). "Steady-state kinetics and inhibitor binding of 3-deoxy D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase (tryptophane sensitive) from *Escherichia coli*." *Biochem.* **36**: 15817-22.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D. J. (1990). "Basic local alignment search tool." *J. Mol. Biol.* **215**(3): 403-10.
- Andreeva, A., Howorth, D., Brenner, S. E., Hubbard, T. J., Chothia, C., Murzin, A. G. (2004). "SCOP database in 2004: refinements integrate structure and sequence family data." *Nucleic Acids Res.* **32**: D226-9.
- Atkinson, D. E. (1977). *Cellular energy metabolism and its regulation*. Academic Press Inc., New York, USA.
- Baasov, T., Knowles, J. R. (1989). "Is the first enzyme of the shikimate pathway, 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase (tyrosine sensitive), a copper metalloenzyme?" *J. Bacteriol.* **171**: 6155-60.
- 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* **60**(4): 787-96.
- 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**: 662-71.
- Baker, T. I., Crawford, I.P. (1966). "Anthranilate synthetase. Partial purification and some kinetic studies on the enzyme from *Escherichia coli*." *J. Biol. Chem.* **241**(23): 5577-84.
- 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): 1-14.
- Beijerinck, M. W. (1911). *Pigmenten als oxidatieproducten door bacterien gevormd*. Verlasgen Kon. Akad. v. Wetenschappen Wis-en Natuurk. Afd., Amsterdam, Nederlande.

## 5 Literatur

---

- Benach, J., Lee, I., Edstrom, W., Kuzin, A. P., Chiangi, Y., Acton, T. B., Montelione, G. T., Hunt, J. F. (2003). "The 2.3-Å Crystal Structure of the Shikimate 5-Dehydrogenase Orthologue YdiB from *Escherichia coli* Suggests a Novel Catalytic Environment for an NAD-dependant Dehydrogenase." *J. Biol. Chem.* **278**(21): 19176-82.
- Bender, S. L., Medhi, S., Knowles, J. R. (1989). "Dehydroquinase synthase: the role of divalent metal cations and of nicotinamide adenine dinucleotide in catalysis." *Biochem.* **28**(19): 7555-60.
- Bentley, R. (1990). "The shikimate pathway-a metabolic tree with many branches." *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **25**(5): 307-84.
- Bianco, A., Brufani, M., Manna, F., Melchioni, C. (2001). "Synthesis of a carbocyclic sialic acid analogue for the inhibition of influenza virus neuraminidase." *Carbohydr. Res.* **332**(1): 23-31.
- Bottomley, J. R., Clayton, C. L., Chalk, P. A., Kleanthous, C. (1996). "Cloning, sequencing, purification and preliminary characterization of a type II dehydroquinase from *Helicobacter pylori*." *Biochem. J.* **319**: 559-65.
- Bower, M. J., Cohen, F. E., Dunbrack Jr., R. L. (1997). "Prediction of protein side-chain rotamers from a backbone-dependent rotamer library: a new homology modeling tool." *J. Mol. Biol.* **267**(5): 1268-82.
- Brown, S. A., Neish, A. C. (1955). "Shikimic acid as a precursor in lignin biosynthesis." *Nature* **175**: 688-9.
- Brunger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J.-S., Kuszewski, J., Nilges, N., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T., Warren, G. L. (1998). "Crystallography and NMR System (CNS): A New Software System For Macromolecular Structure Determination." *Acta Cryst. D* **54**: 905-21.
- Cain, R. B. (1972). "The identity of shikimate dehydrogenase and quinate dehydrogenase in *Aspergillus niger*." *Biochem. J.* **127**: 15.
- Carrington, J. C., Dougherty, W. G. (1988). "A viral cleavage site cassette: identification of amino acid sequence required for tobacco etch virus polyprotein processing." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 3391-3395.
- Carugo, O., Argos, P. (1997). "NADP-Dependant Enzymes. II: Evolution of the Mono- and Dinucleotide Binding Domains." *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics* **28**: 29-40.
- Carugo, O., Argos, P. (1997). "NADP-Dependant Enzymes. I: Conserved Stereochemistry of Cofactor Binding." *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics* **28**: 10-28.
- Case, D. A., Darden, T.A., Cheatham, T. E., Simmerling, C. L., Wang, J., Duke, R. E., Luo, R., Merz, K. M., Wang, B., Pearlman, D. A., Crowley, M., Brozell, S., Tsui, V., Gohlke, H., Mongan, J., Hornak, V., Cui, G., Beroza, P., Schafmeister, C., Caldwell, J. W., Ross, W. S., Kollman, P. A. (2004). AMBER 8.
- Case, D. A., Cheatham III T.E., Darden, T., Gohlke, H., Luo, R., Merz Jr., K. M., Onufriev, A., Simmerling, C., Wang, B., Wood, R. J., (2005). "The Amber biomolecular simulation programs." *J. Comp. Chem.* **26**: 1668-88.
- CCP4 (1994). "The CCP4 suite: programs for crystallography." *Acta Cryst. D* **50**: 760-3.
- Chachrewarthy, S. (1996). Studies on the Active-site of *Escherichia coli* Shikimate Dehydrogenase. *PhD-Thesis*, Glasgow, Schottland.
- 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." *Prot. Expr. and Purif.* **39**: 137-43.
- Chaudhuri, S., Coggins, J. R. (1985). "The purification of shikimate dehydrogenase from *Escherichia coli*." *Biochem. J.* **226**(1): 217-23.

## 5 Literatur

---

- Christendat, D., Saridakis, V. C., Turnbull, J. L. (1998). "Use of site-directed mutagenesis to identify residues specific for each reaction catalyzed by chorismate mutase-prephenate dehydrogenase from *Escherichia coli*." *Biochem.* **37**: 15703-12.
- Coggins, J. R. (1989). *Herbicides and Plant Metabolism*, University press, Cambridge, England.
- Coggins, J. R., Boocock, M., Campbell, M. S., Chaudhuri, S., Lambert, J. M., Lewendon, A., Mousdale, D. M., Smith, D. D. S. (1985). "Functional domains involved in aromatic amino acid biosynthesis." *Biochem. Soc. Trans.* **13**(2): 299-303.
- Coggins, J. R., Boocock M. R., Chaudhuri S, Lambert J. M., Lumsden, J., Nimmo, G. A., Smith, D. D. (1987). "The arom multifunctional enzyme from *Neurospora crassa*." *Meth. Enzymol.* **142**: 325-41.
- Colovos, C., Yeates, T. O. (1993). "Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions." *Prot. Sci.* **2**(9): 1511-9.
- Cornell, W. D., Cieplak, P., Bayly, I., Gouls, I. R., Merz, K. M., Ferguson, D. M., Spellmeyer, D. C., Fox, T., Caldwell, J. W., Kollmann, P. A. (1995). "A second generation force field for the simulation of proteins and nucleic acids." *J. Am. Chem. Soc.* **117**: 5179-97.
- d'Ans, J., Lax E., Schäfer K. (1992). *Taschenbuch für Chemiker und Physiker*, Springer Verlag, Berlin/Heidelberg.
- Dal, S., Trautwein, G., Gerischer, U. (2005). "Transcriptional organization of genes for protocatechuate and quinate degradation from *Acinetobacter* sp. strain ADP1." *Appl. Environ. Microbiol.* **71**(2): 1025-34.
- Davies, G. M., Barrett-Bee K., Jude, D. A., Lehan, M., Nichols, W. W., Pinder, P. E., Thain, J. L., Watkins, W. J., Wilson, R. G. (1994). "(6S)-6-fluoropshikimic acid, an antibacterial agent acting on the aromatic biosynthetic pathway." *Antimicrob. Agents and Chemother.* **38**(2): 403-6.
- Davis, B. D., Gilvarg, C., Mitsuhashi, S. (1955). "Enzymes of aromatic biosynthesis." *Meth. Enzymol.* **2**: 300-311.
- Deka, R. K., Kleanthous, C., Coggins, J. R. (1992). "Identification of the essential histidine residue at the active site of *Escherichia coli* dehydroquinase." *J. Biol. Chem.* **267**: 22237-42.
- Deka, R. K., Aanton, I. A., Dunbar, B., Coggins, J. R. (1994). "The characterization of the shikimate pathway enzyme dehydroquinase from *Pisum sativum*." *FEBS Letters* **349**(3): 397-402.
- Dewick, P. (2001). *Medicinal Natural Products - A Biosynthetic Approach*. John Wiley & Sons Ltd., Sussex, England.
- Dosselaere, F., Vanderleyden, J. (2001). "A metabolic node in action: chorismate-utilizing enzymes in microorganisms." *Crit. Rev. Microbiol.* **27**: 75-131.
- Duncan, K., Chaudhuri, S., Campbell, M. S., Coggins, J. R. (1986). "The overexpression and complete amino acid sequence of *Escherichia coli* 3-dehydroquinase." *Biochem. J.* **246**: 475-83.
- Duncan, K., Coggins, J. R. (1986). "The *serC-aroA* operon of *Escherichia coli*. A mixed function operon encoding enzymes from two different amino acid biosynthetic pathways." *Biochem. J.* **234**: 49.
- Eisenberg, D., Luthy, R., Bowie J. U. (1997). "VERIFY3D: assessment of protein models with three-dimensional profiles." *Meth. Enzymol.* **277**: 396-404.
- Eklund, H., Nordstrøm, B., Zeppezauer, E., Søderland, G., Ohlsson, I., Boiwe, T., Sønnderberg B.-O., Tapia, O., Bränden, C.-I., Akeson, A. (1976). "Three-dimensional structure of horse liver alcohol dehydrogenase at 2.4 Å resolution." *J. Mol. Biol.* **102**: 27-59.
- Elsemore, D. A., Ornston L. N. (1995). "Unusual ancestry of dehydratases associated with quinate catabolism in *Acinetobacter calcoaceticus*." *J. Bacteriol.* **177**: 5971-8.

## 5 Literatur

---

- Euverink, G. J. W., Hessels, G. I., Vrijbloed, J. W., Coggins, J. R., Dijkhuizen, L. (1992). "Purification and characterization of a dual function 3-dehydroquinate dehydratase from *Amycolatopsis methanolica*." *J. Gen. Microbiol.* **138**: 2449-57.
- Eykman, J. (1891). "Über die Shikimisäure." *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* **24**: 1278-303.
- Felsenstein, J. (1989). "PHYLIP - Phylogeny Inference Package (Version 3.2)." *Cladistics* **5**: 164-166.
- Fischer, H. O. L., Dangschat, G. (1934). "Zur Konfiguration der Shikimisäure." *Helv. Chim. Acta* **18**: 1206-1213.
- Fischer, H. O. L., Dangschat, G. (1935). "Konstitution der Shikimisäure." *Helv. Chim. Acta* **17**: 1200-1207.
- Fischer, H. O. L., Dangschat, G. (1937). "Über die Konfiguration der Shikimisäure und ihren Abbau zur Glucodensonsäure." *Helv. Chim. Acta* **20**: 705-16.
- Fiser, A., Sali, A. (2003). "Modeller: generation and refinement of homology-based protein structure models." *Meth. Enzymol.* **374**: 461-91.
- Fotadar, U., Zaveloff, P., Terracio, L. (2005). *Growth of Escherichia coli at elevated temperatures*. John Wiley & Sons, Sussex, England.
- Frishman, D., Argos, P. (1997). "Seventy-five percent accuracy in protein secondary structure prediction." *Proteins* **27**(3): 329-35.
- Frost, J., Bender, J. L., Kadonage, J. T., Knowles, J. R. (1984). "Dehydroquinate synthase from *Escherichia coli*: purification, cloning, and construction of overproducers of the enzyme." *Biochem.* **23**(19): 4470-5.
- Murshudov, G. N., Vagin, A. A., Dodson, E. J. (1997). "Refinement of Macromolecular Structures by the Maximum-Likelihood Method." *Acta Cryst. D* **53**: 240-55.
- Garner, C. C., Herrmann, K. (1985). "Operator mutations of the *Escherichia coli* *aroF* gene." *J. Biol. Chem.* **260**: 3820-5.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D., Bairoch, A. (2005). *The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press.
- Gerischer, U., Segura, A., Ornston, L. N. (1998). "PcaU, a transcriptional activator of genes for protocatechuate utilization in *Acinetobacter*." *J. Bacteriol.* **180**: 1512-24.
- Griffith, H. G., Gasson, M. (1995). "The gene (*aroK*) encoding shikimate kinase I from *Escherichia coli*." *DNA Sequence* **5**: 195-7.
- Grund, E., Kutzner, H. J. (1998). "Utilization of quinate and p-hydroxybenzoate by actinomycetes: key enzymes and taxonomic relevance." *J. Basic Microbiol.* **38**(4): 241-55.
- Haebel, P. W., Wichman, S., Goldstone, D., Metcalf, P. (2001). "Crystallization and initial crystallographic analysis of the disulfide bond isomerase DsbC in complex with the alpha domain of the electron transporter DsbD." *J. Struct. Biol.* **136**(2): 162-6.
- Hagino, H., Nakayama, K. (1974). "Regulatory properties of prephenate dehydrogenase and prephenate dehydratase from *Corynebacterium glutamicum*." *Agric. Biol. Chem.* **38**: 2367-76.
- Hall, L. D. (1964). *J. Org. Chem.* **29**: 297-9.
- Hasan, N., Nester, E. W. (1978). "Dehydroquinate synthase in *Bacillus subtilis*. An enzyme associated with chorismate synthase and flavin reductase." *J. Biol. Chem.* **253**(14): 4999-5004.
- Haslam, E. (1974). *The Shikimate Pathway*. Butterworth, London.
- Hatefi, Y., Yamaguchi, M. (1996). "Nicotinamide nucleotide transhydrogenase: a model for utilization of substrate binding energy for proton translocation." *FASEB J.* **10**(4): 444-52.

## 5 Literatur

---

- Hawkins, A. R., Lamb, H. K., Moore, J. D., Charles, I. G., Roberts, C. F. (1993). "The pre-chorismate (shikimate) and quinate pathways in filamentous fungi: theoretical and practical aspects." *J. Gen. Microbiol* **139**: 2891-99.
- Herrmann, K. (1995). "The Shikimate Pathway: Early Steps in the Biosynthesis of Aromatic Compounds." *Plant Cell* **7**: 907-919.
- Herrmann, K. M., Weaver, L. (1999). "THE SHIKIMATE PATHWAY." *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**: 473-503.
- Holm, L., Sander, C. (1996). "Mapping the protein universe." *Science* **273**: 595-602.
- Ikeda, M., Nakagawa, S. (2003). "The *Corynebacterium glutamicum* genome: features and impacts on biotechnological processes." *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **62**: 99-109.
- Ikeda, M. (2003). "Amino acid production processes." *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **79**: 1-35.
- Inoue, H., Nojima, H., Okayama, H. (1990). "High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids." *Gene* **96**: 23-8.
- 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**: 3115-22.
- Jacob, F., Monod, J. (1961). "Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins." *J. Mol. Biol.* **3**: 318-56.
- Jones, T. A., Zou, J., Cowan, S. W., Kjeldgaard, M. (1991). "Improved methods for binding protein models in electron density maps and the localisation of errors in these models." *Acta Cryst. A* **47**: 110-9.
- 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**: 4226-30.
- Kabsch, W., Sander, C. (1983). "Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features." *Biopolymers* **22**: 2577-637.
- 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., Kramer, R., Linke, B., McHardy, A. C., Meyer, F., Mockel, B., Pfefferle, W., Puhler, A., Rey, D. A., Ruckert, C., Rupp, O., Sahm, H., Wendisch, V. F., Wiegrabe, 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. Biotechnol.* **104**: 5-25.
- Kantardjieff, K. A., Rupp, B. (2003). "Matthews coefficient probabilities: Improved estimates for unit cell contents of proteins, DNA, and protein-nucleic acid complex crystals." *Prot. Sci.* **12**(9): 1865-71.
- Kieslich, K. (1976). *Microbial Transformation of Non-Steroid Cyclic Compounds*. Georg Thieme Publishers, Stuttgart.
- Kinoshita, S., Udaka, S., Shimono, M. (1957). "Studies on the amino acid fermentation. Industrial Production of L-glutamic acid by various microorganisms." *J. Gen Appl. Microbiol* **3**: 193-205.
- Kishore, G. M., Shah, D. (1988). "Amino Acid Biosynthesis Inhibitors as Herbicides." *Annu. Rev. Biochem.* **57**: 627-63.
- Kleanthous, C., Deka, R., Davis, K., Kelly, S. M., Cooper, A. (1992). "A comparison of the enzymological and biophysical properties of two distinct classes of dehydroquinase enzymes." *Biochem. J.* **282**: 687-95.
- Kowalchuk, G., Hartnett, G. B., Benson, A., Houghton, J. E., Ngai, K.-L., Ornston, L. N. (1994). "Contrasting patterns of evolutionary divergence within the *Acinetobacter calcoaceticus* *pca* operon." *Gene* **146**: 23-30.

## 5 Literatur

---

- Krell, T., Chackrewarthy, S., Pitt, A. R., Elwell, A., Coggins, J. R. (1998). "Chemical modification monitored by electrospray mass spectrometry: a rapid and simple method for identifying and studying functional residues in enzymes." *J. Pept. Res.* **51**(3): 201-9.
- Krissinel, E., Henrick, K. (2005). *Detection of Protein Assemblies in Crystals*. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg.
- Kyte, J., Doolittle, R. (1982). "A simple method for displaying the hydropathic character of a protein." *J. Mol. Biol.* **157**(1): 105-32.
- Laskowski, R. A., Luscombe, N. M., Swindells, M. B., Thornton, J. M. (1996). "Protein clefts in molecular recognition and function." *Protein Sci.* **5**(12): 2438-52.
- Laskowski, R. J., 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**: 283-91.
- Lesk, A. M. (1995). "NAD-binding domains of dehydrogenases." *Curr. Opin. Struct. Biol.* **5**(6): 775-83.
- Lewendon, A., Coggins, J. R. (1983). "Purification of 5-enolpyruvyl-shikimate-3-phosphate synthase from an overproducing strain of *Escherichia coli*." *Biochem J.* **213**: 187-91.
- Lim, S., Schröder, I., Monbouquette, H. G. (2004). "A thermostable shikimate 5-dehydrogenase from the archeon *Archaeoglobus fulgidus*." *FEMS Microb. Letters* **238**: 101-6.
- Lindner, H. A., Nadeau, G., Matte, A., Michel, G., Menard, 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): 7162-9.
- Liu, Y., Harrison, P. M., Kunin, V., Gerstein, M. (2004). "Comprehensive analysis of pseudogenes in prokaryotes: widespread gene decay and failure of putative horizontally transferred genes." *Genome Biol.* **5**(9): Epub.
- Lucast, L. J., Batey, R., Doudna, J. A. (2001). "Large-scale purification of a stable form of recombinant tobacco etch virus protease." *Biotechniques* **30**: 544-6, 548, 550 passim.
- Luthy, R., Bowie, J. U., Eisenberg, D. (1992). "Assessment of protein models with three-dimensional profiles." *Nature* **356**(6364): 83-5.
- Luyten, M., Bur, D., Wynn, H., Parris, W., Gold, M., Friesen, J. D., Jones, J. B. (1989). "An Evaluation of the Substrate Specificity, and of Its Modification by Site-Directed Mutagenesis, of the Cloned L-Lactate Dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus*." *J. Am. Chem. Soc.* **111**: 6800-4.
- 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**: 512-5.
- Magalhaes, M. L. B., Pereira, C. P., Basso, L. A., Santos, D. S. (2002). "Cloning and expression of functional shikimate dehydrogenase (EC 1.1.1.25) from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv." *Prot. Expr. Purif.* **26**: 59-64.
- Mesecar, A. D., Stoddard, B. L., Koshland Jr., D. E. (1997). "Orbital Steering in the Catalytic Power of Enzymes: Small Structural Changes with Large Catalytic Consequences." *Science* **277**: 202-6.
- Michel, G., Roszak, A. W., Sauve, V., Maclean, J., Matte, A., Coggins, J. R., Cygler, M., Laphorn, A. J. (2003). "Structures of Shikimate Dehydrogenase AroE and its Paralog YdiB." *J. Biol. Chem.* **278**(21): 19463-72.
- Moore, J. D., Hawkins, A. R., Charles, I. G., Deka, R., Coggins, J. R., Cooper, A., Kelly, S. M., Price, N. C. (1992). "Inducible overproduction of the *Aspergillus nidulans* pentafunctional AROM protein and the type-I and -II dehydroquinases from *Salmonella typhi* and *Mycobacterium tuberculosis*." *Biochem. J.* **287**: 173-81.

## 5 Literatur

---

- Moore, J. D., Hawkins, A., Charles, I. G., DeKa. R., Coggins, J. R., Cooper, A., Kelly, S. M., Price, N. C. (1993). "Characterization of the type I dehydroquinase from *Salmonella typhi*." *Biochem. J.* **295**: 277-85.
- Muday, G. K., Johnsson, D., Somerville, R. L., Herrmann, K. M. (1991). "The tyrosine repressor negatively regulates *aroH* expression in *E. coli*." *J. Bacteriol.* **173**: 3930-2.
- Notredame, C., Higgins, D. G., Heringa, J. (2000). "T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment." *J. Mol. Biol.* **302**(1): 205-17.
- Ogino, T., Garner, C., Merkley, J. L., Herrmann, K. M. (1982). "Biosynthesis of aromatic compounds: <sup>13</sup>C NMR spectroscopy of whole *Escherichia coli* cells." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 5828-32.
- Olmea, O., Straus, C. E., Ortiz, A. R. (2002). "MAMMOTH (matching molecular models obtained from theory): an automated method for model comparison." *Prot. Sci.* **11**: 2606-21.
- Otwinowski, Z., Minor, W. (1997). "Processing of X-Ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode." *Meth. Enzymol.* **276**: 407-26.
- Padyana, A. K., Burley, S. (2003). "Crystal Structure of Shikimate 5-Dehydrogenase (SDH) Bound to NADP: Insights into Function and Evolution." *Structure* **11**: 1005-13.
- Parke, D., Ornston, L. (2003). "Hydroxycinnamate (*hca*) catabolic genes from *Acinetobacter* sp. strain ADP1 are repressed by *HcaR* and are induced by hydroxycinnamoyl-coenzyme A thioesters." *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 5398-409.
- Perrakis, A., Harkiolaki, M., Wilson, K. S., Lamzin, V. S. (2001). "ARP/wARP and molecular replacement." *Acta Cryst. D* **57**(10): 1445-50.
- Persson, B., Krook, M., Jörnvall, H. (1991). "Characteristics of short-chain alcohol dehydrogenases and related enzymes." *Eur. J. Biochem.* **200**: 537-43.
- Pittard, J., Wallace B. (1966). "Distribution and function of genes concerned with aromatic biosynthesis in *Escherichia coli*." *J. Bacteriol.* **91**(4): 1494-508.
- Popov, A. N., Bourenkov, G. (2003). "Choice of data-collection parameters based on statistic modelling." *Acta Cryst D* **59**: 1145-53.
- Quiagen (2002). The QIAexpressionist A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins, Qiagen, Hilden.
- Ramaswamy, S., Eklund, H., Plapp, B. V. (1994). "Structures of horse liver alcohol dehydrogenase complexed with NAD<sup>+</sup> and substituted benzyl alcohols." *Biochemistry* **33**(17): 5230-7.
- 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**: 1894-901.
- Reinscheid, D. J., Eikmanns, B.J., Sahm, H. (1991). "Characterization of the isocitrate lyase gene from *Corynebacterium glutamicum* and biochemical analysis of the enzyme." *J. Bacteriol.* **173**(12): 3228-30.
- 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**: 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**: 801-5.
- Römpp (1997). *Römpp Lexikon - Naturstoffe*. Thieme-Verlag, Stuttgart.
- Sahm, H., Eggeling, L., de Graaf, A. A. (2000). "Pathway analysis and metabolic engineering in *Corynebacterium glutamicum*." *Biol. Chem.* **381**(9-10): 899-910.

## 5 Literatur

---

- Salamon II, Davis, B. D. (1953). "Aromatic Biosynthesis. IX: The Isolation of a Precursor of Shikimic Acid." *J. Am. Chem. Soc.* **75**: 5567-71.
- Schlegel, H. (1992). *Allgemeine Mikrobiologie*, Thieme Verlag, Stuttgart.
- Schlieben, N. H., Niefind, K., Muller, J., Riebel, B., Hummel, W., Schomburg, D. (2005). "Atomic resolution structures of R-specific alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus brevis* provide the structural bases of its substrate and cosubstrate specificity." *J. Mol. Biol.* **349**(4): 801-13.
- Schomburg, D., Reichelt, J. (1988). "A Comprehensive Protein Modeling Program System." *J. Mol. Graphics* **234**: 779-815.
- Schomburg, I., Chang, A., Hofmann, O., Ebeling, C., Ehrentreich, F., Schomburg, D. (2002). "BRENDA: a resource for enzyme data and metabolic information." *Trends Biochem. Sci.* **27**(1): 54-6.
- Schuettelkopf, A. W., Aalten, D. M. F. (2004). "PRODRG - a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes." *Acta Cryst D* **60**: 1355-63.
- 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): 17101-8.
- Sippl, M. J. (1993). "Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins." *Proteins* **17**(4): 355-62.
- Smith, E. A., Oehme, F. (1992). "The biological activity of glyphosate to plants and animals: a literature review." *Vet. Hum. Toxicol.* **34**(6): 531-43.
- Smith, M. A., Weaver, V. B., Young, D. M., Ornston, L. N. (2003). "Genes for chlorogenate and hydroxycinnamate catabolism (hca) are linked to functionally related genes in the dca-pca-qui-pob-hca chromosomal cluster of *Acinetobacter sp.* strain ADP1." *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 524-32.
- Srinivasan, P. R., Shigeura, H., Sprecher, M., Sprinson, D. B., Davis, B. D. (1956). "The biosynthesis of shikimic acid from D-glucose." *J. Biol. Chem.* **220**(1): 477-97.
- Srivastava, P., Deb, J. K. (2004). "Gene expression systems in corynebacteria." *Prot. Exp. Purif.* **40**: 221-9.
- Stryer, L. (1995). *Biochemistry*. Freeman, New York, USA.
- Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J., Dubendorff, J. W. (1990). "Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes." *Meth. Enzymol.* **185**: 60-89.
- Trautwein, G., Gerischer, U. (2001). "Effects exerted by transcriptional regulator PcaU from *Acinetobacter sp.* strain ADP1." *J. Bacteriol.* **183**: 873-81.
- van Kleef, M. A., Duine, J. A. (1988). "Bacterial NAD(P)-independent quinate dehydrogenase is a quinoprotein." *Arch. Microbiol.* **150**(1): 32-6.
- Vinella, D., Gagny, B., Joseleau-Petit, D., D'Ari, R., Cashel, M. (1996). "Mecillinam resistance in *Escherichia coli* is conferred by loss of a second activity of the aroK protein." *J. Bacteriol.* **178**: 3818-28.
- Whipp, M. J., Pittard, A. (1995). "A reassessment of the relationship between aroK- and aroL-encoded shikimate kinase enzymes of *Escherichia coli*." *J. Bacteriol.* **177**: 1627-9.
- White, P. J., Mousedale, D., Coggins, J. R. (1987). "A simple anaerobic assay for chorismate synthase." *Biochem. Soc. Trans.* **15**: 144.
- White, P. J., Young, J., Hunter, I. S., Nimmo, H. G., Coggins, J. R. (1990). "The purification and characterization of 3-dehydroquinase from *Streptomyces coelicolor*." *Biochem. J.* **265**: 735-8.
- Wilson, D. K., Bohren, K. M., Gabbay, K. H., Quiocho, F. A. (1992). "An unlikely sugar substrate site in the 1.65 Å structure of the human aldose reductase holoenzyme implicated in diabetic complications." *Science* **257**: 81-4.
- Yaniv, H., Gilvarg, C. (1954). "Aromatic Biosynthesis XIV. 5-Dehydroshikimic Reductase." *J. Biol. Chem.* **213**(2): 787-95.

## 5 Literatur

---

- Ye, S., 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): 4144-51.
- Zurawski, G., Gunsalus, R., Brown, K. D., Yanowsky, C. (1981). "Structure and regulation of *aroH*, the structural gene for the tryptophan-repressible 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase of *Escherichia coli*." *J. Mol. Biol.* **145**: 47-73.

### **Kurzzusammenfassung**

Enzymkinetische Experimente haben gezeigt, dass sich die Genprodukte der drei vermeintlichen Shikimat-Dehydrogenase-kodierenden offenen Leseraster in *C. glutamicum* erheblich voneinander unterscheiden. Zwei der Genprodukte ähneln den in der Literatur bereits beschriebenen Enzymen AroE und SDH-L. Das dritte Genprodukt ist eine NAD-abhängige Quinat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.24) mit gleichzeitiger Affinität zu Shikimat. Mittels Analyse der Primär- und Tertiärstrukturen der nunmehr vier Subtypen Shikimat/Quinat-Dehydrogenase-Familie aus Prokaryoten und Archeen ließen sich die Unterschiede zu den anderen Mitgliedern dieser Familie herausstellen, so dass es nun möglich ist, die verschiedenen Enzyme durch bioinformatische Annotation voneinander zu unterscheiden. Modellierungsstudien unterstützen den Substratbindungsmodus, der in der Literatur als Modell A bezeichnet wird.

### Abstract

In *Corynebacterium glutamicum*, three open reading frames (ORFs) are predicted by bioinformatical means to encode shikimate dehydrogenases (SDH, E.C. 1.1.1.25). These ORFs were cloned, overexpressed, purified and characterized with enzymatic assays. One of them is very similar to the classical shikimate dehydrogenase AroE (EC 1.1.1.25). The second one is comparable with the so-called SDH-L (EC 1.1.1.25), which has also been described in *Haemophilus influenzae*. The third one is an NAD dependent quinate dehydrogenase (EC 1.1.1.24) with concurrent affinity to shikimate. This kind of catabolic enzyme has only been described in some eukaryota, before. Hence, it can be excluded that these three proteins are isoenzymes.

Analysis of the tertiary structure via homology modelling (AroE and SDH-L) and X-ray crystallography (quinat dehydrogenase) lead to the assumption that the width of the active site are responsible for the substrate specificity as well as a special residue in the region of the active site.

Together with the identification of the conserved residues being responsible for cosubstrate recognition, the characteristic amino acids for any member of the shikimate/quinat dehydrogenase could be identified. Therefore, it is now possible to distinguish between these enzymes with multiple sequence alignments.

Modelling trials with shikimate as well as quinate support the “model A” for substrate binding which can be found in literature. It is very likely that the highly conserved lysine in the active site plays the decisive key role in the catalytic mechanism by transferring a proton.

## Vorabveröffentlichungen

### Artikel

- S. Chatterjee, J. Schoepe, S. Lohmer, D. Schomburg (2005): High level expression and single-step purification of hexahistidine-tagged L-2-hydroxyisocaproate dehydrogenase making use of a versatile expression vector set. *Prot. Expr. Purif.* 39 (2), 137-43.
- J. Schoepe, K. Niefind, S. Chatterjee, D. Schomburg: Cloning, expression, purification and preliminary crystallographic characterization of a shikimate dehydrogenase from *Corynebacterium glutamicum*, akzeptiert von *Acta Cryst.*
- J. Schoepe, K. Niefind, D. Wetzler, D. Schomburg: 1.6 Å Crystal Structure of a novel NAD-dependent Quinate Dehydrogenase from *Corynebacterium glutamicum*, in Vorbereitung.
- S. Buchinger, J. Schoepe, S. Choorapoikayil, D. Schomburg: Metabolic Observations of the two Shikimate Dehydrogenases from *Corynebacterium glutamicum*, in Vorbereitung

### Vortrag

- J. Schoepe: Enzyme multiplicity of the shikimate dehydrogenases in *C. glutamicum* CUBIC-Retreat 2004.

### Posterbeiträge

- J. Schoepe, S. Chatterjee, D. Schomburg: From DNA sequence to protein structure. CUBIC-Evaluierung 2003, Köln.
- J. Schoepe, S. Chatterjee, K. Niefind, D. Schomburg: The three Shikimate Dehydrogenases from *Corynebacterium glutamicum*. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kristallographie (DGK) in Köln, 2005

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1.1:</b> REM-Aufnahme des Bakteriums <i>C. glutamicum</i> (KFZ Jülich) .....	1
<b>Abb. 1.2:</b> Der anabole Shikimatweg im engeren Sinne und der teilweise überlappende katabole Quinatweg .....	6
<b>Abb. 1.3:</b> Idealisieretes Schema zur Rückkopplungshemmung des doppelt verzweigten Rumpfes des Shikimatweges in <i>C. glutamicum</i> .....	10
<b>Abb. 1.4:</b> Die Metabolite der S/QDH.....	15
<b>Abb. 1.5:</b> Der Nikotinsäureamidring des NAD(P)s.....	17
<b>Abb. 1.6:</b> Topologievergleiche.....	23
<b>Abb. 1.7:</b> Bindung von NADP an die AroE von <i>E. coli</i> .....	25
<b>Abb. 1.8:</b> Vermutete Bindungsmodi von Dehydroshikimat in der AroE und von Shikimat in YdiB jeweils in <i>E. coli</i> .....	26
<b>Abb. 3.1:</b> Agarose-Gel der drei PCR-Produkte .....	57
<b>Abb. 3.2:</b> Analytisches Agarose-Gel der drei Expressionsvektoren.....	58
<b>Abb. 3.3:</b> Primärstrukturen der drei S/QDH.....	58
<b>Abb. 3.4:</b> SDS-PAGE der drei S/QDH nach der Ni-Affinitätschromatographie .....	59
<b>Abb. 3.5:</b> ESI-MS: Monomere der QDH und der <i>Cgl</i> SDH-L nach Spaltung mit der rTEV-Protease .....	61
<b>Abb. 3.6:</b> pH-Optimumskurve der <i>Cgl</i> QDH .....	67
<b>Abb. 3.7:</b> Kristalle der <i>Cgl</i> QDH .....	70
<b>Abb. 3.8:</b> Kristalline Strukturen der <i>Cgl</i> SDH-L.....	72
<b>Abb. 3.9:</b> Eine typische Diffraktionsaufnahme der <i>Cgl</i> QDH.....	73
<b>Abb. 3.10:</b> Eine Diffraktionsaufnahme der <i>Cgl</i> SDH-L.....	75
<b>Abb. 3.11:</b> 2F <sub>0</sub> F <sub>c</sub> -Elektronendichten im Bereich des aktiven Zentrums.....	80
<b>Abb. 3.12:</b> Ramachandran-Plots der drei S/QDH-Strukturmodelle .....	81
<b>Abb. 3.13:</b> ERRATv2-Plots der drei S/QDH-Strukturmodelle .....	82
<b>Abb. 3.14:</b> Übersicht über die Sekundärstrukturen der drei S/QDH-Modelle .....	85
<b>Abb. 3.15:</b> Die Quartärstruktur der <i>Cgl</i> QDH .....	87
<b>Abb. 3.16:</b> Abhängigkeit der Konservierung der C <sub>α</sub> -Atome von der Sequenzidentität bei den S/QDH .....	89
<b>Abb. 3.17:</b> Tertiärstruktur der <i>Cgl</i> QDH mit modelliertem NAD .....	90
<b>Abb. 3.18:</b> Konservierung von Seitenketten des aktiven Zentrums der S/QDH .....	91
<b>Abb. 3.19:</b> Potentielle Bindungsmodi von Quinat und Shikimat bei der <i>Cgl</i> QDH.....	92

<b>Abb. 3.20:</b> Vermutete Ursachen für die verschiedenen Substratspezifitäten der <i>Cgl</i> QDH und der AroE aus <i>E. coli</i> .....	94
<b>Abb. 3.21:</b> Multiples strukturelles Alignment der S/QDH.....	97
<b>Abb. 3.22:</b> Unverwurzelter phylogenetischer Baum mit Mitgliedern der S/QDH-Familie	99

## Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 1.1:</b> Kinetische Parameter bakterieller S/QDH .....	20
<b>Tab. 1.2:</b> Lage der drei S/QDH-Gene im Genom von <i>C. glutamicum</i> .....	21
<b>Tab. 2.1:</b> Verwendete Geräte .....	33
<b>Tab. 2.2:</b> Sonstige Materialien .....	34
<b>Tab. 2.3:</b> Computerprogramme .....	35
<b>Tab. 2.4:</b> Messparameter für den Datensatz der <i>Cgl</i> QDH .....	50
<b>Tab. 3.1:</b> Kinetische Parameter der drei S/QDH aus <i>C. glutamicum</i> .....	63
<b>Tab. 3.2:</b> Substratspezifitäten der drei S/QDH aus <i>C. glutamicum</i> .....	64
<b>Tab. 3.3:</b> Cosubstratspezifitäten der drei S/QDH aus <i>C. glutamicum</i> .....	65
<b>Tab. 3.4:</b> pH-Optima der drei S/QDH aus <i>C. glutamicum</i> .....	66
<b>Tab. 3.5:</b> Molekulargewichte der drei S/QDH aus <i>C. glutamicum</i> .....	68
<b>Tab. 3.6:</b> Statistik zu den einzelnen Auflösungsschalen des nativen Datensatzes der <i>Cgl</i> QDH .....	73
<b>Tab. 3.7:</b> Die besten fünf Ergebnisse der Kreuzrotationssuche des Datensatzes der <i>Cgl</i> QDH mit dem Suchmodell 1NVT. ....	75
<b>Tab. 3.8:</b> Die ersten fünf Ergebnisse der Translationssuche .....	76
<b>Tab. 3.9:</b> Statistische Parameter der verfeinerten <i>Cgl</i> QDH-Struktur .....	77
<b>Tab. 3.10:</b> Fehlende Residuen der drei S/QDH-Strukturmodelle .....	85
<b>Tab. 3.11:</b> Vergleich der Primär- und Tertiärstrukturen verschiedener S/QDH .....	88

### **Erklärung**

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig 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 Fall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass sie – abgesehen von oben angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Dietmar Schomburg betreut worden.

---

Jan Schoepe