

# **Untersuchung der molekularen Determinanten für Fructose-6- phosphat-Aldolasen und Transaldolasen**

Von der Fakultät für Energie-, Verfahrens- und Biotechnik  
der Universität Stuttgart zur Erlangung der Würde eines Doktors der  
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigte Abhandlung

Vorgelegt von

Lena Stellmacher

aus Bruchsal

Hauptberichter:	Prof. Dr. Georg Sprenger
Mitberichter:	Apl. Prof. Dr. Jürgen Pleiss
Tag der mündlichen Prüfung:	28.04.2021

Institut für Mikrobiologie der Universität Stuttgart, 2021



„Unsere größte Schwäche liegt im Aufgeben. Der sicherste Weg zum Erfolg ist immer, es noch einmal zu versuchen“ (Thomas Alva Edison).



# 1 Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>2</b>	<b>Abstract</b> .....	<b>V</b>
<b>3</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>X</b>
<b>4</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>XIV</b>
<b>5</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
5.1	Enzymatische Biokatalyse und Carboligasen .....	1
5.2	Transferasen.....	3
5.2.1	Transaldolasen .....	3
5.2.2	Transaldolase B aus <i>E. coli</i> .....	5
5.2.3	Weitere Transaldolasen.....	10
5.2.4	Sequenzdatenbank und phylogenetische Einteilung .....	12
5.3	Lyasen .....	14
5.3.1	Aldolasen.....	14
5.3.2	Fructose-6-phosphat-Aldolase aus <i>E. coli</i> .....	16
5.3.3	Weitere Fructose-6-phosphat-Aldolasen .....	22
5.4	Strukturbiologie .....	23
5.4.1	Kristallstrukturen Transaldolase .....	23
5.4.2	Kristallstrukturen Aldolase .....	28
5.5	Gegenüberstellung von Transaldolase und Fructose-6-phosphat-Aldolase... ..	30
5.5.1	Gemeinsamkeiten der TalB und der FSAA.....	30
5.5.2	Unterschiede zwischen der TalB und der FSAA.....	35
5.6	Strukturelle Analoga.....	37
<b>6</b>	<b>Fragestellung und Zielsetzung der vorliegenden Arbeit</b> .....	<b>41</b>
<b>7</b>	<b>Materialien und Methoden</b> .....	<b>43</b>
7.1	Chemikalien, Enzyme und Materialien .....	43
7.2	Geräte und Programme .....	44
7.3	Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide .....	46
7.4	Molekulargenetische und mikrobiologische Methoden.....	50
7.4.1	Kultivierung der Bakterien.....	50

7.4.2	Isolierung, Restriktion und Agarosegelelektrophorese .....	51
7.4.3	Zielgerichtete Mutagenese mittels PCR.....	51
7.4.4	Sequenzierung von DNA .....	54
7.4.5	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen .....	54
7.4.6	Transformation von <i>E. coli</i> Zellen .....	55
7.5	Proteinbiochemische Methoden.....	55
7.5.1	Anzucht von Bakterien zur Isolierung von Proteinen .....	55
7.5.2	Zellaufschluss und Herstellung von zellfreien Rohextrakten.....	56
7.5.3	Reinigung rekombinanter Proteine .....	57
7.5.4	SDS-PAGE, Umpufferung und Konzentrierung von Proteinen .....	61
7.5.5	Konzentrationsbestimmung von Protein nach Bradford.....	63
7.5.6	Photometrische Bestimmungen in Küvetten .....	64
7.5.7	Photometrische Bestimmungen in Mikrotiterplatten.....	67
7.6	pK <sub>a</sub> - und pH-Bestimmungen.....	70
7.6.1	pH-Optima .....	70
7.6.2	pK <sub>a</sub> -Bestimmungen mittels PROPKA.....	71
7.6.3	pK <sub>a</sub> -Bestimmungen des aktiven Lysinrestes.....	71
7.7	Präparative Synthesen.....	72
7.7.1	D-Sedoheptulose-7-phosphat.....	72
7.7.2	D-Tagatose-6-phosphat.....	73
7.8	Inhibition.....	74
7.8.1	Inhibitionskinetiken Tagatose-6-phosphat .....	74
7.8.2	Massenspektrometrie (LC-ESI-MS).....	76
7.8.3	Inhibitionskinetiken D-Glycerinaldehyd.....	77
7.9	Kristallisationen.....	77
7.9.1	Enzym-Substrat-Komplex .....	77
7.9.2	Screening .....	79
7.9.3	Optimierung der Kristallisationsbedingungen .....	80
7.9.4	Datenerfassung, Datenprozessierung und Modellierung.....	82
7.10	DLS- und CD-Spektroskopie-Analysen .....	82
7.10.1	Untersuchung der Oligomerisierung .....	82
7.10.2	Thermostabilität und Faltungszustand.....	83
<b>8</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>85</b>
8.1	Mutagenese von TalB/FSAA und Aufreinigung der Varianten .....	85

## Inhaltsverzeichnis

8.2	Biochemische Charakterisierung der Muteine.....	89
8.2.1	Aldolase- und Transaldolaseaktivitäten .....	89
8.2.2	Kinetiken im Fließgleichgewicht.....	90
8.2.3	pH-Profile und Puffersysteme.....	93
8.2.4	pK <sub>a</sub> -Wert wichtiger katalytischer Reste.....	98
8.2.5	pK <sub>a</sub> -Wert des katalytisch aktiven Lysinrestes .....	98
8.2.6	Quartärstruktur und Oligomerisierungszustand .....	101
8.2.7	Thermostabilität .....	103
8.3	Mögliche Transaldolaseaktivität im Aldolasegrundgerüst.....	105
8.3.1	Auffinden neuer Mutagenesestellen .....	105
8.3.2	Aktivitätsuntersuchungen der FSAA Varianten der zweiten Stufe .....	109
8.4	Inhibitorkinetiken .....	115
8.4.1	Inhibitor Tagatose-6-phosphat.....	115
8.4.2	MS Analyse .....	119
8.4.3	Inhibition D-GA in Kombination mit DHA .....	120
8.5	Röntgenkristallstrukturanalyse .....	123
8.5.1	Reduktion des Enzym-Substrat-Komplexes .....	123
8.5.2	Kristallisation .....	125
8.5.3	Ergebnisse der Kristallstrukturen.....	130
<b>9</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>139</b>
9.1	Determinanten von Aldolase und Transaldolase.....	139
9.1.1	Verbesserung der Aldolaseeigenschaften im TalB-Grundgerüst.....	139
9.1.2	pH-Abhängigkeiten und Protonierungszustand des aktiven Lysins .....	144
9.1.3	Thermische Stabilität .....	150
9.1.4	Kristallstrukturen und 3D-Aufbau.....	150
9.1.5	Wasserstoffbrückennetzwerk des aktiven Wassermoleküls .....	152
9.1.6	D-F6P als Schiff'sche Base und ihre mechanistische Implikation.....	154
9.1.7	Protonendonator und Funktion als generelle Base.....	155
9.1.8	Postulierter Mechanismus .....	158
9.2	Versuch der Einführung einer Transaldolaseaktivität im Aldolasegrundgerüst .....	164
9.2.1	Auswahl der Mutagenesestellen und Enzympräparationen.....	164
9.2.2	Einführung einer Transaldolaseaktivität?.....	165
9.3	Tagatose-6-phosphat – Furanringbildung am aktiven Lysinrest.....	171

9.3.1	Zeitabhängige irreversible Inhibition .....	171
9.3.2	Inhibitor- und Substratkomplexe .....	172
9.3.3	Inhibitionsmechanismus – Furanringbildung über Heyns-Umlagerung	178
<b>10</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>181</b>
<b>11</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>193</b>
11.1	Abbildungsverzeichnis .....	193
11.2	Tabellenverzeichnis .....	194
<b>12</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>197</b>



## 2 Abstract

Enzymes that form carbon-carbon bonds (C-C bonds) are in demand for biocatalytic applications. New insights into the active centres and the reaction mechanisms could open up new application possibilities. The closely related model enzymes transaldolase B (TalB) and fructose-6-phosphate aldolase A (FSAA) of *Escherichia coli* are C-C-bond forming enzymes. They belong to the different enzyme classes of transferases and lyases. TalB catalyses the transfer of a glyceryl unit from the donor D-fructose-6-phosphate (D-F6P) to the acceptor D-erythrose-4-phosphate to form D-sedoheptulose-7-phosphate (D-S7P) and D-glyceraldehyde-3-phosphate (D-GAP). FSAA is named after the addition reaction of D-GAP with dihydroxyacetone (DHA, corresponding to a glyceryl unit) to D-F6P. The newly formed C-C bonds have a 3*S*,4*R* configuration. The reaction mechanisms each take place involving a highly conserved Lys. In both enzymes a Schiff base intermediate with D-F6P is formed. The two enzymes are very similar in the topology of the active site, though the exchange of one amino acid leads to aldolase activity in TalB<sup>F178Y</sup> [1].

The molecular determinants for the different reaction types were unknown until the beginning of this work. In FSAA, the catalytic water molecule is bound in the active site by hydrogen bonds connected to the side chains of three residues (Gln59, Thr109 and Tyr131 [2]), whereas in TalB only two side chains (Glu96 and Thr156 [3]) are involved. It is not the hydrogen bonding network of the active water molecule that discriminates between FSAA and TalB: The differences in pK<sub>a</sub> of the catalytic Lys and the general acid-base catalyst, as well as the substrate binding are the basis for the differentiation between lyase and transferase. The general acid-base catalyst Tyr in combination with the stereochemistry at the C4 atom of D-T6P results in the inhibition of enzymes with F6P aldolase activity. This is described here in mechanism postulates for TalB, FSAA and inhibition.

By using site directed mutagenesis, the hydrogen bonding network of the catalytic water of the model enzymes was exchanged. The muteins were expressed and concentrated. The double variant TalB<sup>E96Q F178Y</sup> showed improved aldolase activity with a catalytic constant (k<sub>cat</sub>) of 4.3 s<sup>-1</sup>. In addition, the wild-type transaldolase activity was reduced from 12 % to 5 % compared to the variant TalB<sup>F178Y</sup> [Stellmacher et al., 2015, henceforth quoted as source [4]]. The activities were investigated by an enzyme coupled assay on the formation of NADPH. In none of the aldolase variants with modified hydrogen bond network transaldolase activity was

detected using the substrates D-S7P and GAP. In addition, no F6P aldolase activity based on D-GAP and DHA could be detected in the FSAA variants without Tyr. When comparing the activities at different pH values, no significant difference in the pH profiles of the wild types (WT) and variants was found [4].

Folding, oligomerisation and the correct structure of the active centre are crucial for catalytic activity. This was verified for the variants by CD/DLS spectroscopy and crystallisation. The structures of the mutants TalB<sup>E96Q</sup> (1.80 Å), TalB<sup>E96Q F178Y</sup> (1.80 Å), FSAA<sup>Q59E</sup> (2.41 Å), FSAA<sup>Y131F</sup> (2.40 Å) and FSAA<sup>Q59E Y131F</sup> (1.75 Å) were successfully solved [4]. All variants showed a high similarity to WT except for the amino acid exchange. Thus, there are no deviations in the 3D structure that could influence the activities [4].

Deprotonation to form a Schiff base intermediate is catalysed in TalB by the general acid-base catalyst Glu96, mediated by the active water molecule [3,5,6]. The mutagenesis studies and structural analyses performed here showed that Tyr131 is the central residue of the F6P aldolase mechanism in the FSAA and can act directly [4]. The pK<sub>a</sub> value of Tyr was influenced by the Arg134 at a distance of 3.5 Å, thus enabling its functionality as a proton donor [4]. The FSAA with Tyr131 was assigned to the group of "opposite faced" and TalB with Glu96 to the group of "co-aligned" acid-base catalysts [4].

Acetylacetone (AA) forms a stable complex with the neutral Lys [7–9]. After preincubation of TalB and FSAA with AA, the residual activity of TalB and FSAA was determined for the first time at different pH values, from which the pK<sub>a</sub> value of the catalytic Lys could be determined in secondary plot. The modification was confirmed by the crystal structure of the enzyme-inhibitor complex of FSAA with AA [4]. In the FSAA the catalytic Lys was deprotonated under assay conditions (pK<sub>a</sub> 5.5), while Lys132 was protonated in TalB (pK<sub>a</sub> 9.3) [4]. In TalB the positive charge can be stabilised by the negative charge of Glu96. Therefore a deprotonation of the catalytic Lys in TalB is necessary. In contrast, Lys85 is already neutral in the FSAA, which is supported by the hydrophobic environment caused by Phe57 and Leu107 [4].

Using CD spectroscopy, the exact denaturation temperatures were determined, which are 76.2 °C for FSAA and 51.0 °C for TalB [4]. The TalB variants showed a similar temperature profile. FSAA<sup>Q59E</sup> was only thermally stable up to 64.6 °C and FSAA<sup>Q59E Y131F</sup> up to 57.7 °C [4]. The introduction of the polar residue Glu at the Gln59 site resulted in destabilizing interactions between the hydrophobic

## Abstract

environment (Pro29 and Pro87 within the subunit and Phe207 of the neighbouring unit) and the newly introduced residue. As a result, the C-terminal anchor used to form the dense 3D packing showed small differences in the positioning of the pentameric interface [4].

The exchange to the proton donor Glu of the transaldolases in the FSAA did not lead to transaldolase activity. As a second step, further FSAA variants based on structural biology and bioinformatics were created, expressed and concentrated. The specific transaldolase activity was measured indirectly via the formation of NADPH in the coupled assay, starting from the two substrates D-S7P and GAP. The variant FSAA<sup>Q59E A129S Y131F</sup> showed a specific transaldolase activity of  $0.08 \pm 0.02$  U/mg and FSAA<sup>Q59E Y131F N133G</sup> of  $0.07 \pm 0.02$  U/mg. The controls included FSAA<sup>wt</sup> and the denatured WT, which showed no activity. Thus, the influence on substrate binding (Ser129 - hydrogen bond to C1-OH and optimisation of the phosphate binding site by Gly133) in addition to the acid-base catalyst would be crucial for the transfer of the glyceryl unit during the transaldolase mechanism. However, further investigation is necessary to prove transaldolase activity in the variants.

Using kinetic inhibition and mass spectrometry studies, it has been shown that enzymes with F6P aldolase activity are covalently and irreversibly inhibited by T6P. The inhibition decreased as follows: TalB<sup>E96Q F178Y</sup> > TalB<sup>F178Y</sup> > FSAA<sup>wt</sup> > FSAA<sup>A129S</sup>. No influence on TalB<sup>wt</sup> was observed [Stellmacher et al., 2016, henceforth quoted as source [10]]. The remaining activity with up to a 10-fold excess of D-T6P over time was detected in the coupled enzyme assay. FSAA<sup>A129S</sup> shows a half-life of inhibition at 10-fold excess of 22 h 39 min compared to FSAA<sup>wt</sup> with 14 h 25 min [10]. The reason for this was the stabilising effect on the enamine due to the hydrogen bond of the Ser in FSAA<sup>A129S</sup> to the hydroxyl group of C1-OH.

The crystal structure of the variant TalB<sup>F178Y</sup> with bound sugar phosphate was solved (1.46 Å) and showed a new type of covalent inhibition [10]. The sugar was covalently bound to the ε-NH2 group of Lys132 via its C2 atom. It was neither bound in the open chain form nor as a closed ring form of T6P, but was converted into D-galactofuranose-6-phosphate (a five-membered ring structure). Based on the furanose ring of the covalent adduct, it was postulated that the adduct is formed by a Heyns rearrangement and subsequent hemiacetal formation [10]. For comparison, the structure of Schiff's base intermediate in TalB<sup>E96Q</sup> was solved with D-F6P (2.20 Å) [10]. The difference in the stereochemistry at the C4 atom and the presence of Tyr

are essential determinants for the formation of the inhibitor adduct [10]. For the first time a ring structure was observed in the active site of a transaldolase. It remains open whether a ring opening of the sugar phosphates takes place in the model enzymes [10].

In addition, the structure of the Schiff's base intermediate proved that Asp17 forms hydrogen bonds to C3-OH and C5-OH [10]. A participation of Asp17 in C-C bond cleavage, as previously assumed [3,5,6], was excluded based on the hydrogen bonds [10]. The correct orientation of Asp to the substrate bond was ensured by the nearby localised Thr33 in TalB and Thr26 in FSAA. A conformational change due to substrate binding was not detected in TalB<sup>E96Q</sup> with bound F6P. Furthermore, no distortion of the planar Schiff's base intermediate was detected. From the carbinolamine model of FSAA, it became clear that Thr109 is in hydrogen bond distance (2.7 Å) to C2-OH. Thus, Thr109 in FSAA and Thr156 in TalB may be involved in the correct substrate positioning and stabilisation of the alkoxide.

- 1 Schneider S, Sandalova T, Schneider G, Sprenger GA & Samland AK (2008) Replacement of a phenylalanine by a tyrosine in the active site confers fructose-6-phosphate aldolase activity to the transaldolase of Escherichia coli and human origin. *J. Biol. Chem.* **283**, 30064–30072.
- 2 Thorell S, Schürmann M, Sprenger GA & Schneider G (2002) Crystal structure of decameric fructose-6-phosphate aldolase from Escherichia coli reveals inter-subunit helix swapping as a structural basis for assembly differences in the transaldolase family. *J. Mol. Biol.* **319**, 161–171.
- 3 Jia J, Huang W, Schörken U, Sahm H, Sprenger GA, Lindqvist Y & Schneider G (1996) Crystal structure of transaldolase B from Escherichia coli suggests a circular permutation of the alpha/beta barrel within the class I aldolase family. *Structure* **4**, 715–724.
- 4 Stellmacher L, Sandalova T, Leptihn S, Schneider G, Sprenger GA & Samland AK (2015) Acid-Base Catalyst Discriminates between a Fructose 6-Phosphate Aldolase and a Transaldolase. *ChemCatChem* **7**, 3140–3151.
- 5 Jia J, Schörken U, Lindqvist Y, Sprenger GA & Schneider G (1997) Crystal structure of the reduced Schiff-base intermediate complex of transaldolase B from Escherichia coli: mechanistic implications for class I aldolases. *Protein Sci.* **6**, 119–124.
- 6 Schörken U, Thorell S, Schürmann M, Jia J, Sprenger GA & Schneider G (2001) Identification of catalytically important residues in the active site of Escherichia coli transaldolase. *Eur. J. Biochem.* **268**, 2408–2415.
- 7 Hoffmann T, Zhong G, List B, Shabat D, Anderson J, Gramatikova S, Lerner RA & Barbas CF (1998) Aldolase antibodies of remarkable scope. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 2768–2779.
- 8 Barbas C, Lerner A, Zhong G & List B (2001) U.S. Patent - Aldol condensations by catalytic antibodies. , Application No. US 6,326,176 B1.
- 9 Wagner J, Lerner RA & Barbas CF (1995) Efficient aldolase catalytic antibodies that use the enamine mechanism of natural enzymes. *Science* **270**, 1797–1800.
- 10 Stellmacher L, Sandalova T, Schneider S, Schneider G, Sprenger GA & Samland

## Abstract

AK (2016) Novel mode of inhibition by D-tagatose-6-phosphate through a Heyns rearrangement in the active site of transaldolase B variants. *Acta Crystallogr. D72*, 467–476.

### 3 Zusammenfassung

Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen (C-C-Bindungen) knüpfende Enzyme sind begehrt für biokatalytische Applikationen. Neue Erkenntnisse in Bezug auf die aktiven Zentren und die Reaktionsmechanismen sollen die Findung neuer Anwendungsmöglichkeiten eröffnen. Die eng verwandten Modellenzyme Transaldolase B (TalB) und Fructose-6-phosphat-Aldolase A (FSAA) von *Escherichia coli* sind C-C-Bindung-knüpfende Enzyme. Sie gehören den unterschiedlichen Enzymklassen der Transferasen und der Lyasen an. TalB katalysiert die Übertragung einer Glyceryl-Einheit von dem Donor D-Fructose-6-phosphat (D-F6P) auf den Akzeptor D-Erythrose-4-phosphat wobei D-Sedoheptulose-7-phosphat (D-S7P) und D-Glycerinaldehyd-3-phosphat (D-GAP) entstehen. Für FSAA ist die Additionsreaktion von D-GAP mit Dihydroxyaceton (DHA, entspricht einer Glyceryl-Einheit) zu D-F6P namensgebend. Die neu geknüpften C-C-Bindungen haben dabei 3S,4R-Konfiguration. Die Reaktionsmechanismen verlaufen je über ein hoch konserviertes Lys. In beiden Enzymen entsteht dabei ein Schiff'sche Base Intermediat mit D-F6P. Die beiden Enzyme sind sich in der Topologie des Aktiven Zentrums sehr ähnlich, wobei der Austausch von einer Aminosäure zu Aldolaseaktivität in der TalB<sup>F178Y</sup> führt [1].

Die molekularen Determinanten für die unterschiedlichen Reaktionstypen waren bis zum Beginn dieser Arbeit unklar. In FSAA ist das katalytische Wassermolekül im Aktiven Zentrum durch Wasserstoffbrücken an die Seitenketten von drei Resten (Gln59, Thr109 und Tyr131 [2]) gebunden, während in TalB nur zwei Seitenketten (Glu96 und Thr156 [3]) beteiligt sind. Nicht das Wasserstoffbrückennetzwerk des aktiven Wassermoleküls diskriminiert zwischen FSAA und TalB: Die Unterschiede im pK<sub>a</sub>-Wert des katalytischen Lys und des generellen Säure-Base-Katalysators, sowie die Substratbindung sind die Basis zur Differenzierung zwischen Lyase und Transferase. Der generelle Säure-Base-Katalysator Tyr in Kombination mit der Stereochemie am C4-Atom von D-T6P resultieren in der Inhibition von Enzymen mit F6P-Aldolaseaktivität. Beschrieben ist dies hier vorliegend in den Mechanismuspostulaten für die TalB, die FSAA und der Inhibition.

Mittels zielgerichteter Mutagenese wurde das Wasserstoffbrücken-Netzwerk des katalytischen Wassers der Modellenzyme ausgetauscht. Die Muteine wurden exprimiert und aufkonzentriert. Die Doppelvariante TalB<sup>E96Q F178Y</sup> zeigte verbesserte Aldolaseaktivität mit einer Katalytischen Konstante ( $k_{\text{cat}}$ ) von  $4,3 \text{ s}^{-1}$ . Zudem wurde

## Zusammenfassung

die wildtypische Transaldolaseaktivität im Vergleich zur Variante TalB<sup>F178Y</sup> von 12 % auf 5 % reduziert [Stellmacher et al., 2015, fortan als Quelle [4] angegeben]. Die Aktivitäten wurden mittels enzymgekoppeltem Assay über die Bildung von NADPH untersucht. In keiner der Aldolasevarianten mit modifiziertem Wasserstoffbrücken-Netzwerk wurde ausgehend von den Substraten D-S7P und D-GAP eine Transaldolaseaktivität detektiert. In den FSAA-Varianten ohne Tyr ließ sich zudem auch keine F6P-Aldolaseaktivität ausgehend von D-GAP und DHA nachweisen. Bei dem Vergleich der Aktivitäten bei unterschiedlichem pH-Wert war kein wesentlicher Unterschied in den pH-Profilen der Wildtypen (WT) und Varianten zu erkennen [4].

Die Faltung, die Oligomerisierung und der korrekte Aufbau des Aktiven Zentrums sind entscheidend für die katalytische Aktivität. Dies wurde für die Varianten mittels CD/-DLS Spektroskopie und Kristallisation überprüft. Die Strukturen der Muteine TalB<sup>E96Q</sup> (1,80 Å), TalB<sup>E96Q F178Y</sup> (1,80 Å), FSAA<sup>Q59E</sup> (2,41 Å), FSAA<sup>Y131F</sup> (2,40 Å) und FSAA<sup>Q59E Y131F</sup> (1,75 Å) wurden erfolgreich gelöst [4]. Alle Varianten zeigten bis auf den Aminosäureaustausch eine große Ähnlichkeit zum WT. Somit liegen keine Abweichungen im 3D-Aufbau vor, welche die Aktivitäten beeinflussen könnten [4].

Die Deprotonierung zur Bildung eines Schiff'sche Base Intermediates wird in TalB vom generellen Säure-Basen-Katalysator Glu96, vermittelt über das aktive Wassermolekül, katalysiert [3,5,6]. Die hier durchgeführten Mutagenesestudien und Strukturanalysen zeigten, dass Tyr131 in der FSAA als zentraler Rest des F6P-Aldolasemechanismus steht und direkt fungieren kann [4]. Der pK<sub>a</sub>-Wert des Tyr wurde dafür durch das 3,5 Å entfernte Arg134 beeinflusst und so die Funktionalität als Protonendonator ermöglicht [4]. Die FSAA mit Tyr131 wurde der Gruppe der "opposite faced" und TalB mit Glu96 der Gruppe der "co-aligned" Säure-Base-Katalysatoren zugeordnet [4].

Acetylaceton (AA) bildet mit dem neutralen Lys einen stabilen Komplex [7–9]. Nach Präinkubation von TalB und FSAA mit AA wurde erstmals die Restaktivität von TalB und FSAA bei unterschiedlichen pH-Werten bestimmt, woraus sich in sekundärer Auftragung der pK<sub>a</sub>-Wert des katalytischen Lys bestimmen ließ. Die Modifikation wurde durch die Kristallstruktur des Enzym-Inhibitor-Komplexes von FSAA mit AA belegt [4]. In der FSAA war das katalytische Lys unter Assaybedingungen deprotoniert (pK<sub>a</sub> 5,5), während Lys132 in TalB protoniert vorlag (pK<sub>a</sub> 9,3) [4]. In der TalB kann die positive Ladung durch die negative Ladung des Glu96 stabilisiert werden. Daher ist eine Deprotonierung des katalytischen Lys in der TalB notwendig.

Im Gegensatz dazu liegt das Lys85 in der FSAA bereits neutral vor, was von der hydrophoben Umgebung durch Phe57 und Leu107 unterstützt wird [4].

Mittels CD-Spektroskopie wurden die genauen Denaturierungstemperaturen ermittelt, welche für FSAA bei 76,2 °C und für TalB bei 51,0 °C liegen [4]. Die TalB-Varianten zeigten ein ähnliches Temperaturprofil. FSAA<sup>Q59E</sup> war lediglich bis 64,6 C und FSAA<sup>Q59E Y131F</sup> bis 57,7 °C thermisch stabil [4]. Die Einführung des polaren Restes Glu an der Stelle Gln59 resultierte in destabilisierenden Interaktionen zwischen der hydrophoben Umgebung (Pro29 und Pro87 innerhalb der Untereinheit und Phe207 der Nachbareinheit) und dem neu eingeführten Rest. Dadurch wies der C-terminale Anker zur Ausbildung der dichten 3D-Packung geringe Unterschiede in der Positionierung der pentameren Grenzfläche auf [4].

Der Austausch zum Protonendonator Glu der Transaldolasen in der FSAA führte nicht zu einer Transaldolaseaktivität. Als zweite Stufe wurden weitere FSAA-Varianten auf Basis der Strukturbiologie und Bioinformatik erstellt, exprimiert und aufkonzentriert. Die spezifische Transaldolaseaktivität wurde indirekt über die Bildung von NADPH im gekoppelten Assay, ausgehend von den beiden Substraten D-S7P und D-GAP gemessen. Die Variante FSAA<sup>Q59E A129S Y131F</sup> zeigte eine spezifische Transaldolaseaktivität von  $0,08 \pm 0,02$  U/mg sowie die FSAA<sup>Q59E Y131F N133G</sup> von  $0,07 \pm 0,02$  U/mg. Als Kontrollen wurden u.a. der FSAA<sup>wt</sup> und der denaturierte WT mitgeführt, welche keine Aktivität zeigten. Somit wäre der Einfluss auf die Substratbindung (Ser129 - Wasserstoffbrücke zu C1-OH und Optimierung der Phosphatbindestelle durch Gly133) zusätzlich zum Säure-Base-Katalysator entscheidend für die Übertragung der Glyceryl-Einheit während des Transaldolasemechanismus. Weitere Untersuchungen zum Nachweis der Transaldolaseaktivität in den Varianten sind jedoch notwendig.

Unter Verwendung von Studien zur kinetischen Inhibition und Massenspektrometrie wurde gezeigt, dass Enzyme mit F6P-Aldolaseaktivität kovalent und irreversibel durch D-T6P gehemmt werden. Die Inhibition nahm folgendermaßen ab: TalB<sup>E96Q F178Y</sup> > TalB<sup>F178Y</sup> > FSAA<sup>wt</sup> > FSAA<sup>A129S</sup>. Ein Einfluss auf TalB<sup>wt</sup> wurde nicht beobachtet [Stellmacher et al., 2016, fortan als Quelle [10] angegeben]. Hierbei wurde die verbliebene Aktivität mit bis zu einem 10-fachen D-T6P-Überschuss über die Zeit im gekoppelten Enzymassay detektiert. FSAA<sup>A129S</sup> weist eine Halbwertszeit der Inhibition bei 10-fachem Überschuss von 22 h 39 min im Vergleich zu FSAA<sup>wt</sup> mit 14 h 25 min auf [10]. Ursächlich war der stabilisierende Effekt auf das Enamin durch



## Zusammenfassung

die Wasserstoffbrückenbindung des Ser in der FSAA<sup>A129S</sup> zur Hydroxylgruppe des C1-OH.

Die Kristallstruktur der Variante TalB<sup>F178Y</sup> mit gebundenem Zuckerphosphat wurde gelöst (1,46 Å) und zeigte eine neue Art der kovalenten Inhibition [10]. Der Zucker war über sein C2-Atom kovalent an die  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub>-Gruppe des Lys132 gebunden. Dabei war dieser weder in der offenen Kettenform noch als geschlossene Ringform von D-T6P gebunden, wurde aber in D-Galactofuranose-6-phosphat (eine fünfgliedrige Ringstruktur) umgewandelt. Basierend auf dem Furanosering des kovalenten Adduktes wurde postuliert, dass dieser über eine Heyns-Umlagerung und anschließende Hemiacetalbildung gebildet wird [10]. Zum Vergleich wurde die Struktur des Schiff'sche Base Intermediates in der TalB<sup>E96Q</sup> mit D-F6P gelöst (2,20 Å) [10]. Der Unterschied in der Stereochemie am C4-Atom und die Anwesenheit von Tyr sind essentielle Determinanten für die Bildung des Inhibitoradduktes [10]. Erstmals wurde eine Ringstruktur im Aktiven Zentrum einer Transaldolase beobachtet. Dies lässt offen, ob eine Ringöffnung der Zuckerphosphate in den Modellenzymen stattfindet [10].

Zudem belegte die Struktur des Schiff'sche Base Intermediates, dass Asp17 Wasserstoffbrücken zu C3-OH und C5-OH ausbildet [10]. Eine Beteiligung von Asp17 an der C-C-Bindungsspaltung, wie bisher angenommen [3,5,6], wurde basierend auf den Wasserstoffbrückenbindungen ausgeschlossen [10]. Die richtige Ausrichtung von Asp zur Substratbindung wurde durch das in der Nähe lokalisierte Thr33 in der TalB und Thr26 in der FSAA sichergestellt. Eine Konformationsänderung durch Substratbindung wurde in TalB<sup>E96Q</sup> mit gebundenem D-F6P nicht festgestellt. Zudem wurde keine Distorsion des planaren Schiff'sche Base Intermediates detektiert. Aus dem Carbinolaminmodell der FSAA wurde deutlich, dass Thr109 in Wasserstoffbrückenbindungsabstand (2,7 Å) zum C2-OH liegt. Somit kann Thr109 in der FSAA und Thr156 in der TalB an der korrekten Substratpositionierung und der Stabilisierung des Alkoxides beteiligt sein.

## 4 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
AA	Acetylaceton
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
BsTal	Transaldolase von <i>Bacillus subtilis</i>
CAPS	N-Cyclohexyl-3-aminopropansulfonsäure
Cbz	Benzyloxycarbonyl-Gruppe
Cbei0317	<i>Clostridium beijerinckii</i> 0317 von <i>Clostridium beijerinckii</i>
C-C	Carbon-Carbon bzw. Kohlenstoff-Kohlenstoff
CD	Zirkulardichroismus
D-E4P	D-Erythrose-4-phosphat
D-F6P	D-Fructose-6-phosphat
D-GA	D-Glycerinaldehyd
D-GAP	D-Glycerinaldehyd-3-phosphat
D/L-GAP	D/L-Glycerinaldehyd-3-phosphat
DHA	Dihydroxyaceton
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
DLS	dynamische Lichtstreuung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
D-Ribo-5P	D-Ribose-5-phosphat
D-S7P	D-Sedoheptulose-7-phosphat
D-T6P	D-Tagatose-6-phosphat
DTT	Dithiothreitol
D-X5P	D-Xylulose-5-phosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EG	Ethylenglykol
ESI	Elektrosprayionisation
EtOH	Ethanol
F6P-Aldolaseaktivität	Fructose-6-phosphat-Aldolaseaktivität
FBP	Fructose-1,6-bisphosphat
FBPA	Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase
FPLC-System	<i>Fast protein liquid chromatography</i> -System
FRK	Fructokinase von <i>Zymomonas mobilis</i>
FSAA	Fructose-6-phosphat-Aldolase A von <i>E. coli</i>
FSAB	Fructose-6-phosphat-Aldolase B von <i>E. coli</i>
FucA	Fuculose-1-phosphat-Aldolase
G6PDH	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase
GatD	Galactitol-1-phosphat-5-Dehydrogenase von <i>E. coli</i>
GDH	Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase
GldA	Glycerin-Dehydrogenase von <i>E. coli</i>
GO	Glycolaldehyd
GST	Glutathion-S-Transferase aus <i>Schistosoma japonicum</i>
HA	Hydroxyaceton
HB	1-Hydroxy-2-butanon
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

## Abkürzungsverzeichnis

hTal	Humane Transaldolase, TALDO1
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
$K_m$	Michaeliskonstante
$k_{cat}$	Katalytische Konstante
LB-Medium	<i>lysogeny broth</i> Medium bzw. Luria-Bertani Medium
LC	Flüssigkeitschromatographie
L-LDH	L-Lactatdehydrogenase
LmbR	Lincomycin building R aus <i>Streptomyces lincolnensis</i>
LPS	Lipopolysaccharid
NAD <sup>+</sup>	oxidiertes Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH	reduziertes Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NTA	<i>Nitrilotriacetic acid</i>
OrfX	Open reading frame X von <i>Clostridium beijerinckii</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PEP	Phosphoenolpyruvat
PLP	Pyridoxal-5-phosphat
PGI	Phosphoglucose-Isomerase bzw. Glucose-6-phosphat-Isomerase
PPW	Pentosephosphatweg
RAMA	<i>rabbit muscle aldolase</i> bzw. Fructose-1,6-bisphosphat Aldolase Klasse I aus dem Kaninchenmuskel
rcf	<i>relative centrifugal force</i>
RhuA	RhamnULOse-1-phosphat-Aldolase
RMSD	<i>root-mean-square deviation</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SF	Subfamilie
TacTal	Transaldolase von <i>Thermoplasma acidophilum</i>
TALED	Transaldolasendatenbank
TalA	Transaldolase von <i>Francisella tularensis</i>
TalB	Transaldolase B von <i>E. coli</i>
TagA	Tagatose-1,6-diphosphat-Aldolase
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TEV	Tev-Protease von Tabak Etch Virus
TIM	Triosephosphatisomerase
T <sub>schmelz</sub>	Denaturierungstemperatur (in der organischen Chemie alternativ auch Schmelztemperatur)
TKT	Transketolase A von <i>E. coli</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TtFBPA	Archäale Fructose-1,6-bisphosphat Aldolase Klasse I von <i>Thermoproteus tenax</i>
$V_{max}$	maximale Geschwindigkeit
WT	Wildtyp

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

## 5 Einleitung

### 5.1 Enzymatische Biokatalyse und Carboligasen

Enzymatische Reaktionen zur Herstellung von Feinchemikalien laufen meist unter milden Bedingungen wie wässrigen Systemen, neutralem pH-Wert, atmosphärischem Druck und Raumtemperatur ab. Zudem sind Enzyme meistens spezifisch für das/die umgesetzte(n) Substrat(e) und die Stereokonfiguration. Dies ist vorteilhaft und häufig umweltfreundlich im Vergleich zu organochemischen Verfahren (zusammengefasst in [11,12]). Zum Einsatz bei der biokatalytischen Synthese von organischen Verbindungen werden Enzyme mittels *Protein Engineering* konstruiert, optimiert und hergestellt. Dies resultiert in Muteinen, Enzyme mit geänderter Aminosäuresequenz. Hierbei wird unterschieden zwischen dem Rationalen Design und der Gerichteten Evolution. Das Rationale Design basiert auf Kenntnissen der Strukturen und des Mechanismus, das Vorhersagen über den Effekt des Aminosäureaustausches zulässt. Im Gegensatz dazu sind für die Gerichtete Evolution keine Vorkenntnisse nötig und die zufällige Mutagenese mit anschließendem Screening findet in einem iterativen Verfahren statt (zusammengefasst in [13]).

Für das Rationale Design spielen computergestützte Methoden, wie *Data Mining* und *Molecular Modeling* eine immer größer werdende Rolle. Seit Mitte der 1990er Jahre ist *de novo design* von Proteinen mit vorbestimmter Funktion, beispielsweise mit neuer Faltung, möglich (zusammengefasst in [14]).

2018 wurde der Nobelpreis für Chemie zur Hälfte an Frances H. Arnold, für die Anwendung der Gerichteten Evolution, verliehen [15]. In ihrer wegweisenden Arbeit von 1993 modifizierte sie die Serinprotease Subtilisin E aus *B. subtilis*, sodass diese hohe Konzentrationen von organischem Lösungsmittel (Dimethylformamid) tolerierte [16].

Die enzymatische Knüpfung neuer Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen (C-C-Bindungen) wird als Carboligation bezeichnet und ist essentiell für das Leben. Eine Vielzahl von Stoffwechselreaktionen stellen die Spaltung oder Knüpfung neuer C-C-Bindungen dar, welche teilweise kommerziell für chirale Synthesen von Feinchemikalien genutzt werden. Carboligasen wurden erstmals 1921 von Neuberg und Hirsch bei der Untersuchung des Gärungsprozesses von *Saccharomyces cerevisiae* entdeckt (Neuberg und Hirsch, Biochemischen Zeitschrift, Springer, Band 115 von 1921, aufgefunden in [17]). Das beobachtete Enzym Pyruvat-Decarboxylase war in der Lage während des Gärungsprozesses in Anwesenheit von Benzaldehyd die Knüpfung einer neuen

C-C-Bindung zu katalysieren. Dies stellt eine Nebenreaktion des Thiamindiphosphat-abhängigen Enzyms aus den Substraten Benzaldehyd und Pyruvat zu Phenylacetylcarbinol dar [18]. Damit ist die Pyruvat-Decarboxylase ein Beispiel für Promiskuität. Dabei wird Promiskuität definiert als zusätzliche Katalyse von anderen Reaktionen zu denjenigen, für die das Enzym physikalisch spezialisiert oder entwickelt ist (zusammengefasst in [19]). Kommerziell wird diese Synthese von R-Phenylacetylcarbinol seit 1932 in *Saccharomyces cerevisiae* aus Melassen und Benzaldehyd (Vorstufe von L-Ephedrin) genutzt (Hildebrandt und Klavehn Deutsches Reichspatent Nr. 548 459 von 1932, aufgefunden in [20]). Auch in jüngerer Zeit ist das Verfahren Gegenstand der Forschung und Weiterentwicklung. Die enzymatische Synthese von R-Phenylacetylcarbinol in einem flüssigen Zweiphasensystem erzielte eine Ausbeute von 92,9 % in Bezug auf Pyruvat [20].

Carboligasen finden sich in verschiedenen Enzymklassen wieder. Beispielsweise seien die Lyasen und die Transferasen genannt. Bei der enzymatischen Aldoladdition wird durch eine C-C Lyase die Bindung zwischen einem Donor und einem Akzeptor geknüpft. Dabei stellen Donor und Akzeptor Kohlenstoffverbindungen dar [11]. Zu den Transferasen gehören die Transaldolasen. Diese katalysieren den Transfer einer Glyceryl-Einheit von einem Donor auf einen Akzeptor und sind Teil des nicht-oxidativen Pentosephosphatweges [21]. In der hier vorliegenden Arbeit werden die beiden C-C-Bindungen knüpfenden Enzyme aus *E. coli* - Transaldolase B (TalB) und Fructose-6-phosphat-Aldolase A (FSAA) eingehend untersucht. Das hier gewonnene und zusammengetragene Wissen der Modellenzyme kann Rationales Design ermöglichen und so zu neuen Anwendungsmöglichkeiten der beiden Modellenzyme zur Synthese von Kohlenstoffgrundkörpern führen. Feinchemikalien könnten so für die Pharmazie, Lebensmittel- und Kosmetikindustrie einfacher zugänglich gemacht werden.

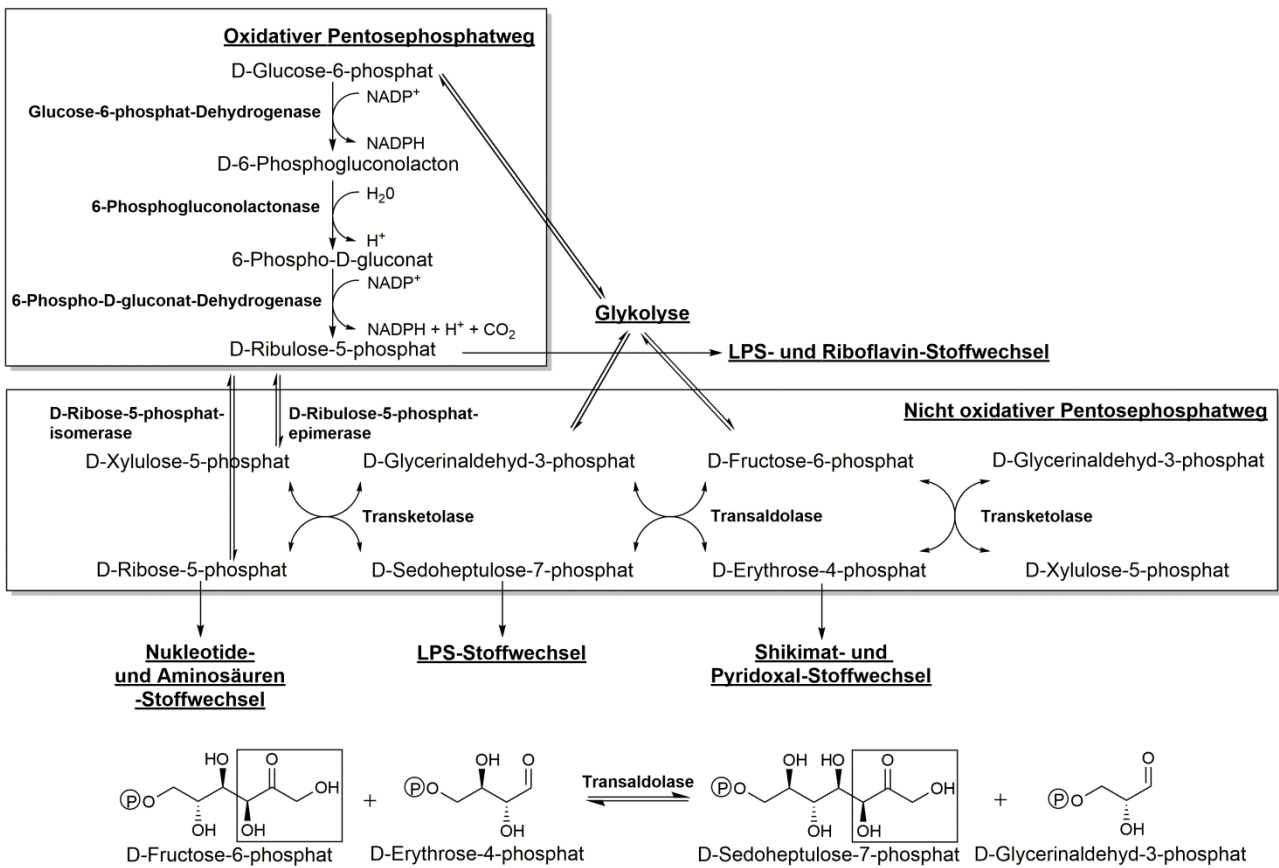
## 5.2 Transferasen

Das Komitee für biochemische Nomenklatur der International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) beschreibt die Nomenklatur und Klassifizierung von Enzymen und vergibt die EC-Nummer [22]. Die Enzymklasse der Transferasen (EC 2.X.X.X) stellt die zweite Enzymklasse dar. Diese Enzyme übertragen in einer katalytischen Reaktion funktionelle Gruppen von einem Donor auf einen Akzeptor. Weiter wird die Klasse unterteilt indem spezifiziert wird, was für eine Gruppe übertragen wird, zum Beispiel eine Keto- oder Aldehyd-Gruppe (EC 2.2.X.X). In der einzigen weiteren Unterkategorie EC 2.2.1.X werden Transketolasen und Transaldolasen gruppiert. Das Modellenzym TalB gehört zu der Enzymklasse der Transaldolasen [23].

### 5.2.1 Transaldolasen

Bei den Transaldolasen (EC 2.2.1.2) handelt es sich um Transferasen, welche eine Glyceryl-Einheit (DHA, entspricht einer Glyceryl-Einheit) von einem Ketosedonor reversibel auf einen Aldehydakzeptor übertragen. Sie katalysieren den Umsatz von D-Fructose-6-phosphat (D-F6P, Donor, Nukleophil) mit D-Erythrose-4-phosphat (D-E4P, Akzeptor, Elektrophil) wodurch D-Sedoheptulose-7-phosphat (D-S7P) und D-Glycerinaldehyd-3-phosphat (D-GAP) entstehen (siehe Abb. 1.1, [23,24]). Damit gehören sie zu den C-C-Bindungen knüpfenden Enzymen. Erstmals beschrieben wurden die Transaldolasen von Horecker und Smyrniotis [21,25].

Als Komponente des nicht-oxidativen Pentosephosphatweges (PPW) und in Verbindung zum Embden-Meyerhof-Parnas-Weg (Glykolyse) stellen die Transaldolasen zusammen mit den Transketolasen verschiedene C<sub>3</sub> bis C<sub>7</sub> Zuckerphosphate zur Verfügung [26]. Diese wichtigen Basiszuckerkomponenten sind Vorläufer für verschiedene Biosynthesewege. Beispielsweise wird D-S7P in der Lipopolysaccharidsynthese (LPS-Synthese) in Gram-negativen Bakterien benötigt. D-E4P ist Bestandteil des Shikimat-, sowie des Pyridoxal-Stoffwechsels. Für die Nukleinsäuresynthese ist D-Ribose-5-phosphat (D-Ribo-5P) notwendig. Zudem wird im oxidativen PPW reduziertes Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH) für die Biosynthese und Erhaltung des Glutathion-Spiegels generiert [27,28].



**Abb. 1.1: Reaktionsschema der Transaldolasen und Eingliederung in den Stoffwechsel**

Die Transaldolase ist Bestandteil des Pentosephosphatweges von *E.coli* und katalysiert den Transfer einer Glyceryl-Einheit. Aus Gründen der Übersicht wurden Kohlenstoffquellen, welche zusätzlich in den PPW eingeschleust werden können, nicht abgebildet (verändert nach [27,29]).



## 5.2.2 Transaldolase B aus *E. coli*

Die TalB ist der bisher am besten charakterisierte Vertreter der Transaldolasen und daher ein geeigneter Ausgangspunkt für *Protein Engineering*. Eine Übersicht über die TalB befindet sich in Tab. 1.1.

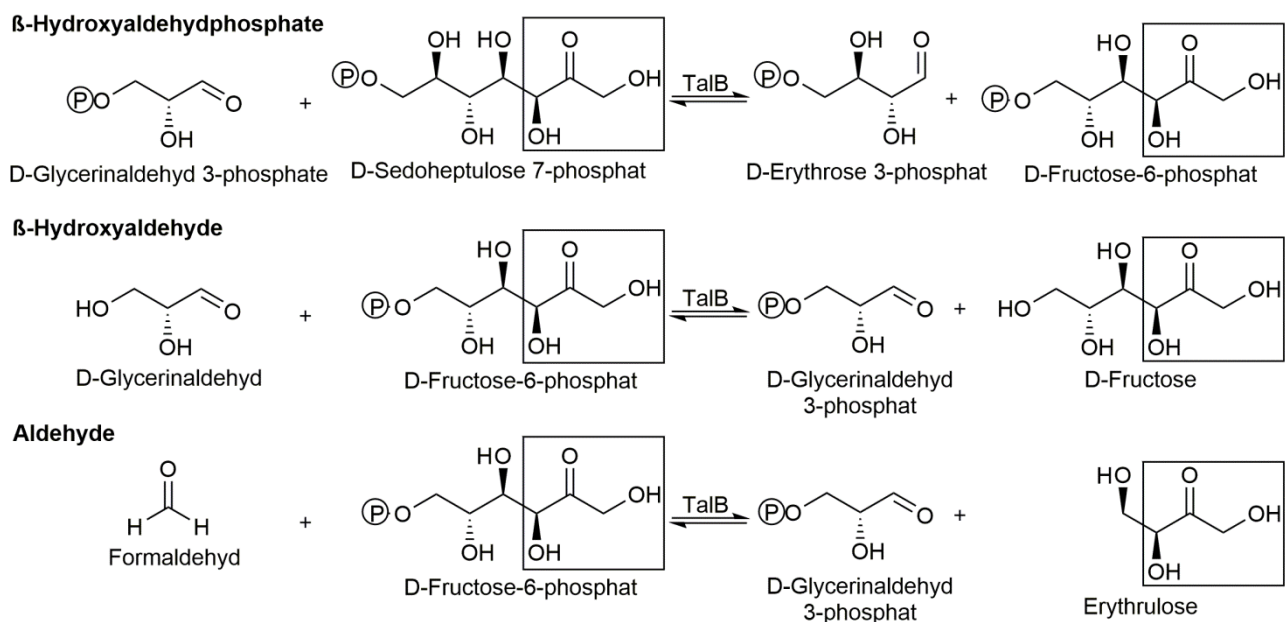
**Tab. 1.1: Übersicht über die Transaldolase B**

Zitate in eckigen Klammern angegeben.

Enzym	TalB
Reaktionstyp	Transferreaktion [23]
Enzymklasse	Transaldolasen [23]
EC-Klassifikation	EC 2.2.1.2 [23]
Substrate	
Donoren mit $K_m$	Fructose (>2000 mM), D-F6P (1,2 mM) und D-S7P (0,3 mM) [23]
Akzeptoren mit $K_m$	<u><math>\beta</math>-Hydroxyaldehydphosphate:</u> D-Ribo-5P (31 mM), D-E4P (0,09 mM), D/L-GAP (0,04 mM) <u><math>\beta</math>-Hydroxyaldehyde:</u> D-Erythrose (500 mM), Glycolaldehyd (GO, 70 mM), D/L-GA (D/L-Glycerinaldehyd 60 mM), Lactaldehyd (67 mM), D-GA (28 mM) <u>Aldehyde</u> Acetaldehyd (> 0,5 M), Propanal (> 0,4 M), Formaldehyd (45 mM) [23,30]
Stereokonfiguration	3S,4R [23]
Stoffwechselbeteiligung	nicht oxidativer PPW [23]
Vorkommen	zytosolisch [23]
Subfamilie	1 [28]
Intermediat	Schiff'sche Base Intermediat [23]
konservierter Lysinrest	Lys132 [5]
H-Brückennetzwerk des aktiven Wassermoleküls	Glu96 und Thr159 [5]
Kofaktoren	keine [23]
Masse	35 kDa [23]
Aminosäuresequenz	317 AS
Monomeraufbau	( $\beta/\alpha$ ) <sub>8</sub> -Fassstruktur [3]
Quartärstruktur	Dimer [23]
Hitzestabilität	Temperaturoptimum 15-40 °C [23]
pH-Optimum	8,5-9,5 [23]
Inhibitoren	D-Arabinose-5-phosphat (D-A5P), L-GA, Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) und Phosphat [23]
UniProt [31]	P0A870

## TalB Kinetik

Die TalB katalysiert endogen die C-C-Bindungen knüpfende Reaktion der Übertragung eine Glyceryl-Einheit von D-F6P auf D-E4P zu D-S7P und D-GAP (siehe Abb. 1.1, Abb. 1.2 und Abb. 1.3). Die enzymkatalytisch geknüpfte C-C-Bindung weist zwei neue Stereozentren, immer mit 3*S*,4*R* Stereokonfiguration, auf [23]. TalB akzeptiert mit absteigender Michaeliskonstante ( $K_m$ ) die in Tab. 1.1 genannten Donoren und Akzeptoren. Eine maximale Geschwindigkeit ( $V_{max}$ ) von 60 U/mg ist für den Umsatz von D-F6P und D-E4P bestimmt worden. Dies wurde mittels gekoppeltem Enzymassay über die Entstehung des Produktes D-GAP gemessen [23]. Wird D-Fruktose als Donor verwendet, sinkt  $V_{max}$  auf 12 % und mit D-S7P als Donor auf 5 % im Vergleich zum Einsatz des natürlichen Donors D-F6P [23]. Als Akzeptoren ist TalB in der Lage drei unterschiedliche Substanzklassen umzusetzen:  $\beta$ -Hydroxyaldehydphosphate,  $\beta$ -Hydroxyaldehyde und Aldehyde (siehe Abb. 1.2, [23,30]). Gemessen über die Bildung von D-GAP ist eine  $V_{max}$  von 80 U/mg für das natürliche Produkt D-E4P beschrieben [23]. Für nicht phosphorylierte Aldehydakzeptoren sinkt die  $V_{max}$  auf  $\leq 12$  % und für Aldehyde auf  $\leq 1$  % im Vergleich zur erreichten Maximalgeschwindigkeit mit D-E4P [30].

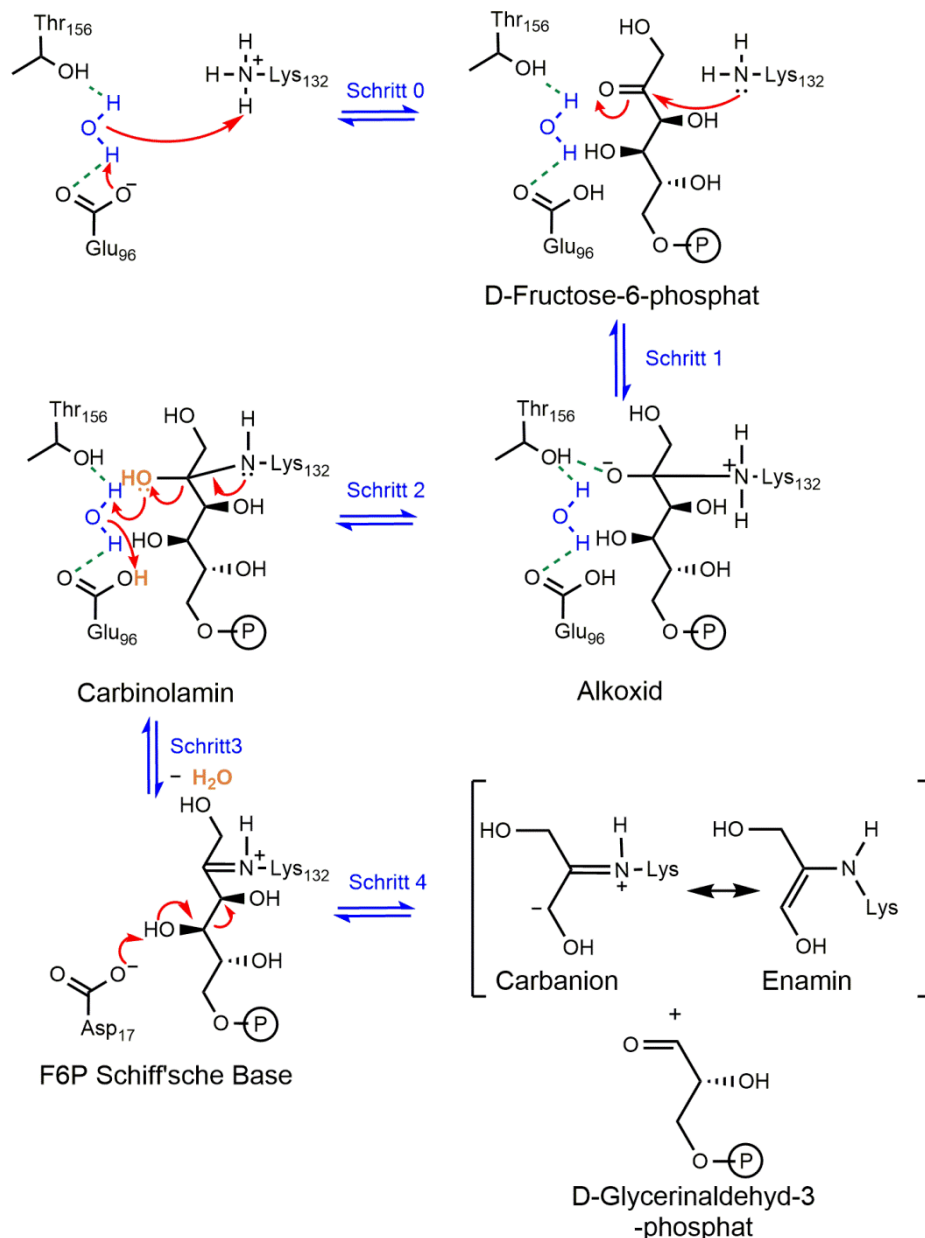


### Abb. 1.2: TalB-katalysierte Reaktionen mit verschiedenen Aldehydakzeptoren

Die übertragene Dihydroxyaceton-Einheit ist durch einen Kasten hervorgehoben. Die Detektion erfolgte mit zwei unterschiedlichen gekoppelten Enzymassays über das Produkt D-F6P oder D-GAP [30].

*Mechanismus von TalB*

Basierend auf den bekannten Muteinen (siehe nächster Absatz), in Kombination mit den Strukturinformationen, wurde die Funktion von verschiedenen Resten ermittelt und ein Transaldolase-Mechanismus-Postulat entwickelt [3,5,6,29,32–36]. Der Transaldolase-Mechanismus (siehe Abb. 1.3) verläuft über ein Schiff'sche Base Intermediat am konservierten Lysinrest Lys132 [5].



**Abb. 1.3: Postulierter Mechanismus für TalB (Stand Beginn dieser Arbeit)**

Über mehrere Protonentransferschritte wird das Substrat D-F6P gebunden, ein Wassermolekül eliminiert und das Substrat final gespalten. Dadurch wird das erste Produkt D-GAP frei. Zur Bildung des zweiten Produktes D-S7P verläuft der Mechanismus unter Bildung des Akzeptorsubstrates in umgekehrter Richtung (nach [3,5,6]).

Lys muss neutral geladen vorliegen, um den ersten Schritt der Katalyse vollziehen zu können. Falls das Lys protoniert vorliegt, muss als Eingangsschritt 0 eine Deprotonierung durch den negativ geladenen Rest Glu96 erfolgen. Dies wird über das katalytisch aktive Wassermolekül vermittelt. In Schritt 1 erfolgt der nukleophile Angriff des freien Elektronenpaares von Lys132 auf das elektrophile Kohlenstoffatom C2 des Donorsubstrates D-F6P. Der Ladungsausgleich (Schritt 2) des bipolaren Alkoxides kann direkt oder vermittelt über das Wassermolekül und Glu96 erfolgen (nicht gezeigt). Zur Bildung der Abgangsgruppe Wasser wird in Schritt 3 die C2-OH-Gruppe durch Glu96 protoniert und im Anschluss aus dem Carbinolamin ein Wassermolekül eliminiert. Das gebildete Schiff'sche Base Intermediat wird in Schritt 4 am C4-OH durch Asp17deprotoniert. Hierdurch wird das erste Produkt D-GAP freigesetzt. Die Glyceryl-Einheit, die während der enzymatischen Reaktion übertragen wird, verbleibt resonanzstabilisiert am Lys. Würde die Glyceryl-Einheit hydrolysiert werden, entspräche dies dem Produkt DHA. Mit dem Akzeptorsubstrat D-E4P läuft der abgebildete Mechanismus in umgekehrter Reihenfolge ab. Somit entsteht in der zweiten Halbreaktion als zweites Produkt D-S7P [3,5,6].

### *Aufbau von TalB*

Das Enzym besteht aus 317 Aminosäuren und besitzt eine Molekularmasse von 35 kDa [23]. Es sind bereits einige Kristallstrukturen der TalB aufgeklärt – WT-Struktur (Wildtyp - WT), Struktur des Intermediates von Dihydroxyaceton (DHA) und verschiedene Muteine [3,5,6]. Hieraus ist bekannt, dass TalB eine  $(\beta/\alpha)_8$ -Fassstruktur aufweist [3] und die Ausbildung von Homodimeren wurde belegt [3,23]. Auf die Strukturdatenlage wird in 5.4.1 weiter eingegangen.

### *TalB Varianten*

Wie bereits erwähnt, waren zu Beginn der vorliegenden Arbeit von der TalB bereits einige Varianten bekannt: Die Varianten TalB<sup>D17A</sup>, TalB<sup>N35A</sup>, TalB<sup>E96A</sup>, TalB<sup>T156A</sup> und TalB<sup>S176A</sup> sind im Vergleich zu TalB<sup>wt</sup> in ihrer Aktivität auf 2,5 % und weniger herabgesenkt [6].

Die Variante TalB<sup>D17A</sup> weist des Weiteren eine geänderte Substrataffinität, eine 5-fache Erhöhung des  $K_m$  für D-E4P, und eine 300-fache Abnahme der katalytische Konstante ( $k_{cat}$ ) auf. Dies kann auf die Beteiligung von Asp17 bei der Spaltung des ersten Substrates und der Stabilisation des Carbanion/Enamin-Intermediates hindeuten (in Abb. 1.3 nicht dargestellt) [6,30].

Als isosterische Varianten wurden TalB<sup>D17N</sup> und TalB<sup>E96Q</sup> untersucht, um die Rolle im katalytischen Protonentransfer zu untersuchen. Diese verhielten sich äquivalent zu den Alaninvarianten, wodurch die katalytische Beteiligung von D17 und E96 bestätigt wurde [6,30].

An der Positionierung des katalytischen Wassermoleküls ist Thr156 und Asn35 beteiligt. Dies bestätigt die geringe Aktivität der Variante TalB<sup>T156A</sup>, sowie die Strukturanalysen [5,6,30].

Der Donor D-F6P kann durch eine Wasserstoffbrücke zwischen C1-OH und Ser176 stabilisiert werden. Durch den Austausch von Ala gegen Ser an der Position 176 wurde die Donoraffinität für D-F6P um das 5-fache gemindert, wobei die Akzeptoraffinität zu D-E4P unverändert blieb. Dies ist zurückzuführen auf die fehlende Wasserstoffbrückenbindung in TalB<sup>S176A</sup> zwischen Ala und dem Donorsubstrat [6,30].

Die Varianten TalB<sup>N154Q</sup> und TalB<sup>S226Q</sup> waren ebenfalls beschrieben. Für Asn154 wurde postuliert, eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem C1-OH des Substrates einzugehen. Dies wird durch die gleichbleibende Affinität zu D-F6P von TalB<sup>N154Q</sup> im Vergleich zu TalB<sup>wt</sup> belegt, da die Säureamidgruppe von Gln für Wechselwirkungen vorhanden ist. Ser226 soll eine Bindung zur Phosphatgruppe eingehen. Eine direkte Beteiligung an der Katalyse ist durch die hohe Restaktivität der Variante auszuschließen [37].

Durch den Austausch von Arg300 zu Ala und Glu liegt TalB als Monomer bei basischem pH-Wert vor. Dabei wurde deutlich, dass die Quartärstruktur nicht für die enzymatische Katalyse notwendig ist und alle notwendigen Reste dafür innerhalb eines Monomers liegen. Zudem trägt die Quartärstruktur nicht signifikant zur Proteinstabilität bei [32].

Über zielgerichtete Sättigungsmutagenese zur Einführung einer Lyaseaktivität (Bildung von D-F6P aus DHA und D-GAP, siehe Abb. 1.8) an elf Positionen im Aktiven Zentrum, wurde die positive Variante TalB<sup>F178Y</sup> gefunden [1]. Dieses Mutein ist in der Lage, verschiedene desoxygenierte Ketoseprodukte zu synthetisieren. Neben DHA kann Hydroxyaceton (HA) als Elektrophil beispielsweise mit D-Glycerinaldehyd (D-GA) umgesetzt werden. Durch den zusätzlichen Austausch des polaren Restes Ser176 gegen Ala wird die Bindetasche hydrophober und die Fähigkeit, eine terminale CH<sub>2</sub>OH-Gruppe des Donors zu binden, entfernt. Somit ist mit TalB<sup>F178Y S176A</sup> auch der Umsatz von 1-Hydroxy-2-butanon (HB) möglich [38].

Mit dem Ziel, die Affinität für nicht-phosphorylierte Substrate zu verbessern und deren Lokalisation, wurden die Aminosäuren der Phosphatbindetasche ausgetauscht. Die beste Variante TalB<sup>F178Y R181E</sup> weist eine 5-fache Steigerung der Affinität zum Akzeptor D/L-GA

auf. Über die Aldoladdition sind in Kombination mit DHA D-Fructose, D-Xylulose und L-Sorbose im präparativen Maßstab zugänglich [39]. Eine Übersicht der Funktionen befindet sich in Tab. 1.5.

### 5.2.3 Weitere Transaldolasen

#### *humane Transaldolase - hTal*

Die hTal (UniProt P37837) mit 337 Aminosäuren [36] und 37,5 kDa [1] zeigt sehr hohe Ähnlichkeiten mit der bakteriellen Transaldolase TalB. Die Sequenzidentität liegt bei 56 % [1] und beide Enzyme weisen eine ähnliche dreidimensionale Struktur auf [36]. In ihren biochemischen Eigenschaften ähneln sich die Enzyme ebenso [28]. Der Austausch von Phe189 gegen ein Tyr in Entsprechung zu TalB<sup>F178Y</sup> resultiert ebenfalls in der Einführung einer Lyaseaktivität [1].

#### *Transaldolase von Bacillus subtilis - BsTal*

Die prokaryotische BsTal (UniProt P19669) mit 212 Aminosäuren ist mit 21 kDa kleiner als TalB. Die Sequenzidentität zwischen TalB und BsTal liegt bei 27 %. BsTal ist bei 75 °C für 26 Stunden thermostabiler und weist mit 28 U/mg eine geringere spezifische Aktivität für die Bildung von D-GAP und D-S7P auf [37]. Die Substratspezifität ist dabei ähnlich zu TalB, wobei die  $K_m$ -Werte für die Akzeptoren D-E4P und D/L-Glycerinaldehyd-3-phosphat (D/L-GAP) um eine Größenordnung höher liegen [40,41].

#### *Transaldolase von Thermoplasma acidophilum - TacTal*

Die TacTal (UniProt Q9HKI3) besitzt 223 Aminosäuren und eine Molekularmasse von 26 kDa. Bei 80 °C sind nach 4 Stunden noch 25 % Restaktivität erhalten. Das pH-Optimum liegt zwischen pH 7,1 und 8,32. Den Grenzen des Optimumplateaus wurden die  $pK_a$ -Werte der katalytisch aktiven Reste Glu60 und Lys86 zugeordnet. TacTal zeigt eine starke Abhängigkeit von der Ionenstärke. Über einen massenspektrometrischen Assay zur Detektion von Intermediaten wurde festgestellt, dass die Bindungsspaltung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des Mechanismus ist. Das Gleichgewicht bei äquimolarer Substratvorlage liegt auf der Seite der Edukte D-S7P und D-GAP [42]. Der postulierte Mechanismus beginnt bei einem deprotonierten Lys86, wodurch kein Eingangsschritt 0 notwendig wäre (siehe Abb. 1.3). Die Deprotonierung von C4-OH (Schritt 4) erfolgt durch den Rest Glu60 unter Beteiligung des katalytischen Wassermoleküls [33,42]. Zudem zeigt die Variante E60Q lediglich 1 % Restaktivität [42].

Aus massenspektrometrischen Untersuchungen der Reaktionsintermediate wurde festgestellt, dass die Bindungsspaltung zwischen C3 und C4 des Donorsubstrates der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist [42]. Die Variante TacTal<sup>F132Y</sup> zeigt analog zu hTal<sup>F189Y</sup> und TalB<sup>F178Y</sup> ebenfalls Fructose-6-phosphat-Aldolaseaktivität (F6P-Aldolaseaktivität, [1,35,42]). Es wird diskutiert, ob der neu eingeführte Rest Tyr132 diese Variante ein Proton von C4-OH (Schritt 4) abstrahieren kann [42]. Die Doppelvariante TacTal<sup>E60Q F132Y</sup> [35], welche etwas zeitgleich 2015 mit der TalB<sup>E96Q F178Y</sup> [4] veröffentlicht wurde, mit F6P-Aldolaseaktivität weist diese als katalytische Hauptaktivität auf. Über kinetische Untersuchungen vor dem Fließgleichgewicht, wurde zudem festgestellt, dass die zweite Halbreaktion (Protonierung des Carbanions bzw. Enamins und die Freisetzung von DHA) für die F6P-Aldolaseaktivität die geschwindigkeitsbestimmenden Schritte sind [35].

#### *Transaldolase von Francisella tularensis - TalA*

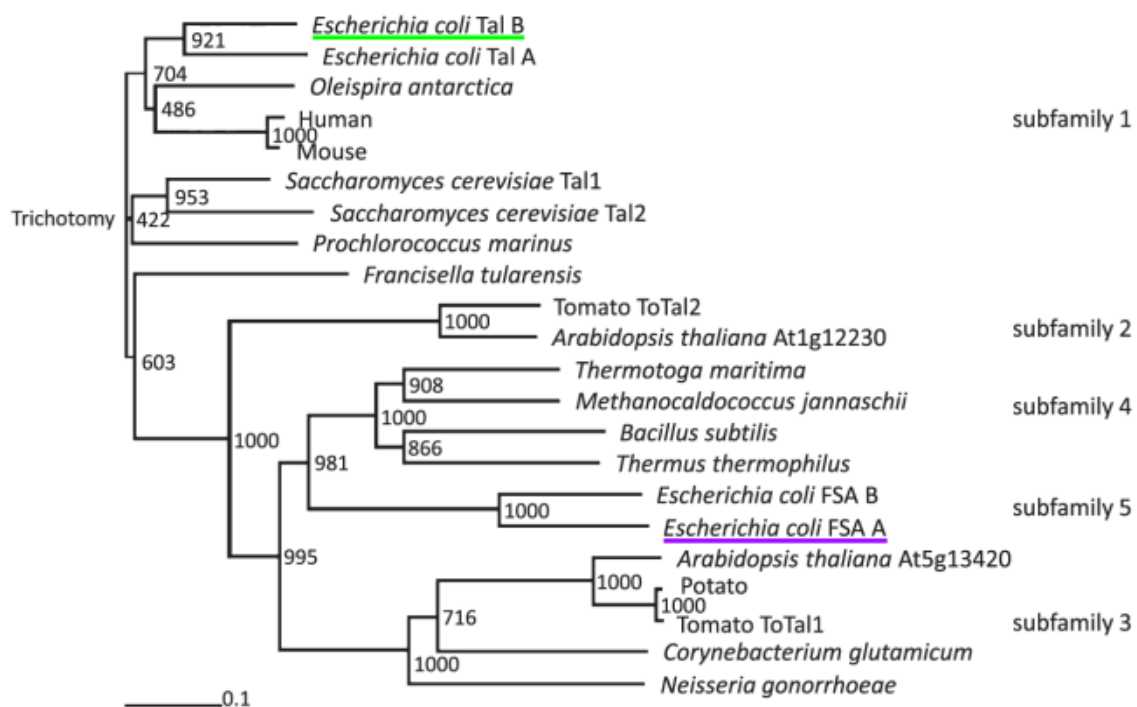
D-A5P stellt, wie für TalB, einen Inhibitor für die TalA (UniProt Q5NFX0) dar [43]. Diese Transaldolase besitzt 321 Aminosäuren und eine Molekularmasse von 36 kDa [31]. Durch Untersuchungen von Enzym-Substrat-Komplexen und eines Enzym-Inhibitor-Komplexes wurden weitere Informationen über den Ablauf des Mechanismus gewonnen, beispielsweise wie die Enzymdynamik zur Substratbindung beiträgt, siehe 5.4.1 [43,44].

#### *Lincomycin building R von Streptomyces lincolnensis - LmbR*

Das Protein LmbR aus *Streptomyces lincolnensis* besitzt 253 Aminosäuren [45] (UniProt Q54372). LmbR katalysiert als Transferase die Initialreaktion der Antibiotikumsynthese von Lincomycin zur Bildung von Octulose-8-P. Dabei wird eine Glyceryl-Einheit von D-S7P auf D-Ribo-5P übertragen, wodurch Octulose-8-P und D-E4P entstehen. D-F6P kann als alternatives Donorsubstrat zu D-S7P ungesetzt werden, wobei Octulose-8-P und D-GAP entstehen. Xylose-5-P stellt *in vitro* eine Akzeptoralternative zu D-Ribo-5P dar [46].

## 5.2.4 Sequenzdatenbank und phylogenetische Einteilung

Basierend auf Sequenzvergleichen lassen sich die Transaldolasen in fünf Subfamilien (SF) unterteilen (siehe Abb. 1.4, [28]). Die erste Untergruppe enthält die „klassischen“ Transaldolasen. Diese bestehen aus 310-350 Aminosäuren und sind vom Bakterium bis zum Menschen auffindbar [28]. Das Modellenzym TalB aus *E. coli*, die hTal und die Transaldolase A aus *Francisella tularensis* (TalA) sind dieser Untergruppe zugeteilt [28,41]. In die zweite Unterfamilie gehören pflanzliche Proteine mit bisher nicht nachgewiesener Transaldolaseaktivität. Diese sind der Gruppe eins sehr ähnlich. Die großen Transaldolasen mit ca. 380 Aminosäuren bilden die Untergruppe drei. In Untergruppe vier sind die kleinen Transaldolasen mit circa 220 Aminosäuren zusammengefasst. Zu dieser SF gehören die Transaldolase aus *Bacillus subtilis* (BsTal) und die Transaldolase aus *Thermoplasma acidophilum* (TacTal) [28]. Die letzte Gruppe mit ähnlicher Sequenzlänge wie Gruppe vier besitzt F6P-Aldolaseaktivität. Die FSAA, das hier ebenfalls untersuchte Modellenzym, ist in Gruppe fünf eingeordnet [28,41]. Das LmbR aus *Streptomyces lincolnensis* lässt sich nicht eindeutig in eine Gruppe einordnen – diskutiert wird eine Zuordnung in Gruppe vier oder fünf sowie eine eigene Gruppe [47].



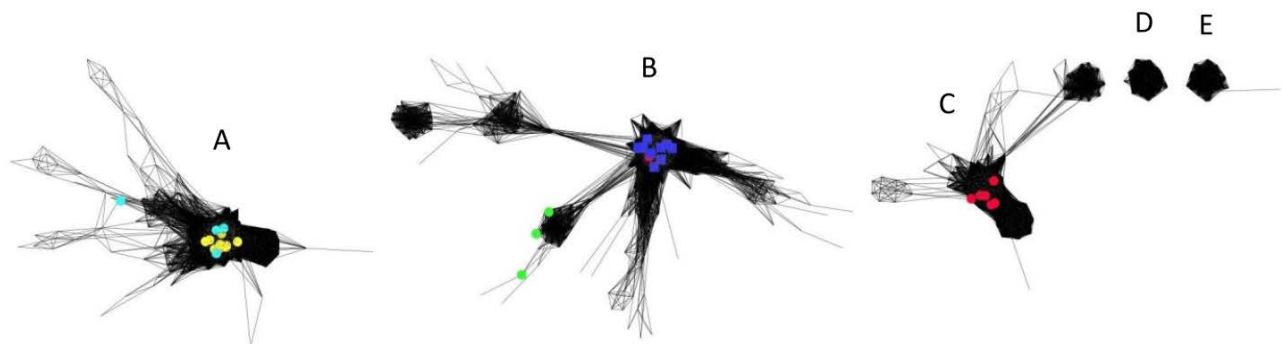
**Abb. 1.4: Phylogenetischer Baum der Transaldolase-Familie**

Der Baum basiert auf einem Multisequenzalignment. Das Modellenzym TalB grün hervorgehoben und FSAA lila (übernommen aus [41], Hervorhebung hinzugefügt).

Die Transaldolase Datenbank (TALED) enthält 4937 Sequenzen (Stand Bachelorarbeit Lorenz 2013, [48]) und gruppiert in sechs Cluster über einen Ähnlichkeitsschwellenwert



von 50 % für ein Verbindung zweier Knoten. Die bisherige Verteilung der SF ist farblich markiert (siehe Abb. 1.5). Dabei sind die Familien eins und zwei gemeinsam in Cluster B zu finden. Hierbei sind die Sequenzen von SF eins in einem Knoten zentriert und im Subcluster die Sequenzen von SF zwei. Die großen Transaldolasen sind in Cluster C gruppiert. Die Gruppe vier und fünf entfallen gemeinsam auf das Cluster A. Dies spiegelt die familienübergreifenden höheren Identitätswerte zwischen diesen beiden Familien wieder. Zusätzlich sind in weiteren Subclustern von B und in den Clustern D und E keine der bisher gruppierten Sequenzen enthalten. In Cluster D sind um ein Vielfaches längere Transaldolasen mit durchschnittlich 947 Aminosäuren enthalten. Die sonstigen Längenwerte der Sequenzen passen zu dem Rahmen der bisherigen SF. Hierbei sind die beiden Modellenzyme, wie bei der Einteilung in SF, in zwei unterschiedlichen Clustern (Cluster B – SF eins mit TalB und Cluster A – SF fünf mit FSAA) lokalisiert [48].



**Abb. 1.5 Protein-Ähnlichkeitsnetzwerk aller Sequenzen der Transaldolase Datenbank**

Einteilung der Sequenzen aus der Transaldolase Datenbank in die Cluster A bis E. SF1 (blau, mit TalB) und SF2 (grün) sowie die Gruppe 3 (rot) abgebildet. Die Untergruppen 4 (gelb) und 5 (türkis, mit FSAAA) dargestellt (unverändert übernommen aus [48]).

Die CSP-Methode (*collection of similar parts*) wurde angewendet um eine andere Sichtweise auf das Netzwerkcluster zu erhalten [48]. Hierbei werden zwei Aminosäuresequenzen unabhängig von ihrer Position in der Sequenz hinsichtlich ihrer Ähnlichkeit verglichen. Hiermit können zum Beispiel Sequenzabschnitte betrachtet werden, die wichtig für bestimmte enzymatische Funktionen sind. Dies erlaubt eine differenzierte Betrachtungsweise der globalen Sequenzähnlichkeit. Das erhaltene Netzwerk (nicht gezeigt) führt zu einer weiteren Auftrennung des Ähnlichkeitsnetzwerks (siehe Abb. 1.5) in elf CSP-Cluster. Die SF4 und SF5 befinden sich auch im CSP-Netzwerk in einem Cluster. Die Gruppe ein und zwei sind dagegen auf

unterschiedliche Cluster verteilt [48]. Auch hier befinden sich die beiden Modellenzym in unterschiedlichen Clustern.

### 5.3 Lyasen

Die Enzymklasse der Lyasen (EC 4.X.X.X) stellt die vierte Enzymklasse dar. Lyasen sind spezifisch für den Reaktionstyp: Sie katalysieren die nicht-hydrolytische Addition oder die reverse Reaktion (Eliminierung von Molekülgruppen). Diese Enzymklasse wird weiter unterteilt, je nachdem welche Art von Bindung bei der Katalyse gespalten oder geknüpft wird. C-C Lyasen (EC 4.1.X.X) spalten reversibel eine C-C-Bindung. Dies wird wiederum in die Subklassen Carboxy-Lyasen (EC 4.1.1.X), Aldehyd-Lyasen (EC 4.1.2.X), Oxosäure-Lyasen (EC 4.1.3.X) und andere C-C Lyasen (EC 4.1.99.X) geteilt. In der Gruppe der Aldehyd-Lyasen (EC 4.1.2.X) und Oxosäure-Lyasen (EC 4.1.3.X) befinden sich die Aldolasen [22]. Das Modellenzym FSAA gehört zu der Enzymklasse Aldolasen [49].

#### 5.3.1 Aldolasen

Die Aldolasen (EC 4.1.X.X) sind C-C-Bindungen spaltende bzw. knüpfende Enzyme. Dabei katalysieren sie die Addition (Aldoladdition) eines Donors (Nukleophil) auf einen Akzeptor (Elektrophil) zu einem Produkt. Wird die reverse Reaktion katalysiert wird von Retro-Aldolreaktion oder Spaltung gesprochen.

Aldolasen werden auf Basis ihres Mechanismus in zwei Klassen unterteilt. Die Klasse I Aldolasen besitzen einen konservierten Lysinrest, an welchem ein Schiff'sche Base Intermediat ausgebildet wird. Die Klasse II dagegen weist einen metallabhängigen Mechanismus auf, wobei meist  $Zn^{2+}$  als Lewis-Säure agiert. Zudem gibt es Pyridoxal-5'-Phosphat-abhängige Aldolasen (zusammengefasst in [11,12,50]).

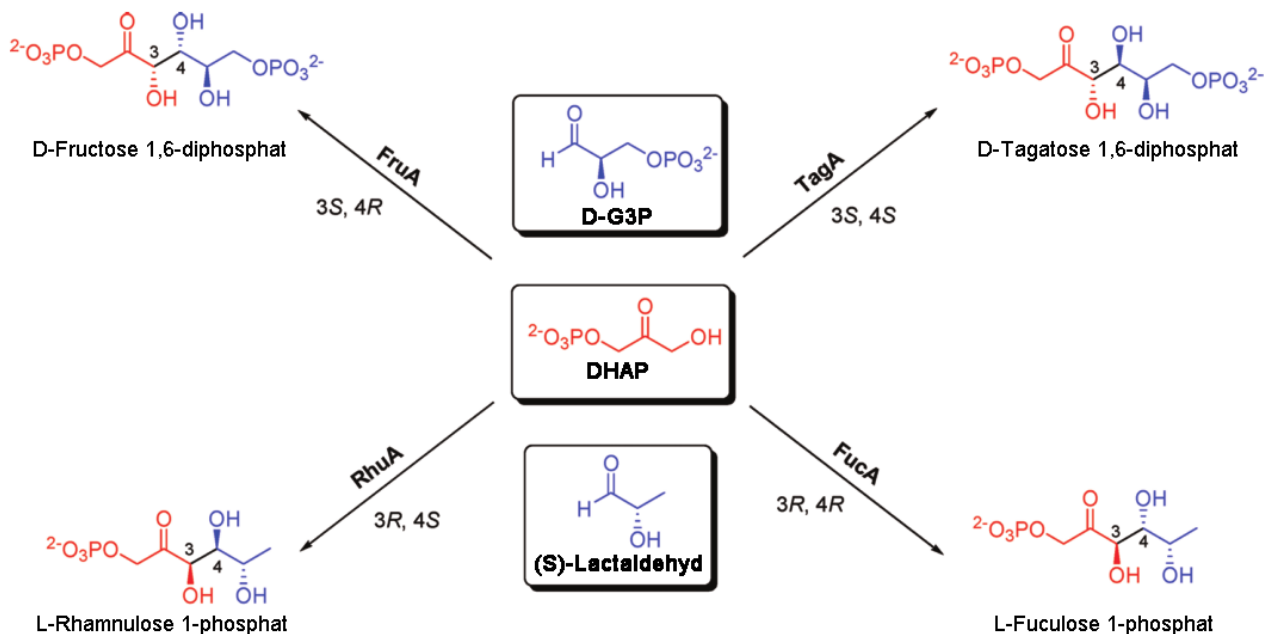
Der Donor ist meist spezifisch für eine Aldolase, wohingegen die Akzeptoren variieren können. Daher werden die Aldolasen auch nach ihrem Donorsubstratspezifität klassifiziert: Dihydroxyacetonphosphat (DHAP), Pyruvat oder Phosphoenolpyruvat (PEP), Acetaldehyd und Glycin (siehe Abb. 1.6, zusammengefasst in [11,12,50]). Das Modellenzym FSAA ist in der Lage unterschiedlichen Donoren umzusetzen und stellt somit eine Ausnahme dar (siehe 5.3.2 *FSAA Kinetik*).

Donor	Acceptor	Produkt	Beispiele
$\text{HO}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2-\text{OR}_1$ DHA(P)	$\text{R}-\text{C}(=\text{O})-\text{H}$	$\text{R}-\text{C}^*(\text{OH})-\text{C}^*(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{OR}_1$	Fructose 1,6-diphosphataldolase (FBPA) Fructose 6-phosphataldolase (FSA) Rhamnulose 1-phosphataldolase (RhuA) Tagatose 1,6-diphosphataldolase (TagA) Fuculose 1-phosphataldolase (FucA)
$\text{CH}_3-\text{C}(=\text{O})-\text{CO}_2\text{H}$ oder $\text{CH}_2=\text{C}(\text{OPO}_3^{2-})-\text{CO}_2\text{H}$ Pyruvat Phosphoenolpyruvat	$\text{R}-\text{C}(=\text{O})-\text{H}$	$\text{R}-\text{C}^*(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{CO}_2\text{H}$	N-Acetylneuraminsäurealdolase (NeuA) 3-Deoxy-D-manno-2-octulosonataldolase (KDO Aldolase) 2-Keto-3-deoxy-6-phosphogluconataldolase (KDPG Aldolase) 2-Keto-3-deoxy-6-phosphogalactonataldolase (KDPGal Aldolase)
$\text{CH}_3-\text{C}(=\text{O})-\text{H}$ Acetaldehyd	$\text{R}-\text{C}(=\text{O})-\text{H}$	$\text{R}-\text{C}^*(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{H}$	2-Deoxyribose-5-phosphataldolase (DERA)
$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{OH}$ Glycin	$\text{R}-\text{C}(=\text{O})-\text{H}$	$\text{R}-\text{C}^*(\text{OH})-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{CO}_2\text{H}$	Serinhydroxymethyltransferase (SHMT) Threoninaldolases (ThrA)

**Abb. 1.6: Aldolasegruppen nach Donorsubstrat klassifiziert**

Neue chirale Zentren mit einem Stern gekennzeichnet (nach [11,12,50]).

Bei der Katalyse wird abhängig vom Enzym nur ein Stereoisomer gebildet. Alle vier Stereoisomere sind mit DHAP-Aldolasen zugänglich, jede spezifisch für eine Stereokonfiguration: 3*S*,4*R* mit Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase (FBPA bzw. FruA), 3*R*,4*S* mit Rhamnulose-1-phosphat-Aldolase (RhuA), 3*R*,4*R* mit Fuculose-1-phosphat-Aldolase (FucA) und 3*S*,4*S* mit Tagatose-1,6-diphosphat-Aldolase (TagA) (siehe Abb. 1.7). Für FucA ist S-Lactaldehyd jedoch das bevorzugte Substrat [11].



**Abb. 1.7: Stereoisomere der DHAP-Aldolasen**

In rot der nucleophile Donor DHAP, in blau die elektrophilen Akzeptoren und in beiden Farbe sind die Produkte dargestellt (übernommen und übersetzt aus [11]).

Ein großer Nachteil für die präparative Synthese ist der teure und instabile Donor DHAP. Zudem kann ein Dephosphorylierungsschritt des Aldolproduktes notwendig sein. Lösungsansätze für die Zurverfügungstellung des Donors sind beispielsweise Enzymkaskaden, die als Ausgangssubstrat Fructose-1,6-bisphosphat (FBP) oder DHA verwenden [51,52]. Die Isoenzyme FSAA und Fructose-6-phosphat-Aldolase B (FSAB) stellen ebenfalls eine Alternative dar, da sie den prochiralen Donor DHA akzeptieren [49,53]. Zudem besitzt FSAA eine breite Spezifität und ist in der Lage die Aldolasereaktion mit einer Vielzahl von Substraten zu katalysieren.

### 5.3.2 Fructose-6-phosphat-Aldolase aus *E. coli*

Das zweite Modellenzym ist die FSAA (EC 4.1.2.x) aus *E. coli*. Die beiden Modellenzyme weisen Ähnlichkeiten und Unterschiede auf – die Gegenüberstellung ist in 5.5 dargestellt. Eine Übersicht über die FSAA befindet sich in Tab. 1.2.

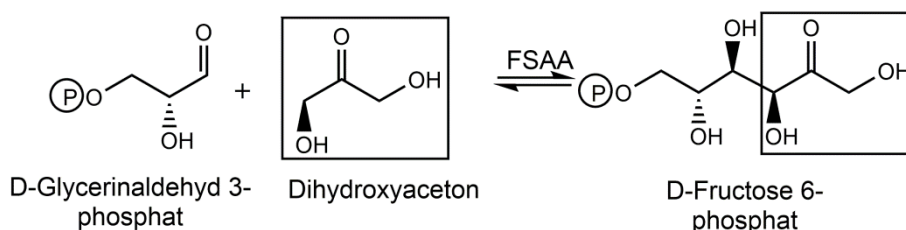
**Tab. 1.2: Übersicht über die Fructose-6-phosphat-Aldolase**

Zitate in eckigen Klammern angegeben.

Enzym	FSAA
Reaktionstyp	Spaltungsreaktion [49]
Enzymklasse	Aldolase - Klasse I [49]
EC-Klassifikation	EC 4.1.2.x [49]
Substrate	
Donoren Aldoladdition mit $K_m$ (falls bekannt)	DHA (35 mM mit D/L-GAP [49]), HA (17 mM mit D/L-GAP [54]), HB (32 mM D/L-GAP [55], 2 mM mit Glycolaldehyd (GO) [54]), GO (0.197 mM mit GO [54], Aceton [56], Ethanal, Propan, Butanon, Cyclopentanon [57]
Akzeptoren	Eine Vielzahl
Stereokonfiguration	Substratabhängig [57], 3S,4R [55], S,S [57]
Stoffwechselbeteiligung	unbekannt
Subfamilie	5 [28]
Intermediat	Schiff'sche Base Intermediat [49]
konservierter Lysinrest	Lys85 [2]
H-Brückennetzwerk des aktiven Wassermoleküls	Gln59, Thr109 und Tyr131 [2]
Kofaktoren	keine [49]
Masse	24 kDa [2]
Aminosäuresequenz	220 AS [49]
Monomeraufbau	( $\beta/\alpha$ ) <sub>8</sub> -Fasstruktur [2]
Quartärstruktur	Dekamer [2]
Hitzestabilität	Halbwertszeit von 16 h bei 75 °C [49]
pH-Optimum	6-12 [49]
Inhibitoren	Tris, Glycerin, Phosphat, A5P [49] D-GA [29]
UniPort [31]	P78055

## FSAA Kinetik

Ohne Kofaktor katalysiert FSAA den Umsatz eines Nucleophils und Elektrophils zu einem Aldolprodukt, wobei eine neue C-C-Bindung geknüpft wird. Der Nachweis, dass FSAA in der Lage ist D-F6P ( $K_m$  9 mM) in D-GAP und DHA zu spalten (siehe Abb. 1.8), war namensgebend [49]. Nach bestem Wissen ist bisher keine endogene F6P-Aldolaseaktivität oder Expressionsbedingungen für die zytosolisch vorliegende FSAA nachgewiesen worden. Die Additionsreaktion von D-GAP und DHA ist mit einer maximalen Geschwindigkeit von 45 U/mg beschrieben, wogegen FSAA eine Retroaldolreaktion von D-F6P mit einer maximalen Geschwindigkeit von lediglich 7 U/mg aufwies [49]. FSAA besitzt einen ungewöhnlich hohen  $K_m$  für DHA von 35 mM und einen  $K_m$  von 0,8 mM für D-GAP [49].

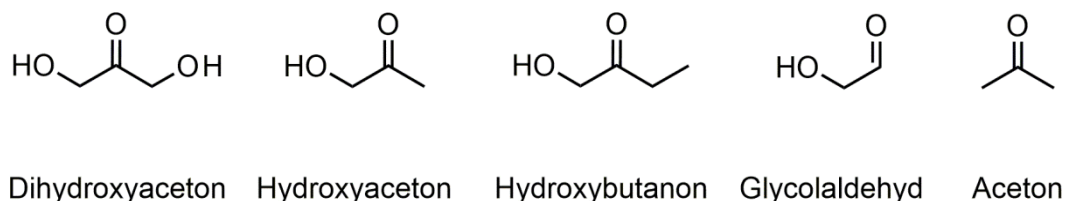


**Abb. 1.8 Reaktionsschema der Fructose-6-phosphat-Aldolase**

FSAA akzeptiert untypisch für Lyasen viele unphosphorylierte Donoren (siehe Abb. 1.9), wobei DHAP kein Donorsubstrat darstellt [49,55]. Lange Zeit wurde angenommen, dass die  $\alpha$ -Hydroxylierung essentieller Strukturbestandteil der Donoren ist. Inzwischen ist bekannt, dass FSAA auch in der Lage ist Aceton [56], Ethanal, Propanon und Butanon als Donoren zu akzeptieren [57]. Zudem wurde mit diesen Donoren nicht die  $3S,4R$  Stereokonfiguration gebildet, für welche angenommen wurde, dass FSAA hierfür spezifisch ist [55]. Somit kann beispielsweise mit L-GAP und Ethanal L-2-deoxyxylose-5-phosphat mit  $S3,4$  Stereokonfiguration erhalten werden [57]. Ferner kann das Ringketon Cyclopentanon als Donor umgesetzt werden [57].

Asymmetrische Donoren binden in gleicher Orientierung im Aktiven Zentrum, sodass beispielsweise aus HA immer 1-Desoxyzucker und nicht 3-Desoxyzucker gebildet werden [58,59]. Das Substrat GO kann sowohl als Donor ( $K_m$  0,20 mM), als auch als Akzeptor ( $K_m$  63 mM) dienen. Überdies ist die Kondensation von zwei Aldehyden möglich und damit Selbstaddition sowie Kreuzaddition. Somit kann durch Selbstaddition von GO das Aldehyd D-Threose synthetisiert werden. In einer zweiten fortlaufenden Kreuzaldoladdition, mit unterschiedlichem Nucleophil und Elektrophil, kann HA mit D-Threose verknüpft werden.

Produktgemische können über Reaktionsbedingungen vermieden werden, hierzu werden die unterschiedlichen  $K_m$ -Werte ausgenutzt [54]. Bisher wurde die Hydroxylfunktion an C1 der Nukleophile als essenzielle Donorfunktion angesehen.



**Abb. 1.9 Donorbeispiele der FSAA [49,54–56]**

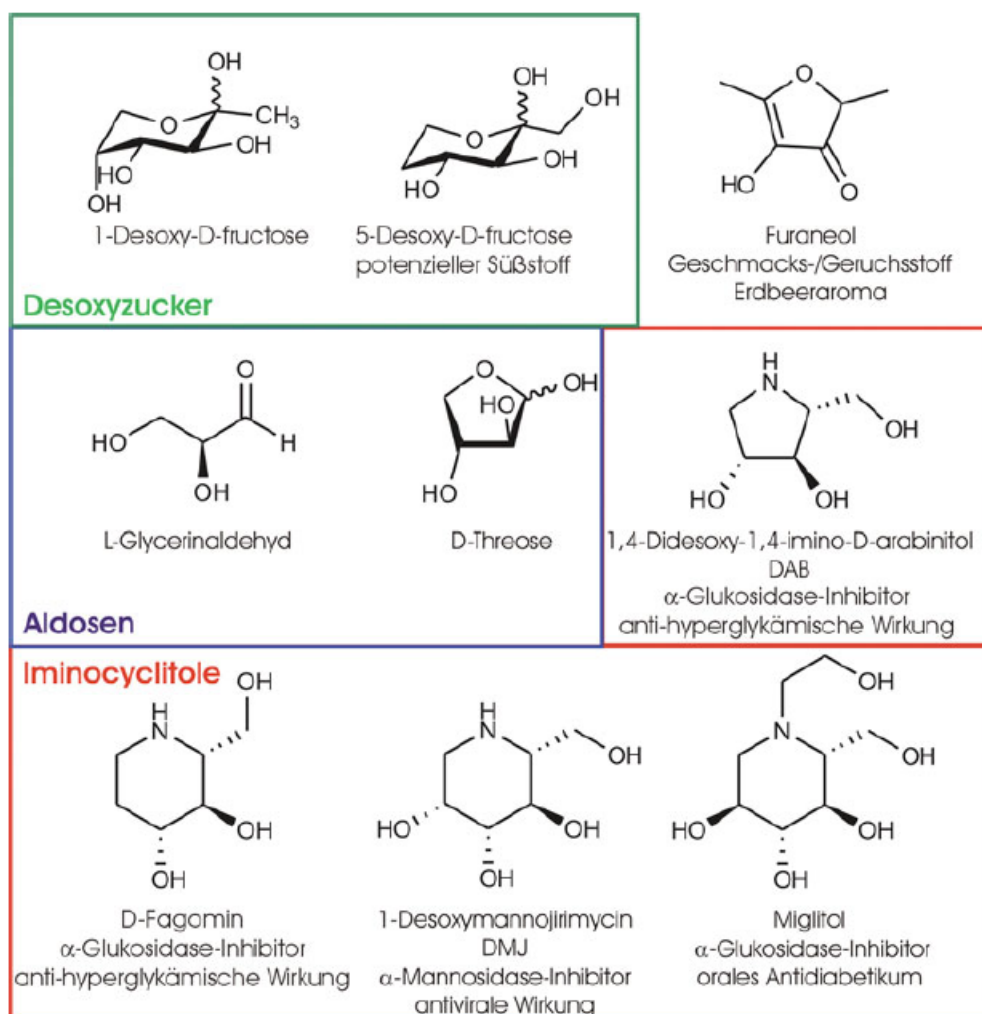
Des Weiteren besitzt FSAA eine große Akzeptorbandbreite: Phosphorylierte und unphosphorylierte Aldehyde werden zu Zuckerphosphaten bis C9, 1-Desoxy und 1,2-Didesoxyzuckern und Zuckern der D- und L-Reihe umgesetzt [38,39,54,58,60–63]. Die Größe des Akzeptors reicht von C1 bis hin zu Aminoaldehyden mit Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppe (Cbz) am N-Terminus oder Aldehyden mit aromatischem Ring(en) [38,54,64–66]. Iminozucker, Thiole und Nitroverbindungen sind mit der FSAA über chemoenzymatische Synthesen ebenfalls zugänglich [55,59,62,67,68]. Zudem sind verschiedene N-Heterozyklen bis hin zu bicyklischen Verbindungen im präparativen Maßstab synthetisierbar [69].

Industrielle Prozesse mit FSAA sind für D-Fagomin ( $\alpha$ -Glucosidase-Inhibitor [70–72]), Furaneol (Geschmacks- und Geruchsstoff beispielsweise in Erdbeeren [73]) und Biotin (Vitamin B7 oder Vitamin H [56]) beschrieben. Synthesebeispiele unter Anwendung der FSAA sind in Abb. 1.10 dargestellt.

Neben den Reaktionsbedingungen ist für FSAA auch die Substratkombination entscheidend. D-GA ist in Kombination mit HA ein Substrat, jedoch mit DHA ein Inhibitor [38,54,58]. An der  $\alpha$ -Position des Aldehyds weist FSAA keine Stereoselektivität auf. Exemplarisch kann FSAA sowohl D-GA (R-Isomer), als auch L-GA (S-Isomer) umsetzen [38,39,58]. Dies trifft ebenfalls auf D-GAP und L-GAP zu, wobei je nach Donor ein Enantiomer als Elektrophil bevorzugt wird [57]. A5P stellt einen kompetitiven Inhibitor im Vergleich zu D-F6P dar [49]. A5P kann ebenfalls als Substrat gespalten werden [54]. D-GA stellt beim Umsatz von DHA und D-GAP in Bezug auf D-GAP einen reversiblen, nicht-kompetitiven Inhibitor dar [29].

Für die industrielle Applikation weist FSAA einige Vorteile auf. Durch Halbacetalbildung des Produktes liegt das Reaktionsgleichgewicht auf der Seite des Kondensationsproduktes [50]. Eine weitere Besonderheit der FSAA ist, dass sie nicht nur einfach überexprimiert werden kann, sondern wegen ihrer Hitzestabilität (Halbwertszeit 16 Stunden bei 75 °C) über Hitzefällung der anderen zytosolischen Proteine angereichert

werden kann [49]. Zellfreier Extrakt kann nach Hitzefällung direkt in präparativen Synthesen eingesetzt werden [54,59,70]. Zudem toleriert FSAA das organische Lösungsmittel Dimethylformamid bis 20 % [55,70,74], sowie Methanol, Ethanol, 2-Propanol, Propanon, Acetonitril und Dimethylsulfoxid [75]. Hierbei war FSAA bei 30 % Dimethylsulfoxid noch bis 70 °C thermisch stabil [75]. Überdies kann FSAA mit geringfügigem Aktivitätsverlust immobilisiert werden [76].



**Abb. 1.10: Synthesebeispiele der FSAA**

Abbildung wurde unverändert übernommen aus [77].

### FSAA Mechanismus

Da FSAA nicht durch Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) inhibiert wird und FSAA<sup>K85R</sup> keine nachweisbare Aktivität zeigt, zählt FSAA mechanistisch zu den Klasse I Aldolasen mit konserviertem Lys und einem Reaktionsmechanismus mit Schiff'sche Base Intermediat [49]. Ein postulierter FSAA-Mechanismus war nach bestem Wissen zu Beginn dieser

Arbeit nicht bekannt. Es wurde davon ausgegangen, dass dieser analog zu den Klasse I Aldolasen abläuft.

### *FSAA Aufbau*

FSAA besteht aus 220 Aminosäuren und besitzt eine Molekularmasse von 23 kDa [49]. Von FSAA war bis zum Beginn dieser Arbeit lediglich die WT-Struktur bekannt [2]. Die Untereinheiten besitzen  $(\beta/\alpha)_8$ -Fasstruktur. Die C-terminale  $\alpha$ -Helix interagiert mit dem benachbarten Monomer wodurch ein Ring aus fünf Monomeren entsteht. Aus zwei Ringen wird ein Homodekamer gebildet [2]. Eine Übersicht zur Strukturdatenlage ist in 5.4.1 zu finden. FSAA wird auf Grund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu den kleinen Transaldolasen und evolutionär in die SF6 der Transaldolasen eingeteilt [28]. Auf die phylogenetische Einteilung wird näher in 5.2.4 eingegangen.

### *FSAA Varianten*

Von FSAA waren zum Zeitpunkt dieser Arbeit einige Varianten bekannt: Der Austausch des aktiven Lysinrestes gegen Arg führt in der FSAA<sup>K85R</sup> zu keiner nachweisbaren Aktivität [49]. Die Aminosäuren Gln59, Thr109 und Tyr131 sind am Wasserbrückennetzwerk des aktiven Wassers beteiligt [2].

Im Vergleich zu Transaldolasen wurden die Varianten FSAA<sup>Q59E</sup>, FSAA<sup>Y131F</sup> und FSAA<sup>Y131A</sup> generiert, um die unterschiedlichen Funktionen der Reste aufzuklären. Alle Muteine wurden während der Hitzefällung zur Aufkonzentration (75 °C, 40 min) denaturiert [78].

Die  $K_m$ -Werte für den Donor D-F6P von FSAA<sup>L107N</sup> (2,4 mM), FSAA<sup>A129S</sup> (1,4 mM) und FSAA<sup>L107N A129S</sup> (2,4 mM) im Vergleich zu FSAA<sup>wt</sup> (9 mM) bestätigen, dass die Aminosäuren bei der Donorbindung beteiligt sind. Die Affinität konnte durch den Austausch der hydrophoben Aminosäuren gesteigert werden [37].

FSAA<sup>A129S</sup> zeigt eine verbesserte katalytische Effizienz beim Umsatz von DHA (FSAA<sup>wt</sup>  $4 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ ; FSAA<sup>A129S</sup>  $69 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ ) [62]. Die Veränderung der Affinität ist auf die zusätzliche Wasserstoffbrücke von Ser129 zur Hydroxylgruppe von DHA zurückzuführen [78]. Zudem ist die Variante in der Lage längere und verzweigte Aldehyde umzusetzen [79]. Der Einsatz von FSAA<sup>A129S</sup> ist für vielzählige Umsätze beschrieben (Zusammengefasst in [63,80–83]).

Mit dem Ziel, die Akzeptor-Bindetasche zu vergrößern, wurden FSAA<sup>R134A</sup> und FSAA<sup>A165G</sup> generiert [67]. FSAA<sup>A165G</sup> und FSAA<sup>A129S A165G</sup> sind in der Lage sperrige  $\alpha$ -substituierte Aminoaldehyde als Akzeptoren umzusetzen, die mit der Schutzgruppe Cbz substituiert



sind [67,74,84]. Der  $\alpha$ -Glucosidaseinhibitor 1,4-Dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol (DAB) konnte mit FSAA<sup>A129S A165G</sup> enzymatisch synthetisiert werden [65]. An der Position A129 wurde zudem eine Sättigungsmutagenese durchgeführt, wobei während des Screenings auf die Selbstaldoladdition von GO getestet wurde. Die drei Varianten FSAA<sup>A129G</sup>, FSAA<sup>A129T</sup> und FSA<sup>A129V</sup> besaßen verbesserte katalytische Effizienz im Vergleich zu FSAA<sup>wt</sup> [85].

Zur Verbesserung des Umsatzes von GO mit N-Cbz-Aminoaldehyden wurde die Synergie der Mutationen an den Stellen L107X, A129X und A165X untersucht [85]. Um die Addition von zwei GO auf einen Donor zu katalysieren, wurde die sterische Einschränkung durch den Austausch S166X vermindert und mit Mutationen an den Stellen L107X, A129X und A165X kombiniert [86]. Da R134 als großer kationischer Rest neben dem essenziellen Rest Y131 die Annäherung des Akzeptors einschränken könnte, wurden FSAA<sup>A129S R134X A165G S166G</sup> und FSAA<sup>L107Y A129G R134X A165G S166G</sup> (X = R, S, V und P) auf katalytische Eigenschaften zur Synthese von Iminocyclitolen analysiert [87].

Auf der Suche nach FSAA-Varianten, die Phenylacetaldehyd als Akzeptor mit HA als Donor umsetzen können, wurden Sättigungsmutagenese an den Stellen S166X und R134 gleichzeitig durchgeführt. Die Variante FSAA<sup>R134S I135T S166K</sup> mit der zusätzlichen Punktmutation I135T weist eine 9-fache Steigerung des Umsatzes im Vergleich zu FSAA<sup>wt</sup> auf [88].

Um die Platzrestriktion im Aktiven Zentrum der FSAA zu mindern und den Umsatz längerer nukleophiler Substrate wie beispielsweise 1-Hydroxy-2-pentanone zu ermöglichen, wurden die Austausche L107A, A129G und L163A einzeln und kombiniert untersucht. FSAA<sup>L107A L163A</sup> ist in der Lage Ketone mit einer Kettenlänge von bis zu sieben Kohlenstoffatomen zu umzusetzen [89].

Im Vergleich zu FSAA<sup>wt</sup> verbessert der Austausch von Asp6 zu His die Akzeptanz der aliphatischen Ketone ohne  $\alpha$ -Hydroxylierung als Donoren (Aceton, Cyclobutanone, Cyclopentanone, Ethanal und Butanon). Dies basiert auf der wasserstoffbrückenbindenden Funktion der Asp6 zu den Hydroxylgruppen der Substrate, ausgehend von D-F6P zu C3-OH und C5-OH. Zudem setzt FSAA<sup>D6H</sup> die beiden GAP-Akzeptor-Enantiomere gleichermaßen um [57,90]. Neben dem Akzeptor GAP sollten weitere nicht phosphorylierte Elektrophile ermöglicht werden. Die Variante FSAA<sup>D6Q</sup> und die Doppelvariante FSAA<sup>D6L A165G</sup> sind dazu in der Lage. Die Aldoladdition der aliphatischen Nukleophile Ethanal, Propanon, Cyclobutanone und Cyclopentanone mit 3-Hydroxypropanal bzw. 3-Hydroxybutanal für die Varianten FSAA<sup>D6H</sup> und FSAA<sup>D6Q</sup> wurde beschrieben [90].

Erweitert wurde die Suche nach Varianten mit einer breiteren Akzeptanz für aliphatische Nukleophile mit der 3DM Aldolase Datenbank und dem Screening von FSAA<sup>D6X T26X</sup>. Durch die Wasserstoffbrückenbindung zwischen Thr26 und Asp6 wird Asp6 optimal für die Substratbindung ausgerichtet und ist damit ein weiteres Mutageneseziel. Hierdurch wurde der Umsatz von Propanal auch in Selbstaddition zu 3-Hydroxy-2-methylpentanal (Hydroxyketon) ermöglicht [91]. Für die Synthesemöglichkeiten der FSAA-Varianten mit den Aldehyden 2-Chloroethanal, Ethanal, Butanal, 3-Hydroxypropanal, 3-Hydroxybutanal, N-Cbz-3-Aminopropanal und N-Cbz-Glycinal in Kombination mit den Ketonen Propanon, Butan, Cyclobutanon, Cyclopentanon und 3-Pentanon liegt eine Patentanmeldung vor. Darin sind verschiedene Kombinationen der Modifikationen an den Stellen D6X, T26X und A165X enthalten [92].

Die Limitierung der Phosphatbindetasche bzw. der Akzeptorbinderegion wurde gezielt in Form der FSAA<sup>R134X S166X</sup> verändert. Die positiven Varianten der Bibliothek zeigen eine erhöhte Retroaldolaktivität und akzeptieren substituierte Phenylacetaldehyd in Kombination mit HA [66].

Eine Übersicht der Funktionen der verschiedenen Reste aus FSAA befindet sich in Tab. 1.5.

### 5.3.3 Weitere Fructose-6-phosphat-Aldolasen

Die beiden Isoenzyme FSAA und FSAB aus *E.coli*, welche die namensgebende Reaktion katalysieren, waren eine lange Zeit die einzigen Enzyme mit beschriebener F6P-Aldolaseaktivität [49,53]. Für *Methanocaldococcus jannaschii* wurde die Spaltung von D-F6P durch ein promiskuitives Enzym postuliert [93]. Dies konnte jedoch in einer weiteren Studie nicht reproduziert werden [94].

Weiter wurden in *Clostridium beijerinckii* die zwei Gene Open reading frame X (OrfX) und *Clostridium beijerinckii* 0317 (Cbei0317) als putative Transaldolasen [95,96] oder FSAs [47,97] identifiziert. OrfX (226 AS [95]) und Cbei0317 (225 AS [96]) zeigten eine schwache spezifische F6P-Aldolaseaktivität von 0,5 U/mg bzw. 0,6 U/mg, wobei keine Transaldolaseaktivität nachgewiesen wurde [47]. Dabei ist Cbei0317, wie die FSAA, hitzestabil und zeigte nach 20 Minuten bei 70 °C noch Aktivität [47]. Bei der Additionsreaktion mit D-GA bevorzugten beide Enzyme HA im Vergleich zu DHA. Bei Untersuchungen der Oligomerisierung zeigte Cbei0317 ein Dekamer/Dodekamer, wohingegen OrfX ein Dekamer/Dodekamer und Dimer aufwies. Das Dimer zeigte keine Aktivität [47]. OrfX aus dem Sorbitol-Operon [95] könnte das beim Sorbitol entstehende D-F6P spalten [97] und damit könnte dies die erste FSA mit endogener F6P-Aldolaseaktivität sein.

Neu annotiert wurden über *Genome Mining* zwei Enzyme als F6P-Aldolasen und sechzehn weitere Enzyme als Transaldolasen. Hierbei wurde für zehn Enzyme Transaldolaseaktivität und für acht Enzyme sowohl Aldol- als auch Retroaldolaktivität nachgewiesen. Somit wurden neue F6P-Aldolasen in *E. coli* O17:K52:H18, *Streptococcus* Spezies und *Listeria monocytogenes* Spezies gefunden [98].

## 5.4 Strukturbiologie

Für das Rationale Design sind Kenntnisse der Kristallstrukturen notwendig. Für die beiden Modellenzyme TalB und FSAA sowie weitere verwandte Enzyme sind die Kristallstrukturen gelöst. Eine Übersicht über die relevanten, gelösten Strukturen der Transaldolasen (siehe Tab. 1.3) und Aldolasen (siehe Tab. 1.4) wird in diesem Abschnitt gegeben.

### 5.4.1 Kristallstrukturen Transaldolase

#### *TalB, Varianten und Intermediate*

Die Struktur des WT der TalB weist eine  $(\beta/\alpha)_8$ -Fassstruktur mit acht Strängen bzw. acht Helices auf [3]. Die Quartärstruktur wird aus zwei Homodimeren gebildet [3,23]. Die  $\alpha$ F-Helix des C-Terminus ist über das Monomer zurückgefaltet und geht hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen mit der zweiten Untereinheit ein. Zudem sind  $\beta$ 3- $\alpha$ 3 Regionen der Untereinheit und die  $\alpha$ E-Helix der Nachbaruntereinheit an den Wechselwirkungen zur Dimerisierung beteiligt (siehe Abb. 1.11) bezüglich der Sekundärstrukturelemente). Der konservierte Rest Arg300 geht dabei die wichtigste Interaktion ein. Das Aktive Zentrum ist bei jeder Untereinheit mittig am Ende eines trichterförmigen Tunnels lokalisiert. Dieser Tunnel wird durch die  $\beta$ -Stränge umgeben von den  $\alpha$ -Strängen ausgebildet. Die Topologie zu den FBPA Klasse I ist dabei recht ähnlich, wobei drei Helices am C-Terminus zusätzlich vorhanden sind [3]. Das Strukturalignment zur humanen Fructose-1,6-bisphosphat Aldolase ([99]) resultiert in 113 äquivalenten C $\alpha$ -Atomen mit einer mittleren quadratischen Abweichung (RMSD - *root-mean-square deviation*) von 2,53 Å [3]. Dieses zeigt, dass die katalytisch aktiven Lysinreste nicht zur Deckung gebracht werden. Es weist auf eine zirkuläre Permutation hin. Ein Alignment basierend auf der Überlagerung der beiden  $\beta$ -Stränge ( $\beta$ 6 in Aldolasen und  $\beta$ 4 in Transaldolasen) mit den Schiff'sche Base bildenden Lys führt zu einer besseren Übereinstimmung der katalytisch aktiven Reste [3].

Über Reduktion war es erstmals möglich die TalB mit Glyceryl aus D-F6P gebunden als Schiff'sche Base Intermediat zu kristallisieren. Diese Struktur bestätigt die Position des Aktiven Zentrums mit Lys132. Die Struktur ist sehr ähnlich zur WT-Struktur und zeigt keine großen Konformationsänderungen. Vor allem das C $\alpha$ -Atom des Phe178 liegt verschoben vor. Dies ist wahrscheinlich begründet in der Substratbindung. In dieser Struktur wurde erstmals das katalytische Wassermolekül der TalB und dessen Bindung zu Glu96 und Thr156 beschrieben [5].

Kristallstrukturen von verschiedenen Varianten (TalB<sup>D17A</sup>, TalB<sup>N35A</sup>, TalB<sup>E96A</sup>, TalB<sup>T156A</sup> und TalB<sup>S176A</sup>) wurden von Schörken et al. zur Funktionsaufklärung gelöst. Alle Strukturen waren isomorph zum WT und besaßen eine RMSD von 316 C $\alpha$ -Atomen zwischen 0,16 - 0,24 Å [6]. Die Struktur der Variante TalB<sup>F178Y</sup> mit F6P-Aldolaseaktivität ist mit der besten Auflösung von 1.40 Å beschrieben. Auch hier liegt eine große Ähnlichkeit zu TalB<sup>wt</sup> mit einer RMSD von 0,38 Å über 315 äquivalente C $\alpha$ -Atomen vor [1]. Die Struktur der Doppelvariante TalB<sup>F178Y R181E</sup> zeigte nur strukturelle Änderungen an den ausgetauschten Aminosäuren. In der TalB<sup>F178Y</sup> und TalB<sup>F178Y R181E</sup> war in der Phosphattasche teilweise ein Sulfat, wahrscheinlich aus dem sulfathaltigen Fällungsmittel der Kristallisation, gebunden [39]. Die Funktion der verschiedenen Reste wird in 5.5.1 näher betrachtet.

#### *humane Transaldolase - hTal*

Die humane Transaldolase (hTal) besitzt eine Sequenzübereinstimmung von 56 % im Vergleich zu TalB [1]. Die Kristallstrukturen weisen ebenfalls eine hohe Ähnlichkeit auf. Das strukturbasierende Alignment zwischen TalB und hTal hat eine RMSD von 0,71 Å über 309 C $\alpha$ -Atome. Beide Strukturen haben eine ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>-Fasstruktur und zeigen Homodimere auf. Im Gegensatz zur TalB fehlt in der hTal die  $\alpha$ 1-Helix. Zudem besitzt die hTal an einer Schleife die zusätzliche  $\alpha$ E-Helix. Die hTal zeigt ein invariantes hydrophobes Cluster bestehend aus Leu168, Phe170, Phe189, Gly311 und Phe315 [36].

#### *Transaldolase von Bacillus subtilis - BsTal*

Die ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>-Fasstruktur wird auch von der kleinen Transaldolase aus *Bacillus subtilis* mit 212 Aminosäuren ausgebildet. Auffällig im Vergleich zur TalB ist, dass die einzelnen Strukturelemente signifikant kürzer sind. Zudem ist in der BsTal die letzte C-terminale  $\alpha$ -Helix nicht zurückgefaltet, sondern interagiert mit der benachbarten Untereinheit. Somit wird ein Dekamer aufgebaut aus zwei Pentameren ausgebildet [37,78]. Die quartäre Struktur ähnelt damit sehr der FSAA (FSAA-Struktur [2]) sowie der geschlossenen TacTal

(TacTal-Struktur [33]). Ferner ist die Elektronendichte für die  $\alpha$ B Helix gering, was die Annahme einer Flexibilität ähnlich zur TacTal zulässt. Die RMSD über 209 äquivalente C $\alpha$ -Atomen im Vergleich zur FSAA liegt bei 1,4 Å und im Vergleich zur TacTal zwischen 1,1-1,2 Å. FSAA und BsTal weisen eine Hitzestabilität auf. Beide Strukturen besitzen Charakteristiken für thermostabile Enzyme. Zum Beispiel besitzen Sie Bereiche, die nicht lösungsmittelzugänglich sind, und kurze Schleifen. Diese lässt das Postulat zu, dass die Thermostabilität aus der kompakten und dichten Packung der quartären Strukturen resultiert [41].

#### *Transaldolase von Thermoplasma acidophilum – TacTal, Variante und Intermediate*

Die kleine TacTal bildet ein Dekamer aus Homopentameren in Donutform aus. Dies ähnelt der quartären Struktur der FSAA (FSAA-Struktur [2]). Die Monomere weisen zudem ebenfalls eine  $(\beta/\alpha)_8$ -Fassstruktur auf. Hierbei läuft die letzte C-terminale  $\alpha$ -Helix ebenso über das Fass des Nachbarmonomers und geht dabei Interaktionen ein. Das katalytische Wassermolekül wird durch Glu60 und Thr110 koordiniert, wie in der TalB (TalB-Struktur [5]). Das Lys86 liegt teilweise, wie in der FSAA, kovalent modifiziert durch D-GA als Carbinolamin aus dem Kristallisationspuffer vor. Für die TacTal wurden eine geschlossene und eine offene Konformation der Monomere beobachtet. In der geschlossenen Form ist der Substratkanal um bis zu 4 Å schmaler. Ähnlich zur Fructose-1,6-bisphosphat Aldolase Klasse I aus dem Kaninchenmuskel (*rabbit muscle aldolase* – RAMA, RAMA-Struktur [100]), liegt bei der TacTal ein *induced-fit* Mechanismus vor. Es wurden die Strukturen der Schiff'sche Base Intermediate in TacTal<sup>wt</sup> für D-F6P und D-S7P und der Michaeliskomplex (ungebundenes Substrat) in TacTal<sup>K86A</sup> für D-F6P gelöst. Hierbei liegen alle Untereinheiten geschlossen vor. Die Hydroxylgruppe des C1 weist in beiden Schiff'sche Base Strukturen zwei unterschiedliche Positionierungen auf. Das katalytische Wassermolekül wird in der Struktur TacTal<sup>wt</sup> + D-F6P durch Glu60 und Thr110 sowie dem C4-OH koordiniert. Die Ebene der sp<sup>2</sup>-Hybridisierung des C2 der Substrate ist nicht koplanar mit dem Stickstoff des Schiff'sche Base bildenden Lys86. Die Distorsion von bis zu 30° des sonst planaren Schiff'sche Base Intermediates wird als treibende Kraft für die Katalyse postuliert: Anhand des Michaeliskomplexes ist anzunehmen, dass eine Wasserstoffbrücke bei der Substratbindung zwischen der Carbonylfunktion und dem protonierten Asp6 ausgebildet wird. Im Anschluss wird das Alkoxid in der TacTal durch Asp6 stabilisiert [33,42].

In der Struktur der Variante TacTal<sup>F132Y</sup> ist kein katalytisches Wasser auffindbar. Dabei ist davon auszugehen, dass Tyr132 durch den erhöhten Raumbedarf dieses verdrängt hat.

Aus der Superposition wurde angenommen, dass Tyr132 in Wasserstoffbrückenreichweite für C4-OH und C2-OH liegt. Somit könnte dieser Rest bei der Protonierung von C2-OH eine katalytische Rolle übernehmen und die F6P-Aldolaseaktivität erklären [42].

Weiter ist die Kristallstruktur der Variante TacTal<sup>E60Q F132Y</sup> mit Glyceryl als Schiff'sche Base Intermediat in geschlossener Konformation beschrieben. Diese Variante besitzt die F6P- Aldolaseaktivität als Hauptaktivität. Hierbei wurde anders als in der WT-Struktur durch Cokristallisation nicht das Schiff'sche Base Intermediat mit D-F6P gelöst. Das katalytische Wassermolekül ist in gleicher Weise gebunden, wie in der FSAA (FSAA-Struktur [2]). Jedoch ist der Abstand des Wassermoleküls zum Intermediat kleiner als in der TacTal + D-F6P Struktur. Dies könnte eine Erklärung sein, warum D-F6P im TacTal<sup>wt</sup> akkumuliert ist. Der Vergleich der geschlossenen und der geöffneten Konformation zeigt, dass wichtige katalytische Reste mit gebundenem Substrat neu positioniert sind [35].

#### *Transaldolase von Francisella tularensis – TalA und Intermediate*

Die Struktur des WT der klassischen Transaldolase aus *Francisella tularensis* wurde bereits von Minasov et al. direkt in der PDB Datenbank veröffentlicht [101]. Diese weist eine ähnliche Struktur zur TalB auf: Dimere, ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>-Fasstruktur, aktives Lys am Boden des Fasses und eine RMSD von 0,63 Å über 456 C $\alpha$ -Atomen [44]. Die Strukturen der Schiff'sche Base Intermediate von D-F6P und D-S7P sowie deren nicht gebundene Komplexe in TalA<sup>K135M</sup> wurden veröffentlicht [44]. Eine planare Geometrie der kovalent gebundenen Intermediate zum aktiven Lys wurde dabei beobachtet. Die TalA durchläuft Konformationsänderungen an der Phosphatbindestelle bei Substratbindung. Die Änderung der Phosphatbindestelle ist spezifisch für die TalA und nicht essentiell für die Transaldolaseaktivität. Eine Konformationsänderung zwischen offen und geschlossen, wie für die TacTal beschrieben, wird bei Substratbindung nicht durchlaufen. Diese Unterschiede basieren auf zusätzlichen Schleifen im Vergleich zwischen der TalA und TacTal. Der Vergleich der Schiff'sche Basen mit den nicht kovalent gebundenen Substraten zeigt, dass für die Ausbildung der kovalenten Schiff'sche Basen eine Positionsänderung am C2 und eine Rotation notwendig sind. Die Interaktionen von Thr159 mit Carbonyl von C2 legt eine Beteiligung an der initialen Substratbindung durch korrekte Positionierung des Substrates für den nukleophilen Angriff nahe [44]. Die bereits gelöste Inhibitor-Kristallstruktur der TalA zeigt den Inhibitor A5P gebunden als Schiff'sche Base Intermediat. Ursächlich für die Inhibition anhand der Kristallstruktur ist die subtile Änderung des Konformationszustandes der A5P-Protein-Verknüpfung [43].

**Tab. 1.3: Übersicht über relevante Kristallstrukturen von Transaldolasen**-<sup>1</sup> Strukturen wurden nicht in der PDB-Datenbank [102] veröffentlicht.

Struktur	Auflösung [Å]	PDB-Code	Quelle
<b>Transaldolase von <i>E. coli</i> (TalB)</b>			
TalB <sup>wt</sup>	1,87	1ONR	[3]
TalB <sup>wt</sup> als Schiff'sche Base	2,20	1UCW	[5]
Intermediat mit DHA			
TalB <sup>D17A</sup>	2,05	1I2P	[6]
TalB <sup>N35A</sup>	2,05	1I2N	[6]
TalB <sup>E96A</sup>	2,05	1I20	[6]
TalB <sup>T156A</sup>	2,05	1I2Q	[6]
TalB <sup>S176A</sup>	2,05	1I2R	[6]
TalB <sup>F178Y</sup>	1,40	3CWN	[1]
TalB <sup>F178Y R181E</sup>	1,90	3KOF	[39]
<b>Humane Transaldolase (hTal)</b>			
hTal <sup>wt</sup>	2,45	1F05	[36]
<b>Transaldolase von <i>Bacillus subtilis</i> (BsTal)</b>			
BsTal <sup>wt</sup>	1,9	3R8R	[41]
<b>Transaldolase von <i>Francisella tularensis</i> (TalA)</b>			
TalA <sup>wt</sup>	1,85	3IGX	[101]
TalA <sup>wt</sup> + Acetat	1,80	4E0C	[44]
TalA <sup>wt</sup> als Schiff'sche Base	2,00	3TK7	[44]
Intermediat mit D-F6P			
TalA <sup>wt</sup> als Schiff'sche Base	1,65	3TNO	[44]
Intermediat mit D-S7P			
TalA <sup>K135M</sup> im Komplex mit D-F6P	1,80	3TE9	[44]
TalA <sup>K135M</sup> im Komplex mit D-S7P	1,50	3TKF	[44]
TalA <sup>wt</sup> als Schiff'sche Base	1,50	3UPB	[43]
Intermediat mit A5P			
<b>Transaldolase von <i>Thermoplasma acidophilum</i> (TacTal)</b>			
TacTal <sup>wt</sup>	1,78	3S0C	[33]
TacTal <sup>wt</sup> als Schiff'sche Base	1,80	3S1V	[33]
Intermediat mit D-F6P			
TacTal <sup>wt</sup> als Schiff'sche Base	1,65	3S1X	[33]
Intermediat mit D-S7P			
TacTal <sup>K86A</sup> als Michaeliskomplexe	2,0	- <sup>1</sup>	[42]
Intermediat mit D-F6P			
TacTal <sup>F132Y</sup>	1,8	- <sup>1</sup>	[42]
TacTal <sup>E60Q F132Y</sup> als Schiff'sche Base	1,80	4XZ9	[35]
Base Intermediat mit DHA			

## 5.4.2 Kristallstrukturen Aldolase

### *Fructose-6-phosphat-Aldolase A von E. coli – FSAA*

Die Struktur des Modellenzym FSAA aus *E. coli* zeigt eine  $(\beta/\alpha)_8$ -Fassstruktur. Den Start bildet der  $\beta$ 1-Strang und somit besitzt die Struktur keine  $\alpha$ -Helix, die auf das Monomer zurückgefaltet ist. Das Schiff'sche Base bildende Lys85 ist auf dem  $\beta$ 4-Strang lokalisiert. Lys85 liegt kovalent modifiziert nach der Elektronendichte vermutlich durch D-GA als Carbinolamin vor. Denkbar ist, dass D-GA durch Oxidation von Glycerin aus dem Kristallisationsmedium entsteht und D-GA wurde nicht zugesetzt. Das katalytische Wassermolekül bildet Wasserstoffbrücken zu Gln59, Thr109 und Tyr132 aus. Die C-terminale  $\alpha$ C-Helix zeigt vom Monomer weg und bildet wichtige Interaktionen zwischen zwei Nachbarmonomeren aus, wobei das Aktive Zentrum teilweise abgeschirmt wird (siehe Abb. 1.11 bezüglich der Sekundärstrukturelemente). Die Interaktionen sind dabei überwiegend hydrophob. Die quartäre Struktur wird durch zwei Ringe bestehend aus fünf Untereinheiten beschrieben. Dabei sind die beiden Pentamere etwas um  $18^\circ$  in Bezug zueinander gedreht. Das so entstehende kompakte und dicht gepackte Dekamer besitzt einen inneren Kanal mit einem Durchmesser von  $30 \text{ \AA}$  [2].

### *Fructose-1,6-bisphosphat Aldolase Klasse I aus dem Kaninchenmuskel – RAMA*

Das  $\beta$ -Fasszentrum und die tetramere Struktur der RAMA wurde erstmals von Sygusch et al. beschrieben [103]. Inzwischen ist die Struktur RAMA mit einer besseren Auflösung von  $1.80 \text{ \AA}$  verfügbar [100]. Für die RAMA ist die Struktur als Schiff'sche Base Intermediat mit Fructose-1,6-bisphosphat (FBP) sowie RAMA in Komplex mit Tagatose-1,6-bisphosphat gelöst. Bei dem Tagatose-1,6-bisphosphat sind nur die Phosphatgruppen sichtbar. Die Struktur des gebundenen FBP gibt weiteren Aufschluss über die mechanistische Rolle als genereller Säure-Base-Katalysator von Glu187, welcher benachbart zum Schiff'sche Base bildenden Lys229 positioniert ist [100]. Das C-terminale Tyr363 agiert über ein konserviertes Wassermolekül in der RAMA im Zusammenspiel mit Glu187 ebenfalls als Säure-Base-Katalysator [104]. Die RAMA durchläuft eine Konformationsänderung durch die Substratbindung und weist damit einen *induced-fit* Mechanismus auf. Die Überlagerung der Schiff'sche Base Strukturen von RAMA + FBP und TalB + DHA sind in Bezug auf den Liganden einheitlich [100].



### Archäale Fructose-1,6-bisphosphat Aldolase Klasse I von *Thermoproteus tenax* – TtFBPA

Neben der RAMA sind verschiedene archäale FBPA Strukturen aus *Thermoproteus tenax* (TtFBPA) bekannt. Die archäale TtFBPA bildet wie die klassischen FBPA eine  $(\beta/\alpha)_8$ -Fassstruktur aus. Die quartäre Struktur lässt sich durch ein Dimer aus Pentameren beschreiben [105]. Zur Lösung der Intermediatstrukturen mit FBPA wurde das *Soaking* Verfahren angewendet. In der Variante TtFBPA<sup>Y146F</sup> wurde die Struktur des Carbinolamins von FBA gelöst. Als geschlossene, nicht kovalent gebundene Ringstruktur wurde FBA in der TtFBPA<sup>W144E Y146F</sup> erhalten [106]. Tyr146 befindet sich an der äquivalenten Position zu dem katalytischen Glu von eukaryotischen FBPA und ist somit ein plausibler Kandidat als Protonendonator [105]. Die Variante TtFBPA<sup>Y146F</sup> und deren Kristallstruktur belegt, dass Tyr146 essenziell für die katalytische Umwandlung des Carbinolamins in eine Schiff'sche Base ist. Von der Positionierung ist Tyr146 jedoch zu weit entfernt, um ebenfalls eine Rolle bei der C3-C4-Spaltung zu spielen. Für diese Funktion steht der konservierte Rest Asp33 zur Diskussion [105,106]. Die Struktur von FBPA als Ring lässt das Postulat zu, dass die Ringöffnung enzymatisch katalysiert wird [106].

**Tab. 1.4: Übersicht über relevante Kristallstrukturen von Aldolasen**

Struktur	Auflösung [Å]	PDB-Code	Quelle
<b>Fructose-6-phosphat-Aldolase A von <i>E. coli</i> (FSAA)</b>			
FSAA <sup>wt</sup>	1,93	1L6W	[2]
<b>Humane Fructose-1,6-bisphosphat Aldolase Klasse I aus dem Muskel (hFBPA)</b>			
hFBPA	2,00	1ALD	[99]
<b>Fructose-1,6-bisphosphat Aldolase Klasse I aus dem Kaninchenmuskel (RAMA)</b>			
RAMA	1,80	1ZAH	[100,103,104]
RAMA als Schiff'sche Base Intermediat mit FBPA	1,76	1ZAI	[100]
RAMA in Komplex mit Tagatose-1,6-bisphosphat	1,89	1ZAL	[100]
<b>Archäale Fructose-1,6-bisphosphat Aldolase Klasse I von <i>Thermoproteus tenax</i> (TtFBPA)</b>			
TtFBPA	1,90	1OJX	[105]
TtFBPA <sup>Y146F</sup> als Carbinolamin mit FBPA	1,93	2YCE	[106]
TtFBPA <sup>W144E Y146F</sup> mit FBPA in zyklischer Form	1,85	1W8S	[106]

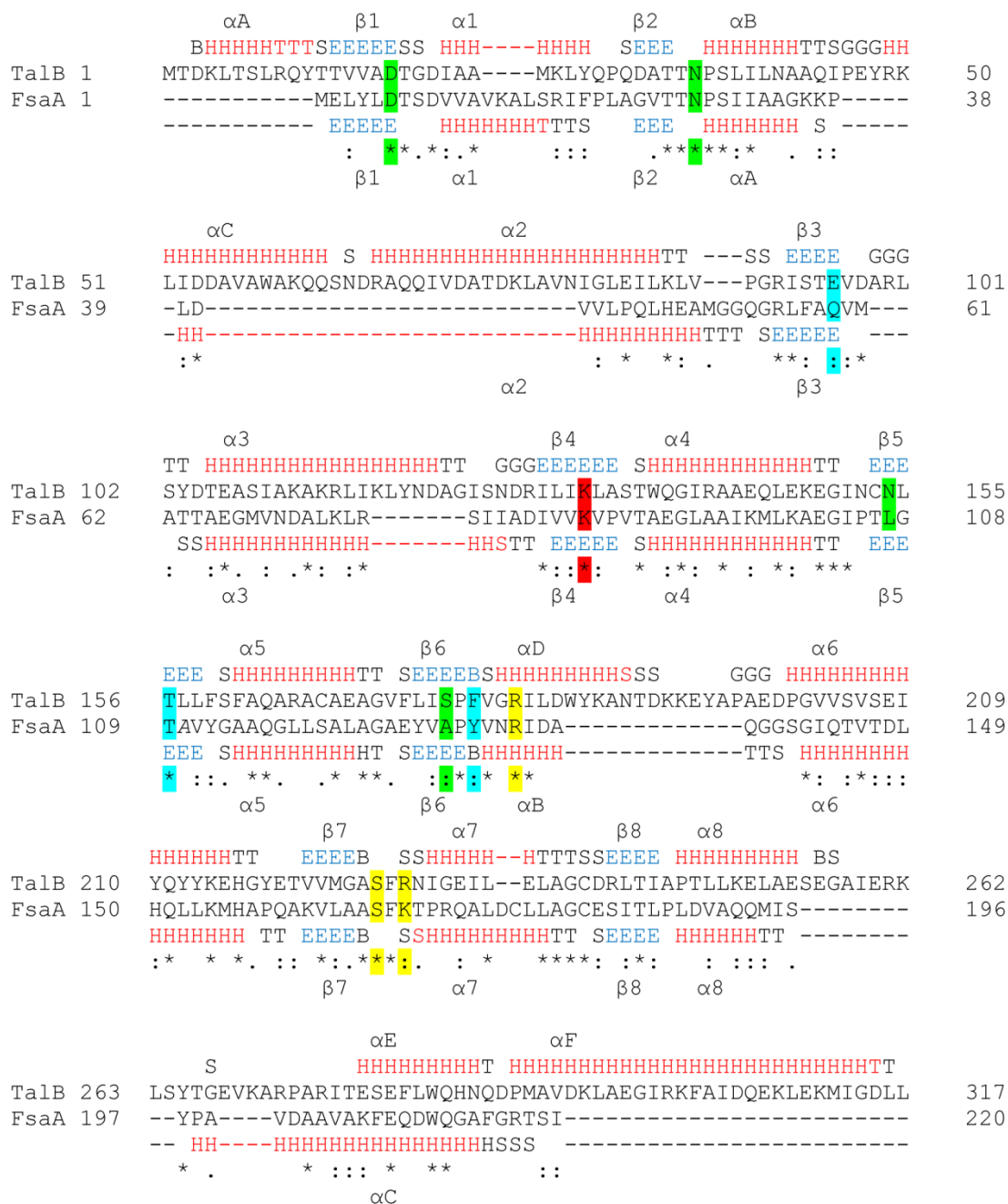
## 5.5 Gegenüberstellung von Transaldolase und Fructose-6-phosphat-Aldolase

Die Modellenzyme TalB [23] und FSA [49] von *E. coli* gehören den unterschiedlichen Enzymklassen der Transferasen und der Lyasen an. In diesem Abschnitt soll der Stand der Literatur zu ihren Gemeinsamkeiten und den Unterschieden zwischen ihnen dargelegt werden. Der Fokus im Rahmen dieser Arbeit liegt auf den molekularen Determinanten für die Unterschiede im Reaktionstyp.

### 5.5.1 Gemeinsamkeiten der TalB und der FSA

Die Transaldolasen und Aldolasen (Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolasen, FBPA) zeigen einen analogen strukturellen Aufbau. Zudem sind sich die Substrate und der enzymatische Mechanismus ähnlich. Dies weist auf einen gemeinsamen Vorfahren und eine starke Ähnlichkeit der Enzymfamilien hin. Die Transaldolase hat sich durch eine zirkuläre Permutation aus der FBPA entwickelt oder umgekehrt. Hierdurch ist das katalytische Lys in den Transaldolasen nicht mehr auf dem  $\beta 6$  Strang wie bei den Aldolasen der Klasse I sondern auf dem  $\beta 4$  Strang lokalisiert [3].

Die Transaldolase TalB und die Fructose-6-phosphat-Aldolase FSA weisen eine ähnliche 3D-Struktur, eine hohe Sequenzübereinstimmung und Gleichheiten in der Topologie des Aktiven Zentrums auf [2]. Die in dieser Arbeit ermittelte Sequenzübereinstimmung liegt bei 27 % (siehe Abb. 1.11). Die Konservierungsanalyse der SF1 und SF5 basierend auf der TALED [48] ergab, dass die Reste im Aktiven Zentrum stärker konserviert sind (persönliche Mitteilung Lorenz, siehe Tab. 1.5). Beide Enzyme bilden eine  $(\beta/\alpha)_8$ -Fassstruktur aus [3]. Die RMSD der beiden Proteinstrukturen über 183 C $\alpha$ -Atome beträgt 1,40 Å und weist einen Z-score von 21,9 auf. Zudem ist in beiden Enzymen das aktive Lys auf dem  $\beta 4$ -Strang lokalisiert (rot markiertes Lys in Abb. 1.11) [3]. Die katalytischen Lysinreste sind im Sequenzalignment mit Vorhersage für die Sekundärstruktur rot markiert (siehe Abb. 1.11). Dies weist auf eine höhere Ähnlichkeit der beiden Modellenzyme hin als zu anderen Klassen von Aldolasen. Zudem deutet dies auf eine weiter entfernte Verwandtschaft von FSAs und FBPA im Vergleich zu den Transaldolasen hin [2]. Final kann postuliert werden, dass FSAs eine SF der Transaldolasen mit F6P-Aldolaseaktivität darstellen [37].



**Abb. 1.11: Sequenzvergleich von FSA und TalB**

Start ist der N-Terminus der Aminosäuresequenzen und der C-Terminus bildet das Ende  
 Sequenzidentität 27 %, Clustal Omega [107,108]

Vorhersage für Sekundärstruktur (DSSP[109]):

B: β-Brücke, E: β-Strang, H: α-Helix, G: 3/10-Helix, S: Bogen, T: Turn;

Sekundärstruktur (aus den Kristallstrukturen [2,3,41]): rot – α-Helix, blau – β-Strang

grün: weitere AS des Aktiven Zentrums

gelb: AS der Phosphatbindungstasche,

blau: Koordination kat. Wasser, F178 in TalB durch Wasserkoordination in FSA Y131 blau

rot: katalytisches Lys

Beide Mechanismen verlaufen über ein Schiff'sche Base Intermediat [23,49]. TalB und FSAA sind in der Lage, die Substrate D-GAP, D-F6P und D-S7P umzusetzen [23,37]. Die Funktionen der katalytischen Reste wurden durch Sequenz- und Strukturvergleiche sowie Mutagenesestudien auf die FSAA übertragen [2,49,78]. Studien zur Erweiterung des Substratspektrums der FSAA zeigen die Funktionen und Einflüsse von Leu163 und Ala165 (nicht in Abb. 1.11 hervorgehoben). Folgende Reste übernehmen dabei die gleiche katalytische Funktion (Übersicht in Tab. 1.5):

#### *Asp17 in der TalB und Asp6 in der FSAA*

Für Asp17 werden Wasserstoffbrückenbindungen zu C3-OH und C4-OH angenommen (grün markierter Rest in Abb. 1.11, [5]). Als katalytische Funktion ist Asp17 Protonenakzeptor des Schiff'sche Base Intermediates an C4-OH. Diese Deprotonierung entspricht Schritt 4 und führt zur Spaltung der C-C-Bindung (siehe Abb. 1.3, [3,5,6]). Zudem wird eine stabilisierende Funktion des Carbanion/Enamin Intermediates angenommen [6]. Des Weiteren wird Asp17 eine Beteiligung bei der Bindung des Akzeptorsubstrates zugeschrieben [30].

#### *Thr33 in der TalB und Thr26 in der FSAA*

In der FSAA wird Asp6 (siehe oben) optimal für die Substratbindung durch eine Wasserstoffbrücke von Thr26 ausgerichtet [91]. In der TalB befindet sich hier das Thr33, welches diese Funktion der Ausrichtung von Asp17 ebenfalls erfüllen könnte.

#### *Asn35 in der TalB und Asn28 i der FSAA*

Bei der Substratbindung ist neben Asp17 der aktive Rest Asn35 beteiligt (grün markierter Rest in Abb. 1.11). Dieser bildet ebenfalls eine Wasserstoffbrückenbindung zu C3-OH aus [3,5]. Teilweise wird Asn35 eine Beteiligung an der Bindung des aktiven Wassermoleküls zugeschrieben, da das Wassermolekül in der Elektronendichteverteilung der Kristallstruktur von TalB<sup>N35A</sup> nicht definiert ist [6].

*Lys132 in der TalB und Lys85 in der FSAA*

Der katalytisch aktive und invariante Rest ist Lys132. An diesem Lys läuft der Mechanismus ab und daher sind hier die verschiedenen Intermediate kovalent gebunden (rot markiertes Lys in Abb. 1.11, [3,5]).

*Thr156 in der TalB und Thr109 in der FSAA*

Thr156 stabilisiert während der Katalyse die negative Ladung des Alkoxides (siehe Abb. 1.3). Die weitere Funktion von Thr ist die Wasserstoffbrückenbindung zum katalytischen Wasser (blau markierter Rest in Abb. 1.11, [5,6]).

*Arg181/Ser226 in der TalB und Arg134/Ser155 in der FSAA*

Bei der Bindung der Phosphatgruppe sind Arg181 und Ser226 in beiden Modellenzymen beteiligt (gelb markierter Rest in Abb. 1.11). Insgesamt bilden drei Reste die Phosphattasche, wobei sich ein Rest zwischen TalB und FSAA unterscheidet [3]

*Met222 in der TalB und Leu163 in der FSAA*

Das Leu163 stellt in der FSAA eine Platzrestriktion bezüglich der Substrate dar [89]. Ein entsprechendes Met222 in der TalB könnte ähnliche Restriktionen bewirken.

*Ala225 in der TalB und Ala165 in der FSAA*

An der Akzeptor-Bindetasche ist in der FSAA Ala165 beteiligt [67]. Ala225 in der TalB könnte ebenfalls beteiligt sein.

**Tab. 1.5: Übersicht über die katalytischen Reste der FSAA und TalB**

Aufgeführt sind die Funktionen und die Konservierung der Aminosäurereste [2,3,5,6,29,32,49,67,89,91]. Die entsprechenden Reste der FSAA im Vergleich zur TalB wurden über Strukturalignment (FSAA, PDB Code 1L6W [2] und TalB PDB 1ONR [3],) bestimmt. Konservierungsanalyse der SF1 basierend auf der TALED mit 1185 Transaldolasesequenzen und der SF5 basierend auf der TALED [48] mit 246 Sequenzen (persönliche Mitteilung Lorenz).

<u>TalB</u>			<u>FSAA</u>		
Konserv. [%]	Rest	Funktion		Rest	Konserv. [%]
95	Asp17	Wasserstoffbrücke zur Hydroxylgruppe des C3-OH und C4-OH – Positionierung des Substrates, Deprotonierung zur Bildung des Schiff'sche Base Intermediates (Schritt 4), Stabilisierung Carbanion/Enamin, Bindung des Akzeptorsubstrates		Asp6	98
97	Thr33	Wasserstoffbrücke zu Asp17 für optimale räumliche Ausrichtung von Asp17		Thr26	99
97	Asn35	Wasserstoffbrücke zur Hydroxylgruppe des C3-OH, Bindung katalytischen Wasser		Asn28	99
93	Glu96	Wasserstoffbrücke zum katalytischen Wasser, Säure-Base-Katalysator – Protonentransfer	Wasserstoffbrücke zum katalytischen Wasser	Gln59	99
100	Lys132	Schiff'sche Base Intermediat bildendes Lys		Lys85	100
93	Asn154	Wasserstoffbrücke zur Hydroxylgruppe des C1-OH, Bindung Donorsubstrat	-	Leu107	76
99	Thr156	Wasserstoffbrücke zum katalytischen Wasser Stabilisation Alkoxid		Thr109	100
96	Ser176	Wasserstoffbrücke zur Hydroxylgruppe des C1-OH, Bindung Donorsubstrat	-	Ala129	99
93	Phe178	-	Wasserstoffbrücke zum katalytischen Wasser	Tyr131	100
93	Arg181	Phosphatbindung		Arg134	99
88	Met222	Platzrestriktion Substrat		Leu163	90
98	Ala225	Beteiligung an der Akzeptor-Bindetasche		Ala165	99
97	Ser226	Phosphatbindung		Ser166	99
93	Arg228	Phosphatbindung		Lys168	86
72	Arg300	Dimerisierung	-		

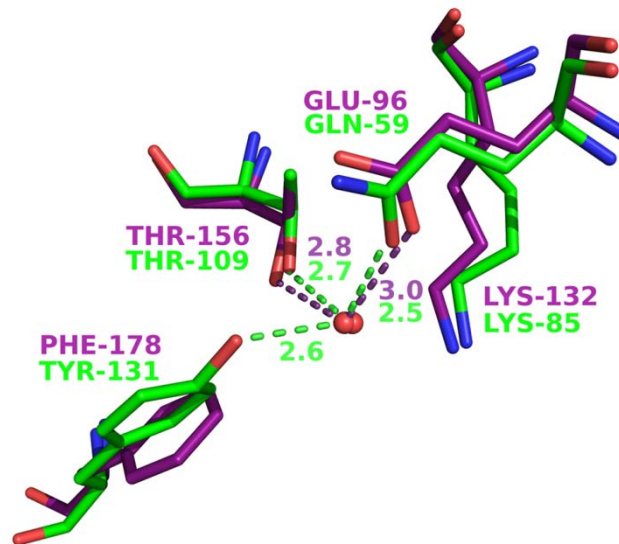
### 5.5.2 Unterschiede zwischen der TalB und der FSAA

Der größte Unterschied der beiden Modellenzyme ist ihre Spezifität im Reaktionstyp. Die TalB katalysiert den Transfer eines C<sub>3</sub>-Körpers [23], wohingegen die FSAA eine Lyase ist [49]. Hierbei weisen die Reste im Aktiven Zentrum teilweise unterschiedliche katalytische Funktion auf (die Nummerierung erfolgt anhand der Position in TalB, Übersicht in Tab. 1.5):

Für den Rest Glu96 in der TalB sind vielfältige Funktionen als genereller Säure-Basen- Katalysator beschrieben (siehe Abb. 1.3). Glu96 ist mechanistisch an der Deprotonierung des katalytischen Lysinrest und an der Protonierung des Carbinolaminintermediates beteiligt [3,5,6]. In der FSAA ist hier Gln59 lokalisiert, welcher die Funktion als Protonendonator nicht übernehmen kann (blau markierter Reste in Abb. 1.11, [2]). In der TalB sind Asn154 und Ser176 an der Bindung der Hydroxylgruppe des C1 beteiligt (grün markierte Reste in Abb. 1.11, [3,5]). Diese beeinflusst die richtige Ausrichtung des Substrates für den nukleophilen Angriff auf die Carbonylgruppe [6]. Diese beiden Reste sind in der FSAA durch die hydrophoben Aminosäurereste Leu bzw. Ala [2] substituiert. Leu und Ala gehen keine Wasserstoffbrückenbindungen ein. Die Varianten FSAA<sup>L107N</sup> und FSAA<sup>A129S</sup> sind in der Lage, eine Wasserstoffbrückenbindung zum Substrat einzugehen. Dies wird durch eine Steigerung der Donorbindung von D-F6P bestätigt [37]. Auswertungen der Kristallstrukturen zeigen, dass in FSAA und TalB die Bindestellen für nicht-phosphorylierte Donoren sich unterscheiden. Der Anteil an apolaren Resten überwiegt hierbei in der FSAA [12]. Die Phosphatbindetasche ist zwischen TalB und FSAA unterschiedlich aufgebaut (gelb markierte Reste in Abb. 1.11). Die Reste Arg181 und Ser226 entsprechen sich. Jedoch ist an der Stelle von Arg228 in der TalB ein Lys168 in der FSAA lokalisiert [2,3]. Aldolasen und Transaldolasen unterscheiden sich an dieser Stelle. Eine Abnahme der Affinität für phosphorylierte Substrate ist in TalB durch Lys168 nicht auszuschließen [2].

In beiden Enzymen ist im Aktiven Zentrum ein Wassermolekül an gleicher Position gebunden (siehe Abb. 1.12, [2]). Dieses Wassermolekül ist durch seine Beteiligung am Protonentransfer in der TalB von zentraler Bedeutung für die Katalyse (siehe Abb. 1.3). Das katalytische Wassermolekül ist in der TalB durch die zwei Reste Glu96 und Thr156 koordiniert [5,6]. In der FSAA bilden die drei Reste Gln59, Thr109 und Tyr131 Wasserstoffbrücken zum aktiven Wassermolekül aus (blau markierte Reste in Abb. 1.11, [2]). An der Stelle von Tyr131 in der FSAA ist in der TalB ein Phe zu finden. Dieser kann nicht am Netzwerk partizipieren. Die Bindung des Wassermoleküls und dessen Funktion

kann die Reaktivität wie beispielweise die Stabilität des Schiff'sche Base Intermediates beeinflussen. Somit könnte das H-Brückennetzwerk kontrollieren, ob Transaldolase- oder Aldolaseaktivität vorliegt [2]. Der Austausch von Phe178 zu Tyr in der TalB resultiert in der Einführung einer F6P-Aldolaseaktivität im Transaldolasegrundgerüst und bestätigt die Bedeutung [1].



**Abb. 1.12: H-Brückennetzwerk des katalytischen Wassers im Aktiven Zentrum**

In FSAA (grün, PDB Code 1L6W [2]) bilden die Reste Gln59, Thr109 und Tyr131 H-Brücken zum Wassermolekül aus. Im Gegensatz dazu besteht das H-Brückennetzwerk in der TalB (lila, PDB Code 1UCW [5]) aus den zwei Resten Glu96 und Thr159.

Des Weiteren unterscheiden sich beide Enzyme bei der Stereoselektivität der katalytisch neugeknüpften C-C-Bindung. TalB ist strikt *3S,4R* stereoselektiv [23], wohingegen bei FSAA die Stereoselektivität vom Substrat abhängt [57].

Strukturell unterscheiden sich die beiden Enzyme in ihrer quartären Struktur. Im Dimer der TalB ist vor allem das Arg300 an den Wechselwirkungen zwischen den beiden Monomeren beteiligt [3,32]. Zudem ist die C-Terminal  $\alpha$ E-Helix über die jeweilige Untereinheit zurückgefaltet [3]. In der FSAA hingegen geht die C-terminale  $\alpha$ C-Helix hydrophobe Wechselwirkungen mit dem Nachbarmonomer ein. Diese ist die strukturelle Basis zur Ausformung von Pentameren. Weiter bilden die beiden Pentamere der FSAA ein Dekamer aus, wodurch die Oberfläche eines Monomers mit 34 % dicht bedeckt ist. Durch die Deletion von vier  $\alpha$ -Helices und verschiedenen längeren Schleifen ist das Monomer der FSAA im Vergleich zur TalB kompakter. Dies soll ursächlich für die Thermostabilität der FSAA sein [2].



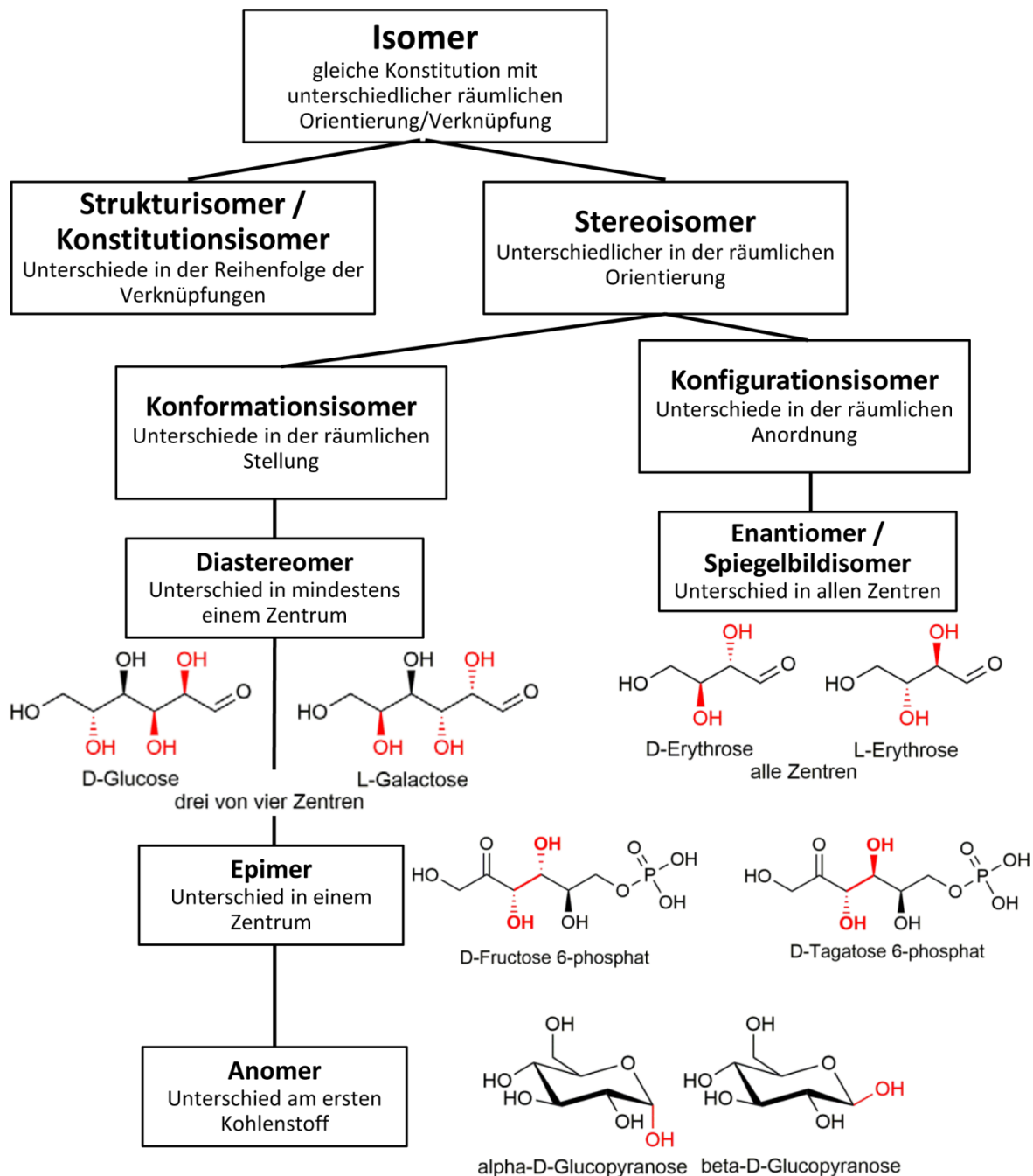
## 5.6 Strukturelle Analoga

D-F6P stellt für die Modellenzyme TalB [23] und FSAA [49] von *E. coli* ein Produkt dar. Die zwei neu gebildeten Stereozentren von D-F6P oder D-S7P weisen die Stereokonfiguration  $3S,4R$  auf [23,49]. Isomere Moleküle mit gleicher Summenformel werden unterschieden in Konstitutionsisomere und Stereoisomeren. Moleküle mit gleicher Konstitution (gleiche Anzahl und Art der Bindungen) besitzen mindestens ein stereogenes Zentrum, wodurch die räumliche Anordnung der Atome nicht zur Deckung gebracht werden kann (siehe Abb. 1.13). Ist die Reihenfolge der Atome identisch, die räumliche Orientierung hingegen unterschiedlich, spricht man von Stereoisomeren. Unterscheiden sich nicht alle stereogenen Zentren in ihrer räumlichen Stellung, spricht man von Diastereomeren, beispielsweise D-Glucose und L-Galactose. Zwischen D-F6P und dem räumlich anders orientierten D-Tagatose-6-phosphat (D-T6P) mit  $3S,4S$  Konfiguration ist der Unterschied nur ein Stereozentrum. Sie sind daher Epimere, eine Sonderform der Diastereometrie. Im Unterschied zu den Konformationsisomeren ist bei der Konfigurationsisomerie die räumliche Anordnung entscheidend. Bei Enantiomeren, auch Spiegelbildisomere, unterscheiden sich die Stereoisomere in allen Zentren [110].

Für die industrielle Applikation ist es wünschenswert, dass ähnlich zu den DHAP-Aldolasen (siehe 5.3.1) alle vier möglichen Stereoisomere zugänglich sind. Unbekannt ist was die Limitierung der Selektivität hervorruft. Für die Anwendung des Rationalen Designs, um jede spezifische Stereokonfiguration zugänglich zu machen, wäre ein breiterer Kenntnisstand wünschenswert. Eine Ausnahme für DHAP-verwendende Aldolasen stellt die TagA dar. Diese ist in der Lage neben der  $3S,4S$  Konfiguration mit manchen Akzeptoren auch Produkte mit  $3S,4R$  Konfiguration zu synthetisieren [11].

Die Untersuchungen zur Ligandenbindung von D-T6P sind aufgrund der Epimerie zu D-F6P geeignet, um weitere Informationen über die Stereoselektivität zu generieren. Bislang ist keine Aldolase bekannt, die D-T6P bilden oder spalten kann. Beschrieben war, dass gezielte Sättigungsmutagenese auf Basis der Variante TalB<sup>F178Y</sup>, die F6P-Aldolaseaktivität besitzt, mit anschließendem Screening der Mutantenbanken keinen Treffer für ein Mutein mit  $3S,4S$  Stereoselektivität lieferte [97]. Hierbei wurde von Samland [97] zum einen auf Retro-Aldolaktivität (Spaltung des potenziellen Substrates D-T6P) analysiert. Dazu wurde ein gekoppelter Enzymassay mit der GAP-Dehydrogenase und Diaphorase zum farblichen Nachweis der Bildung von D-GAP verwendet. Zum anderen wurde die Aldolaktivität (Bildung von D-T6P) mit Hilfe der

Galactitol-1-phosphat-5-Dehydrogenase (GalT) untersucht. Für die Transaldolase TalB und deren Variante(n) stellt D-T6P ebenfalls kein Substrat dar [97].



**Abb. 1.13: Verschiedene Arten von Isomerie und Stereokonfiguration**

In rot markiert sind die entscheidenden Stereokonfigurationen. Eine Ausnahme stellen die C6-Zuckerphosphate dar, in denen die C3- und C4-Stereokonfiguration rot markiert Abb. 1.13 ist. Bei den Epimeren ist die Konfiguration an C4 entscheidend.

Die Auswirkungen von D-T6P auf die Transaldolaseaktivität von TalB<sup>wt</sup> und der Variante TalB<sup>F178Y</sup> sind bereits beschrieben [29]. Dabei stellt D-T6P für die TalB<sup>F178Y</sup> einen irreversiblen Inhibitor dar. Bei einem 10-fachen Überschuss an D-T6P war die Transferreaktion zur Bildung von D-S7P und D-GAP nach 24 h auf 21 % der Ausgangsaktivität vermindert. Eine Verdünnung und weitere Inkubation konnten die

Aktivität nicht wiederherstellen. Somit liegt offenbar eine irreversible Inhibierung oder Inaktivierung vor. Das WT-Enzym zeigte auch nach 48 h Inkubation keine signifikante Inhibition. Die Retro-Aldolaktivität der TalB<sup>F178Y</sup> wurde auf 15 % der Ausgangsaktivität herabgesetzt. Auch hier konnte eine Verdünnung und erneute Inkubation die Inhibierung nicht aufheben [29]. Aufgrund der irreversiblen Inhibition wurde angenommen, dass das Epimer D-T6P an die Substratbindestellen kovalent oder extrem stark nicht-kovalent bindet. Die Bindung an das katalytische Lys132 wurde durch einen Trypsinverdau mit anschließender Massenspektrometrie im Vergleich zur TalB<sup>wt</sup> nahegelegt [29,97].



## 6 Fragestellung und Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Die Modellenzyme Transaldolase B (TalB) und Fructose-6-phosphat-Aldolase A (FSAA) von *Escherichia coli* katalysieren die Knüpfung neuer C-C-Bindungen. Dabei gehören sie den unterschiedlichen Enzymklassen der Transferasen bzw. der Lyasen an. Dennoch zeigen sie viele Gemeinsamkeiten. Beispielsweise weisen TalB und FSAA Ähnlichkeiten im Aktiven Zentrum auf, bilden Schiff'sche Base Intermediate und bilden die gleiche  $(\beta/\alpha)_8$ -Fasstruktur aus. Die Substratspektren der Enzyme ähneln sich, wobei FSAA eine ungewöhnlich breite Substrattoleranz besitzt. Als Generalist ist vor allem die FSAA ein besonders interessanter Biokatalysator.

Offen ist, welche Determinanten zwischen der Transaldolase und der Fructose-6-phosphat-Aldolase und den unterschiedlichen Reaktionstypen diskriminieren. Hierzu sollte Transaldolaseaktivität in die Fructose-6-phosphat-Aldolase eingeführt werden. Zudem sollte die Aldolaseeigenschaften der TalB<sup>F178Y</sup> [1], welche bereits Aldolaseaktivität zeigt, verbessert werden. Hierdurch könnte das Grundgerüst der Transaldolase für die Anwendung in der Biokatalyse als Aldolase attraktiver werden. Zur Untersuchung der Funktion-Strukturbeziehung und Mechanismusaufklärung wurden gezielt Veränderungen in den Enzymeigenschaften vorgenommen. Auf Basis der Informationslage der Strukturbiochemie und Bioinformatik sollte Rationales Design angewendet werden. Die Veränderung der Enzymeigenschaften sollte dementsprechend durch zielgerichtete Mutagenese hervorgerufen werden.

Die neuen Varianten sollten unter Anwendung unterschiedlicher Funktionalitätsstudien charakterisiert werden. Hierzu sollten die mutierten Enzym-kodierenden Sequenzen in geeigneten Systemen exprimiert werden. Über photometrische Bestimmungen sollten die kinetischen Parameter und  $pK_a$ -Werte des aktiven Lysinrestes der rekombinanten Proteine bestimmt werden. Hierzu sollten Enzymassays im Mikrotiterplattenmaßstab adaptiert werden. Strukturaufklärung sollte angewandt werden, um Informationen zum 3D-Aufbau und zur Stabilität der Muteine zu erhalten. Untersuchungen zur Ligandenbindung von D-Tagatose-6-phosphat, welches ein Struktur analogon zum Substrat D-F6P darstellt, sollten neue Erkenntnisse zu Inhibitoreigenschaften und Funktionalität der aktiven Reste erbringen. Hierzu sollte im ersten Schritt D-T6P synthetisiert werden. Zudem sollte die Anwendung von D-Tagatose-6-phosphat Informationen über die 3S,4R Stereospezifität von TalB und FSAA liefern.

Das Fernziel war, die erhaltenen Erkenntnisse dem *Protein Engineering* zur Verfügung zu stellen, damit neue Anwendungsmöglichkeiten für die Arzneimittelsynthese und die Grüne Biotechnologie gefunden werden können.

## 7 Materialien und Methoden

### 7.1 Chemikalien, Enzyme und Materialien

In dieser Arbeit wurden folgende Materialien am Institut für Mikrobiologie / Universität Stuttgart / Deutschland bzw. am Institut für Mikrobiologie / Universität Hohenheim / Deutschland oder am Department of Medical Biochemistry and Biophysics, Karolinska Institutet / Schweden benutzt:

Hersteller	Material
Agilent Technologies	<i>PfuUltra</i> High-Fidelity Polymerase und <i>PfuTurbo</i> Polymerase
Biomers	Primer
Biomol	Glycylglycin, NADPH (>98 %)
Bio-Rad	Agarose, Mini-Protean TGX Gele 12 %, 10 / 15 Well, Precision Plus Protein™ All Blue Standards
Boehringer Ingelheim	ATP, Glutathion red.
Carl Roth	Aceton, 30 % Acrylamid-Bisacrylamid (37,5:1), Antibiotika, BSA, Bromphenolblau, Essigsäure, Imidazol, Isopropanol, Lysozym, Mediumbestandteile, Mikroküvetten, Natriumborhydrid, o-Phosphorsäure 85 %, Puffersubstanzen und -Salze, Salzsäure
Corning	Corning 96 Well Protein Crystallization Microplate mit 3:1, Falcon 24 Well Platten steril mit Deckel
Emerald BioSystems	Wizard-Kristallisationsscreen
Fermentas	6x DNA-Ladepuffer, GeneRuler DNA-Leiter (21 DNA-Fragmente 100-10.000 bp)
GE Healthcare	Glutathion-Sepharose 4B, Q-Sepharose-Säule HP
Genaxxon	dNTPs
Gerbu	DTT, IPTG, NAD <sup>+</sup> (>97.5 %), NADH (≥93 %), NADP <sup>+</sup> (≥97 %),
Hampton Research	CryoLoop mit CrystalCap und Vial, Siliconized Glass Cover Slides
InnoSweet	D-Tagatose (kostenlose Probe)
Macherey + Nagel	NucleoSpin Plasmid Kit
Merck	Acetonitril, Agar, Bromphenolblau, CaCl <sub>2</sub> , Ethidiumbromid, Ethylenglykol (EG) / PEG, Glycylglycin, Glycin, Imidazol, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Merck-Millipore	Amicon Ultra Zentrifugen-Filtereinheiten 10 kDa, 0,45 µm Spitzenvorsatzfilter
New England BioLabs	Restriktionsenzyme, Restriktionspuffer 10x
Nippon Genetics	BlueStar Prestained Protein Marker
Pall	Nanosep 10 kDa
Prolab	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Qiagen	Ni-NTA Agarose, Kristallisationsscreens
Sarstedt	Verschiedene Plastikware
Roche	DNase I, G6PDH Grade II (Cat. No. 10127671001), PGI [111]
Sartorius	Vivaspin 10 kDa
Schralau	NaCl

<b>Hersteller</b>	<b>Material</b>
Sigma-Aldrich / Fluka	AA (≥99 %), APS, Äpfelsäure, Bariumchlorid, BSA, Coomassie Brilliant Blau R-250 / G-250, DHA (97 %), DNase I, Dowex 50Wx8, Essigsäure, Glycerin, GO, HA (≥95 %), HEPES, LiCl,
Sigma-Aldrich / Fluka	Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , L-LDH, Natriumacetat, NADH (≥94 %), NADPH (≥95 %), PEG, Pyruvatkinase, Taurin, Tetracyclin, TEMED, Thiamindiphosphat (≥95 %), TIM/ GDH , Tris(2-carboxyethyl)phosphin, Zucker/-phosphate
ThermoFisher Scientific	Coomassie Plus (Bradford) Reagent, PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, SnakeSkin Dialyseschläuche 10kDa
VWR	Essigsäure

## 7.2 Geräte und Programme

Für diese Arbeit wurden folgende Geräte und Programme am Institut für Mikrobiologie / Universität Stuttgart / Deutschland, am Institut für Mikrobiologie / Universität Hohenheim / Deutschland und am Department of Medical Biochemistry and Biophysics / Karolinska Institutet / Schweden benutzt:

<b>Hersteller</b>	<b>Geräte und Programme</b>
Agarose-Gelelektrophorese	Kammer, Mini Sub <sup>TM</sup> und Wide Mini Sub <sup>TM</sup> , Biorad Laboratories (Richmond, USA) Netzgeräte, peqPOWER E250 Power Supply, peqlab (Erlangen)
CD-Spektroskopie	715 CD-Spectropolarimeter, Jasco (Hachioji, Japan) CDSSTR via Dichroweb [112–114] OriginPro 8 (OriginLab, Northampton, Massachusetts, USA).
Datenbanken	Brenda – <a href="http://www.brenda-enzymes.org">www.brenda-enzymes.org</a> – [115] ExpASy – <a href="http://www.expasy.org">www.expasy.org</a> – [116] NCBI – <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">www.ncbi.nlm.nih.gov</a> – [117] PBD – <a href="http://www.wwpdb.org">www.wwpdb.org</a> – [102] UniProt KB – <a href="http://www.uniprot.org">www.uniprot.org</a> – [31]
DLS-Spektroskopie	W130i Instrument mit iSize 2.0, Avid Nano Ltd (High Wycombe, England)
FPLC	ÄKTApurifier mit Unicorn 5.11 Software, Amersham Bioscience / GE Healthcare (München) ÄKTA FPLC-System: UPC-900 P-920 INV-907 M-925 FRAC-900 mit Unicorn 5.01 Software; Amersham Bioscience/GE Healthcare (München) Vakuumpumpe, Vacuubrand GmbH (Wertheim)
Geldokumentation	IDA (Image Documentation & Analysis), raytest (Straubenhardt) Monitor RMB92, RainbowCCTV (Traverse City, USA) Drucker P91, Mitsubishi Electric (Ratlingen)
Inkubationsschrank	Inkubationsschrank Precision 3EG Economy Incubator, McKinley Scientific (Sparta, USA), Schüttelinkubator Infors HT, Infors AG (Bottmingen, Schweiz), Inkubationsschrank Function Line B6, Schütt Labortechnik (Göttingen) Inkubationsschrank B505E, Heraeus (Hanau)



<b>Hersteller</b>	<b>Geräte und Programme</b>
Kinetische Auswertung	SigmaPlot 9.0, Systat Software (Erkrath) Microsoft Office Excel (Redmond, USA)
Kristallisation	Crystal Phoenix, Art Robbins Instruments (Sunnyvale, USA) mosquito, ttplabtech (Melbourn, England) Freedom EVO, Tecan (Männedorf, Schweiz) RockMaker mit RockImager, Formulatrix (Bedford, USA)
Kühlgeräte	Arctis, AEG (Nürnberg) ProfiLine, Liebherr (Biberach an der Riss) Ultra Low Temperature Freezer, New Brunswick Scientific (Nürtingen)
Lyophilisator	DUO 5 M, Pfeiffer Vacuum GmbH (Asslar) Alpha I-5, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH (Osterode am Harz)
Magnetrührer	MR2000 / MR2002, Heidolph (Schwabach)
Mikroskop	Stereomikroskop Leica MZ8, Leica (Wetzlar) Intralux 600-1 Nool
pH-Meter	Basic pH Meter PB-11 mit der Einstabmesskette PY-P21, Sartorius (Göttingen) SevenEasy, Mettler Toledo (Gießen) Titrando 842, Metrohm (Herisau, Schweiz)
Photometer	Cary 50 / 100 Bio UV-Visible Spektrophotometer mit Cary WinUV Version 2.00 / 3.00 / 4.20, Varian / Agilent Technologies (Darmstadt) BioPhotometer plus, Eppendorf (Hamburg) Thermostat D3, Haake / ThermoFisher Scientific (Braunschweig) Inkubations- / Inaktivierungsbad 1002 und 1003, GFL – Gesellschaft für Labortechnik mbH (Burgwedel)
Plattenleser	Eon mit Gen5-Software, BioTek (Bad Friedrichshall)
Schüttler/ Vortexgeräte	Inkubationsschüttler, Infors HT (Einsbach) Thermomixer comfort, Eppendorf (Hamburg) Reax 200, Heidolph (Schwabach) Vortex 2 genie, Scientific Industries (New York, USA)
SDS-PAGE-Analyse	Elektrophoresekammer, Mini-PROTEAN Tetra Cell / Criterion Cell, Biorad Laboratories (München) Netzgeräte, peqPOWER E250 Power Supply, peqlab (Erlangen) Geltrockner, SLAB Dryer Model 483, Biorad Laboratories (Richmond, USA) Netzgeräte, Power Supplies Model 302, VWR (Darmstadt)
Strukturanalysen/ -modellierung/ -darstellung	CCP4 suite [118]: AIMLESS [119], MOLREP [120], Phaser [121], MOSFLM [122], XDS [123], REFMAC5 [124], MolProbity [125], PISA Servers [126], SSM Algorithmus [127], PyMol DeLano Scientific (San Francisco, USA) WinCoot 0.8.1 [128], Yasara Structure (Wien, Österreich) 14.7.17
Sequenzanalyse	ClustalX2 / W / Omega, Conway Institute (UCD Dublin, Irland) SeqMan und SeqEdit, Version 5.07, DNA Star Inc. (Madison, USA), CloneManager, Version 7, SCI-ED Software (Morrisville, USA), Jalview [129], WebLogo 3.4 [130]
Thermocycler	Tgradient, Biometra (Göttingen)

Hersteller	Geräte und Programme
Ultraschallspitze	Ultrasonic disintegrator Soniprep 150 (ThermoFisher Scientific (Braunschweig) Sonoplus HD200 mit Sonotrode UW 200/MS 73, Bandelin electronic (Berlin)
Visualisierung Mechanismen / Strukturen	ChemBioDraw, Version 14.0 CambridgeSoft Kooperation mit PerkinElmer (Waltham, USA)
Waagen	Sartorius analytic / L2200, laborata (Göttingen) AB-S / PJ3600 Delta Range, Mettler Toledo (Gießen)
Zentrifugen	Avanti J-25, Beckman (Krefeld) Centrifuge 5415C / 5417C / 5415R / 5804R, Eppendorf (Hamburg) MIKRO 22R / Rotanta 460 / Rotina 380R, Hettich (Tuttlingen) Tube-Strip Picofuge, Stratagene (La Jolla, USA) Heraeus Pico Mikrozentrifuge / Sorvall RC 5C Plus, ThermoFisher Scientific (Braunschweig)

### 7.3 Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide

In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide sind aufgeführt in Tab. 2.1 - Tab. 2.3.

**Tab. 2.1: Verwendete *E. coli* Stämme mit relevanten Genotypen und Marker**

Bakterienstämme	Relevante Genotypen/Marker	Referenz/Herkunft
XL1Blue	recA1, endA1, gyrA96, thi-1 hsdR17 (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> , m <sub>B</sub> <sup>+</sup> ), supE44, relA1 lac [F', proAB <sup>+</sup> , lacI <sup>q</sup> ZΔM15 Tn10 (Tet <sup>R</sup> )]	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
DH5α	F <sup>-</sup> , φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(r <sub>k</sub> <sup>-</sup> , m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ), phoA, supE44, λ <sup>-</sup> , thi <sup>-</sup> 1, gyrA96, relA1	[131]
BL21 (DE3) Star pLysS	F <sup>-</sup> ompT hsdSB (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) gal dcm rne131 (DE3) pLysS (Cam <sup>R</sup> )	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
LJ110 (DE3) talA <sup>-</sup> , talB <sup>-</sup> , pLysS RARE2	alias W3110, wild-type K-12, prototroph, DE3, talA <sup>-</sup> , talB <sup>-</sup> , pLysS RARE2	[1]
Rosetta (DE3) pLysS RARE2	F <sup>-</sup> ompT hsdSB(r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) gal dcm (DE3) pLysS (Cam <sup>R</sup> )	Novagen – Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland

Tab. 2.2: Verwendete und konstruierte Plasmide

Plasmide	Beschreibung	Referenz/Herkunft
pET16b	P <sub>T7</sub> , Amp <sup>R</sup> , ori <sub>pBR322</sub> , lacI, N-term. 10xHis	Novagen – Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
pET22b(+)	P <sub>T7</sub> , Amp <sup>R</sup> , lacI	Novagen – Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
pGEXTN*	alias pGEX4T2: P <sub>tac</sub> , Amp <sup>R</sup> , ori <sub>pBR322</sub> , lacI <sup>q</sup> , N-term GST-Tag mit TEV- Spaltungsstelle (ENLY FQ↓G) zwischen dem GST-Tag (234 Aminosäuren, 27 kDa) und dem ORF, NdeI Restriktionsenzymchnittstelle anstatt einer NcoI Schnittstelle	[39]
pJF119EH	P <sub>tac</sub> , Amp <sup>R</sup> , lacI	[132]
pJF119kan	pJF119EH mit zusätzlicher Kan <sup>R</sup> Kassette (XbaI/XhoI)	[29]
pLysS RARE2	lacI, Cam <sup>R</sup> , p15A ori, tRNA Gene: proL, leuW, metT, argW, thrT, glyT, tyrU, thrU	Novagen, EMD Millipore Chemicals, Billerica, MA USA; [133]
pET9tev	tev Gen (741 bp) in pET9d (NcoI/BamHI)	[134]
pET16fsaA	fsaA Gen (717 bp) in pET16b (NcoI/NdeI)	[58]
pET22bfsaA	fsaA Gen von <i>E. coli</i> K12 (strain MC4100) mit N-term. 6xHis	[53]
pET22bfsaA Q59E	fsaA Q59E Gen mit N-term. 6xHis	[4]
pET22bfsaA A129S	fsaA A129S Gen mit N-term. 6xHis	diese Arbeit
pET22bfsaA Y131F	fsaA Y131F Gen mit N-term. 6xHis	[4]
pET22bfsaA Y131L	fsaA Y131L Gen mit N-term. 6xHis	diese Arbeit
pET22bfsaA Q59E Y131F	fsaA Q59E Y131F Gen mit N-term. 6xHis	[4]
pET22bfsaA Q59E Y131L	fsaA Q59E Y131L Gen mit N-term. 6xHis	diese Arbeit
pET22bfsaA Q59E A129S Y131F	fsaA Q59E A129S Y131F Gen mit N-term. 6xHis	diese Arbeit
pET22bfsaA Q59E Y112F Y131F	fsaA Q59E Y112F Y131F Gen mit N-term. 6xHis	diese Arbeit
pET22bfsaA Q59E Y131F N133G	fsaA Q59E Y131F N133G Gen mit N-term. 6xHis	diese Arbeit

Plasmide	Beschreibung	Referenz/Herkunft
pET22b <i>fsaA</i> Q59E A129S Y131F N133G	<i>fsaA</i> Q59E A129S Y131F N133G Gen mit N-term. 6xHis	diese Arbeit
pET22b <i>tktA</i>	<i>tktA</i> Gen aus <i>E. coli</i> LJ110 mit C-term. 6xHis (NdeI/XhoI)	[135]
pET28 <i>gatD</i>	<i>gatD</i> Gen (1020 bp) aus <i>E. coli</i> W3110 N-term. 6xHis (NdeI/EcoRI)	[29]
pET28 <i>gldA</i>	<i>gldA</i> Gen (1104 bp) aus <i>E. coli</i> LJ110 (DE3) (NdeI/BamHI)	[39]
pGEXTN* <i>hTal</i>	<i>taldo1</i> cDNA (1717 bp) mit N-term. GST-Tag in pGEXTN* (NdeI/SmaI)	[39]
pGEXTN* <i>hTal</i> F189Y	<i>taldo1</i> F189Y cDNA (1716 bp) mit N-term. GST-Tag	[39]
pJF119 <i>frk</i>	<i>frk</i> Gen aus <i>Zymomonas mobilis</i> in pJF119EH (KpnI/BamHI)	[39]
pJF119 <i>talB</i>	<i>talB</i> Gen aus <i>E. coli</i> W3110 amplifiziert mit N-term. 6xHis	[39]
pJF119 <i>talB</i> F178Y	<i>talB</i> F178Y Gen mit N-term. 6xHis	[39]
pJF119 <i>talB</i> E96Q	<i>talB</i> E96Q Gen mit N-term. 6xHis	[4]
pJF119 <i>talB</i> E96Q F178Y	<i>talB</i> E96Q F178Y Gen mit N-term. 6xHis	[4]

**Tab. 2.3: Oligonukleotide für zielgerichtete Mutagenese und Sequenzierung**

**Teil I - Oligonukleotide für zielgerichtete Mutagenese**

Ausgetauschte Nukleotide sind fett gedruckt. Restriktionsstellen sind unterstrichen. For – forward, rev – reverse

Name	Sequenz	Schnittstelle/ -muster	Vorlage
FSAA Q59E for	5'-TGCC <b>G</b> AGGTAATGGCTACCACTGC C-3'	-	<i>fsaA</i>
FSAA Q59E rev	5'-CATTACCT <b>C</b> GGCAAACAGACGCCCC -3'	-	<i>fsaA</i>
FSAA Y112F for	5'-CCGACGCTGGG <b>T</b> ACCGCGGTATTT GGCGC-3'	<i>KpnI</i> -Stelle	<i>fsaA</i> Q59E Y131F
FSAA Y112F rev	5'-CTTGTGCTGCGCC <b>A</b> AATACCGCGG <b>T</b> ACCCAG-3'	<i>KpnI</i> -Stelle	<i>fsaA</i> Q59E Y131F
FSAA A129S for	5'-GGCAGGTGCGGAATATGTTTCGCCT TACG-3'	-	<i>fsaA</i>
FSAA A129S rev	5'-CAATACGATTAACGTAAGGCG <b>A</b> AAC ATATTC-3'	-	<i>fsaA</i>

Name	Sequenz	Schnittstelle/ -muster	Vorlage
FSAA A129S Y131F for	5'-GGCAGGTGCGGAATATGT <b>GTCGCC</b> TTTCG-3'	-	fsaA Q59E
FSAA A129S Y131F rev	5'-CAATACGATTAACG <b>AAAGGCGACAC</b> ATATTC-3'	-	fsaA Q59E
FSAA A129S Y131F for	5'-GGCAGGTGCGGAATATGT <b>GTCGCC</b> TTTCG-3'	-	fsaA Q59E Y131F N133G
FSAA A129S Y131F rev	5'- <b>CG</b> ATACG <b>ACCAACGAAAGGCGACA</b> CATATTC-3'	-	fsaA Q59E Y131F N133G
FSAA Y131F for	5'-GAATATGT <b>GGCGCCTTTCGTTAATC</b> GTATTGATG-3'	KasI-Muster	fsaA
FSAA Y131F rev	5'-GATTAACG <b>AAAGGCGCC</b> CACATATTC CGCACCTG-3'	KasI-Muster	fsaA
FSAA Y131L for	5'-GCGGAATATGTTG <b>CTCCTCT</b> CGTTA ATC-3'	BseRI-Stelle	fsaA, fsaA Q59E
FSAA Y131L rev	5'-GCATCAATACGATTAACG <b>AGAGGAG</b> CAAC-3'	BseRI-Stelle	fsaA, fsaA Q59E
FSAA Y131F N133G for	5'-GCGCCTTTCGTT <b>GGTCGTATCGATG</b> CTC-3'	ClaI-Stelle	fsaA Q59E Y131F
FSAA Y131F N133G rev	5'-CTACCGCCCTGAGCAT <b>CGATACGAC</b> CAACG-3'	ClaI-Stelle	fsaA Q59E Y131F
TalB E96Q for	5'-CAACT <b>CAAGTTGATGCGCGTCTTTC</b> - 3'	-	talB
TalB E96Q rev	5'-CAACTT <b>GAGTTGAGATACGGCCCG</b> G-3'	-	talB

### Teil II - Oligonukleotide für Sequenzierung

Name	Sequenz
pJF119 rev	5'-TAA TCT GTA TCA GGC TG-3'
pJF119 for	5'-GGC AAA TAT TCT GAA ATG AGC-3'
pET rev	5'-CTA GTT ATT GCT CAG CGG-3'
pET for	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG-3'

## 7.4 Molekulargenetische und mikrobiologische Methoden

### 7.4.1 Kultivierung der Bakterien

Die *E. coli* Bakterien wurden aerob in *lysogeny broth* (LB [136]) Medium (siehe Tab. 2.4) mit entsprechenden Antibiotika (siehe Tab. 2.5) zur Selektion auf Agarplatten oder Flüssigkultur bei 145 rpm (*revolutions per minute*) und 37 °C kultiviert. Das Kulturvolumen betrug maximal 20 % des Schüttelkolbenvolumens. Vorkulturen (5 ml im Reagenzglas oder 20 ml im 100 ml Schüttelkolben) wurden von einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht angezogen. Lagerung über kurze Zeiträume erfolgte auf Agarplatten bei 8 °C. Dauerkulturen bestehend aus 50 % (v/v) sterilem Glycerin und 50 % (v/v) Übernachtkultur wurden zur Stammerhaltung bei -70 °C gelagert. Zur Expression wurden die Bakterien in 2YT-Medium (siehe Tab. 2.4) angezogen und mit dem Zusatz Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG, Tab. 2.5) kultiviert (siehe 7.5.1).

**Tab. 2.4: Nährmedien (nach [137], Appendix 2)**

Medium	Bestandteil	
LB-Medium	Trypton	1 % (w/v)
	Hefe-Extrakt	0,5 % (w/v)
	NaCl	1 % (w/v)
LB-Agar	Trypton	1 % (w/v)
	Hefe-Extrakt	0,5 % (w/v)
	NaCl	1 % (w/v)
	Agar	1,5 % (w/v)
2YT-Medium	Trypton	1,6 % (w/v)
	Hefe-Extrakt	1 % (w/v)
	NaCl	1 % (w/v)

**Tab. 2.5: Antibiotika und Induktor**

Chloramphenicol und Tetracyclin wurden in Ethanol (EtOH) gelöst und dann mit dem entsprechenden Volumen Wasser aufgefüllt. Die restlichen Zusätze wurden alle in Wasser gelöst und evtl. mit einem entsprechenden Volumen an EtOH versetzt. Verwendete Zusätze wurden nach deren Herstellung steril filtriert (nach [137], Appendix 2.6).

Zusätze	Arbeitskonzentration	Stammlösung	Lösungsmittel
Ampicillin	100 µg/ml	100 mg/ml	EtOH (50 %, v/v) oder Wasser
Kanamycin	50 µg/ml	50 mg/ml	EtOH (50 %, v/v) oder Wasser
Chloramphenicol	25 µg/ml	25 mg/ml	EtOH (70 %, v/v)
Tetracyclin	10 µg/ml	20 mg/ml	EtOH (70 %, v/v)
IPTG	1 mM	1 M	Wasser

### 7.4.2 Isolierung, Restriktion und Agarosegelelektrophorese

Plasmid-Desoxyribonukleinsäure (Plasmid-DNA) wurde nach dem Protokoll von „NucleoSpin Plasmid“ – Macherey + Nagel isoliert. Dies umfasste die Schritte Zellernte, Zelllyse, Klärung des Lysates, DNA-Bindung, Waschen der Silicamembran, Trocknung der Silicamembran und DNA-Elution. Zur Erfolgskontrolle der Isolierung oder/und einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (siehe 7.4.3) wurde ein Restriktionsverdau mit entsprechendem(en) Restriktionsenzym(en) durchgeführt. Der Reaktionsansatz wurde für 2 h bei 37 °C inkubiert und anschließend einer Agarose-Gelelektrophorese bei 100 V für ca. 1 h ([137], Kapitel 5.4) unterzogen. Zusätzlich wurden 5 µl DNA-Leiter zur Größenbestimmung und Mengenabschätzung der DNA-Fragmente auf das Agarosegel aufgetragen.

#### RCR-Restriktionsansatz

2 µl	Plasmid-DNA (200 ng – 1 µg) oder
5 µl	PCR-Reaktionsgemisch (200 ng – 1 µg)
1 µl	Restriktionsenzym I (ca. 5 U/µg DNA)
1 µl	Restriktionspuffer 10x
ggf. 1 µl	Restriktionsenzym II (ca. 5 U/µg DNA)
ggf. 1 µl	Bovines Serumalbumin (BSA)
auf 10 µl mit bidestilliertem Wasser auffüllen	
nach der Inkubationszeit wurden 2 µl 6x DNA-Ladepuffer zugegeben.	

#### 50x Tris-Acetat-EDTA-Puffer

2 M	Tris-Puffer
5,7 % (v/v)	Essigsäure
50 mM	EDTA pH 8,0 (eingestellt mit 1 M NaOH)

#### Agarosegel 1 %

50 ml	1x Tris-Acetat-EDTA-Puffer
0,5 g	Agar
aufgekocht, abgekühlt mit 5 µl (50 µg) Ethidiumbromid versetzt	

### 7.4.3 Zielgerichtete Mutagenese mittels PCR

Die zielgerichtete Mutagenese wurde auf den Expressionsvektoren pJF119*talB* [1], pJF119*talBF178Y* [1] und pET22*fsaA* [53] nach dem „QuikChange XL Site-directed Mutagenesis“ Protokoll von Stratagene (Amsterdam, Niederlande) durchgeführt. Dieses umfasst die Schritte (Abb. 2.1): Plasmidpräparation (siehe 7.4.2) mit der angestrebten Zielsequenz für die einzuführende Mutation, Denaturierung des Plasmides, Hybridisierung der mutagenen Primer, Elongation mit dem Resultat eines geöffneten zirkularen Doppelstrangs, Verdau der DNA-Matrize und abschließend Transformation (siehe 7.4.6) zur Ligation *in vivo*. Alle Varianten von *TalB* und *FSAA* besaßen somit einen N-terminalen

His<sub>6</sub>-Tag. Das Primerdesign, basierend auf Zheng et al. [138], dem QuikChange Protokoll und der Pfu-Polymerasen Vorschrift von Agilent Technologie, ist in Tab. 2.6 angegeben. Zudem sollte möglichst eine neue Restriktionsstelle eingefügt werden. Eine Auflistung der verwendeten Oligonukleotide befindet sich in Tab. 2.3 Teil I. Das verwendete PCR Reaktionsgemisch und das PCR-Programm sind in den Tabellen Tab. 2.7 und Tab. 2.8 dargestellt. Nach Durchführung der PCR unter Anwendung der Hot-Start Methode ([137], Kapitel 8.110) und Kontrolle über ein Agarosegel, wurde die DNA-Matrize 2 h bei 37 °C mit *DpnI* verdaut. *DpnI* spaltet lediglich bakteriell synthetisierte DNA, die als Matrize eingesetzt wurde, da das Restriktionsenzym spezifisch für methylierte Sequenzen ist, die durch die dam-Methyltransferase methyliert wurden [139]. Zur Ligation wurden 5 µl des PCR-Reaktionsgemischs in XL1-blue Zellen mit zelleigener Ligase transformiert.

**Tab. 2.6: Primerdesign**

Zheng et al. [138], dem QuikChange Protokoll und der Pfu-Polymerasen Vorschrift von Agilent Technologies

- 
- 8 Basen ohne Überlappung in 3' Richtung
  - Mutation in beiden Primern
  - Anfang und Ende jeweils mit mindestens einem C oder G
  - Mutation 4 Basen entfernt von 5' Ende
  - Mutation 6-8 Basen entfernt von 3' Ende
  - Max. 17,5 % Unterschied der Sequenzidentität zwischen dem mutagenen Primer und der Matrize
  - T<sub>m</sub> 60-80 °C
  - 25-45 bp
  - > 40 % GC-Gehalt
  - neue Restriktionsstelle (nahe an der angestrebten Mutation, Restriktionsenzym möglichst im Labor vorhanden, stille Mutation)
- 

**Tab. 2.7: PCR Reaktionsgemisch**

<sup>1</sup>Herstellerangaben zum Reaktionspuffer: über 1,5 mM Mg<sup>2+</sup>, Tris basierender Puffer über pH 8,0

Komponente	Volumen [µl]	Konzentration
Plasmid	1	100 pg – 30 ng
Vorwärtsprimer	1	10 pmol/µl
Rückwärtsprimer	1	10 pmol/µl
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	4	2,5 mM/µl
Pfu Puffer	5	
Pfu Polymerase	1	2,5 U/µl
Wasser <sub>steril</sub>	37	
Gesamtvolumen	50	



Tab. 2.8: PCR-Programm

PCR-Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (min)	
Deckel vorheizen	> 95	ca. 5	
Pause und Einsetzen des Reaktionsgemisches			
Denaturierung	95	0,5	
Primerhybridisierung	65	1	
Elongation	70	12	18 Wiederholungen
Finale Elongation	70	10	
Temperierung bis Zugabe <i>Dpn</i> I	4	bis Ende	

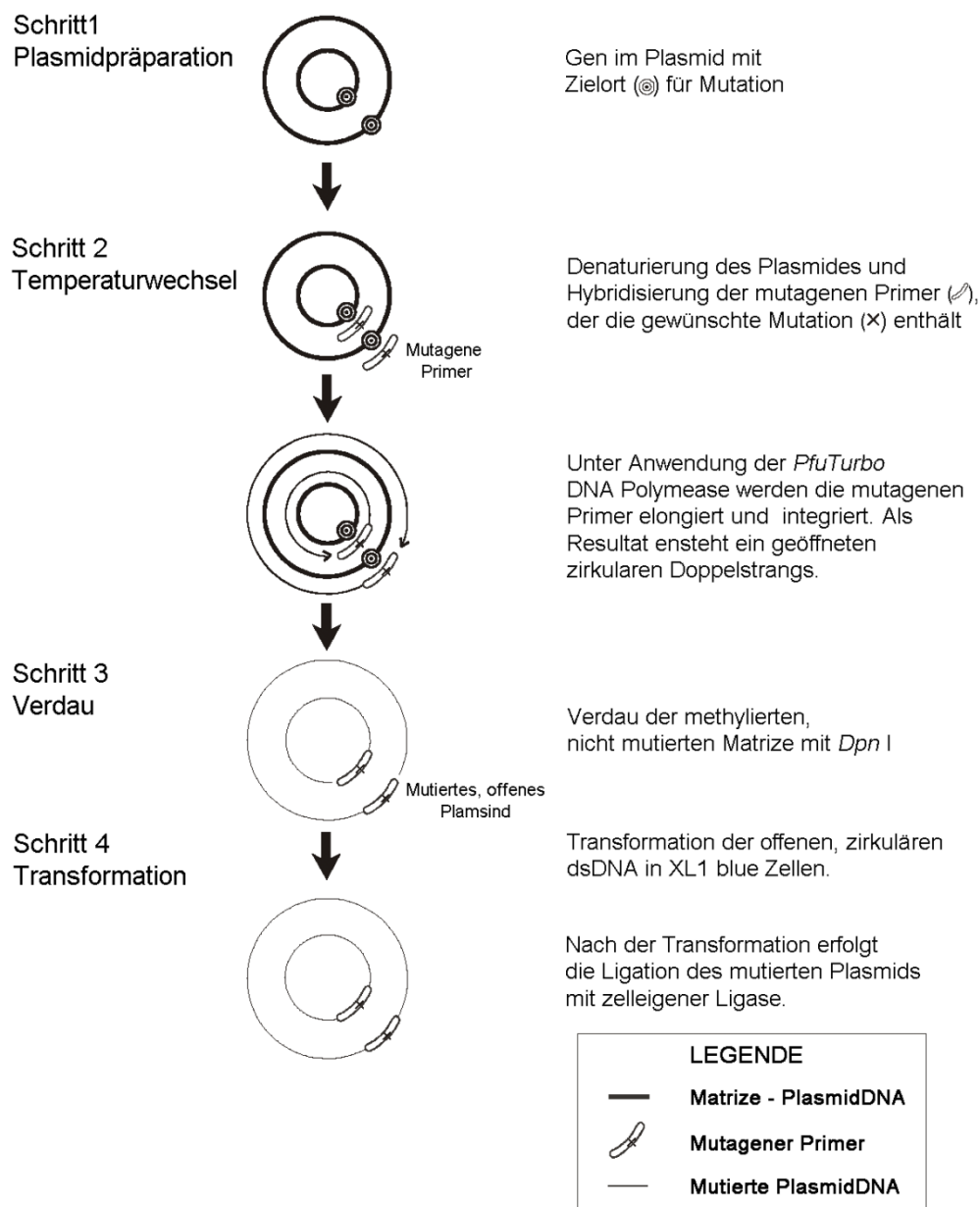


Abb. 2.1: Übersicht über die QuikChange XL zielgerichtete Mutagenese (verändert nach dem Protokoll von Stratagene (Amsterdam, Niederlande)).

#### 7.4.4 Sequenzierung von DNA

Die angestrebten Mutationen in der isolierten Plasmid-DNA (siehe 7.4.2) wurden durch Sequenzierung als Auftragsarbeit von GATC (Konstanz, Deutschland) kontrolliert (Auflistung der verwendeten Oligonukleotide Tab. 2.3 Teil II). Die verwendete Methode beruht auf dem Prinzip der Kettenabbruchmethode [140], zudem finden die Methoden der *single molecule real time* Sequenzierung (SMRT, [141]) und die Sequenzierung durch reversible Termination (auch Illumina Farbsequenzierung genannt [142]) bei GATC Anwendung. Die Analyse der Sequenzdaten wurde mit dem Programm SeqMan durchgeführt. Erforderliche Vergleichssequenzen wurden aus NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) entnommen und mit SeqEdit bearbeitet. Plasmidkarten wurden mit CloneManager Version 8 erstellt bzw. bearbeitet. Zum Sequenzvergleich wurde auf ClustalX2/W ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)) zurückgegriffen. Zur Darstellung bzw. Konservierungsanalyse wurde Jalview [129] und WebLogo 3.4 [130] verwendet. Die Multisequenzalignments der SF führte Lorenz (Institut für Technische Biochemie, Universität Stuttgart) durch und Kummer half bei der Darstellung der Sequenzmotive.

#### 7.4.5 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Durch CaCl<sub>2</sub>-Behandlung wurde die Kompetenz von *E. coli* erreicht [131,137,143]. Aus einer Übernachtskultur wurden 100 ml LB-Medium 1:20 angeimpft. Nach einer Kultivierung (37 °C; 145 rpm) bis OD<sub>600</sub> ~ 0,4 wurden die Zellen 10 min auf Eis gekühlt. Im Anschluss wurde die Zellsuspension zentrifugiert (10 min; 4 °C; 1.942 *relative centrifugal force* (rcf) – 3.000 rpm in Hettich Rotanta 460), der Überstand verworfen und das Sediment in 15 ml steriler 100 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert. Der Zentrifugationsschritt wurde nach einer Inkubation von mindestens 30 min auf Eis wiederholt und die erhaltene Biofeuchtmasse in 2 ml kalter, steriler 100 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung mit 15 % (v/v) Glycerin resuspendiert. Abschließend erfolgte nach einer Inkubationszeit von 2 h auf Eis eine Aliquotierung á 200 µl. Die Aliquote wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -70 °C gelagert. Die Transformationseffizienz lag bei 5 x 10<sup>6</sup> bis 2 x 10<sup>7</sup> transformierten Kolonien / µg ringförmiger Plasmid-DNA ([137], Kapitel 1.116).

#### **7.4.6 Transformation von *E. coli* Zellen**

Die chemisch kompetenten Zellen wurden für die Hitzeschock-Transformation ([137], Kapitel 1.116, Protocol 25) auf Eis aufgetaut und im Anschluss mit ~50 - 200 ng DNA versetzt (5 µl PCR-Produkt oder 1 µl Plasmid-DNA). Ein weiteres Aliquot wurde zur Kontrolle mit sterilem Wasser versetzt. Die Aliquote wurden vorsichtig durch Schütteln gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte für 45 s bei 42 °C. Die Proben, die zuvor für 2 min auf Eis abgekühlt wurden, wurden mit 500 µl LB-Medium versetzt und zur Ausprägung der Antibiotikumresistenz 1 h bei 37 °C inkubiert. 100 µl der transformierten Zellen wurden auf einer Selektionsplatte ausgebracht. Die restliche Zellsuspension wurde zentrifugiert (1 min; Raumtemperatur (RT); 19.064 rcf – 11.000 rpm in Eppendorf 5417C), in 100 µl Medium resuspendiert und ebenfalls ausgestrichen. Von diesen Selektionsplatten wurden Einzelkolonien verwendet, um Übernachtskulturen anzupflanzen (7.4.1). Diese wurden im Anschluss zur Isolierung von Proteinen in größerem Maßstab kultiviert (7.5.1) oder zur Isolation von Plasmid-DNA verwendet (7.4.2).

### **7.5 Proteinbiochemische Methoden**

#### **7.5.1 Anzucht von Bakterien zur Isolierung von Proteinen**

Verschiedene rekombinante Stämme wurden zur Genexpression und anschließender Proteinaufreinigung verwendet (siehe Tab. 2.9). Der Expressionsansatz (20 ml 2YT-Medium im 100 ml Kolben / 400 ml im 2 l Kolben) wurde mit einer Übernachtskultur (1 ml / 20 ml) angeimpft. Die Zellen wurden bei 37 °C und 145 rpm kultiviert. Bei Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,5-1 wurde mit 1 mM IPTG-induziert (Endkonzentration, [137], Kapitel 15.14). Hierfür wurden die IPTG induzierbaren Promotoren T7 [144] und lacI<sup>q</sup> [145] genutzt. Nach einer Expressionszeit von 4 h wurde durch Zentrifugation (10 min; 4 °C; 6.354 rcf – 6.000 rpm in Beckmann Avanti J-25) geerntet. Die Zellen wurden in 50 mM Glycylglycinpuffer, pH 8,5 oder 50 mM Phosphatpuffer, pH 8,0 mit 300 mM NaCl und 10 mM Imidazol resuspendiert, in ein gewogenes 50 ml Reaktionsgefäß überführt, erneut zentrifugiert (10 min; 4 °C; 4.000 rcf – 4.307 rpm in Hettich Rotanta 460) und der Überstand verworfen. Die gewaschenen und gewogenen Biofeuchtmassen wurden bis zur Aufreinigung bei -20 °C gelagert.

**Tab. 2.9: Verwendete Expressionsvektoren/-stämme**

Enzym	Expressionsvektor	Expressionsstamm
Fructokinase (FRK)	pJF119	XL1 blue
FSAA und Varianten	pET22	BL21(DE) Star pLysS
FSAA	pET16	BL21(DE) Star pLysS
Galactitol-1-phosphat-5-Dehydrogenase (GatD)	pET28	Rosetta (DE3) pLysS RARE2
Glycerin-Dehydrogenase (GldA)	pET28	BL21(DE3) Star pLysS
Transketolase A (TKT)	pET22	BL21(DE) Star pLysS
TEV-Protease (TEV)	pET9	Rosetta (DE3) pLysS RARE2
TalB und Varianten	pJF119	LJ110(DE3) talA <sup>-</sup> talB <sup>-</sup> pLysS RARE2
Humane Transaldolase (hTal) und Variante	pGEXTN*	LJ110(DE3) talA <sup>-</sup> talB <sup>-</sup> pLysS RARE2

### 7.5.2 Zellaufschluss und Herstellung von zellfreien Rohextrakten

Zum Aufschluss wurde je 1 g Biofeuchtmasse mit 2 ml Lysepuffer (siehe Tab. 2.10) und mit 0,1 mg/ml Desoxyribonuklease I versetzt. Die Biofeuchtmasse wurde 20 min bei 30 °C aufgetaut. Zum Zellaufschluss, mittels *pLysS* Plasmid, wurde 30 min auf Eis inkubiert. Im Fall der Reinigung von Fructokinase von *Zymomonas mobilis* (FRK) wurde zusätzlich 1 mg/ml Lysozym zugesetzt, da der Expressionsstamm kein *pLysS* Plasmid trägt. Der weitere Zellaufschluss erfolgte durch Ultraschall (4x: 30 s Ultraschall und 30 s Ruhephase, 30 % Leistung) auf Eis. Die Zellbestandteile wurden abschließend durch Zentrifugation (1 h; 4 °C; 17.727 rcf – 13.500 rpm in Hettich MIKRO 22R) abgetrennt. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und auf Eis oder bei einer Temperatur von 8 °C gehalten.

**Tab. 2.10: Verwendete Reinigungsmethoden und Lysepuffer**

Reinigungsmethode	Enzyme	Lysepuffer	
GST-Affinitätschromatographie	hTal und Variante	„Bindepuffer“ pH 7,4	
		NaCl 150 mM	
		KCl 3 mM	
		KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1,5 mM	
		NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 8 mM	
Ni-NTA-Affinitätschromatographie	FSAA und Varianten, GatD, GldA, TalB und Varianten, TEV, TKT	„10 mM Imidazol-Puffer“	
		NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 8,0 50 mM	
		NaCl 300 mM	
		Imidazol 10 mM	

Reinigungsmethode	Enzyme	Lysepuffer	
Ni-NTA-Affinitätschromatographie	GatD	10 mM Imidazol-Puffer + 0,3 mM oxidiertes Nicotinamid- adeninukleotid (NAD <sup>+</sup> )	
Anionenaustauschchromatographie	FRK	Tris-HCl pH 7,5 DTT	20 mM 1 mM
	FSAA ohne Tag	„Glycylglycin-Puffer“ Glycylglycin pH 8,5 DTT	50 mM 1 mM

### 7.5.3 Reinigung rekombinanter Proteine

Die verschiedenen Proteine und Muteine wurden entsprechend der in Tab. 2.10 aufgelisteten Methoden aufgereinigt. Im Folgenden sind die verwendeten Reinigungsmethoden ausgehend vom jeweiligen zellfreien Rohextrakt beschrieben.

#### Reinigung von GST-Fusionsproteinen

Die Glutathion-S-Transferase (GST) aus *Schistosoma japonicum* wird als Fusionsprotein zur Aufreinigung verwendet [146]. Das Enzym selbst ist 26 kDa groß und kann auch als GST-Tag Enzymaktivität besitzen und dimerisieren. Die GST-Fusionsproteine binden über die hohe Affinität zu Glutathion an die Glutathion-Sepharose-Matrix und können somit hoch effektiv aufgereinigt werden ([137], Kapitel 15.36).

Die Reinigungsmethode basiert auf dem Protokoll des Säulenherstellers (Glutathion Sepharose 4B - Instructions 52-2303-00 von GE Healthcare) und der Dissertation von S. Schneider [29]. Eine Säule mit einem Volumen von 1 ml Glutathion-Sepharose 4B wurde dreimal mit 3 ml Bindepuffer äquilibriert. Hierzu wurde das Säulenmaterial im Reaktionsgefäß mit Puffer versetzt, zentrifugiert (5 min; 4 °C; 863 rcf – 2.000 rpm in Hettich Rotanta 460) und schließlich der Überstand dekantiert. Für die Proteinbindung wurde der zellfreie Extrakt mit der Glutathion-Sepharose gemischt und für > 12 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach der Inkubation ließ sich das Säulenmaterial durch Zentrifugation (10 min; 4 °C; 863 rcf) abtrennen und der Überstand wurde auf Vollständigkeit der Proteinbindung mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) überprüft. Zum Waschen wurde die Säule zuvor gegossen, um den Materialverlust durch Dekantieren zu vermeiden. Hierzu wurden dreimal 4 ml Bindepuffer verwendet, welcher zusätzlich mit Dithiothreitol (DTT) 1 mM versetzt war. Mit einem Bradfordschnelltest (20 µl Bradfordlösung + 5 µl Eluat) ließ sich feststellen, ob alle ungebundenen Proteine bereits von der Säule gewaschen wurde. Zum

Abspalten des GST-Tags wurde das Säulenmaterial in ein Reaktionsgefäß überführt und mit Tev-Protease von Tabak Etch Virus (TEV, 1:50 v/v in 5 ml Bindepuffer mit zusätzlich 0,5 mM EDTA pH 8,0 und 1 mM DTT) über Nacht bei Raumtemperatur und leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Säule gegossen. Zur Elution des Zielproteins wurden fünfmal 1 ml Aliquote Bindepuffer verwendet. Die Identifikation des Proteins in den Fraktionen erfolgte mittels SDS-PAGE (siehe 7.5.4). Abschließend wurde die Säule durch Elution des GST-Tags regeneriert. Dazu wurden 4 ml Elutionspuffer mit Säulenmaterial dreimal für > 5 min bei Raumtemperatur und leichtem Schütteln inkubiert. Der Überstand wurde jeweils durch Zentrifugation bei 863 rcf, 4 °C, 5 min abgetrennt. Zur Lagerung der Säule wurde das Material im Reaktionsgefäß mit 20 % EtOH<sub>techn</sub> gelagert.

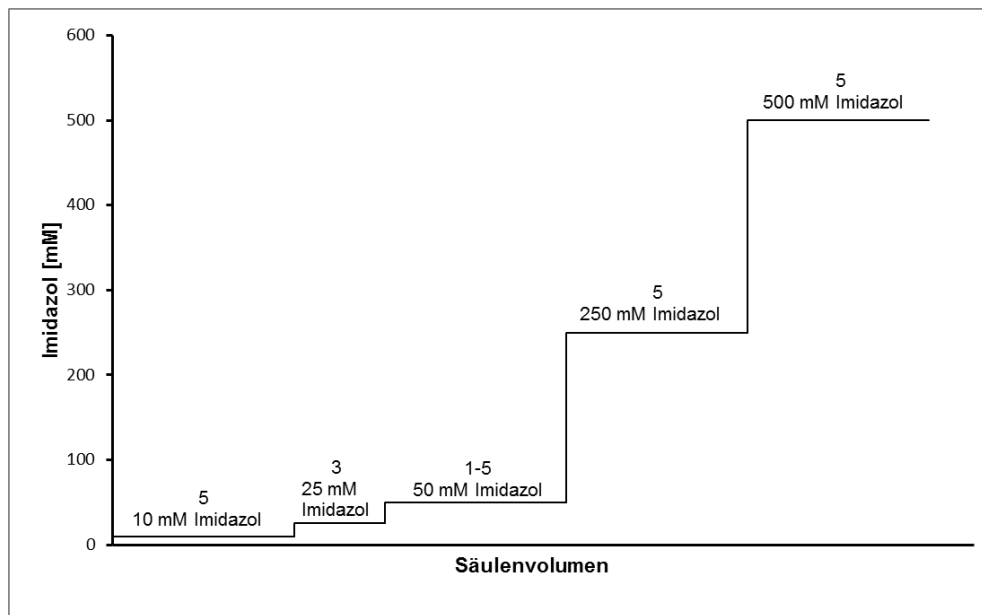
<u>Bindepuffer pH 7,4</u>	150 mM	NaCl
	3 mM	KCl
	1,5 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	8 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
<u>Elutionspuffer pH 8,0</u>	50 mM	Tris-HCl
	10 mM	Glutathion reduziert

### Reinigung von Proteinen mit His<sub>6</sub>-Tag

Bei dieser Reinigung wird die Affinität des C- oder N-terminalen His<sub>6</sub>-Tag des Proteins zu einer mit Nickel (Ni<sup>2+</sup>) beladenen Chelatsäule genutzt [147]. Die Nitrilotriessigsäure (*Nitrilotriacetic acid* – NTA), die an eine Agarose-Matrix gebunden ist, kann vier der sechs Koordinationsstellen des Nickels besetzen. Die übrigen zwei koordinativen Bindungen des Nickels können somit zwei His des Tags binden. Das His-Strukturanalogon Imidazol kann ebenfalls an das Nickel binden und daher zur Verdrängung des Tags bzw. zur Elution verwendet werden. Eine geringe Menge an Imidazol im Lysepuffer (siehe Tab. 2.10) vermindert die unspezifische Bindung von Proteinen aus dem zellfreien Extrakt. Hohe Salzkonzentrationen beeinflussen die spezifische Bindung nicht, reduzieren jedoch unspezifische Bindungen über ionische Interaktionen. Diese Methode bietet verschiedene Vorteile, wie zum Beispiel milde Elutionsbedingungen, hohe Reinheit oder einen vergleichsweise kleinen Tag (The QIAexpressionist, 5. Auflage von 2003, Protokoll von Qiagen, Deutschland).

Die Aufreinigung kann unter Ausnützung der Gravitation erfolgen oder an einem *Fast protein liquid chromatography*-System (FPLC-System) durchgeführt werden. Das FPLC-System wurde für die Aufreinigung der Proteine FSAA<sup>Q59E Y131F</sup>, TaIB<sup>F178Y</sup> und TaIB<sup>E96Q F178Y</sup> verwendet, die anschließend für die Kristallisation eingesetzt wurden. Die

weiteren benötigten Proteine (TalB<sup>E96Q</sup>, FSAA<sup>Y131F</sup> und FSAA) wurden per Gravitationssäulen gereinigt. GatD, TEV und Glycerin-Dehydrogenase von *E. coli* (GldA) wurden von Samland bzw. Schmidtke aufgereinigt.



**Abb. 2.2: Stufengradient der Ni-NTA-Affinitätschromatographie**

Die Reinigungsmethode basiert auf dem Protokoll des Säulenherstellers („The QIAexpressionist“, 5. Auflage von 2003, Protokoll von Qiagen, Deutschland) und der Dissertation von S. Schneider [29]. Zur Aufreinigung über Gravitation wurde die Säule (1 ml Säulenmaterial) zuerst mit 5 ml 10 mM Imidazol-Puffer äquilibriert. Im zweiten Schritt wurde der zellfreie Extrakt zugegeben und mit einem aufsteigenden Stufengradienten (siehe Abb. 2.2) das Zielprotein eluiert. Der Durchfluss wurde zur Sicherheit aufgefangen und aufbewahrt. Zur Überprüfung des Waschvorgangs kann ein Bradfordschnelltest (20 µl Bradfordlösung + 5 µl Eluat) verwendet werden. Die Zielproteine wurden mit 250 mM Imidazol-Puffer eluiert. Anschließend wurde ein Waschschrift mit 5 Säulenvolumen 500 mM Imidazol-Puffer durchgeführt. Die Fraktionen à 1 ml wurden während der Reinigung aufgefangen. Die Analyse und Umpufferung der Fraktionen ist unter 7.5.4 und fortfolgenden erläutert. Die Säule wurde abschließend mit 5 ml Wasser und 5 ml 20 % EtOH<sub>techn</sub> gewaschen, in welchem die Säulen bei 4 °C gelagert wurden. Die Regeneration der Säulen zur Aufreinigung eines anderen Proteins oder nach ca. 5 Läufen, umfasst folgende Schritte: 5 ml Wasser, 3 ml 2 % (v/v) Natriumdodecylsulfat-Lösung (SDS), 1 ml 25 % EtOH<sub>techn</sub>, 1 ml 50 % EtOH<sub>techn</sub>, 1 ml 75 % EtOH<sub>techn</sub>, 1 ml 100 % EtOH<sub>techn</sub>, 1 ml 75 % EtOH<sub>techn</sub>, 1 ml 50 % EtOH<sub>techn</sub>, 1 ml 25 % EtOH<sub>techn</sub>, 1 ml Wasser, 5 ml 100 mM EDTA pH 8,0, 5 ml Wasser, 2 ml 100 mM NiSO<sub>4</sub>, 2 ml Wasser und abschließend 5 ml

20 % EtOH<sub>techn.</sub>. Zu berücksichtigen ist der zum Teil entstehende schwermetallhaltige Abfall.

Bei dem FPLC-System wurde eine Ni-NTA-Affinitätssäule (20/10) mit einem Säulenvolumen von 10 ml verwendet. Der zellfreie Extrakt wurde mit einem 10 ml Superloop<sup>TM</sup> aufgetragen, und es wurde eine Flussrate von 1 ml/min angelegt. Die Reinigung erfolgte ebenfalls mit einem Stufengradienten. Puffer A entsprach dem 10 mM Imidazol-Puffer und Puffer B dem 500 mM Imidazol-Puffer.

<u>Imidazol-Puffer</u>	50 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 8,0
	300 mM	NaCl
	10, 25, 50, 250 oder 500 mM	Imidazol
	[0,3 mM	NAD <sup>+</sup> (nur für GatD)]

### Reinigung über Anionenaustauschchromatographie

Bei dieser Methode sind quartäre Ammoniumgruppen R-CH<sub>2</sub>N<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> kovalent an die Matrix gebunden („Q-Sepharose“ – Agarosematrix). Diese führen zu einer positiv geladenen Matrixoberfläche, welche Wechselwirkungen mit negativ geladenen Proteinen eingehen kann. Daher ist der richtige pH-Wert für die negative Oberflächenladung der Proteine (pH > pI) und deren Aufreinigung von Bedeutung. Basierend auf den Coulombwechselwirkungen ist Anionenaustauschchromatographie sehr vielseitig einsetzbar (Ion Exchange Chromatography & Chromatofocusing von GE Healthcare). Die Verwendung dieser Aufkonzentrierung für FSAA wurde beschrieben von Schürmann und Sprenger 2001 [49] bzw. für die FRK von S. Schneider 2010 [29].

Zur Vorbereitung der Reinigung wurden alle Puffer und Lösungen für das FPLC-System über eine Nutsche mit 0,45 µm Filtern filtriert und entgast. Zudem wurde der zellfreie Extrakt mit FSAA<sup>wt</sup> ohne Tag einer Hitzefällung bei 75 °C für 20 min unterzogen. Dies ist möglich, da FSAA bis 75 °C hitzestabil ist [49]. Unerwünschte denaturierte Proteinverunreinigungen wurden über Zentrifugation (1 h; 4 °C; 17.727 rcf – 13.500 rpm in Hettich MIKRO 22R) vor Auftragung auf die Q-Sepharose-Säule HP (16/10, Säulenvolumen 20 ml) abgetrennt.

Im Falle der FRK wurde der zellfreie Extrakt direkt auf die Q-Sepharose-Säule aufgetragen. Die Säule wurde mit 2 Säulenvolumen Wasser und anschließend 3 Säulenvolumen Puffer A äquilibriert. Die Auftragung auf die äquilibrierte Säule erfolgte mit einem 10 ml Superloop, an die sich ein Waschschrift mit 2 Säulenvolumen anschloss. Ein linear aufsteigender NaCl-Gradient bis maximal 500 mM NaCl über 10 Säulenvolumen bei einer Flussrate von 1 ml/min wurde zur Elution verwendet. Die Zielproteine ließen sich



bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen eluieren (FSAA 340 mM NaCl, FRK 250 mM NaCl). Abschließend wurde die Säule mit 5 Säulenvolumen Puffer B, 5 Säulenvolumen Puffer A, 3-5 Säulenvolumen Wasser und schließlich 3-5 Säulenvolumen 20 % EtOH<sub>techn</sub> mit 0,2 M Natriumacetat gewaschen.

<u>Puffer A FSAA</u>	50 mM	Glycylglycin pH 8,0
	1 mM	MDTT
<u>Puffer B FSAA</u>	Puffer A FSAA +	
	1 M NaCl	
<u>Puffer A FRK</u>	20 mM	Tris-HCl pH 7,5
	1 mM	MDTT
<u>Puffer B FRK</u>	Puffer A FRK +	
	1 M NaCl	

#### 7.5.4 SDS-PAGE, Umpufferung und Konzentrierung von Proteinen

Die Polyacrylamidgelelektrophorese wird zur Trennung von Proteinen eingesetzt. Die Porengröße wird definiert durch das relative Konzentrationsverhältnis von Acrylamid zu Bis-Acrylamid, das zur Quervernetzung benötigt wird. Die Polymerisation wird durch den Radikalbildner Ammoniumpersulfat (APS) und den Polymerisationskatalysator N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin (TEMED) herbeigeführt. Bei dieser diskontinuierlichen Elektrophorese (Laemmli-System, [148]) wird durch eine Kombination von Molekularsiebeffekt und Konzentrierungseffekt die Trennleistung verbessert. Durch die Verwendung eines Trenngeles mit neutralem pH-Wert und eines Sammelgels mit basischem pH-Wert entsteht ein pH-Gradient an der Grenze zwischen den beiden Gelen. Dies führt zu einem Konzentrierungs- bzw. Stapelungseffekt. SDS bindet stark an die hydrophoben Bereiche eines Proteins, wodurch dieses denaturiert und eine starke negative Ladung eingeführt wird. Der Protein-SDS-Komplex wandert während der Elektrophorese proportional zur Proteingröße in Richtung Anode. Somit ist eine Bestimmung der Molekülmasse und der Reinheit möglich [149].

Von allen Fraktionen einer Reinigung, die potenziell Zielprotein enthalten, wurden jeweils 10 µl auf ein SDS-Gel aufgetragen (4 %-iges Sammelgel und 15 %-iges Trenngel, Tab. 2.11). Alternativ wurde auf ein 12 %-iges vorgegossenes Gel von Bio-Rad zurückgegriffen. Zuvor wurden die Proben mit 2-fach konzentriertem Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 100 °C erhitzt. Als Größenmarker wurde ein Proteinstandard mitaufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 20 mA durchgeführt, bis die Lauffront das untere Ende des Gels erreicht hatte (ca. 1,5 h). Anschließend wurden die Proteine mit Coomassie Brilliant Blau R-250 für 20 min angefärbt und schließlich > 1 h mit Entfärbemittel

behandelt. Alternativ konnten die Inkubationszeiten für Färbung (5 min) und Entfärbung (> 20 min), durch kurzes Aufkochen in der Mikrowelle, verkürzt werden. Zudem konnte die Entfärbelösung, zur Beschleunigung, zusätzlich durch frische ausgetauscht werden. Die Fraktionen, die tatsächlich das rekombinante Protein enthielten, wurden vereinigt und auf ca. 200 µl eingengt. Des Weiteren wurde der Puffer gegen 50 mM Glycylglycin-Puffer pH 8,5 mit 1 mM DTT mittels Zentrifugationseinheit ausgetauscht. Die Zentrifugationseinheit besitzt einen Größenausschluss von 10 kDa und wurde maximal mit 4.000 g bei 4 °C zentrifugiert. Für das Umpuffern wurde mit mindestens 4 ml Glycylglycin-Puffer gewaschen und bis ca. 200 µl eingengt (Proteinkonzentration > 1 mg/ml). Die Reinheit der Proteine wurde durch erneute SDS-PAGE mit jeweils 10 µg Protein und Coomassie Brilliant Blau R-250 Färbung überprüft (Konzentrationsbestimmung 7.5.5). Hierbei wurden zumeist resuspendierte Biofeuchtmasse, zellfreier Extrakt und gereinigtes Protein aufgetragen. Alle Proteine wurden im Glycylglycin-Puffer bei 4 °C gelagert, mit Ausnahme von GatD, die in 50 mM 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure-Puffer (HEPES) und 25 % (v/v) Glycerin nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei -70 °C gelagert wurde. Die GatD wurde daher nicht in Glycylglycin-Puffer umgepuffert, sondern entsprechend in HEPES-Puffer.

<u>Laufpuffer 10x</u>	2 M	Glycin
	1 % (w/v)	SDS
	0,25 M	Tris
<u>Probenpuffer 2x</u>	2 % (w/v)	SDS
	10 % (v/v)	Glycin
	60 mM	Tris/HCl, pH 6,8
	0,02 % (w/v)	Bromphenolblau
	5 % (w/v)	DTT
<u>Färbelösung</u>	0,1 % (w/v)	Coomassie Brilliant Blau R-250
	10 % (v/v)	Isopropanol
	20 % (v/v)	Essigsäure
<u>Entfärbelösung</u>	20 % (v/v)	Essigsäure

**Tab. 2.11: Zusammensetzung der SDS-Gele (Angaben für 6 Gele)**

	<b>Sammelgel 4 %</b>	<b>Trenngel 15 %</b>
H <sub>2</sub> O	3,9 ml	4,7 ml
0,5 M Tris/HCl pH 6,8	1,6 ml	-
1,5 M Tris/HCl pH 8,8	-	4,8 ml
10 % (w/v) SDS	64 µl	194 µl
30 % (v/v) Acrylamid-Bisacrylamid (37,5:1)	833 µl	9,7 ml
10 % (w/v) APS	128 µl	98 µl
TEMED	13 µl	20 µl
	1 ml je Gel	3 ml je Gel

### 7.5.5 Konzentrationsbestimmung von Protein nach Bradford

Die anionische Form des Coomassie Brilliant Blau G-250 ist in der Lage, makromolekulare Proteine mit basischen oder aromatischen Gruppen zu binden. Dabei verschiebt sich die Extinktion von 470 nm nach 595 nm. Dies wird zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen genutzt [150,151].

Zur Konzentrationsbestimmung wurde in einer 1 ml Einweg-Küvette 900 µl Reagenz mit 100 µl Probe/Standard versetzt, zur Durchmischung invertiert und für 5 min inkubiert. Alternativ wurde in Mikroküvetten (Volumen 70-550 µl) 150 µl Reagenz mit 5 µl Probe versetzt. Die Extinktionsmessung erfolgte bei 595 nm. Zur Ermittlung der Konzentration wurde eine Kalibrierung von 0 - 0,1 mg/ml mit mindestens einem  $R^2 \geq 0,98$  angefertigt. Je Probe wurde mindestens eine Doppelbestimmung durchgeführt. Proben wurden mit 50 mM Glycylglycinpuffer pH 8,0 mit 1 mM DTT auf eine Endkonzentration innerhalb des Kalibrierbereichs (meist  $OD_{595} = 0,1 - 0,7$ ) vorverdünnt. Typische Verdünnungsfaktoren waren für zellfreien Extrakt 1:500, für Biofeuchtmasse resuspendiert in 1 ml 1:200 (jeweils aus 400 ml Kultur) und für aufgereinigtes Protein 1:1000.

Bradford-Reagenz    50 mg Coomassie Brilliant Blau G-250  
                           25 ml EtOH<sub>techn.</sub>  
                           50 ml o-Phosphorsäure (85 %)  
                           ad 500 ml Wasser  
                           über Nacht rühren, über Faltenfilter filtrieren und dunkel lagern

BSA-Stammlösung 10x    10 mg/ml und für Testansatz 1:10 verdünnen

**Tab. 2.12: BSA-Standards für Bradford-Kalibrierung**

Konzentration des Standards [mg/ml]	Wasser [µl]	Stammlösung 1x [µl]
0,1	900	100
0,08	920	80
0,06	940	60
0,04	960	40
0,02	980	20
0,00	1000	-

### 7.5.6 Photometrische Bestimmungen in Küvetten

Alle Enzymaktivitäten wurden über verschiedene enzymgekoppelte Assays im 1 ml Maßstab in 50 mM Glycylglycinpuffer pH 8,5 mit 1 mM DTT bestimmt. Die Ab- oder Zunahme der Absorption wurde bei 340 nm über 10 min bei 28 °C beziehungsweise 30 °C an einem Cary 100 Bio UV-Visible Spektrophotometer detektiert. Durch lineare Regression wurde die Anfangssteigung der Absorptionskurve über der Zeit bestimmt. Die initiale Bildungsrate bzw. initiale Umsatzgeschwindigkeit ist proportional zur Konzentration des gebildeten Enzym-Substrat-Komplexes [152]. Die spezifische Aktivität ist wiederum die Bildungsrate bei einer bestimmten Substratkonzentration. Daher wurde zur Berechnung der spezifischen Aktivität (I) die gemessene Anfangssteigung über 1 min verwendet. Zum Vergleich der verschiedenen spezifischen Aktivitäten wurden die TalB<sup>wt</sup>- und FSA<sup>wt</sup>-Aktivität als 100 % definiert. Die angegebenen spezifischen Aktivitäten sind Mittelwerte aus mindestens zwei unabhängigen biologischen Messungen (zwei Aufreinigungen) mit jeweils zwei technischen Replikaten. Zur Bestimmung der kinetischen Parameter der D-F6P-Aldolasereaktion wurden die spezifischen Aktivitäten gegen die variierte Substratkonzentration (D-F6P, D-S7P oder DHA) aufgetragen. Abweichungen von diesen Angaben werden explizit genannt.

$$\begin{aligned}
 \text{(I) Spezifische Aktivität } \left[ \frac{U}{mg} \right] &= \frac{\Delta E}{\Delta t} \times \frac{1}{\epsilon d} \times \frac{V_{Küvette}}{m_{Protein}} \\
 &= \text{Anfangssteigung [min]} \times \frac{1}{6220} \left[ \frac{l}{cm \text{ mol}} \right] \times \frac{1}{m_{Protein}} \left[ \frac{ml}{mg} \right] \times 1000
 \end{aligned}$$

Für die weitere Auswertung der Daten im Fließgleichgewicht, unter Anwendung der Michaelis-Menten-Gleichung (II, [153]), wurde SigmaPlot 9.0 verwendet. Hierbei wurden die Substratkonzentrationen [mM] gegen die initialen Umsatzgeschwindigkeiten [U/mg] aufgetragen. Aus dem hyperbolischen Fit (II) in SigmaPlot 9.0 wurden die apparenten kinetischen Parameter Maximalgeschwindigkeit  $V_{max}$  ([U/mg], b) und Michaelis-Menten-Konstante  $K_m$  ([mM], a) berechnet. Der  $K_m$ -Wert ist die Substratmenge bei halber

Maximalgeschwindigkeit. Unter der Annahme, dass die Produktbildung viel langsamer von statten geht als die Bildung des Enzym-Substrat-Komplex-Gleichgewichtes, entspricht der  $K_m$ -Wert der Dissoziationskonstante. Damit kann der  $K_m$ -Wert Hinweise auf die Affinität des Proteins zum Liganden geben - je kleiner  $K_m$  desto höher die Affinität. Als weiterer Parameter wurde die Geschwindigkeitskonstante  $k_{cat}$  ( $[1/s]$ , III) berechnet. Diese beschreibt die Wechselzahl je Enzymuntereinheit mit einem Aktiven Zentrum. Zudem wurde der Quotient  $k_{cat} / K_m$ , die katalytische Effizienz,  $[1/sM]$  berechnet.

$$(II) \quad y = \frac{a x}{b+x} \quad \text{bzw.} \quad V_0 = \frac{V_{max} \times [S]}{K_m + [S]}$$

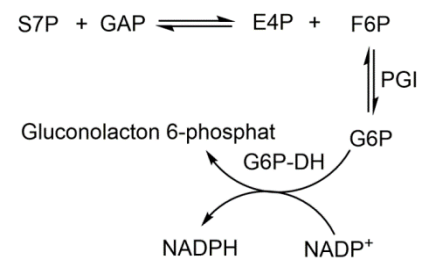
$$(III) \quad k_{cat} \left[ \frac{1}{s} \right] = \frac{V_{max}}{60} \times \text{Molekulargewicht der Untereinheit [kDa]}$$

Die Nachweisgrenze wurde wie folgt nach DIN 32645 [154] definiert (IV) und in Anwendung der höchsten verwendeten Enzymkonzentration in spezifische Aktivität umgerechnet:

$$(IV) \quad \text{Nachweisgrenze} = (\Delta E_{\text{Mittelwert Hintergrund}} + 3 \times \Delta E_{\text{Standardabweichung Hintergrund}})$$

### Transaldolaseaktivität

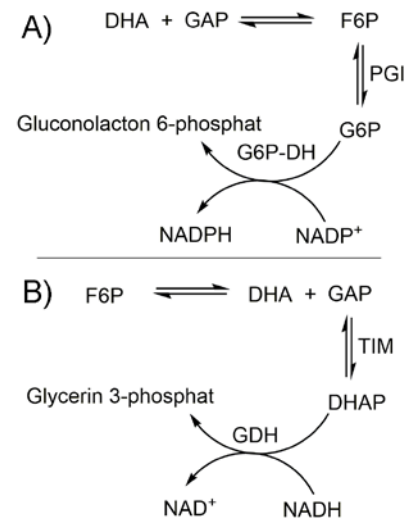
Die Bildung von D-F6P wurde über die Entstehung von NADPH aus 0,5 mM  $\text{NADP}^+$  gemessen (siehe Abb. 2.3) [23]. Hierzu wurden die Kopplungsenzyme Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PDH, 3,5 U) und Glucose-6-phosphat-Isomerase bzw. Phosphoglucose-Isomerase (PGI, 17,5 U) eingesetzt. Als Substrate wurden D-S7P (0,9 mM) und D/L-GAP (2,8 mM, 98,2 % Reinheit) verwendet. D-S7P wurde zum Starten der Reaktion zugegeben. Dabei wurde D-S7P unter sättigenden Bedingungen für TalB<sup>wt</sup> verwendet ( $K_m = 285 \mu\text{M}$  [23]). Die enzymatische Kopplung zur Bestimmung der Transaldolaseaktivität wurde bereits 1953 von Horecker und Smyrniotis beschrieben. Das Substrat D-GAP wurde durch die Spaltung von FBP mit Hilfe einer FBPA bereitgestellt [21,155].



**Abb. 2.3: Transaldolase Assay**

### F6P-Aldolaseaktivität

A) D-F6P-Aldolasereaktion [49]: Die Kopplungsenzyme G6PDH (3,5 U) und PGI (17,5 U) wurden eingesetzt, um die Bildung von D-F6P zu bestimmen (siehe Abb. 2.4, A). Die Substrate DHA (50 mM,  $\geq 97\%$  Reinheit) und D/L-GAP (2,8 mM, 98,2 % Reinheit) sowie 0,5 mM  $\text{NADP}^+$  als Kofaktor wurden dem Reaktionsansatz zugegeben. Für die Bestimmung des apparenten  $K_m$ -Wertes wurde 10 - 300 mM DHA eingesetzt. Dabei wurde D/L-GAP konstant bei 2,8 mM gehalten. Dies entspricht in etwa den  $K_m$ -Werten von  $\text{FSAA}^{\text{wt}}$  (1,9 mM) und  $\text{TalB}^{\text{F178Y}}$  (2,4 mM) [38]. Zudem weist  $\text{FSAA}^{\text{wt}}$  bei einer Konzentration  $> 4$  mM D/L-GAP eine Substratinhibition auf [29]. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von D/L-GAP gestartet.

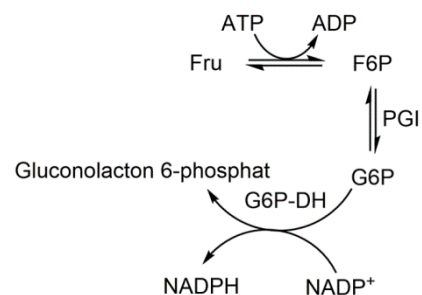


**Abb. 2.4: D-F6P-Aldolase Assay**

B) D-F6P Retroaldolreaktion [49]: Die Spaltung von D-F6P ( $\sim 98\%$  Reinheit) wurde über die Oxidation von  $\text{NADH}$  (0,5 mM) detektiert (siehe Abb. 2.4, B). Hierzu wurden die Hilfsenzyme Triosephosphatisomerase (TIM,  $> 7$  U) und Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase (GDH, 30 U) eingesetzt. Zur Bestimmung des apparenten  $K_m$ -Wertes wurde eine Konzentration zwischen 1 - 60 mM D-F6P zugegeben.

### Fructokinase-Aktivität (FRK-Aktivität)

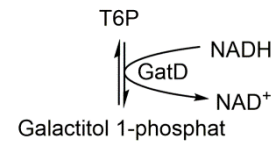
Die Bildung von D-F6P aus D-Fructose (10 mM,  $\geq 99\%$  Reinheit) wurde über die Bildung von  $\text{NADPH}$  aus  $\text{NADP}^+$  (0,5 mM) mit den koppelnden Enzymen G6PDH (3,5 U) und PGI (17,5 U) verfolgt (siehe Abb. 2.5). Adenosintriphosphat (ATP; 1,2 mM) und  $\text{MgCl}_2$  (10 mM) wurden als Kofaktoren für die FRK zugegeben [29].



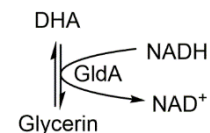
**Abb. 2.5: FRK Assay**

Galactitol-1-phosphat-5-Dehydrogenaseaktivität (GatD-Assay)

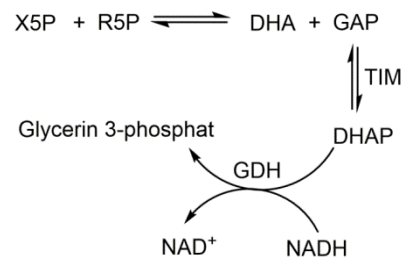
Der Assay (siehe Abb. 2.6) zur Bestimmung der GatD-Aktivität enthielt 0,5 mM NADH, 2 mM D-T6P und 0,8 U GatD. Hierfür wurden 50 mM HEPES, pH 8,0 als Puffer verwendet [29].

**Abb. 2.6: GatD Assay**Glycerin-Dehydrogenaseaktivität

Die Aktivität wurde über die Reduktion von DHA (5 mM,  $\geq 97\%$  Reinheit) zu Glycerin bestimmt (siehe Abb. 2.7). Der Assay enthielt zudem 0,5 mM NADH und 30 mM Ammoniumsulfat [29].

**Abb. 2.7: GldA Assay**Transketolaseaktivität (TKT-Aktivität)

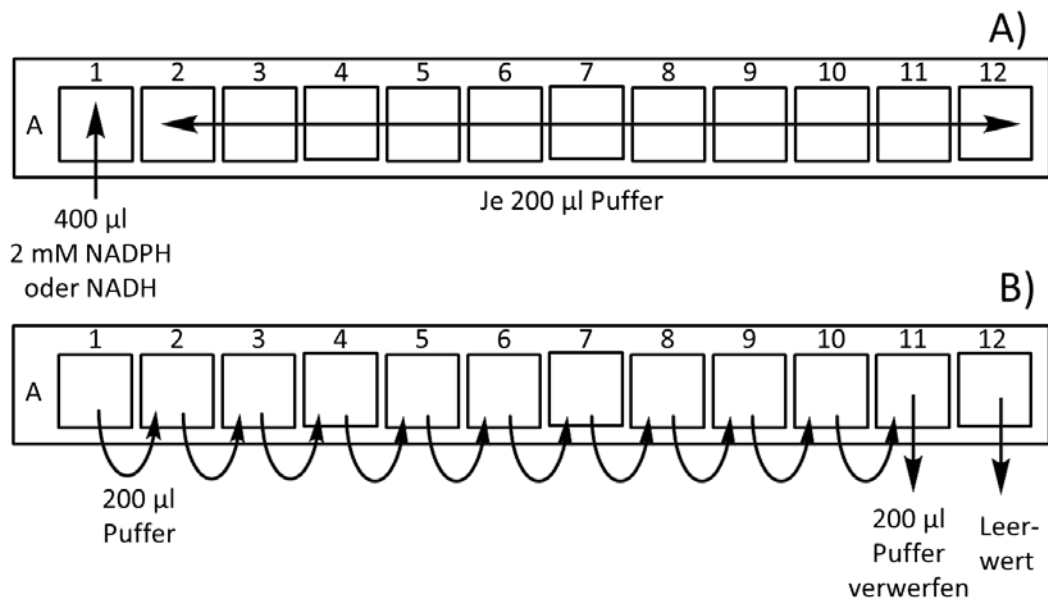
D-Xylulose-5-phosphat (D-X5P, 1,7 mM,  $\geq 90\%$  Reinheit) und D-Ribo-5P (1,7 mM,  $\geq 98\%$  Reinheit) wurden als Substrate für die Detektion der TKT-Aktivität verwendet (siehe Abb. 2.8) [156]. Thiamindiphosphat (0,05 mM) und MgCl<sub>2</sub> (15 mM) wurden als Kofaktoren zugegeben. Die Kopplungsenzyme TIM (> 7 U) und GDH (30 U)

**Abb. 2.8: TKT Assay**

wurden zur Umsetzung des entstehenden D-GAP und zur Bildung von oxidiertem Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD<sup>+</sup>) aus 0,5 mM NADH eingesetzt [156].

**7.5.7 Photometrische Bestimmungen in Mikrotiterplatten**

Zur Quantifizierung in Mikrotiterplatten mit 96 Well wurden Kalibriergeraden von NADH und NADPH im Bereich von 0,002 - 2 mM angefertigt. Hierfür wurde in ,Vertiefung 2' bis ,Vertiefung 12' 200  $\mu$ l Puffer (50 mM Glycylglycinpuffer pH 8,5 mit 1 mM DTT) und in ,Vertiefung 1' 400  $\mu$ l 2 mM Stammlösung (2 mM NADH bzw. NADPH) vorgelegt (siehe Abb. 2.9 A). Anschließend wurde aus ,Vertiefung 1' 200  $\mu$ l entnommen und diese mit den 200  $\mu$ l in ,Vertiefung 2' gemischt. Dieses Prinzip der Entnahme und Vermischung wurde bis ,Vertiefung 11' wiederholt. Abschließend wurden 200  $\mu$ l verworfen, sodass in ,Vertiefung 12' lediglich Puffer enthalten war (siehe Abb. 2.9 B). Dies entspricht einer seriellen Verdünnungsreihe mit dem Faktor 2.



**Abb. 2.9: Pipettierschema für die Verdünnungsreihe zur Kalibrierung in Mikrotiterplatten**

Für die Kalibrierung wurde stets eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Um Schwankungen im Volumen und dadurch in der Schichtdicke auszugleichen, wurden Absorptionsmessungen bei 977 nm (Absorption von Wasser) und 900 nm (Hintergrund) durchgeführt. Hieraus ergab sich der Schichtdickefaktor (I) (Gen5-Software von BioTek). Die gemessenen Absorptionen bei 340 nm wurden um diesen Faktor korrigiert (II). Die Steigung der Kalibriergeraden ( $m_{Kal}$ ) entspricht dem Extinktionskoeffizienten  $\epsilon$  multipliziert mit der Schichtdicke. Daher lässt sich die spezifische Aktivität aus der folgenden Formel (III) berechnen.  $M_{Kal}$  [1/mM] betrug beispielsweise für NADPH 5,6547 1/mM und für NADH 5,1455 1/mM.

$$(I) \quad \text{Schichtdickefaktor} = \frac{E_{977nm} - E_{900nm}}{0,18}$$

$$(II) \quad \text{Abs 340 nm korrigiert} = \frac{E_{340nm}}{\text{Schichtdickefaktor}}$$

$$(III) \quad \text{Spezifische Aktivität [U/mg]} = \frac{m_{Kin} [1/min]}{m_{Kal} [1/mM]} \times \frac{V_P [ml]}{m_{Enzym} [mg]} / 1000$$

$m_{Kin}$  [1/min] = (Anfangssteigung Kinetikkurve – Hintergrund)/ Schichtdickefaktor

$m_{Kal}$  [1/mM] = Steigung Kalibriergerade

= Extinktionskoeffizienten  $\epsilon$  x Schichtdickefaktor

$m_{Enzym}$  [mg] = Masse des eingesetzten Enzyms

$V_P$  [ml] = Volumen der Probe in Mikrotiterplatte = 0,2

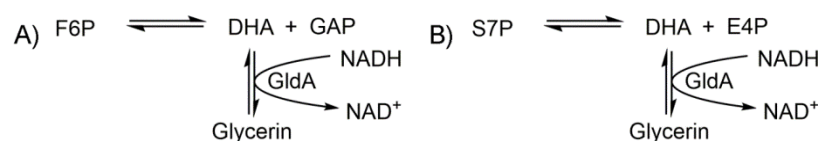
In Mikrotiterplatten wurde für die Bestimmung der D-F6P-Aldolasereaktion die Bildung von D-F6P bei 30 °C detektiert (siehe Abb. 2.4 A). Ein Ansatz von 200 µl bestand aus G6PDH



(0,7 U), PGI (3,5 U), DHA (50 mM,  $\geq 97$  % Reinheit), D/L-GAP (2,8 mM, 98,2 % Reinheit) und 0,5 mM NADP<sup>+</sup>. Zum Start der Reaktion wurden 10  $\mu$ l D/L-GAP zu 190  $\mu$ l Ansatz gemischt. Es wurden 40  $\mu$ g der jeweiligen FSAA-Variante eingesetzt. Als Positivkontrolle diente 0,5 - 4  $\mu$ g FSAA<sup>wt</sup>-Protein (0,1 - 0,8  $\mu$ M) und als Negativkontrolle 40  $\mu$ g TalB<sup>wt</sup>-Protein (5,7  $\mu$ M). Dies entspricht einer Abwandlung der Vorschrift von Schürmann et al. [49].

Die Retroaldolreaktion wurde über den Nachweis von DHA mit GldA (0,04 U/200  $\mu$ l) mit 0,5 mM NADH als Kofaktor und 30 mM Ammoniumsulfat [157] gemessen. Hierbei wurden entweder D-F6P (50 mM,  $\sim 98$  % Reinheit) oder D-S7P (5 mM) als Substrat verwendet (siehe Abb. 2.10). Von allen Proteinen wurde jeweils 40  $\mu$ g (8,3  $\mu$ M Aldolase und 5,7  $\mu$ M Transaldolase) eingesetzt, einschließlich Positiv- und Negativkontrolle. Als Negativkontrolle wurde zudem hitzedenaturierte FSAA<sup>wt</sup> eingesetzt (10 Min, 80 °C). Zur Bestimmung des apparenten  $K_m$ -Wertes wurde zwischen 2,5 - 80 mM D-S7P eingesetzt.

Für die Bestimmung der Transaldolaseaktivität wurde die Bildung von D-F6P (siehe Abb. 2.3) herangezogen. Ein Ansatz von 200  $\mu$ l beinhaltete G6PDH (0,7 U), PGI (3,5 U), D-S7P (0,9 oder 0,3 mM), D/L-GAP (2,8 mM, 98,2 % Reinheit) und 0,5 mM NADP<sup>+</sup>. Die Reaktion wurde ebenfalls durch die Zugabe von 10  $\mu$ l D/L-GAP gestartet. Es wurden 40  $\mu$ g Protein (8,3  $\mu$ M FSAA und Varianten) sowie 1 - 4  $\mu$ g TalB<sup>wt</sup> (0,1-0,6  $\mu$ M) als Positivkontrolle eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde denaturierte FSAA<sup>wt</sup> verwendet. Die Denaturierung erfolgte für 10 min bei 80 °C mit anschließender Zentrifugation (1 h; 4 °C; 17.727 rcf – 13.500 rpm in Hettich MIKRO 22R) und Proteinbestimmung. Dies entspricht einer Abwandlung der Vorschrift von Sprenger et al. [23].



**Abb. 2.10: Retroaldolassay mit GldA**

Zur Äquilibration wurde die Platte nach einer orbitalen Mischung über 5 s mit je einem Probevolumen von 190  $\mu$ l für 10 min im Plattenreader belassen (Einstellung auf 32 °C und Kontrolle der Plattentemperatur auf 30 °C). Anschließend wurde 2 min der Hintergrund gemessen. Es schloss sich eine Absorptionsmessung bei 977 nm und 900 nm an, um den Schichtdickefaktor zu bestimmen. Nach Zugabe des Startreagenz wurde für 3 s doppelorbital geschüttelt und die Reaktion über 10 min verfolgt. In einem Assayansatz wurden maximal acht Dreifachbestimmungen durchgeführt.

## 7.6 pK<sub>a</sub>- und pH-Bestimmungen

### 7.6.1 pH-Optima

Für die Bestimmung des pH-Optimums wurde die Bildung von D-F6P über Transaldolase- und D-F6P-Aldolaseaktivität in verschiedenen Puffersystemen bei 30 °C gemessen (siehe Abb. 2.3, Abb. 2.4). Als Puffer dienten 50 mM HEPES (pK<sub>a</sub> 7,47 [158]; pH 6 - 8), 50 mM Glycylglycin (pK<sub>a</sub> 8,25 [158]; pH 7,5 - 9,5) und 50 mM Taurin (pK<sub>a</sub> 9,06 [158]; pH 9 - 11). Die Ionenstärke wurde konstant bei 128 mM gehalten. Fehlende Ionen wurden durch die Zugabe von NaCl ausgeglichen. Die Ionenstärke ( $I$ ) wurde aus der Molarität der Ionensorte ( $c_j$ ) und der Ladung der Ionensorte ( $z_j$ ) nach Formel (I) berechnet. Im Ansatz befinden sich neben der Basenkonzentration  $[A^-]$  ein zusätzlicher Beitrag an Ammoniumsulfat durch die Kopplungsenzyme PGI und G6PDH. Der Natriumionenbeitrag wird durch die Einstellung des pH-Wertes mit NaOH zugegeben (lediglich bei einem Einkomponentenpuffer). Der Eintrag von Ionen durch die Proteine oder Substrate wurde vernachlässigt. Zusammenfassend wird die Ionenstärke mit Gleichung (II) berechnet. Die Basenkonzentration berechnet sich aus der Henderson-Hasselbalch-Gleichung (III) und beträgt beispielsweise 35,4 mM in 50 mM Glycylglycinpuffer bei pH 8,5 und 30 °C. Zur Einstellung des pH-Wertes war die Zugabe von 3,4 ml einer 1 M NaOH-Lösung notwendig. Hieraus resultieren eine Ionenstärke von 114,7 mM aus Berechnung (IV) und eine fehlende Ionenstärke von 13,3 mM, welche durch die Zugabe von NaCl ausgeglichen wurde.

$$(I) \quad I = \frac{1}{2} \times \sum_j^n c_j \times z_j^2$$

$$(II) \quad I = \frac{1}{2} \times ([A^-] + [Na^+] + 4[SO_4^{2-}] + [NH_4^+])$$

$$(III) \quad pH = pK_a + \lg \frac{[A^-]}{[HA]}$$

$$(IV) \quad I = \frac{1}{2} \times (35,41 + 34 + 4 \times 32 + 32) = 114,7 \text{ mM}$$

Der pH-Wert wurde in Schritten von 0,5 pH-Einheiten verändert. Hierbei wurde pH 7,5 und 8 sowohl in HEPES-Puffer als auch in Glycylglycinpuffer und pH 9 und 9,5 sowohl in Glycylglycinpuffer als auch in Taurinpuffer gemessen. Dies diente zum Ausschluss, dass ein Einfluss des Puffersystems auf die gemessene Aktivität vorliegt. Verschiedene Puffer wurden zuvor auf deren Eignung getestet (saurer Bereich – HEPES, Phosphat; basischer Bereich – N-Cyclohexyl-3-aminopropansulfonsäure (CAPS), Carbonat, Ammoniak, Glycin, Taurin). Bei einem pH-Wert von > 9,5 war die Aldolaseaktivität aufgrund einer chemischen

Hintergrundreaktion von  $\text{NADP}^+$  und dem Substrat DHA nicht mehr messbar (siehe Abb. 3.5). Um Verunreinigungen auszuschließen, wurden zudem alle Komponenten neu hergestellt. Um Wendepunkte zu bestimmen, wurden die pH-Profile zusätzlich halblogarithmisch aufgetragen. Hierdurch ist Zuordnung der Wendepunkte zu den  $\text{pK}_a$ -Werten wichtiger katalytischer Reste eventuell möglich. Für die Visualisierung wurde SigmaPlot 9.0 verwendet.

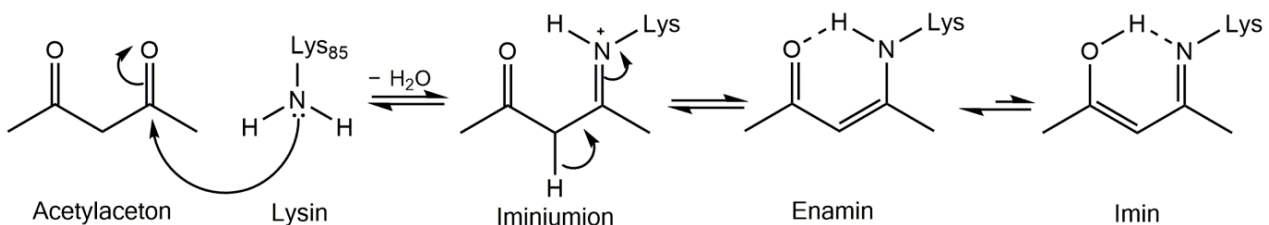
### 7.6.2 $\text{pK}_a$ -Bestimmungen mittels PROPKA

Mittels PROPKA 3.0 bzw. 3.1 [159–162] können die  $\text{pK}_a$ -Werte von ionisierbaren Gruppen in Proteinen auf Basis von Kristallstrukturen vorhergesagt werden. Dies wurde verwendet um die  $\text{pK}_a$ -Werte des aktiven Lys und der Protonendonoren der WT Modellenzyme zu berechnen.

### 7.6.3 $\text{pK}_a$ -Bestimmungen des aktiven Lysinrestes

#### Acetylaceton (AA)

AA ist in der Lage, kovalent an ein neutrales Lys zu binden und einen stabilen Komplex auszubilden (siehe Abb. 2.11) [7–9]. Diese inhibitorische Eigenschaft von AA wurde verwendet, um den  $\text{pK}_a$ -Werte des aktiven Lysinrestes zu experimentell zu bestimmen.



**Abb. 2.11: Reaktionsschema von AA mit dem aktiven Lys von FSAA**

Die Enzyme wurden für bis zu 48 h mit einem 320-fachen molaren Überschuss an AA bei 25 °C und 300 rpm inkubiert. Als Puffer wurden Acetat ( $\text{pK}_a$  4,76 [158]; pH 4/5/5,5; 25 mM), HEPES (pH 6/8; 50 mM), Glycylglycin (pH 9,5; 50 mM) und Carbonat ( $\text{pK}_a$  10,33 [158]; pH 9/9,5/11; 25 mM) mit einer Ionenstärke von 128 mM verwendet. Die verbliebene Aktivität wurde über die Bildung von D-F6P bei 30 °C gemessen (siehe Abb. 2.3, Abb. 2.4). Als Referenz wurde jeweils eine Probe ohne AA beim höchsten und beim niedrigsten pH-Wert von jedem Puffer mitgeführt. Die verbleibende Aktivität bei den unterschiedlichen pH-Werten wurde gegen die Zeit aufgetragen. Ausgehend vom Reaktionsschema (siehe Abb. 2.11) ist die Geschwindigkeit sowohl von der Enzym- als auch von der Inhibitorkonzentration abhängig. Daher wurde aus diesen Messwerten je pH-

Wert mittels SigmaPlot 9.0 die Funktion einer Reaktion zweiter Ordnung abgeleitet (I). Hieraus resultierten die Geschwindigkeitskonstanten der Inhibitionen ( $k_{app}$ ), die wiederum gegen den pH-Wert aufgetragen wurden. Um die  $pK_a$ -Werte zu erhalten, wurde an diese Datenpunkte die Kurve einer Henderson-Hasselbalch-Gleichung (II) angelegt [163,164].

$$(I) \quad [FSAA]_{verbleibend} = \frac{[FSAA]_0}{1 + k_{app} t [FSAA]_0}$$

$$(II) \quad k_{app} = k_{min} + \frac{k_{max} - k_{min}}{1 + 10^{pK_a - pH}}$$

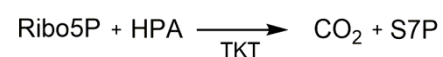
### Pyridoxal-5-phosphat (PLP)

Die Bestimmung des  $pK_a$ -Wertes von Lys wurde alternativ zu AA mit PLP versucht. Hierfür wird die Änderung des Absorptionsspektrums bei 329 nm durch Bindung von PLP an Lys detektiert. Zum Vergleich müsste die Modellsubstanz Pyridoxamin 5-phosphat bei 325 nm gemessen werden. Die Unterschiede in den  $pK_a$ -Werten der Modellsubstanz und des gebundenen PLP lassen die Abweichung des  $pK_a$ -Wertes des Lysinrestes durch das ionische Potential des Enzyms abschätzen [165,166]. Voraussetzung dafür ist, dass PLP an das katalytisch aktive Lys bindet und inhibierend wirkt. Hierfür wurden 100  $\mu\text{g}$   $FSAA^{wt}$  mit einem 25-fachen Überschuss [166] an PLP für 30 min bei 30 °C inkubiert. Direkt im Anschluss wurde der Ansatz ohne Verdünnung durch Zugabe der Substrate DHA und D/L-GAP sowie der Kopplungsenzyme einem F6P-Aktivitätstest unterzogen.

## 7.7 Präparative Synthesen

### 7.7.1 D-Sedoheptulose-7-phosphat

Die bereits beschriebene Synthese von D-S7P wurde auf die Anwendung von TKT aus *E. coli* angepasst [167]. Der Ansatz (0,5 ml) enthielt eine



**Abb. 2.12: Synthesereaktion D-S7P**

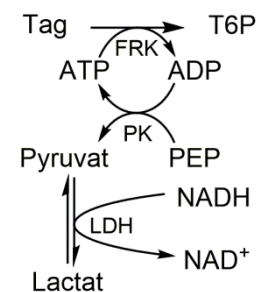
Endkonzentration von 130 mM D-Ribose-5P (Ribo5P,  $\geq 98\%$  Reinheit), 130 mM Hydroxypyruvat (HPA,  $\geq 95\%$  Reinheit), 0,1 mM Thiamindiphosphat, 3 mM  $\text{MgCl}_2$  und 3 U TKT in Wasser (Abb. 2.12). Der pH-Wert wurde vor der Zugabe von TKT auf Indikatorpapier überprüft und mit Hilfe von 1 M NaOH auf pH 6 - 7 eingestellt. Der Reaktionsansatz wurde über Nacht bei 30 °C und 145 rpm in einem offenen Reaktionsgefäß inkubiert. Abschließend wurde das Enzym mittels einer Zentrifugationseinheit (Ausschlussgröße 10 kDa) abgetrennt. Die Konzentration von D-S7P wurde über einen modifizierten Assay für Transaldolaseaktivität bestimmt (siehe 7.5.6). Hierfür wurden 50 U TalB, 2,8 mM D/L-GAP, 0,5 mM  $\text{NADP}^+$  und 3,5 U

G6PDH sowie 17,5 U PGI verwendet. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1  $\mu$ l Syntheseansatz, der keine TKT mehr enthielt, gestartet und für 30 min beobachtet. Die Konzentration  $c$  [M] wurde aus der Absorption zu Beginn  $E_1$  und am Ende  $E_2$  der Reaktion berechnet (siehe Formel I). Die Konzentration betrug mindestens 36 mM ( $\geq 30$  % Reinheit), im Durchschnitt betrug sie 102 mM (79 % Reinheit). Es besteht die Möglichkeit D-S7P einer Gefriertrocknung zu unterziehen. Diese wurde lediglich einmal angewandt, um höhere Konzentrationen im Assay zu erzielen.

$$(I) \quad c [M] = \frac{(E_2 - E_1)}{6220}$$

### 7.7.2 D-Tagatose-6-phosphat

Der präparative Syntheseansatz (50 ml) entwickelt von Samland, Heilig, Fessner und Sanchez-Moreno für D-T6P war zusammengesetzt aus 111 mM D-Tagatose (5,6 mmol), 60 mM PEP (3 mmol), 1,2 mM ATP (0,1 mmol), 2,3 mM  $MgCl_2$  (0,1 mmol), 10 U Pyruvatkinase und 300 U FRK in Wasser; angegeben sind jeweils die Endkonzentrationen. Der Zusatz von PEP und Pyruvatkinase (PK) diente als ATP-Regenerationssystem. Es wurde eine 1 M PEP-Stammlösung verwendet, die zuvor mit KOH neutralisiert wurde. Nach 24 h



**Abb. 2.13:**  
**Tagatose-**  
**Umsatzassay**

Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Vollständigkeit der Reaktion kontrolliert. Hierzu wurde der PEP-Verbrauch mit der L-Lactatdehydrogenase (L-LDH) getestet (siehe Abb. 2.13). Der Assay im 1 ml Maßstab wurde in 50 mM Tris/HCl pH 8,0 durchgeführt. Die Bestandteile waren 0,5 mM NADH und 5 U L-LDH. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 1  $\mu$ l Syntheseansatz gestartet. Die entstandene Pyruvat-Konzentration wurde ebenfalls aus der Absorption zu Beginn  $E_1$  und am Ende  $E_2$  der Reaktion berechnet (siehe 7.7.1 (I)).

Nach Abschluss des Umsatzes wurden die Enzyme mit einer Zentrifugationseinheit entfernt (Ausschlussgröße 10 kDa). D-T6P wurde zur Aufreinigung als Bariumsalz gefällt (analog zu [61]). Hierzu wurden 1,5 Äquivalente  $Ba^{2+}$ -Ionen unter Berücksichtigung aller phosphorylierten Komponenten aus einer 0,1 M  $BaCl_2$ -Stammlösung langsam unter Schütteln zugegeben. Dies entspricht 4,6 mmol Äquivalente und einem Volumen von 46 ml. Nach 15 min Schütteln bei Raumtemperatur wurde das erste Präzipitat, bestehend aus kleineren phosphorylierten Molekülen wie beispielsweise anorganischem Phosphat, zentrifugiert (20 min; 4 °C; 6.527 rcf – 5.500 rpm in Hettich Rotanta 460). Der Überstand

wurde in einen Erlenmeyerkolben überführt und 5 Volumenäquivalente EtOH<sub>techn</sub> langsam unter Schütteln zugegeben. Nach einer Inkubation von 20 min unter Schütteln bei Raumtemperatur wurde der Reaktionsansatz über Nacht bei 4 °C inkubiert. Das so entstandene zweite Präzipitat enthält das angestrebte D-T6P-Salz. Der Reaktionsansatz wurde schrittweise durch Zentrifugation (20 min; 4 °C; 6.527 rcf) und Dekantieren in ein gewogenes 50 ml Reaktionsgefäß überführt, wodurch das zweite Präzipitat erhalten wurde. Dieses wurde im Anschluss 3-mal mit 15 ml EtOH<sub>techn</sub> gewaschen, wobei der Überstand jeweils nach der Zentrifugation (20 min; 4 °C; 6.527 rcf) verworfen wurde. Abschließend wurde das D-T6P-Salz bei 50 °C getrocknet. Um 0,1 g des D-T6P-Salzes zu lösen, wurde in 5 ml Wasser eine Spatelspitze Ionenaustauscher Dowex 50Wx8 zugegeben, bis das Salz gelöst war. Über einen Spritzenfilter Filtropur S 0.2 µm von Sarstedt wurde der Ionenaustauscher vom D-T6P abgetrennt. Abschließend wurde mit 1 M NaOH der pH-Wert auf 8,5 eingestellt und D-T6P bei 8 °C gelagert. Es besteht die Möglichkeit, D-T6P gefrierzutrocknen und anschließend bei –20 °C zu lagern. Diese wurde jedoch nicht genutzt.

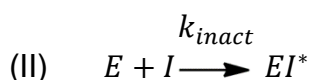
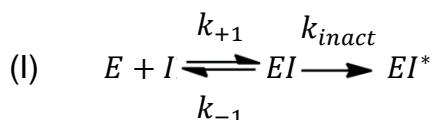
Die Konzentrationsbestimmung von D-T6P wurde mit GatD durchgeführt. GatD akzeptiert weder D-Tagatose [Samland, unveröffentlicht] noch D-F6P [97] als Substrat. Der Assay bestand aus 1 U GatD und 0,5 mM NADH (siehe Abb. 2.6). Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 10 µl gelöstes D-T6P gestartet und für 30 min verfolgt. Aus der Absorption zu Beginn der Reaktion und nach 30 min wurde die Konzentration berechnet (siehe 7.7.1). Eine Ausbeute von 45 % als Bariumsalz konnte erzielt werden. Die Reinheit des gelösten D-T6P betrug  $\geq 95$  % (Interpretation der NMR Daten durch Fessner, TU Darmstadt). Diese Arbeiten wurden unterstützt von Frisch durch Hilfe bei der Expression und Aufkonzentrierung der TKT sowie bei der D-S7P-Synthese.

## 7.8 Inhibition

### 7.8.1 Inhibitionskinetiken Tagatose-6-phosphat

Zur Inhibition wurden die Enzyme mit verschiedenen Konzentrationen an Inhibitor vorinkubiert (nach [29]). Dieses Verfahren wurde für TalB und TalB<sup>F178Y</sup> bereits von S. Schneider beschrieben und im Rahmen dieser Arbeit weiterentwickelt. Beispielsweise wurde 1-facher, 2-facher, 5-facher und 10-facher Überschuss an Inhibitor über die Enzymkonzentration verwendet. Es wurden 14 µM TalB, 143 µM TalB<sup>F178Y</sup>, 71 µM TalB<sup>E96Q F178Y</sup>, 104 µM FSAA, 6 µM FSAA<sup>A129S</sup>, 41 µM hTal und 27 µM hTal<sup>F189Y</sup> eingesetzt. Die Konzentrationen wurden so gewählt, dass ausreichend Messpunkte vorlagen, um jeweils die Anfangssteigungen zur Berechnung der spezifischen Aktivität

durch lineare Regression zu ermitteln. Die verbliebene spezifische Aktivität wurde zu verschiedenen Zeitpunkten innerhalb von 24 h gemessen (beispielsweise 0 h, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h und 24 h). Dabei wurde die Retroaldolaktivität (Spaltung von D-F6P) bzw. Transaldolaseaktivität (Bildung von D-F6P) bei 30 °C gemessen, wie in Abb. 2.4 B bzw. Abb. 2.3 schematisch dargestellt. Um zu kontrollieren, dass es sich um eine irreversible Inhibition handelt, wurden die Ansätze nach 24 h im Verhältnis 1:50 mit 50 mM Glycylglycinpuffer pH 8,5 und einem Zusatz von 1mM DTT verdünnt und für weitere 24 h inkubiert. Abschließend wurde überprüft, ob die Aktivität durch diese Verdünnung wiederherstellbar war. Zum Vergleich wurde ein Ansatz ohne D-T6P gemessen und als 100 % definiert (Retroaldolaktivität: TalB<sup>F178Y</sup> 0,4 U/mg, TalB<sup>E96Q F178Y</sup> 1,3 U/mg, FSAA 1,7 U/mg, FSAA<sup>A129S</sup> 11,1 U/mg, hTal<sup>F189Y</sup> 0,1 U/mg; Transaldolaseaktivität: TalB 4,4 U/mg, hTal 0,8 U/mg). Diese Ergebnisse wurden mit Hilfe von Guitart-Font angefertigt. Um die Halbwertszeit der Inaktivierung zu bestimmen, wurde mit SigmaPlot 9.0 ein exponentieller Abfall an die gemessenen spezifischen Aktivitäten gefittet. Des Weiteren kann über eine Sekundärauftragung eine Aussage über den Inaktivierungsmechanismus getroffen werden. In der Literatur ist beschrieben, dass bei Aldolasen zwei Inaktivierungsmechanismen möglich sind [168]. Es kann zuerst ein reversibler Inhibitor-Komplex gebildet werden, der im Anschluss irreversibel inaktiviert wird (I). Alternativ kann direkt ein irreversibler Enzym-Inhibitor-Komplex entstehen (II). Über die Kitz-Wilson-Formel (III) [168,169] lassen sich die Inaktivierungskonstante ( $k_{inact}$ ) und die Dissoziationskonstante des reversiblen Inhibitor-Komplexes ( $K_i$ ) im Fließgleichgewicht bestimmen. Hierzu wurde die Halbwertszeit der Inaktivierung gegen die reziproke Inhibitor-Konzentration [ $n$ -fache Enzymkonzentration] aufgetragen. Der extrapolierte lineare Fit kann zwei Koordinatenschnittpunkte aufweisen (Ordinate/Abszisse) oder einen Schnittpunkt durch den Ursprung. Handelt es sich um eine Ursprungsgerade, so wird direkt der irreversible Enzym-Inhibitor-Komplex (II) gebildet.



$$(III) \quad t_{\frac{1}{2}} = \frac{\ln(2)}{k_{inact}} \left( 1 + \frac{K_i}{[I]} \right)$$

## 7.8.2 Massenspektrometrie (LC-ESI-MS)

Bei dem verwendeten Massenspektrometriesystem handelte es sich um ein Durchsatzverfahren mit direkter Entsalzung der Proben von Mikrotiterplatten [170]. Der Analysenbereich liegt zwischen 5 und 100 kDa mit einer Genauigkeit von  $\pm 4$  Da. Das erste Element dieses Systems ist die Flüssigkeitschromatographie (LC) an einer Umkehrphase (CapLC System). Hier wurden die Proben und Standards direkt auf eine äquilibrierte Säule, gefüllt mit Acclaim® PepMap300 C4 von Thermo Scientific Dionex, aufgetragen. Das direkt angeschlossene „Q-ToF II“ System ist ein Hybridsystem, bestehend aus einer Z-Elektrosprayionisationsquelle (ESI), einem orthogonalen Quadrupol-Massenfilter und einem *Time of flight*-Massenanalysator von Waters. Ein Vorteil einer Z-ESI ist, dass die angestrebten Analytionen einer Z-förmigen Trajektorie folgen und somit von den Lösungsmittel- und Puffermolekülen auf der kegelförmigen Trajektorie abgetrennt werden [171]. Mit diesem Hybridsystem wurden die Flugzeitdaten analysiert bzw. das Masse-zu-Ladungsverhältnis ( $m/z$ ) bestimmt. Zusammenfassend handelt es sich um eine LC-ESI-MS, die am Royal Institute of Technology / Albanova University Centre / Stockholm / Schweden lokalisiert ist.

Die Bindung des Inhibitors D-T6P an TalB<sup>F178Y</sup> und TalB<sup>E96Q F178Y</sup> sowie an FSAA<sup>wt</sup> und FSAA<sup>A129S</sup> sollte nachgewiesen werden. Hierfür wurde eine Lösung mit 143  $\mu$ M TalB<sup>F178Y</sup> und 71  $\mu$ M TalB<sup>E96Q F178Y</sup> mit zweifachem Überschuss an D-T6P bei 37 °C für 24 h inkubiert. Für die Ausbildung der Inhibitorkomplexe von FSAA<sup>wt</sup> und FSAA<sup>A129S</sup> bei 30 °C für 66 h wurde eine 83  $\mu$ M Enzymlösung mit 10-fachem Überschuss an D-T6P eingesetzt. Es wurde jeweils ein Ansatz ohne D-T6P als Stabilitätskontrolle mitgeführt. Dieser wurde ebenfalls als Referenzansatz für die Berechnung der verbliebenen Aktivität verwendet. Dadurch wurden Denaturierungseffekte und systemische Schwankungen berücksichtigt. Die Inaktivierung für FSAA<sup>wt</sup> und FSAA<sup>A129S</sup> wurde über die Spaltung von D-F6P nachgewiesen, wie bereits beschrieben (siehe Abb. 2.4 B). Für TalB<sup>F178Y</sup> und TalB<sup>E96Q F178Y</sup> wurde der Assay zur D-F6P-Bildung angewendet (siehe Abb. 2.3). Die Reaktionsansätze wurden entsprechend auf 2 mg/ml verdünnt. Vor der MS-Analyse wurden die Proben (5  $\mu$ l) in einer Mikrotiterplatte mit 500  $\mu$ l Reduktionsmittel gemischt (0,2 mM Tris(2-carboxyethyl)phosphin, 5 % (v/v) Acetonitril und 0,1 % (v/v) Essigsäure). Die LC-ESI-MS wurde in Kooperation mit der Protein Science Facility (PSF) am Karolinska Institutet als Auftragsarbeit des Royal Institute of Technology in Stockholm/Schweden durchgeführt.



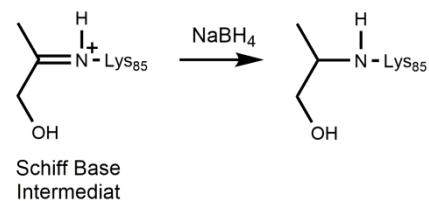
### 7.8.3 Inhibitionskinetiken D-Glycerinaldehyd

Der Aldolaseassay zur Bildung von D-F6P wurde wie bereits in 7.5.6 durchgeführt. Zur Bestimmung des  $K_I$ -Wertes wurden 0 - 0,5 mM D-GA und 5 - 150 mM DHA eingesetzt. Die Konzentration an D/L-GAP wurde konstant bei 2,8 mM gehalten. Die Auswertung erfolgte als direkte Auftragung der Spezifischen Aktivität [U/mg] gegen die DHA-Konzentration [mM] nach Michaelis-Menten. Die Auswertung mittels SigmaPlot 9.0 ist in 7.5.6 beschrieben. In der doppelreziproken Auftragung der Spezifischen Aktivität [U/mg]<sup>-1</sup> nach Lineweaver-Burk gegen die DHA-Konzentration [mM]<sup>-1</sup>, kann die Art der Inhibition bestimmt werden. Im der Sekundären Auftragung der Steigung gegen die Inhibitor-Konzentration kann aus dem Schnittpunkt der Geraden der  $K_I$ -Wert berechnet werden.

## 7.9 Kristallisationen

### 7.9.1 Enzym-Substrat-Komplex

Um eine Struktur eines Enzym-Substrat-Komplexes der FSAA zu erhalten, wurden verschiedene Substrate nach Bindung an das Enzym mit Hilfe von Natriumborhydrid reduziert, wodurch eine irreversible Bindung an das essenzielle Lys zustande kommen kann (siehe Abb. 2.14). Diese Methode ist für Transaldolasen bei pH 6 am effektivsten, wobei der Verlust an



**Abb. 2.14: Reaktionsschema der Reduktion des Schiff'sche Base Intermediates, gezeigt am Beispiel von HA mit FSAA**

Aktivität mit der Blockierung des aktiven Lysinrestes korrespondiert [172]. Der irreversibel reduzierte Komplex kann im Anschluss zur Kristallisation eingesetzt werden. Dies wurde bereits erfolgreich für TalB mit D-F6P gezeigt, wobei das aktive Lys mit einer Glyceryl-Einheit modifiziert war [5]. Als Alternative kann zur Ausbildung eines Enzym-Substrat-Komplexes *Soaking* (beschrieben für eine archäale FBPA mit FBP, [106]) oder Ko-Kristallisation (beschrieben für die TacTal mit D-F6P und D-S7P, [33]) verwendet werden. Beim *Soaking* wurden bereits erhaltene Kristalle der FSAA<sup>wt</sup> in Frostschutzlösung mit Substrat eingeweicht. Die Ko-Kristallisation basiert darauf, dass das Substrat direkt in der Kristallisationslösung enthalten ist.

## Reduktion

Zur Substratbindung im Enzym wurde eine Abwandlung der beschriebenen Methode verwendet [29,173]. Hierzu wurde 1 mg FSAA in 5 ml 20 mM HEPES pH 7,5 für 10 min bei 30 °C mit Substrat bzw. ohne Substrat als Kontrolle inkubiert. Die Substratkonzentration entsprach dem 440-fachen Überschuss zur Proteinkonzentration (3,5 mM bezogen auf FSAA) oder dem  $K_m$ , falls dieser höher als der 440-fache Überschuss war. Es wurden folgende Substrate verwendet: D-F6P (19 mM [diese Arbeit],  $\geq 98\%$ ), DHA (31 mM mit Akzeptor D/L-GAP [diese Arbeit], 97%), HA (17 mM mit Akzeptor D/L-GAP [54],  $\geq 95\%$ ), HB (32 mM mit Akzeptor D/L-GAP [55]) GO (0,2 mM mit Akzeptor GO [54]), D-GA ( $K_m$  nicht bekannt,  $K_m(\text{GAP}) = 1,9$  [38] mit dem Donor DHA,  $> 98\%$ ), Aceton ( $K_m$  nicht bekannt,  $K_m(\text{DHA}) = 31$  mM [diese Arbeit]). Nach der Inkubationszeit wurden 5 ml kalter 50 mM 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure-Puffer pH 5,8 zugegeben. Unter Rühren auf Eis wurde langsam (1 ml/min) 1 ml frisch hergestellte 3 M  $\text{NaBH}_4$  zugegeben. Anschließend wurde der pH-Wert mit 5 M Essigsäure langsam auf pH 6 eingestellt. Die Zugabe von  $\text{NaBH}_4$  und Essigsäure wurde wiederholt, bis insgesamt 5 ml 3 M  $\text{NaBH}_4$  im Ansatz enthalten waren. Durch denaturierende Bedingungen wurde hier bis zu 80 % des Proteins verloren. Der Ansatz wurde abschließend über Nacht gegen 1 l 20 mM Glycylglycin pH 8,5 bei 8 °C dialysiert (Ausschlussgröße 10 kDa). Nach Überführung des Dialyseschlauchinhaltes in ein 50 ml Reaktionsgefäß wurde dieser zentrifugiert (10 min; 4 °C; 4.000 rcf – 4.307 rpm in Hettich Rotanta 460), um ausgefallene Proteinbestandteile abzutrennen. Über eine Zentrifugationseinheit wurde eingeeengt und umgepuffert (2x 4 ml 50 mM Glycylglycin pH 8,5 mit 1 mM DTT). Die Inaktivierung wurde über die D-F6P Bildung mit PGI und G6PDH (siehe Abb. 2.4 A) überprüft. Als Positivkontrolle wurde eine Probe ohne Substrat durch den gesamten Prozess mitgezogen.

Zudem wurden zur Kontrolle LC-ESI-MS-Messungen durchgeführt (siehe 7.8.2). Hierzu wurden die Proben unter Anwendung der Zentrifugationseinheit auf eine Konzentration von 2 g/l eingeeengt und dies mittels Bradford (siehe 7.5.5) überprüft.

## Soaking

Zum Überprüfen der Bindung bzw. der Bindungsart von D-F6P wurden Kristalle von  $\text{FSAA}^{\text{Y131F}}$ ,  $\text{FSAA}^{\text{Q59E Y131F}}$  und  $\text{TalB}^{\text{E96Q}}$  in Frostschutzlösung mit D-F6P eingeweicht. Die Bindung des Inhibitors AA an  $\text{FSAA}^{\text{wt}}$  sollte ebenfalls mit *Soaking* gezeigt werden. Die verwendeten Frostschutzlösungen basierten auf der Zusammensetzung der Präzipitationslösungen mit 25 – 30 % Ethylenglykol (EG) als Kryoprotektant und

0,1 M - 0,6 M D-F6P (Reinheit  $\geq 98\%$ ). Die verwendete Einweichzeit betrug zwischen 30 s und 5 min. Im Fall des Inhibitors AA wurden 0,5 M verwendet und 2 min - 7 min eingeweicht. Als Präzipitationslösungen wurden möglichst Zusammensetzungen gewählt, die keine inhibierenden Komponenten enthalten. Sulfat und Phosphat könnten die Substratbindung durch Blockieren der Phosphatbindungstasche verhindern. Ebenfalls sollte der pH-Wert im Enzymoptimum liegen, sodass Bedingungen für enzymatische Aktivität vorliegen. Die bekannte Struktur von TalB<sup>wt</sup> und FSAA<sup>wt</sup> wurde bei einem pH-Wert von 4,5 bzw. 4,6 erhalten, welche nicht im pH-Optimum liegen [2,3]. Ferner sollte Glycerin als Präzipitant vermieden werden. In den bekannten Strukturen von FSAA<sup>wt</sup> und der TacTal ist das aktive Lys modifiziert, wahrscheinlich während der Kristallisation durch die Applikation von Glycerin [2,33].

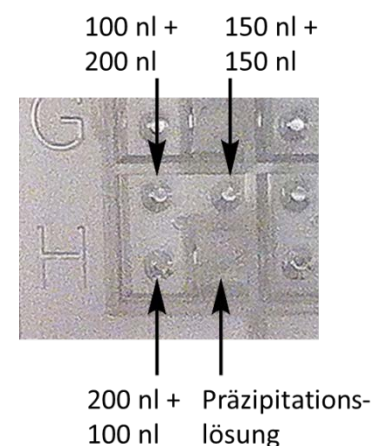
### *Ko-Kristallisation*

Als Alternative zu dem reduzierten Enzym-Substrat-Komplex der FSAA wurde DHA direkt in die Präzipitationslösungen gegeben. Hierbei wurde das 5- bis 13-fache des Km Wertes von DHA (31 mM [diese Arbeit], 97 %) eingesetzt. Es wurden hierzu Kristallisationsbedingungen gewählt, welche lediglich Polyethylenglycol3350, eine Pufferkomponente (HEPES oder Glycylglycin) pH 8 und LiCl enthalten. Somit soll die Aktivität von FSAA erhalten bleiben.

### 7.9.2 Screening

Zur Auffindung von neuen bzw. zur Kontrolle der schon bekannten Kristallisationsbedingungen wurden vier verschiedene Kristallisationsscreenings verwendet: *JCSG+*, *PEGs*, *Wizard* und *Classic II*. Beispielsweise lassen sich mit dem *PEGs* Screen verschiedene Polyethylenglycol (PEG) und Salze testen. Unter Anwendung des Crystal Phoenix Pipettierroboters wurden aus den vorgefertigten Deepwellplatten Präzipitationslösungen in eine Mikrotiterplatte vorgelegt. Im Anschluss wurden Präzipitationslösung und Proteinlösung mit dem Mosquito Pipettierroboter in drei Verhältnissen gemischt (1:2, 1:1, 2:1) und bei 20 °C inkubiert (siehe Abb. 2.15). Die Platten wurden direkt nach dem Ansetzen und anschließend nach 1 Tag,

der schon bekannten



**Abb. 2.15:**  
**Mischungsverhältnisse in Mikrotiterscreeningplatte**

2 Tagen, 3 Tagen, 1 Woche und 2 Wochen auf Kristalle kontrolliert. Zum Teil wurde auf eine Inkubationskammer mit RockMaker System zurückgegriffen, welches vollautomatisch zu den festgelegten Zeitpunkten Bilder der einzelnen Ansätze aufnahm. Alternativ wurde das Stereomikroskop Leica MZ8 verwendet. Die Ergebnisse wurden folgendermaßen klassifiziert: klare Lösung, Verunreinigung (z. B. Luftblasen), Präzipitat, Phasenseparation, Sphärolite, Nadeln, Polykristalle, plattenförmige Kristalle und Monokristalle. Hilfe bei der Einarbeitung in die Bedingung der Roboter erfolgt durch Moche und Sandalova.

### 7.9.3 Optimierung der Kristallisationsbedingungen

Nach dem Auffinden von möglichen Kristallisationsbedingungen und der Kontrolle bisher verwendeter Bedingungen [2,3], die zu Polykristallen, plattenförmigen Kristallen oder Monokristallen führten, wurden diese in Platten mit 24 Well optimiert (Beispielbilder in Abb. 3.25). Hierfür wurden diese Bedingungen in die *Hanging-drop* Methode übertragen und leicht variiert. Beispielsweise wurde ein Monokristall im PEG-Screen mit den Bedingungen 20 % PEG 3350 und 200 mM Lithiumsulfat aufgefunden. Hieraus wurden insgesamt 24 verschiedene Bedingungen abgeleitet: In der jeweiligen Kombination von 18, 19, 20, 21 - 22 % PEG 3350 (vertikale Abfolge) und 50, 100, 150 - 200 mM Lithiumsulfat (horizontale Abfolge). Diese Präzipitationslösungen ließen sich mittels Freedom EVO in den Platten mischen. Dabei wurde die Hanging-drop Methode verwendet (siehe Abb. 2.16): Durch Diffusion des Wassers in das 1 ml Reservoir wird eine Aufkonzentrierung erreicht, die möglichst in Keimbildung und schließlich in Kristallisation resultiert. Dabei wurden die Glasdeckel mit dem Gemisch aus Protein und Fällungsmittel mit Hilfe von Silikonfett luftdicht auf die Platte aufgebracht. Alle Proteine befanden sich in 50 mM Glycylglycin pH 8,0 mit 1 mM DTT. Zur Verbesserung der Kristallbildung wurden zum Teil über *Streak-Seeding* Keime eingebracht.

Zur Röntgenanalyse wurden die erhaltenen Kristalle mit einer Schlaufe aus dem Tropfen gefischt, kurz in Frostschutz- oder *Soakinglösung* getaucht, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und darin gelagert. Die genauen Bedingungen sind in Tab. 2.13 aufgeführt.

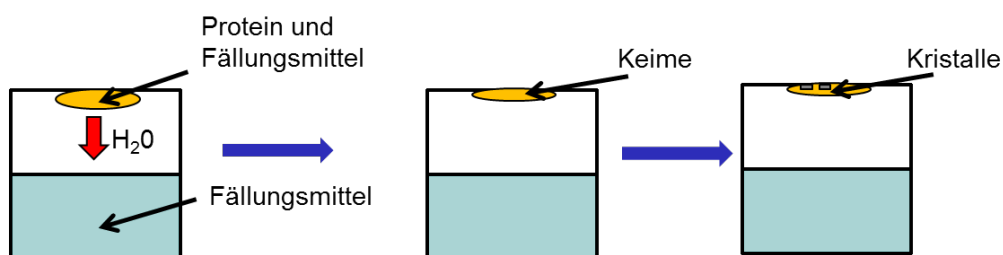


Abb. 2.16: *Hanging-drop* Methode

**Tab. 2.13: Erfolgreich getestete Kristallisationsbedingungen**

<sup>1</sup>Aufgeführt ist das Volumen der Proteinlösung [µl] gefolgt von dem Volumen der Präzipitationslösung [µl]. <sup>2</sup>D-F6P war gelöst in 50 mM Glycylglycin, pH 8,0. <sup>3</sup>Ethylenglycol (EG). <sup>4</sup>Für die Bindung des Inhibitors wurde TalB<sup>F178Y</sup> (857 µM) mit zweifachem Überschuss über die Enzymkonzentration an D-T6P bei 37 °C für 24h inkubiert.

	<b>FSAA<sup>Q59E</sup></b>	<b>TalB<sup>E96Q F178Y</sup></b>	<b>FSAA<sup>Q59E Y131F</sup></b>	<b>FSAA<sup>Y131F</sup></b>	<b>TalB<sup>E96Q</sup></b>	<b>FSAA<sup>wt</sup> + AA</b>	<b>TalB<sup>E96Q</sup> + D-F6P</b>	<b>TalB<sup>E96Q</sup> + D-T6P</b>
<b>Konzentration Proteinlösung [mg/ml]</b>	15	30	20	15	30	15	28	30 <sup>3</sup>
<b>Präzipitationslösung</b>	12 % (w/v) PEG4000 0,1 M Natriumacetat, pH4.7 30 % Glycerin	18 % (w/v) PEG3350 0,15 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO	21 % (w/v) PEG3350 0,2 M NaCl 0,1 M (Tris)/HCl pH 8,5	19 % (w/v) PEG3350 0,2 M LiCl 0,1 M HEPES pH 8,0	23 % (w/v) PEG3350 0,15 M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	25 % (w/v) PEG3350 0,2 M LiCl 0,1 M Tris/HCl, pH 8,5	18 % (w/v) PEG 3350 0,2 M D/L-Äpfelsäure, pH 7	18 % (w/v) PEG3350 0,15 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> <sup>4</sup>
<b>Tropfenzusammensetzung<sup>1</sup></b>	2 µl + 2 µl	2 µl + 2 µl	3 µl + 1,5 µl	2 µl + 2 µl	2 µl + 2 µl	2 µl + 2 µl	3 µl + 1,5 µl	3 µl + 1,5 µl
<b>Streak-Seeding</b>	-	-	ja	-	ja	-	ja	ja
<b>Soakingzeit [min]</b>	-	-	1	1	3	7	0,5	-
<b>Soaking-/Frostschutzlösung</b>	50 % (v/v) EG <sup>3</sup>	50 % (v/v) EG	16% (w/v) PEG 3350 0,2 M LiCl 0,38 M D-F6P <sup>2</sup> 25 % (v/v) EG	16 % (w/v) PEG 3350 0,2 M LiCl 0,38 M D-F6P <sup>2</sup> 25 % (v/v) EG	21 % (w/v) PEG3350 0,1 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> <sup>4</sup> 0,1 M D-F6P <sup>2</sup> 30 % (v/v) EG	16 % (w/v) PEG3350 0,1 M LiCl 0,1 M Glycylglycin, pH 8,0 0,5 M AA 30 % (v/v) EG	18 % (w/v) PEG 3350 0,2 M D/L-Äpfelsäure, pH 7 0,1 M D-F6P <sup>2</sup> 30 % (v/v) EG	50 % (v/v) EG

## 7.9.4 Datenerfassung, Datenprozessierung und Modellierung

Die Röntgenstrukturdaten wurden an den Strahllinien I04 / I02 in der Diamond Light Source (Didcot, England), MX\_14.1 am BESSY (Helmholtz Zentrum Berlin, Deutschland), P13 Petra III am DESY (Hamburg, Deutschland) sowie ID23-1, ID29, und ID14-4 in der European Synchrotron Radiation Facility (Grenoble, Frankreich) aufgenommen. Die Röntgenstrukturdaten wurden von G. Schneider / Schnell oder Mitarbeitern der Gruppe von Achour / Sandalova aufgenommen. Die Datensätze wurden mit den Programmen *MOSFLM* [122] oder *XDS* [123] prozessiert und mit *AIMLESS* [119], implementiert in der *CCP4 suite* [118], skaliert. Mit Hilfe von Molekularem Ersatz, durchgeführt mit den Programmen *Phaser* [121] oder *MOLREP* [120], wurden die Strukturen aufgeklärt. Als Grundlage für den Molekularen Ersatz dienten eine Untereinheit der TalB<sup>wt</sup> (1ONR [5]) oder der FSAA<sup>wt</sup> (1L6W, [2]). Die Inspektion der Elektronendichteverteilung, die Modellbildung und das Hinzufügen von Liganden bzw. Pufferbestandteilen wurden in *Coot* durchgeführt [128]. Zur Verfeinerung der Kristallstruktur wurde *REFMAC5* verwendet [124]. Mit *MolProbity* [125] wurden die Modelle validiert. Die Quartärstruktur wurde mit Hilfe des *PISA Servers* analysiert [126], der ebenfalls in *Coot* [128] eingebettet ist. Hierbei wurden Strukturvergleiche unter Anwendung des *SSM* Algorithmus [127] analysiert. Für die Visualisierung der Strukturen wurde *PyMol Molecular* (Graphics System, Version 1.5.0.4 Schrödinger, LLC) verwendet. Die kristallographischen Daten wurden in der Protein Data Bank (<http://www.rcb.org>) unter folgenden Nummern veröffentlicht: 4RQX (FSAA<sup>Q59E</sup>), 4RXF (FSAA<sup>Y131F</sup>), 4RZ4 (FSAA<sup>Q59E Y131F</sup>), 4RZ5 (TalB<sup>E96Q</sup>), 4RZ6 (TalB<sup>E96Q F178Y</sup>), 4S1F (FSAA + AA) und 4S2C (TalB<sup>E96Q</sup> + D-F6P) sowie 4S2B (TalB<sup>F178Y</sup> + D-T6P). Diese Arbeiten wurden in Kooperation mit Sandalova durchgeführt, mit Ausnahme der Validierung, die von Sandalova alleine durchgeführte wurden. Die Generierung und Aufreinigung der FSAA<sup>Q59E</sup> sind Arbeiten von Inoue. Die Kristalldaten der FSAA<sup>Q59E</sup> wurden im Rahmen dieser Arbeit verfeinert und weiterverarbeitet.

## 7.10 DLS- und CD-Spektroskopie-Analysen

### 7.10.1 Untersuchung der Oligomerisierung

Die dynamische Lichtstreuung (DLS) wurde genutzt, um den hydrodynamischen Radius der nativen Proteine in wässriger Lösung zu messen und den Oligomerisationszustand zu bestimmen. Die Brownsche Molekularbewegung von Proteinen führt bei Bestrahlung durch Laserlicht zu zeitabhängigen Streuungsintensitätsunterschieden. Hieraus können mithilfe der Stokes-Einstein-Beziehung die hydrodynamische Partikelgröße, die Größenverteilung

bzw. der Aggregationszustand ermittelt werden [174]. Somit stellt die DLS-Messung eine schnelle Alternative zur Größenausschlusschromatographie dar.

Die Enzyme wurden in 10 mM Phosphatpuffer (pH 7,5) für FSAA und Varianten sowie in 0,66 mM Glycylglycinpuffer (pH 8,5) für TalB und Varianten über eine Zentrifugationseinheit umgepuffert. Ein Proteingehalt von 0,1 – 0,2 mg/ml wurde eingestellt und mittels Bradford überprüft. Zur Abtrennung von möglichen Proteinaggregaten und Staubpartikeln wurde vor der Messung zusätzlich zentrifugiert (10 min; 4 °C; 10.000 rcf). Die DLS-Messungen wurden nach Temperierung bei 20 °C in Quarzküvetten (40 µl Probe) 10-mal für je 10 s durchgeführt. Diese Arbeiten wurden in Zusammenarbeit mit Kuhn / Leptihn durchgeführt.

### 7.10.2 Thermostabilität und Faltungszustand

Der Zirkulardichroismus (CD) bezeichnet die ungleiche Absorption von links- und rechtszirkular polarisiertem Licht an asymmetrischen optischen Zentren. Aufgrund der Asymmetrie des  $\alpha$ -Kohlenstoffes der Aminosäuren (mit Ausnahme von Gly) lässt sich die CD-Spektroskopie zur Proteinanalytik der Sekundärstrukturelemente anwenden. Hierbei wird der ferne UV-Spektralbereich genutzt [175]. Durch den Vergleich mit dem WT ist eine Aussage über die korrekte Faltung möglich.

Zur Messung wurden 0,1 – 0,2 mg/ml Enzymlösung verwendet. Hierzu wurden FSAA und Varianten in 10 mM Phosphatpuffer (pH 7,5) sowie TalB und Varianten in 0,66 mM Glycylglycinpuffer (pH 8,5) überführt und die Proteinkonzentration überprüft. Der Pufferaustausch gewährleistet eine geringe Eigenabsorption des Puffers. Die CD-Spektren von 190 – 260 nm wurden bei 30 °C mit 1,0 nm Schritten und einer Geschwindigkeit 50 nm pro min aufgenommen. Die Schichtdicke betrug 0,1 mm. Dies entspricht einem Probenvolumen von 100 µl. Der Mittelwert aus vier gemessenen Spektren wurde um das Pufferspektrum korrigiert. Aus den Rohdaten  $\theta_\lambda$  [mdeg] wurde die durchschnittliche Elliptizität  $\theta$  [deg cm<sup>2</sup> dmol] berechnet (I) [175]. Dabei ist „MWR“ das durchschnittliche Aminosäurenrestgewicht [Da] (II), „d“ die Schichtdicke [cm] und „c“ die Konzentration [g/ml]. „MWR“ ist bestimmt durch die Molekulare Masse des Proteins „M“ und die Anzahl an Aminosäuren „N“ (II). Zur Dekonvolution und damit zur Ermittlung der relativen Anteile an Sekundärstrukturelementen ( $\beta$ -Faltblatt,  $\alpha$ -Helix und unstrukturierte Proteinabschnitte) wurde CDSSTR über den Dichroweb Server verwendet [112–114]. Die CD-Denaturierungskurven wurden bei 220 nm mit einer Temperaturerhöhung von 1 °C per min aufgenommen. Diese Wellenlänge entspricht dem Minimum der  $\alpha$ -Helix. Die Übergänge wurden zweifach bestimmt und Reversibilität geprüft. Der Umschlagspunkt des

Übergangs, welcher der Denaturierungstemperatur  $T_{\text{schmelz}}$  entspricht, wurde aus einem Boltzmannfit (III) ermittelt. Aus der organischen Chemie stammend wird von Schmelztemperatur  $T_{\text{schmelz}}$  gesprochen. Übertragen auf die hier untersuchten Proteine handelt es sich bei  $T_{\text{schmelz}}$  um die Denaturierungstemperatur. Diese Arbeiten erfolgten ebenfalls in Kooperation mit Leptihn.

$$(I) \quad [\theta] = MRW \times \theta_{\lambda} / 10 \times d \times c$$

$$(II) \quad MWR = \frac{M}{(N-1)}$$

$$(III) \quad y = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{(x-x_0)/dx}} + A_2$$



## 8 Ergebnisse

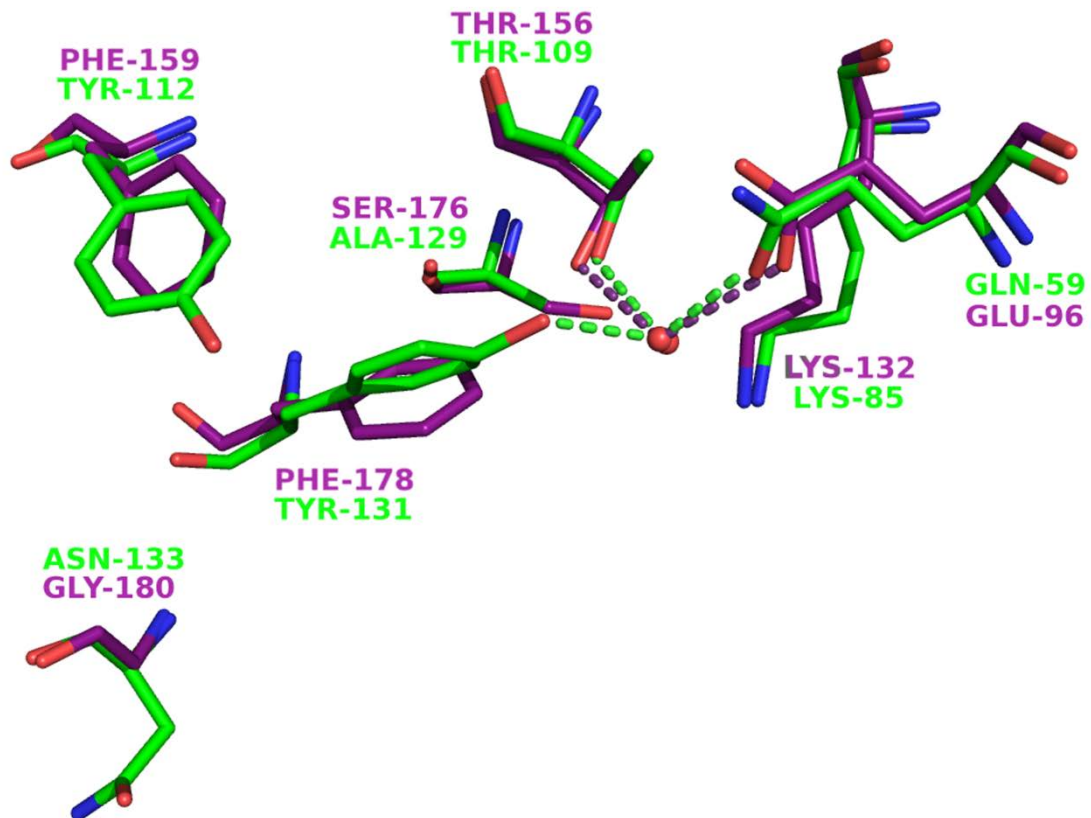
Die Enzyme FSAA und TalB von *E. coli* gehören unterschiedlichen Enzymklassen (Transferase beziehungsweise Lyase) an. Dennoch weisen die beiden Enzyme viele Gemeinsamkeiten auf wie beispielsweise die 3*S*,4*R* Stereospezifität, das Schiff'sche Basen Intermediat und die  $(\beta/\alpha)_8$ -Fasstruktur (siehe 5.5.1). Unter Anwendung der gezielten Mutagenese wurde der Mechanismus weiter aufgeklärt. Insbesondere wurden Ursachen, wie unterschiedliche Protonendonoren, für die Unterschiede im Reaktionstyp definiert. Hierfür wurden mit Hilfe der zielgerichteten Mutagenese verschiedene Mutanten erstellt. Diese Varianten wurden im Anschluss mit verschiedenen Analyseverfahren charakterisiert. Die Ergebnisse sind im Folgenden aufgeführt.

### 8.1 Mutagenese von TalB/FSAA und Aufreinigung der Varianten

In der Arbeit von S. Schneider war bereits auf dem Grundgerüst der TalB durch den Austausch von Phe178 gegen Tyr eine F6P-Aldolaseaktivität eingeführt worden [1]. Zudem war gezeigt worden, dass der gleiche Austausch (Phe189Tyr) in der humanen Transaldolase ebenfalls zu D-F6P-Aldolaseaktivität führt [1]. Dies rückte das Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerk des katalytischen Wasser in den Fokus der Betrachtung. Das katalytische Wassermolekül wird in der TalB durch die Reste Glu96 und Thr156 stabilisiert [5] (Abb. 1.12). In der FSAA hingegen wird dieses Wassermolekül über H-Brücken von drei Resten gebunden: Gln59, Thr109 und Tyr131 [2]. Zur Untersuchung der Auswirkung des Netzwerks auf die D-F6P-Aldolase- und Transaldolaseaktivität wurden die Wasserstoffbrücken-bildenden Reste (siehe Abb. 1.12) für die zielgerichtete Mutagenese ausgewählt. Hierdurch wurde versucht, die Aldolaseeigenschaften im Vergleich zur bereits bekannten Variante TalB<sup>F178Y</sup> zu verbessern und Transaldolaseaktivität im Aldolasegrundgerüst zu generieren. Die neuen Varianten mit His<sub>6</sub>-Tag und geändertem Wasserstoffbrückennetzwerk waren TalB<sup>E96Q</sup>, TalB<sup>E96Q F178Y</sup>, FSAA<sup>Q59E</sup> FSAA<sup>Y131F</sup> und FSAA<sup>Q59E Y131F</sup>. Die Einzelvarianten FSAA<sup>Q59E</sup> und FSAA<sup>Y131F</sup> sowie TalB<sup>E96Q</sup> waren bereits bekannt [6,78]. Diese wurden für Arbeit ebenfalls als His-Tag-Konstrukt generiert. Eine Gegenüberstellung der Reste im Aktiven Zentrum findet sich in Abb. 3.1.

Als zweiten Schritt sollte mittels Rationalen Designs aufbauend auf den Ergebnissen der Varianten FSAA<sup>Q59E</sup>, FSAA<sup>Y131F</sup> und FSAA<sup>Q59E Y131F</sup> [4,78] erneut versucht werden, über weitere zielgerichtete Veränderungen Transaldolaseaktivität im

D-F6P-Aldolasegrundgerüst einzuführen. Dies war im ersten Schritt (Austausch der Wasserstoffbrücken-bildenden Reste zum aktiven Wasser) nicht gelungen. Basis für diese Varianten waren Informationen aus der Bioinformatik und Strukturbiologie. Die Ergebnisse der Auswertung dieser Informationen sind in Kapitel 8.3 ausgeführt. Zusammenfassend wurde als Ziel die Generierung der Varianten FSAA<sup>Y131L</sup>, FSAA<sup>Q59E Y131L</sup>, FSAA<sup>Q59E Y112F Y131F</sup>, FSAA<sup>Q59E A129S Y131F</sup>, FSAA<sup>Q59E Y131F N133G</sup> und FSAA<sup>Q59E A129S Y131F N133G</sup> gesetzt.



**Abb. 3.1: Aktives Zentrum mit Mutagenesestellen**

Dargestellt sind FSAA (grün, PDB Code 1L6W [2]) und TalB (lila, PDB Code 1UCW [5]). Dabei sind die Reste Thr und Lys zwischen den beiden Enzymen konserviert.

Des Weiteren sollte die Stereospezifität durch den Vergleich von D-F6P und D-T6P untersucht werden. Nur das Stereoisomer D-F6P und das Stereoisomer D-S7P waren bisher über die Knüpfung einer C-C-Bindung mittels TalB oder FSAA zugänglich. Bereits bekannt war, dass das C4 Stereoisomer D-T6P (3S,4S) für TalB<sup>F178Y</sup> einen Inhibitor darstellt [29], für TalB<sup>wt</sup> jedoch nicht. Für FSAA<sup>A129S</sup> war eine verbesserte katalytische Effizienz für DHA [37,62] ähnlich zu TalB bestimmt worden. Von Interesse war, welchen Einfluss D-T6P auf diese Variante zeigt. Zusätzlich wurde daher von der bereits bekannten Variante FSAA<sup>A129S</sup> [37] das entsprechende His-Tag-Konstrukt generiert. Eine Auflistung aller plasmidcodierten verwendeten Proteine befindet sich in 7.3.

Die Mutagenese wurde durchgeführt wie in 7.4.3 beschrieben und im Anschluss über kommerzielle Sequenzierung der isolierten Plasmide überprüft (siehe 7.4.4). Die verschiedenen Konstrukte wurden in *E. coli* rekombinant überexprimiert (siehe Tab. 2.9) und unter Anwendung verschiedener Reinigungsmethoden (siehe Tab. 2.10) aufgereinigt. Eine genaue Beschreibung der Methoden von der Anzucht der Bakterien bis hin zur Bestimmung des Proteingehaltes findet sich in den Abschnitten 7.5.1 - 7.5.7.

Aus 1 g Nassgewicht konnten mittels Affinitätschromatographie im Durchschnitt  $16 \pm 10$  mg aufgereinigte Transaldolase von *E. coli* bzw.  $0,2 \pm 0,04$  mg hTal und  $23 \pm 9$  mg aufgereinigte FSAA gewonnen werden. Eine Verbesserung der Expressionsbedingungen für die hTal wurde nicht vorgenommen. Angegeben sind die Mittelwerte aus allen Transaldolase- bzw. Aldolase-Aufreinigungen, für die Aufreinigungen bezogen auf die einzelnen Varianten, siehe Tab. 3.1. Dies entspricht einer Ausbeute von 26 % für die Aldolase und 22 % bzw. 2 % für die Transaldolasen. Der Aufreinigungsfaktor für Aldolasen war 4,8 bzw. 4,1 für Transaldolase von *E. coli* und 3,9 für hTal. Dabei wurde die gleiche Menge an Proteinvariante wie WT erhalten, mit der Ausnahme von FSA<sup>Q59E A129S Y131F N133G</sup>, FSA<sup>A Q59E Y131L</sup> und FSA<sup>A Q59E Y112F Y131F</sup>, die eine geringere Proteinmenge aufwiesen. Die Aktivitäten der Proteine werden in Abschnitten 8.2.1, 8.2.2 und 8.3 aufgeführt.

**Tab. 3.1: Reinigungsschema für alle charakterisierten Proteine**

FSAA-Konstrukte rekombinant exprimiert in BL21 (DE3) pLysS. Für TalB- und hTal-Konstrukte wurde der *knock-out* Stamm LJ110 (DE3) *talA<sup>-</sup> talB<sup>-</sup>* pLysS RARE2 verwendet.

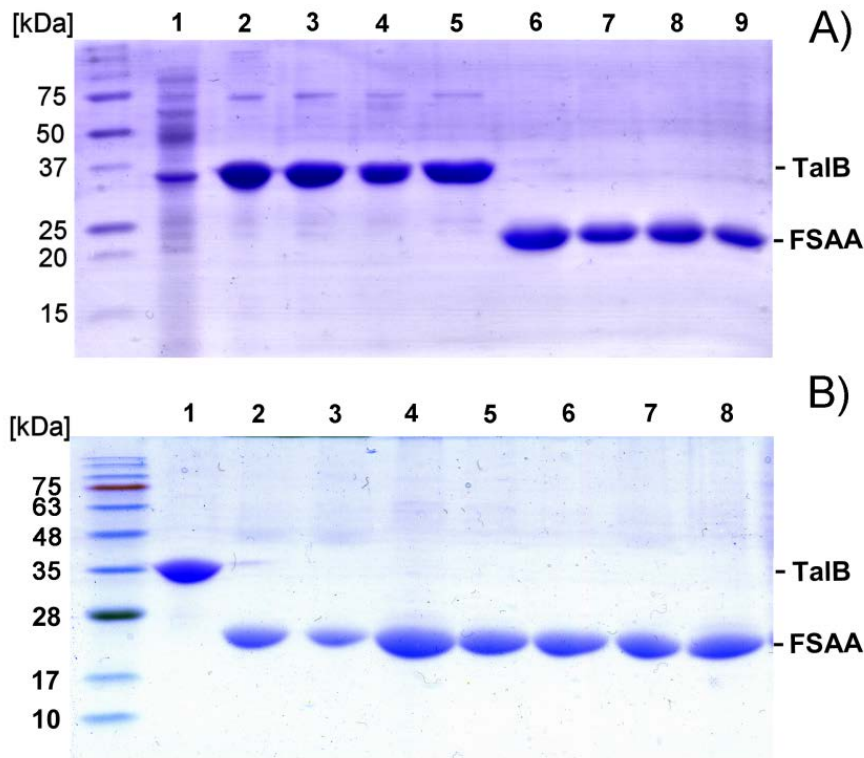
His <sub>6</sub> -/GST-Konstrukt	Proteinmenge [mg/1g Biofeuchtmasse]	Reinigungsfaktor	Proteinausbeute [%]
FSAA <sup>wt</sup> [a]	27	4,9	26
FSAA <sup>Q59E</sup> [b]	19	2,7	23
FSAA <sup>Y131F</sup> [b]	26	n.d.	23
FSAA <sup>A129S</sup> [d]	18	13,1	40
FSAA <sup>Y131L</sup> [c]	30	n.d.	36
FSAA <sup>Q59E Y131F</sup> [b]	23	n.d.	24
FSAA <sup>Q59E Y131L</sup> [c]	14	n.d.	18
FSAA <sup>Q59E Y112F Y131F</sup> [d]	10	n.d.	28
FSA <sup>Q59E A129S Y131F</sup> [d]	14	n.d.	20
FSA <sup>Q59E Y131F N133G</sup> [d]	18	n.d.	57
FSA <sup>Q59E A129S Y131F N133G</sup> [d]	9	n.d.	10
TalB <sup>wt</sup> [a]	18	3,6	25
TalB <sup>E96Q</sup> [b]	15	3,5	21
TalB <sup>F178Y</sup> [a]	17	4,5	22
TalB <sup>E96Q F178Y</sup> [b]	11	4,4	19
hTal <sup>wt</sup> [d]	0,2	4,7	4
hTal <sup>F189Y</sup> [c]	0,2	3,9	1

Weiterführende Legende zur vorhergehenden Abbildung:

[a] Mittelwert aus  $\geq 10$  Aufreinigungen [b] Mittelwert aus  $\geq 5$  Aufreinigungen

[c] Mittelwert aus  $\geq 2$  Aufreinigung [d] Werte aus einer Aufreinigung

n.d. – nicht detektierbar, da die Aktivität unter der Nachweisgrenze lag. Nachweisgrenze der Aldolaseaktivität  $< 0,006$  U/mg unter Anwendung von 50 mM DHA; 2,8 mM D/L-GAP und bis zu 21  $\mu$ mol FSAA-Varianten (Küvette 7.5.6, FSAAY131F und FSAAQ59E Y131F), beziehungsweise  $< 0,01$  U/mg unter Verwendung von 2,8 mM D/L-GAP bzw. 50 mM DHA und 1,7  $\mu$ mol Protein (Mikrotiterplatten 7.5.7, restliche FSAA-Varianten unter der Nachweisgrenze).



**Abb. 3.2: SDS-PAGE der gereinigten His<sub>6</sub>-FSAA- und His<sub>6</sub>-TalB-Varianten**

10  $\mu$ g angereichertes Protein wurden je Spur appliziert, sofern nicht anders angegeben. Zellfreier Extrakt A)1 und angereichertes Protein A)2 von TalB<sup>E96Q F178Y</sup> wurden aufgetragen, um den Aufreinigungseffekt zu zeigen. Die Molekularmasse einer Untereinheit von His<sub>6</sub>-TalB beträgt 37 kDa [1] und von His<sub>6</sub>-FSAA 24 kDa [53]. Die Variante FSA<sup>A129S</sup> und die hTal bzw. deren Variante sind nicht dargestellt. Die Methodik SDS-PAGE aus [148].

A) Varianten des ersten Schrittes [4]:

1 zellfreier Extrakt TalB<sup>E96Q F178Y</sup>

2 TalB<sup>E96Q F178Y</sup>

3 TalB<sup>F178Y</sup>

4 TalB<sup>E96Q</sup>

5 TalB<sup>wt</sup>

6 FSAA<sup>wt</sup>

7 FSAA<sup>Q59E</sup>

8 FSAA<sup>Y131F</sup>

9 FSAA<sup>Q59E Y131F</sup>

B) Varianten des zweiten Schrittes:

1 TalB<sup>wt</sup>

2 FSAA<sup>wt</sup>

3 FSAA<sup>Y131L</sup>

4 FSAA<sup>Q59E Y131L</sup>

5 FSAA<sup>Q59E Y112F Y131F</sup>

6 FSAA<sup>Q59E YA129S Y131F</sup>

7 FSAA<sup>Q59E Y131F N133G</sup>

8 FSAA<sup>Q59E A129S Y131F N133G</sup>

## 8.2 Biochemische Charakterisierung der Muteine

Die neuen Varianten mit geändertem Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerk des katalytischen Wassermoleküls (siehe Tab. 3.2) wurden auf ihre D-F6P-Aldolase- und Transaldolaseaktivität untersucht [4]. D-E4P war zu diesem Zeitpunkt nicht käuflich zu erwerben, daher wurde die Transaldolasereaktion in der umgekehrten Reaktionsrichtung gemessen. D-S7P und D-GAP wurden hierfür als Substrate eingesetzt. Das dafür notwendige D-S7P wurde unter der Anwendung der TKT aus *E. coli* erfolgreich mit einer durchschnittlichen Reinheit von 79 % synthetisiert (siehe 7.7.1). Im Vergleich zum Standardassay mit D-E4P und D-F6P als Substraten beträgt die Maximalgeschwindigkeit der Transaldolaseaktivität lediglich 5 % [23]. Grund könnte die Lage des Gleichgewichtes auf der Seite von D-S7P und D-GAP sein [42]. Dennoch laufen dieselben chemischen Schritte ab und die gleichen Intermediate werden gebildet. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass der Einfluss des Aminosäureaustauschs unabhängig von der Reaktionsrichtung ist.

### 8.2.1 Aldolase- und Transaldolaseaktivitäten

Zu Beginn wurde die spezifische Aktivität der neuen Varianten unter identischen Reaktionsbedingungen verglichen. Hierbei sollte festgestellt werden, ob Transaldolaseaktivität in das D-F6P-Aldolasegrundgerüst eingeführt werden konnte und welchen weiteren Einfluss die Austausche auf die Aktivität besitzen. Die hierzu durchgeführten Assays sind unter 7.5.6 beschrieben. Besondere Parameter zur Bestimmung der spezifischen Aktivität sind in Tab. 3.2 angegeben.

Zum Vergleich wurde die Aktivität von TalB<sup>wt</sup> und FSAA<sup>wt</sup> als 100 % definiert. Unter den gleichen Bedingungen wies die TalB<sup>F178Y</sup>-Variante 12 % Transaldolaseaktivität (0,56 U/mg) im Vergleich zum WT (4,7 U/mg) auf. Der zusätzliche Austausch von Glu zu Gln in TalB<sup>E96Q F178Y</sup> (0,24 U/mg) reduzierte die spezifische Transaldolaseaktivität weiter. In Abwesenheit des Glutamatrestes in TalB<sup>E96Q</sup> betrug die Transaldolaseaktivität nur noch 1,3 % (0,062 U/mg). Eine Transaldolaseaktivität im D-F6P-Aldolasegrundgerüst mit geändertem Wasserstoffbrückennetzwerk konnte jedoch nicht detektiert werden. Die spezifischen Aktivitäten der Muteine in Bezug auf die D-F6P-Aldolaseaktivität wurden ausgehend von den Substraten D-GAP und DHA bestimmt. Die Varianten FSAA<sup>Y131F</sup> und FSAA<sup>Q59E Y131F</sup> wiesen zudem auch keine D-F6P-Aldolaseaktivität auf. Der reziproke Austausch von Gln zu Glu in FSAA<sup>Q59E</sup> verminderte die Aldolaseaktivität um 64 % (3,9 U/mg). Die Variante TalB<sup>F178Y</sup>, in der Phe178 gegen Tyr ausgetauscht wurde, wies, wie aus S. Schneider et al. bereits bekannt [1], zusätzlich zur Transaldolaseaktivität auch

D-F6P-Aldolaseaktivität auf (2,7 U/mg, 25 % der D-F6P-Aldolaseaktivität). Der zusätzliche Austausch von Gln in TalB<sup>E96Q F178Y</sup> führte zu einer Steigerung der D-F6P-Aldolaseaktivität auf 40 % der (4,4 U/mg). Somit besitzt die Doppelvariante geringere Transaldolaseaktivität im Vergleich zur D-F6P-Aldolaseaktivität [4].

**Tab. 3.2: Spezifische Aktivitäten für die D-F6P-Aldolase- und Transaldolasereaktion.**

Die angegebenen Werte sind der Durchschnitt von mindestens zwei unabhängigen biologischen Replikaten, bzw. zwei verschiedenen Proteinpräparationen. Jeder Wert besteht aus mindestens zwei technischen Replikaten bei 28 °C (Abweichung ≤ 18 %). Die spezifische Aktivität wurde über die Bildung von D-F6P mit den Kopplungsenzymen PGI und G6PDH bestimmt (siehe 7.5.6). Zum Vergleich wurde die Aktivität von TalB<sup>wt</sup> und FSAA<sup>wt</sup> als 100 % definiert [4].

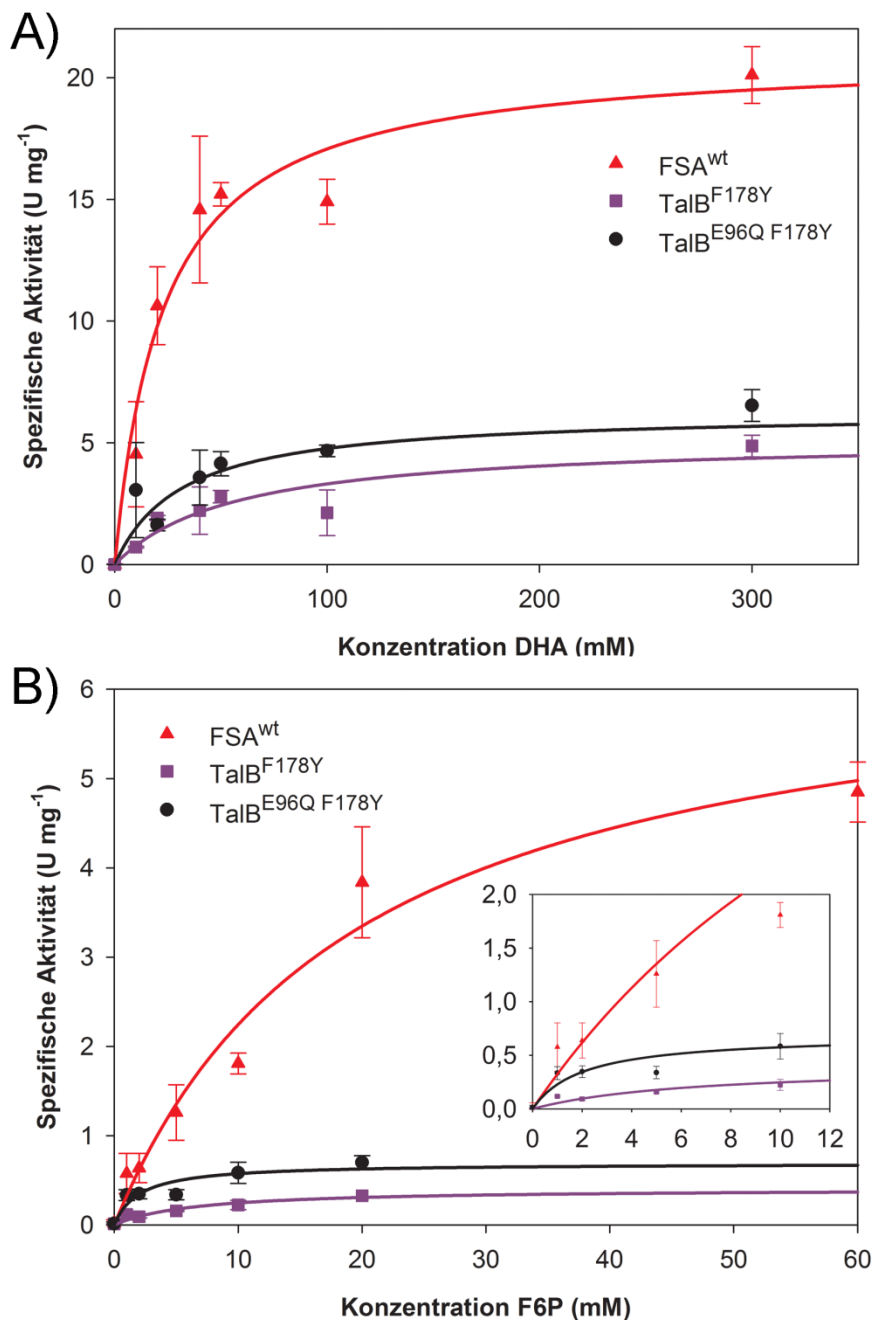
Protein	Transaldolasereaktion	D-F6P-Aldolasereaktion
	Spezifische Aktivität [U/mg] <sup>[a]</sup> D-S7P + D-GAP $\rightleftharpoons$ D-F6P + D-E4P	Spezifische Aktivität [U/mg] <sup>[b]</sup> DHA + D-GAP $\rightleftharpoons$ D-F6P
FSAA <sup>wt</sup>	n.d. <sup>[c]</sup>	11 (100 %)
FSAA <sup>Y131F</sup>	n.d. <sup>[c]</sup>	n.d. <sup>[d]</sup>
FSAA <sup>Q59E</sup>	n.d. <sup>[c]</sup>	3,9 (36 %)
FSAA <sup>Q59E Y131F</sup>	n.d. <sup>[c]</sup>	n.d. <sup>[d]</sup>
TalB <sup>wt</sup>	4,7 (100 %)	n.d. <sup>[d]</sup>
TalB <sup>F178Y</sup>	0,56 (12 %)	2,7 (25 %)
TalB <sup>E96Q</sup>	0,062 (1,3 %)	n.d. <sup>[d]</sup>
TalB <sup>E96Q F178Y</sup>	0,24 (5,0 %)	4,4 (40 %)

- [a] D-S7P (0,9 mM) und D/L-GAP (2,8 mM) sollte unter sättigenden Bedingungen für TalB<sup>wt</sup> vorliegen. K<sub>m</sub>-Wert war für D-S7P auf 285 µM und für D/L-GAP auf 38 µM bestimmt worden [23]. Für alle anderen Proteine sind diese für die Transaldolasereaktion nicht bekannt.
- [b] Die Konzentrationen an D/L-GAP (2,8 mM) und DHA (50 mM) entsprachen in etwa den bekannten K<sub>m</sub>-Werten. Der K<sub>m</sub>-Wert für D/L-GAP war für FSAA<sup>wt</sup> auf 1,9 mM und für TalB<sup>F178Y</sup> auf 2,4 mM bestimmt worden [38]. Bezüglich des K<sub>m</sub>-Wertes für DHA war dieser für FSAA<sup>wt</sup> auf 62 mM und für TalB<sup>F178Y</sup> auf 30 mM bestimmt worden [1].
- [c] n.d., nicht detektierbar; Transaldolaseaktivität < 0,02 U/mg unter Anwendung von 0,9 mM D-S7P; 2,8 mM D/L-GAP und bis zu 21 µM FSAA bzw. FSAA-Varianten. Der K<sub>m</sub>-Wert für die FSAA im Bezug zu D-S7P war zum Zeitpunkt dieser Untersuchung noch nicht bekannt.
- [d] n.d., nicht detektierbar; Aldolaseaktivität < 0,006 U/mg unter Anwendung von 50 mM DHA; 2,8 mM D/L-GAP und bis zu 21 µM FSAA bzw. FSAA-Varianten beziehungsweise bis zu 14 µM TalB/ -Varianten.

**8.2.2 Kinetiken im Fließgleichgewicht**

Die Variante TalB<sup>E96Q F178Y</sup> zeigte im Vergleich zur bereits bekannten Variante TalB<sup>F178Y</sup> verbesserte spezifische D-F6P-Aldolaseaktivität (siehe Tab. 3.2). Daher sollte diese Doppelvariante genauer charakterisiert werden. Hierfür wurden die apparenten kinetischen Parameter für die D-F6P-Aldolasereaktion der verschiedenen Proteine parallel und unter gleichen Bedingungen bestimmt. In den D-F6P-Aldolaseassays, beschrieben in 7.5.6, wurde zu diesem Zweck die Konzentration von D-F6P (Retroaldolreaktion / Spaltung von

D-F6P) und die Konzentration von DHA (Aldolreaktion / Bildung von D-F6P) variiert. Diese eigenständigen Messungen zur Bestimmung der apparenten Parameter wurden unabhängig von den Daten aus Tab. 3.2 durchgeführt.



**Abb. 3.3: Bestimmung der apparenten kinetischen Parameter für die Bildung (A) und Spaltung (B) von D-F6P.**

Die spezifischen Aktivitäten für TalB<sup>F178Y</sup>, TalB<sup>E96Q F178Y</sup> und FSA<sup>wt</sup> bei 28 °C sind gegen die Substratkonzentration aufgetragen. Über die repräsentativen Daten einer Aufreinigung (ein biologisches Replikat) wurde eine Michaelis-Menten-Kurve gelegt. Es wurde von 10 - 300 mM DHA und 2,8 mM D/L-GAP eingesetzt. Für die Retroaldolreaktion wurde 1 - 60 mM D-F6P für FSA<sup>wt</sup> und 1 - 20 mM D-F6P für Transaldolasevarianten verwendet. Die D/L-GAP-Konzentration war nicht sättigend und entsprach in etwa den bekannten  $K_m$ -Werten (FSA<sup>wt</sup> 1,9 mM und TalB<sup>F178Y</sup> 2,4 mM [38]). Die gekoppelten Enzymassays für den Nachweis von D-F6P bzw. D-GAP sind in 7.5.6 beschrieben [176].

Der zusätzliche Austausch von Glu zu Gln in TalB<sup>E96Q F178Y</sup> erhöhte die apparente  $k_{cat}$  für die Aldolasereaktion um 50 % auf  $4,3 \pm 0,8 \text{ s}^{-1}$  (siehe Tab. 3.3 und Abb. 3.3). Die bereits bekannte Variante TalB<sup>F178Y</sup> weist unter Anwendung der gleichen Bedingungen einen  $k_{cat}$  von  $2,8 \pm 0,2 \text{ s}^{-1}$  auf. Die FSAA<sup>wt</sup> besitzt den höchsten  $k_{cat}$  mit  $8,0 \pm 0,5 \text{ s}^{-1}$ . Die Michaelis-Menten-Konstanten ( $K_m$ -Wert) von DHA für alle drei Enzyme besitzen die gleiche Größenordnung, daher entsprechen sich die Substratspezifitäten. Die beste katalytische Effizienz ( $k_{cat}/K_m$ ) für die Bildung von D-F6P besitzt ebenfalls FSAA<sup>wt</sup> [4].

Für die Retroaldolreaktion ließ sich die maximale Reaktionsgeschwindigkeit ( $V_{max}$ ) um 200 % verbessern, im Vergleich zwischen der Einzelvariante und TalB<sup>E96Q F178Y</sup>. Die FSAA<sup>wt</sup> weist einen wesentlich höheren apparenten  $K_m$ -Wert auf als die TalB-Varianten. Somit ist die Doppelvariante TalB<sup>E96Q F178Y</sup> mit einem  $k_{cat}/K_m$  von  $195 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  der effizienteste Katalysator für die Spaltung von D-F6P. Mit TalB konnte keine Aldolaseaktivität detektiert werden ( $< 0,25 \text{ U/mg}$  Aldolreaktion,  $< 0,04 \text{ U/mg}$  Retroaldolreaktion) [4].

**Tab. 3.3: Apparente kinetische Parameter für die D-F6P-Aldolase- und Retroaldolasereaktion**

von TalB<sup>wt</sup>, TalB<sup>F178Y</sup>, TalB<sup>E96Q F178Y</sup>, und FSAA<sup>wt</sup>. Für die grafische Visualisierung siehe Abb. 3.3. Die gekoppelten Enzymassays für den Nachweis von D-F6P bzw. D-GAP wurden wie in 7.5.6 beschrieben bei 28 °C durchgeführt [4].

Protein		TalB <sup>wt</sup>	TalB <sup>F178Y</sup>	TalB <sup>E96Q F178Y</sup>	FSAA <sup>wt</sup>
<b>Bildung von D-F6P aus DHA und D-GAP<sup>[a]</sup></b>	$V_{max}$ [U/mg]	n.d. <sup>[c]</sup>	$4,8 \pm 0,4$	$7,3 \pm 1,3$	$20 \pm 1$
	$K_m^{DHA}$ [mM]	n.d. <sup>[c]</sup>	$47 \pm 11$	$31 \pm 6$	$31 \pm 10$
	$k_{cat}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	n.d. <sup>[c]</sup>	$2,8 \pm 0,2$	$4,3 \pm 0,8$	$8,0 \pm 0,5$
	$k_{cat}/K_m$ [ $\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ]	n.d. <sup>[c]</sup>	$61 \pm 11$	$142 \pm 51$	$275 \pm 95$
<b>Spaltung von D-F6P in DHA und D-GAP<sup>[b]</sup></b>	$V_{max}$ [U/mg]	n.d. <sup>[d]</sup>	0,4	0,8	5,7
	$K_m^{D-F6P}$ [mM]	n.d. <sup>[d]</sup>	6,2	2,3	19
	$k_{cat}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	n.d. <sup>[d]</sup>	0,2	0,5	2,3
	$k_{cat}/K_m$ [ $\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ]	n.d. <sup>[d]</sup>	35	195	119

[a] Der Durchschnitt von drei unabhängigen biologischen Messungen mit Standardabweichung ist angegeben. Jedes biologische Replikat an sich besteht aus mindestens zwei technischen Replikaten. Die konstant gehaltene D/L-GAP-Konzentration (2,8 mM) entsprach in etwa den bekannten  $K_m$ -Werten (FSAA<sup>wt</sup> 1,9 mM und TalB<sup>F178Y</sup> 2,4 mM [38]). Die DHA-Konzentration wurde zwischen 10 - 300 mM variiert.

[b] Der Durchschnitt von zwei unabhängigen biologischen Messungen ist angegeben (Abweichung  $\leq 22 \%$ ). Jedes biologische Replikat an sich besteht aus mindestens zwei technischen Replikaten. Die D-F6P-Konzentration wurde zwischen 1 - 20 mM variiert.

[c] n.d., nicht detektierbar; Aldolaseaktivität  $< 0,25 \text{ U/mg}$  unter der Anwendung von 10 - 300 mM DHA; 2,8 mM D/L-GAP und 0,3  $\mu\text{M}$  TalB bzw. TalB-Varianten.

[d] n.d., nicht detektierbar; Aldolaseaktivität  $< 0,04 \text{ U/mg}$  unter der Anwendung von 1 - 20 mM D-F6P und 2,9  $\mu\text{mol}$  TalB bzw. TalB-Varianten.



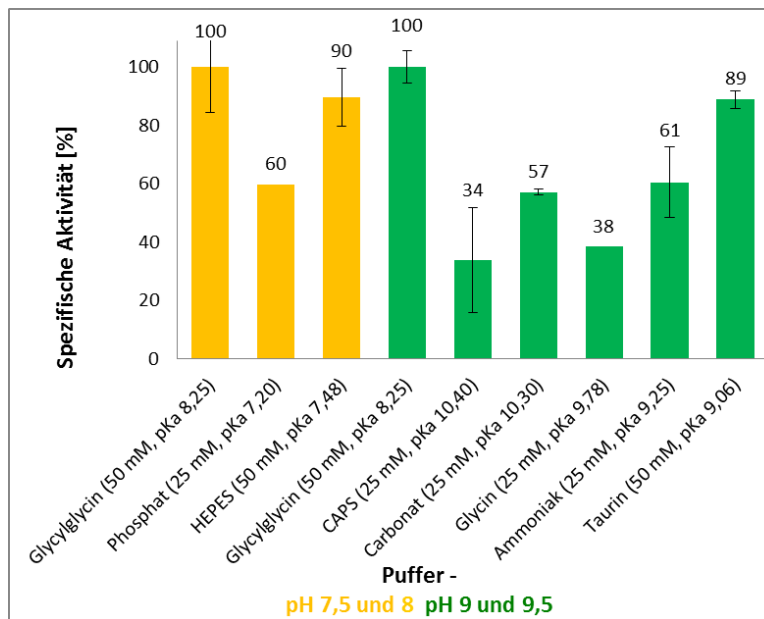
### 8.2.3 pH-Profile und Puffersysteme

Bei der D-F6P-Aldolasereaktion sowie bei der Transaldolasereaktion sind mehrere Protonentransferschritte nötig. Beispielsweise wird das Intermediat Carbinolamin an der C2-OH-Gruppe protoniert, um im Anschluss ein Wassermolekül eliminieren zu können. (postulierte Mechanismen [3,5,6], Abb. 1.3). Zur Bildung der Abgangsgruppe Wasser wird die C2-OH-Gruppe protoniert. Dabei sind verschiedene polare Aminosäureseitenketten beteiligt (siehe Tab. 1.5), die abhängig vom pH-Wert dissoziiert und damit auch abhängig vom pH-Wert katalytisch aktiv sind. Ziel war es daher, die pH-Profile zu bestimmen und dabei Aufschlüsse über die  $pK_a$ -Werte wichtiger katalytischer Reste zu erlangen. Durch halblogarithmische Auftragungen des pH-Profils kann ein Optimumbereich erkennbar werden, dessen Plateaugrenzen (Wendepunkte) den  $pK_a$ -Werten wichtiger katalytischer Reste entsprechen können [42]. Für die pH-Profile wurden die spezifischen Aktivitäten in geeigneten Puffersystemen bei unterschiedlichen pH-Werten bestimmt. Die Methode ist in Abschnitt 7.6.1 beschrieben.

#### *Puffersysteme*

Für die Durchführung von Aktivitätstests wurde zuerst nach geeigneten Puffersystemen gesucht. Die Ionenstärke wurde konstant bei 128 mM gehalten, da die Reaktionsgeschwindigkeit von dieser abhängen kann. Die Abhängigkeit von der Ionenstärke war für die TacTal gezeigt worden [42].

Die spezifische Aktivität in Abhängigkeit vom pH-Wert wurde im Bereich pH 6 - 11 gemessen. Daher wurde je ein Puffer für die pH-Bereiche von 6 – 8; 7,5 - 9,5 und 9 – 11 verwendet. Die Aktivitäten wurden in 0,5 pH-Schritten gemessen, wobei sich zwei Pufferbereiche um zwei Punkte überlappen. Ausgehend vom Stand der Literatur [30,37] wurde der Glycylglycin-Puffer  $pK_a$  8,25 [158] als „Goldstandard“ im Bereich pH 7,5 - 9,5 verwendet. Da die Aktivitäten der beiden WT und deren Varianten unter Anwendung der gleichen Puffersysteme gemessen werden sollten, wurde nach weiteren geeigneten Puffern gesucht, sowie die bekannte Datenlage zum Teil experimentell überprüft.



**Abb. 3.4: TalB-Aktivitäten in verschiedenen Puffern**

Die Puffersysteme bei pH 7,5 und 8 (gelb) sowie bei 9 und 9,5 (grün) besaßen eine Ionenstärke von 128 mM und den Zusatz 1 mM DTT. Gemessen wurde bei 30 °C im gekoppelten Enzymassay über den Nachweis von NADPH über die Bildung von D-F6P aus den Substraten 2,8 mM D/L-GAP und 0,9 mM D-S7P (siehe 7.5.6). Dargestellt sind mindestens zwei Bestimmungen der TalB. Die Standardabweichung ist ab mindestens drei Bestimmungen angegeben. Die höchste spezifische Aktivität im Glycylglycin-Puffer von  $4,9 \pm 0,8$  U/mg (pH 7,5 und 8) bzw.  $5,8 \pm 0,3$  U/mg (pH 9 und 9,5) wurde auf 100 % normiert.  $pK_a$ -Werte wurden [158] entnommen.

Im unteren pH-Bereich (6 – 8) stellte sich der HEPES-Puffer (50 mM) als geeignet heraus (siehe Abb. 3.4). Die  $pK_a$ -Werte von HEPES und allen anderen Puffern sind in Tab. 3.4 aufgelistet. Zum besseren Vergleich zweier Puffersysteme wurden die spezifischen Aktivitäten bei zwei pH-Werten gemittelt. Im Glycylglycin-Puffer bei pH 7,5 und 8,0 betrug die spezifische Aktivität für TalB im Durchschnitt  $4,9 \pm 0,8$  U/mg (100 %). Für HEPES bei pH 7,5 und 8,0 wurde eine durchschnittliche spezifische Aktivität von  $4,4 \pm 0,4$  U/mg (90 %) bestimmt. Der inhibitorische Effekt von Phosphat ( $K_i$  25 mM) wurde bestätigt und ist in guter Übereinstimmung mit dem bereits bekannten  $K_i$ -Wert von 20 mM [30]. Im oberen pH-Bereich (9 – 11) sind CAPS, Carbonat, Glycin und Ammoniak ungeeignet, da TalB in diesen verminderte spezifische Aktivitäten aufwies (siehe Abb. 3.4). Sie zeigten alle eine Restaktivität von unter 61 %. Als am besten geeignet stellte sich der Taurin-Puffer (50 mM) heraus. Im Taurin-Puffer wies TalB lediglich eine geringfügig verminderte spezifische Aktivität von  $5,1 \pm 0,2$  U/mg (89 %) im Vergleich zu  $5,8 \pm 0,3$  U/mg (100 %) im Glycylglycin-Puffer auf (die spezifischen Aktivitäten sind Mittelwerte von Messungen bei pH 9 und 9,5). Um zu verdeutlichen, dass kein Unterschied zwischen den als geeignet identifizierten Puffersystemen vorliegt, wurden in Abb. 3.6 B die spezifischen Aktivitäten in Glycylglycin, HEPES und Taurin aufgetragen. Die spezifischen Aktivitäten in den zwei

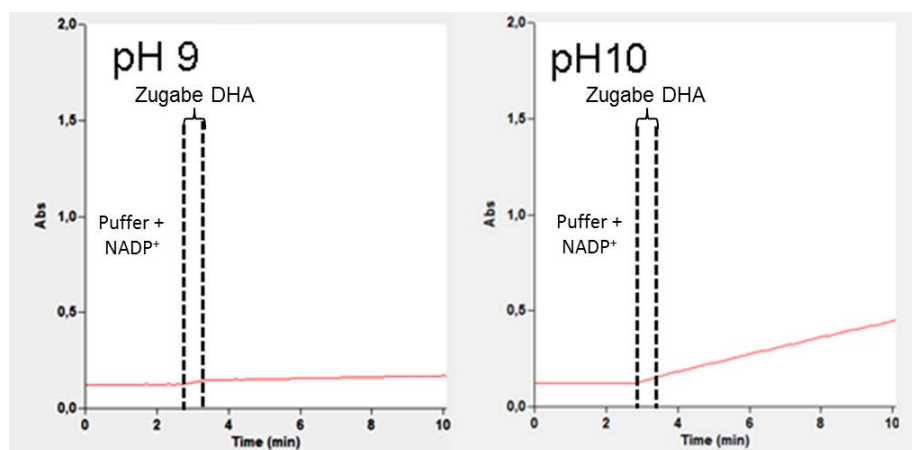
überlappenden pH-Bereichen (pH 7,5 und 8 sowie pH 9 und 9,5) entsprechen sich. Daher ist es zulässig, in den pH-Profilen die spezifische Aktivität je pH-Schritt zu mitteln.

**Tab. 3.4: pK<sub>a</sub>-Werte der verwendeten Puffersysteme**

pK<sub>a</sub>-Werte sind entnommen aus [177].

Imidazol-Puffer	6,95	Taurin-Puffer	9,06
Phosphat-Puffer	7,20	Ammoniak	9,25
HEPES-Puffer	7,48	Glycin	9,78
Tris-HCl-Puffer	8,06	Carbonat	10,30
Glycylglycin-Puffer	8,25	CAPS	10,40

Im Aldolaseassay war bei der Bildung von NADPH mit den Substraten DHA und D/L-GAP eine Messung über einem pH-Wert von 9,5 nicht aussagekräftig. Es wurde eine Hintergrundreaktion detektiert, welche in Anwesenheit von Pufferkomponente, NADP<sup>+</sup> und DHA bei hohen pH-Werten entstand (siehe Abb. 3.5). Die Assaybestandteile wurden einzeln und in Kombination bei 340 nm getestet, unter anderem die Kontrolle Puffer mit DHA und der Anstieg bei Zugabe von NADP<sup>+</sup> (nicht gezeigt).



**Abb. 3.5: Hintergrundreaktion bei hohen pH-Werten im Aldolaseassay**

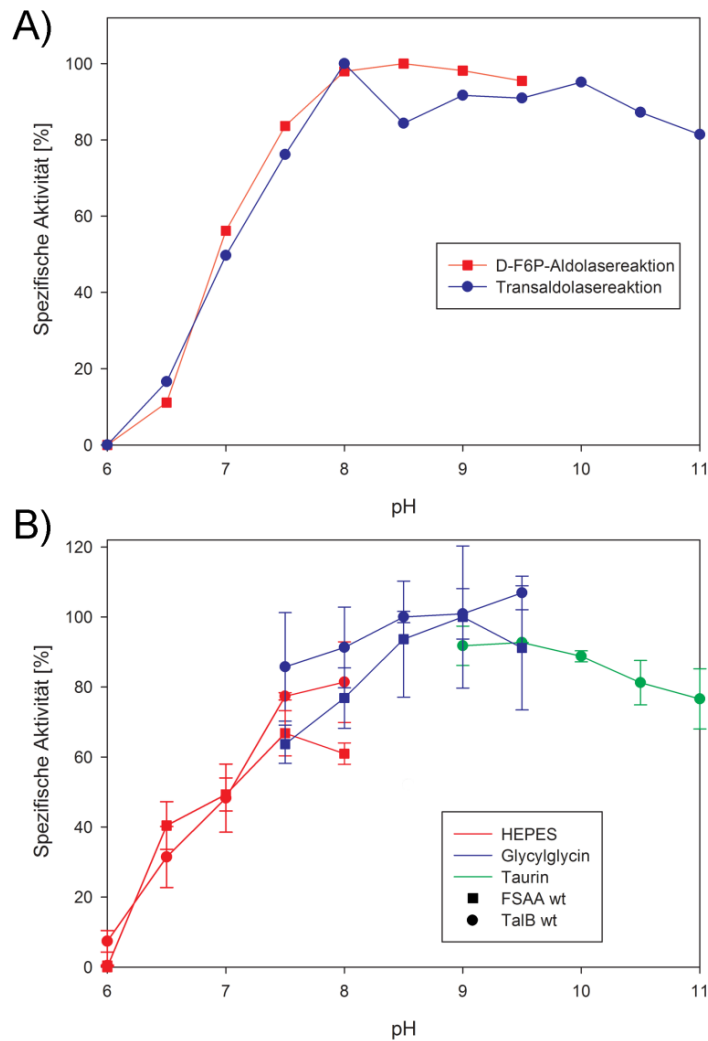
Vorgelegt wurde Taurin-Puffer mit einer Ionenstärke von 128 mM und dem Zusatz von 1 mM DTT bei pH 9 oder 10. Zudem war 0,5 mM NADP<sup>+</sup> enthalten. Zugabe von 50 mM DHA, wobei die Zugabezeit durch die vertikal gestrichelten Linien gekennzeichnet ist. Es war kein Protein im Ansatz enthalten.

### pH-Profile

Aufgrund unterschiedlicher katalytischer Reste, beispielsweise Glu96 in TalB im Vergleich zu Gln59 in der gleichen Position in der FSAA (siehe Tab. 1.5) und damit einhergehend unterschiedlicher Protonierungszustände, ist es möglich, dass sich die pH-Profile zwischen Aldolase- und Transaldolasereaktion unterscheiden. Daher wurden die pH-Profile der beiden WT verglichen. Die beiden Transaldolasevarianten TalB<sup>F178Y</sup> [1] und TalB<sup>E96Q F178Y</sup> [4] besitzen sowohl Transaldolaseaktivität als auch Aldolaseaktivität. Daher

wurden für diese Varianten jeweils ein pH-Profil für die Transaldolase- und Aldolasereaktion angefertigt.

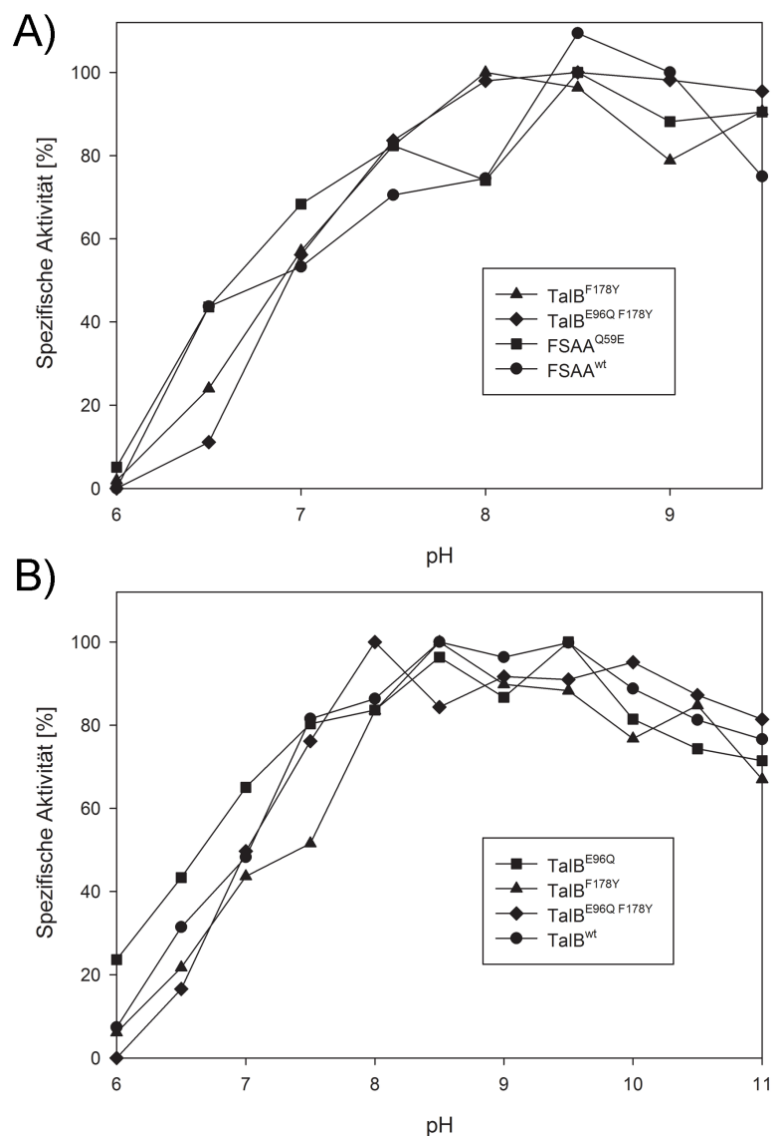
Bei dem Vergleich der beiden WT von FSAAs und TalB (siehe Abb. 3.6 A) ist kein wesentlicher Unterschied im pH-Profil zu erkennen. Am Beispiel der Doppelvariante TalB<sup>E96Q F178Y</sup> (siehe Abb. 3.6 B) wird deutlich, dass ebenfalls keine Unterschiede zwischen dem Transferasen- und Lyasen-Reaktionstyp bestehen. Im pH-Bereich von 9,5 - 11 lässt sich keine Aussage treffen, da hier die Aldolasereaktion aufgrund der Hintergrundreaktion (siehe Abb. 3.5) nicht verlässlich bestimmt werden konnte [4].



**Abb. 3.6: Vergleich der pH-Abhängigkeit des Reaktionstyps und der Puffersysteme**

- (A) Vergleich der pH-Profile von D-F6P-Aldolasereaktion (FSAA<sup>wt</sup>, ■) und Transaldolasereaktion (TalB<sup>wt</sup>, ●) in den unterschiedlichen verwendeten Puffern dargestellt; jeweils mit einer Überlappung von zwei Punkten (die Überlappung ist nicht dargestellt), um Unterschiede zwischen den Puffersystemen bzw. inhibitorische Eigenschaften auszuschließen.
- (B) Vergleich der pH-Abhängigkeit der Aldolasereaktion und der Transaldolasereaktion von TalB<sup>E96Q F178Y</sup>. Die Assays für die Bildung von D-F6P für beide Vergleiche (Puffersystem und Reaktionstyp) wurden in Schritten von 0,5 pH-Einheiten durchgeführt: pH 6 - 9,5 für D-F6P-Aldolaseaktivität und pH 6 - 11 für Transaldolaseaktivität (HEPES pH 6 - 8; Glycylglycin pH 7,5 - 9,5; Taurin pH 9 - 11). Durch das hohe Hintergrundsignal ab einem pH-Wert 10 im Aldolaseassay, war eine Detektion nicht möglich. Durchführung beschrieben in 7.6.1 [176].

Die pH-Profile der Varianten mit Aldolaseaktivität (siehe Abb. 3.7 A) zeigten ein breites Optimum zwischen pH 7,5 und 9,5 auf. Ferner wurde keine spezifische Transaldolase- oder Aldolaseaktivität der Varianten FSAA<sup>Y131F</sup> und FSAA<sup>Q59E Y131F</sup> auch bei anderen pH-Werten zwischen 6,5 und 9,5 detektiert (nicht dargestellt). Die Nachweisgrenze der Transaldolaseaktivität war auf 0,02 U/mg und 0,01 U/mg für die D-F6P-Bildung über Aldolaseaktivität festgesetzt. In den pH-Profilen der Transaldolasen (siehe Abb. 3.7 B) war ebenfalls ein breites pH-Optimum von pH 8,0 - 10,5 sichtbar. Insgesamt wurden keine Unterschiede durch den Gln-Glu-Austausch im pH-Profil hervorgerufen.



**Abb. 3.7: Dargestellt sind die pH-Profile**

von TaIB, TaIB<sup>F178Y</sup>, TaIB<sup>E96Q</sup>, TaIB<sup>E96Q F178Y</sup>, FSAA und FSAA<sup>Q59E</sup>

Die Bildung von D-F6P durch die D-F6P-Aldolasereaktion (A, unter Einsatz von 50 mM DHA und 2,8 mM D/L-GAP) und die Transaldolasereaktion (B, unter Einsatz von 0,9 mM D-S7P und 2,8 mM D/L-GAP) wurden detektiert. Der Aktivitätsassay für die Bildung von D-F6P wurde in Schritten von 0,5 pH-Einheiten bei 30 °C durchgeführt: pH 6 – 9,5 für F6P-Aldolaseaktivität und pH 6 – 11 für Transaldolaseaktivität und jeweils mit konstanter Ionenstärke von 128 mM. Für die Durchführung siehe 7.6.1 [176].

Eine Zuordnung der pK<sub>a</sub>-Werte der Wendepunkte bei halblogarithmischer Auftragung zu wichtigen katalytischen Resten war nicht möglich. Zum einen erschwerten der breite Optimumsbereich und der langsame Aktivitätsabfall im hohen pH-Bereich die Bestimmung der Wendepunkte. Zum anderen entsprachen sich die Wendepunkte der verschiedenen Varianten. Die pK<sub>a</sub>-Werte wichtiger katalytischer Reste mussten somit durch andere Methoden bestimmt werden [4].

#### 8.2.4 pK<sub>a</sub>-Wert wichtiger katalytischer Reste

Mit Hilfe des Programms PROPKA [159–162] wurden die pK<sub>a</sub>-Werte wichtiger katalytischer Reste berechnet (siehe Tab. 3.5). Die Vorhersage der pK<sub>a</sub>-Werte der Seitenketten im Aktiven Zentrum der TalB-Struktur ergab, dass der pK<sub>a</sub>-Wert für Lys132 im Vergleich zu wässriger Lösung leicht abgesenkt ist (pK<sub>a</sub> 9,8 gegenüber 10,5). Für die FSAA ergab sich mit einem pK<sub>a</sub>-Wert von 6,7 ein wesentlich niedrigerer pK<sub>a</sub>-Wert des entsprechenden Lys85. Basierend hierauf wurde ein weiterer experimenteller Ansatz für den pK<sub>a</sub>-Wert des Lys gesucht. Für die Seitenketten von Glu96 und Tyr178 ergaben sich keine Unterschiede in der Variante TalB<sup>F178Y</sup> zu Glu96 im WT, bzw. nur ein geringer Unterschied zum Tyr131 in der Aldolase.

#### Tab. 3.5: pK<sub>a</sub>-Werte der wichtigen katalytischen Reste

Bereits veröffentlicht von Samland [97]. Für Enzyme mit Ligand im Aktiven Zentrum wurde PROPKA 3.1 und für Enzyme ohne Ligand PROPKA 3.0 verwendet. Der Durchschnitt der pK<sub>a</sub>-Werte aller Untereinheiten ist in der Tabelle angegeben. In der FSAA<sup>wt</sup> Kristallstruktur ist das aktive Lys modifiziert, vermutlich durch D-GA (GOL).

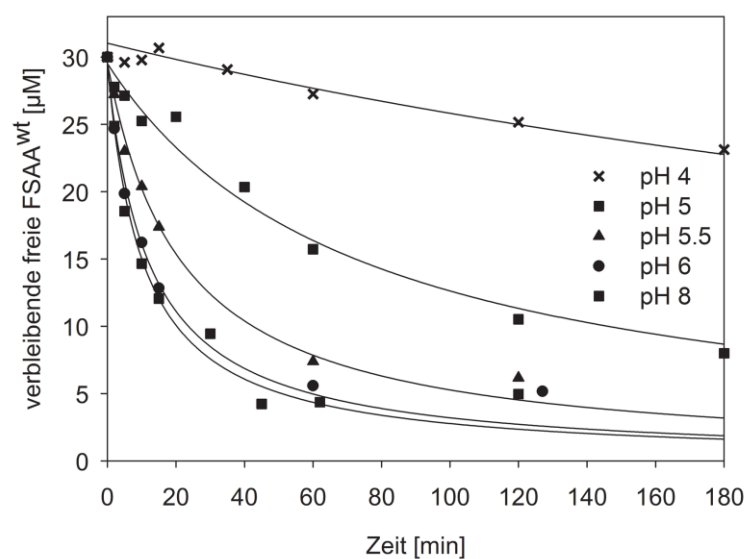
Protein	TalB	TalB <sup>F178Y</sup>	FSAA - GOL	Wasser
PDB code	1ONR [3]	3CWN [1]	1L6W [2]	-
Aktives Lys	9,75	9,77	6,67	10,50
Glu96	7,58	7,58	Gln	4,5
Tyr131	Phe	11,08	12,48	10,00

#### 8.2.5 pK<sub>a</sub>-Wert des katalytisch aktiven Lysinrestes

Der zentrale katalytisch aktive Rest ist das Lys, welches das Schiff'sche Base Intermediat bildet. Unterschiede im pK<sub>a</sub>-Wert dieses Restes hätten Auswirkungen auf die mechanistischen Reaktionsschritte und auf die Reaktionsgeschwindigkeit. Ein experimenteller Ansatz zur Bestimmung des pK<sub>a</sub>-Wertes wurde gesucht. Nach Dax et al. [165], kann PLP verwendet werden, um den pK<sub>a</sub>-Wert eines Schiff'sche Base Intermediat bildenden Lys in FBPA zu bestimmen. Ein dafür notwendiger inhibitorischer Effekt auf die FSAA konnte jedoch nicht beobachtet werden. Die Versuchsbedingungen sind unter 7.6.2 aufgeführt. Kürzlich wurde auch Methodon als Inhibitor für de-novo Retroaldolasen [178]

beschrieben. Auch hier war keine Inhibition in FSAA und TalB detektierbar (Samland, unveröffentlicht). AA wurde als Inhibitor für katalytische Antikörper beschrieben, der an das neutrale Lys binden kann (siehe Abb. 2.11) [7–9]. Um die Bindung von AA nur an das aktive Lys zu belegen, wurden *Soaking*-Experimente in der Gruppe von G. Schneider durchgeführt. Die Ergebnisse hierzu befinden sich in 8.5.3.

Um den  $pK_a$ -Wert des Lysinrestes zu detektieren, wurden in früheren Studien Unterschiede im Absorptionsspektrum gemessen [9,179]. Derartige Unterschiede waren nicht detektierbar, jedoch ließ sich ein inhibitorischer Effekt feststellen. Daher wurde die Inhibitionsrate bei verschiedenen pH-Werten bestimmt (siehe 7.6.2). Hierzu wurde die verbliebene Aktivität in Abhängigkeit von der Inkubationszeit detektiert. Dies ergab verschiedene Inhibitionsverläufe (Gleichung (I) 7.6.2), beispielhaft abgebildet für  $FSAA^{wt}$  (siehe Abb. 3.8). Weiterführend wurden die so erhaltenen Raten gegen den pH-Wert aufgetragen und die Kurve einer Henderson-Hasselbalch-Gleichung [163,164] angelegt (Gleichung (II) 7.6.2).

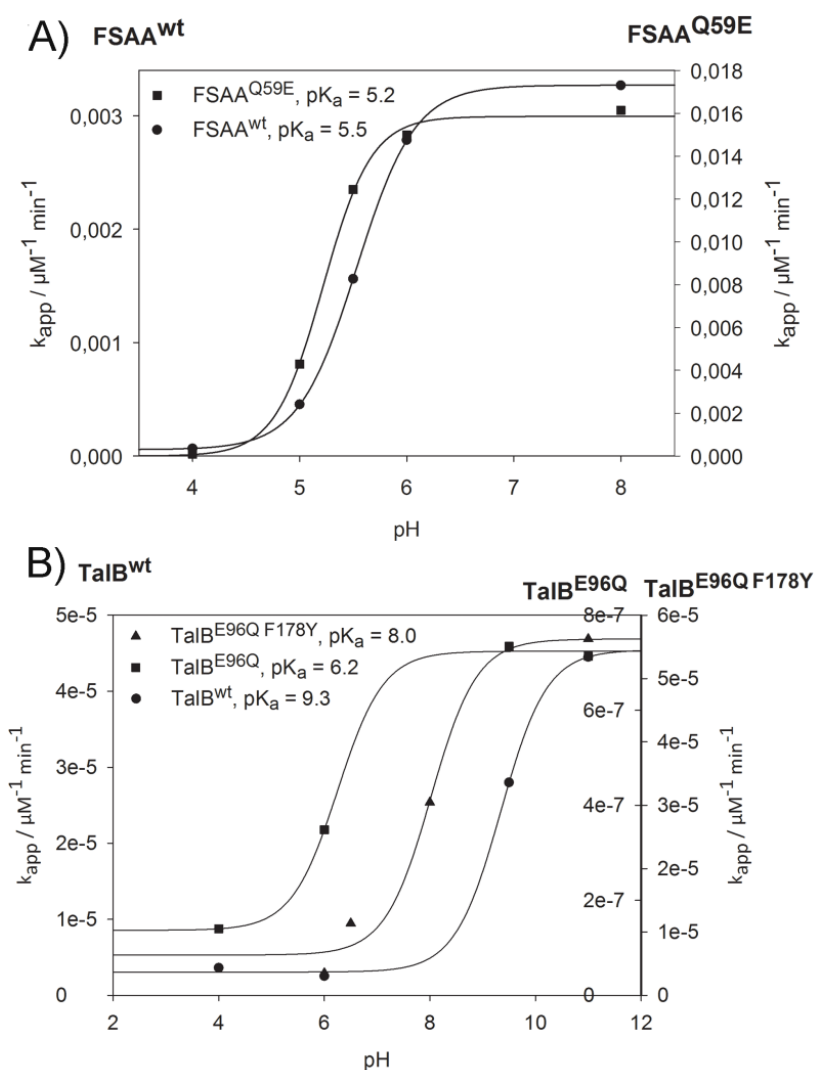


**Abb. 3.8: Inhibition von  $FSAA^{wt}$  durch AA**

Das Enzym wurde bis zu 48 h mit einem 320-fachen molaren Überschuss an AA in verschiedenen Puffern (pH 4 - 8) bei 25 °C und 300 rpm inkubiert. Die verbliebene Menge an freier FSAA ist eine Funktion der Zeit, die aus der spezifischen Aktivität bei 30 °C berechnet wurde. Die Menge an freier FSAA wurde durch die Funktion einer Reaktion zweiter Ordnung beschrieben ( $R^2 \geq 0.99$ ). Die Methode ist aufgeführt in 7.6.2 [4].

Die durchgeführten Aminosäureaustausche in TalB hatten einen starken Einfluss auf den  $pK_a$ -Wert des katalytisch aktiven Lys. Die  $pK_a$ -Titrationskurve für  $TalB^{wt}$  (siehe Abb. 3.9) besaß ihren Wendepunkt bei pH 9,3. Der Austausch von Glu96 zu Gln führte zu einer Verschiebung von 3,1 pH-Einheiten auf einen  $pK_a$ -Wert von 6,2. Die Doppelvariante  $TalB^{E96Q F178Y}$  wies mit einem  $pK_a$ -Wert von 8,0 einen Wert zwischen dem WT und der

Variante TalB<sup>F178Y</sup> auf. Aus der tabellarischen Übersicht (siehe Tab. 3.6) wird deutlich, dass in der FSAA die Einführung des polaren Restes Glu59 keine Änderung des pK<sub>a</sub>-Wertes hervorrief. Die pK<sub>a</sub>-Werte von FSAA<sup>wt</sup> (5,5) und FSAA<sup>Q59E</sup> (5,2) waren vergleichbar. Aufgrund der nicht nachweisbaren Aktivität von FSAA<sup>Y131F</sup> und FSAA<sup>Q59E Y131F</sup> (siehe Tab. 3.2) konnten die pK<sub>a</sub>-Werte der Lysinreste in diesen Enzymen nicht bestimmt werden. Die beiden WT-Enzyme weisen somit einen mechanistisch relevanten Unterschied auf: Das aktive Lys in TalB lag unter Standardassaybedingungen (pH 8,5; siehe 7.5.6 und 7.5.7) protoniert vor, während in der FSAA das Lys neutral war [4].



**Abb. 3.9: Bestimmung der pK<sub>a</sub>-Werte des aktiven Lys von D-F6P-Aldolasen (A) und Transaldolasen (B)**

Die Bildung von D-F6P gekoppelt an die Zunahme von NADPH wurde nach der Inkubation mit dem 320-fachen Überschuss an AA bei verschiedenen pH-Werten zu unterschiedlichen Zeitpunkten innerhalb von 48 Stunden gemessen. Die Raten der Funktion einer Reaktion zweiter Ordnung wurden somit bestimmt (siehe Abb. 3.8). Diese wurden im Anschluss gegen den pH-Wert aufgetragen, um die pK<sub>a</sub>-Werte zu bestimmen. Daher entspricht ein Punkt auf den Kurven der Henderson-Hasselbalch-Gleichungen [73] mindestens vier Messpunkten der verbleibenden Aktivität [4].



**Tab. 3.6: Experimentell bestimmte pK<sub>a</sub>-Werte des aktiven Lys**

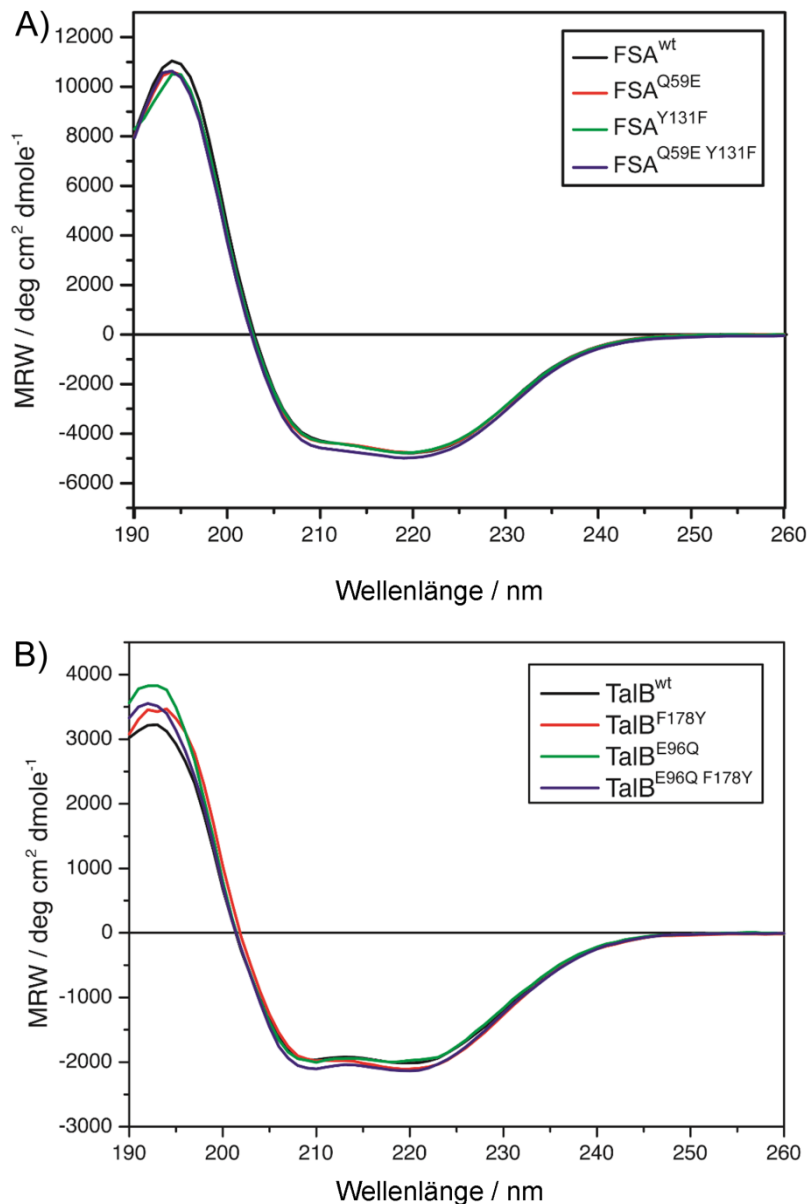
Hierzu wurde die verbleibende Aktivität (Bildung von D-F6P gekoppelt an die Zunahme von NADPH) nach der Inkubation mit dem Inhibitor AA bestimmt und durch die Funktion einer Reaktion zweiter Ordnung beschrieben (siehe Abb. 3.8). Die so erhaltenen Raten wurden gegen den pH-Wert aufgetragen und unter Anwendung der Henderson-Hasselbalch-Gleichung wurden die pK<sub>a</sub>-Werte berechnet. Das Bestimmtheitsmaß R<sup>2</sup> des Henderson-Hasselbalch-Fits wurde mit Sigma-Plot berechnet. Der Protonierungszustand des katalytischen Lys bezieht sich auf Standardassaybedingungen bei pH 8,5. Grafisch sind die pK<sub>a</sub>-Kurven in Abb. 3.9 abgebildet. Die gesamte Methodenbeschreibung befindet sich in 7.6.2 [4].

Enzym	pK <sub>a</sub> -Wert	Protonierungszustand des katalytischen Lys	R <sup>2</sup>
TalB <sup>wt</sup>	9,3	protoniert	0,9997
TalB <sup>E96Q</sup>	6,2	neutral	0,9996
TalB <sup>E96Q F178Y</sup>	8,0	neutral/ protoniert	0,9928
FSAAs <sup>wt</sup>	5,5	neutral	0,9957
FSAAs <sup>Q59E</sup>	5,2	neutral	0,9994

**8.2.6 Quartärstruktur und Oligomerisierungszustand**

Eine D-F6P-Aldolase- bzw. Transaldolaseaktivität für die Muteine FSAAs<sup>Y131F</sup> und FSAAs<sup>Q59E Y131F</sup> war nicht nachweisbar (siehe Tab. 3.2). Unterschiede in der Aktivität oder gar der Verlust von Aktivität können auch durch Änderungen der Quartärstruktur und des Oligomerisierungszustandes begründet sein. Zur Untersuchung dieser strukturellen Eigenschaften wurden Untersuchungen mit CD- und DLS-Spektroskopie in Kooperation mit Leptihn herangezogen. Eine Beschreibung dieser Methoden ist in 7.10 zu finden. Für die TalB war gezeigt worden, dass die Oligomerisierung nicht notwendig für enzymatische Aktivität ist [32]. Eine Bestimmung des Oligomerisierungszustandes von TalB mittels DLS war deswegen nicht notwendig und wurde nicht durchgeführt.

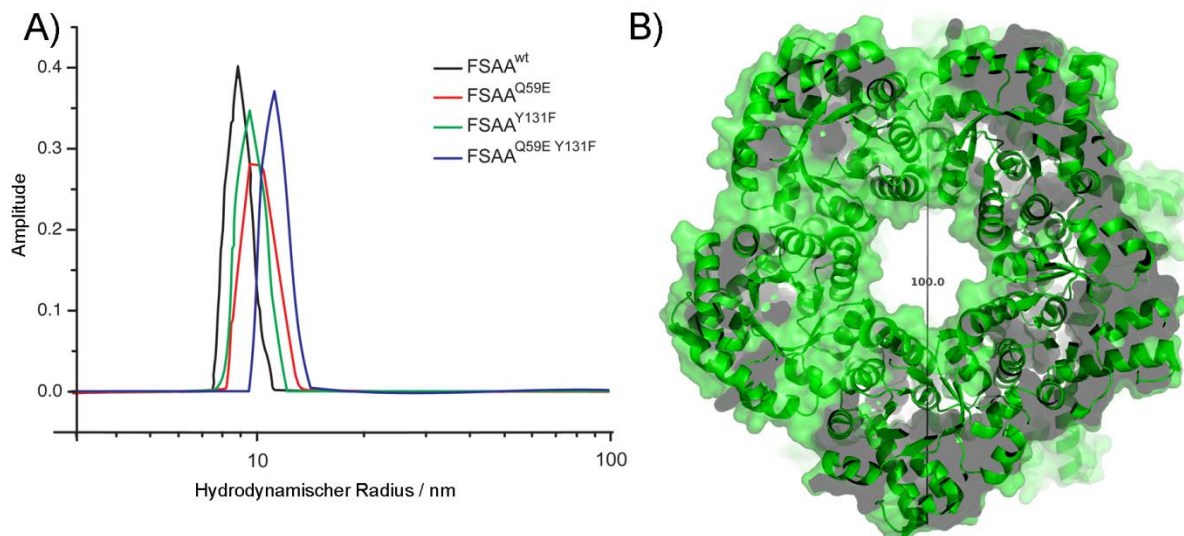
Die CD-Spektren in Abb. 3.10 zeigen ein Mischsignal von  $\alpha$ -Helix und  $\beta$ -Faltblatt [175], was durch eine Überlagerung der für  $\alpha$ -Helix und  $\beta$ -Faltblatt typischen Signale erklärt werden kann. Es sind keine deutlichen Unterschiede zwischen den Varianten und den WT sichtbar. Demzufolge besitzen alle Varianten die gleichen Sekundärstrukturelemente wie der entsprechende WT [4].



**Abb. 3.10: CD-Spektren des fernen Spektralbereichs von FSA (A) und TalB-Varianten (B)**

Die Spektren der WT sind in schwarz und die der Varianten in rot, grün und blau eingefärbt. Die Methodenbeschreibung befindet sich unter 7.10.2 [176].

In der DLS-Größenverteilung weisen FSA<sup>wt</sup> und alle FSA-Varianten jeweils nur ein Hauptsignal auf (siehe Abb. 3.11 A). Der daraus abgeleitete hydrodynamische Radius von ~10 nm entspricht dem Durchmesser (~ 100 Å) eines Dekamers aus der Kristallstruktur der FSA (siehe Abb. 3.11 B, [2]). Dies weist darauf hin, dass der WT wie auch die Varianten in Lösung richtig gefaltet sind und Homodekamere ausbilden [4].



### Abb. 3.11: Quartärstruktur der FSAA

(A) Die auf DLS basierende Verteilung des hydrodynamischen Radius von FSAA und -Varianten (Methode 7.10.1) [176]

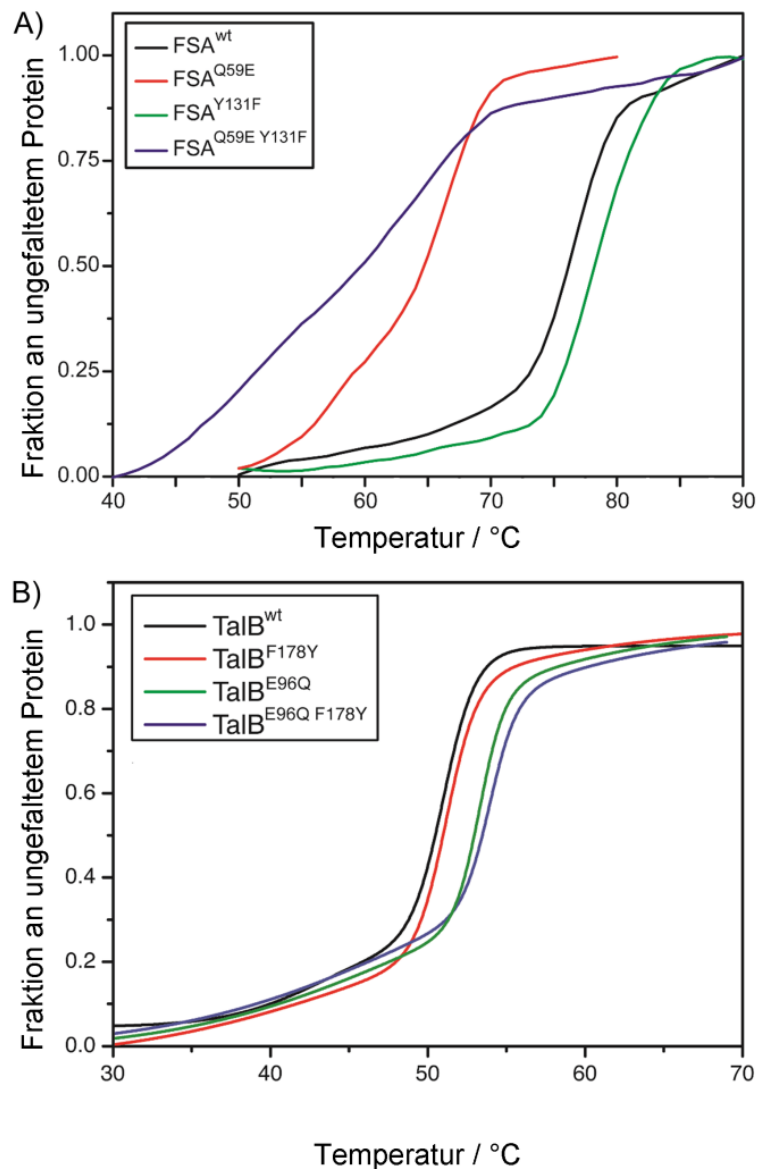
(B) Durchmesser 100 Å des FSAA<sup>wt</sup> Dekamers anhand der Kristallstruktur [2].

### 8.2.7 Thermostabilität

Für die FSAA war eine hohe Hitzestabilität bestimmt worden [49]. Die Halbwertszeit für das *E. coli* Enzym FSAA war bei 75 °C auf 16 Stunden bestimmt worden [37]. TalB dagegen weist keine Hitzestabilität auf, sondern es war ein Verlust der Aktivität oberhalb von 55 °C beschrieben worden [23]. Infolgedessen war von Interesse, welches thermische Verhalten die generierten Varianten aufweisen. Hierzu wurde die CD-Signal-Änderung bei Temperaturerhöhung aufgenommen (siehe Abb. 3.10). Dabei wurde die feste Wellenlänge von 220 nm, was dem Absorptionsminimum der  $\alpha$ -Helices entspricht (siehe Abb. 3.10), verwendet.

Basierend auf den in Abb. 3.12 gezeigten thermischen Übergängen wurden die Denaturierungstemperaturen  $T_{\text{schmelz}}$  berechnet (siehe 7.10.2). Die thermischen Entfaltungen waren nicht reversibel. Die bestimmten  $T_{\text{schmelz}}$  von 51 °C für TalB<sup>wt</sup> und 76 °C für FSAA bestätigten die bereits genannten Literaturdaten [23,37]. Die FSAA-Varianten, mit der Ausnahme von FSAA<sup>Y131F</sup>, wiesen große Differenzen zum WT auf (siehe Tab. 3.7). Besonders der Austausch von Gln zu Glu hatte einen destabilisierenden Effekt von 12 °C in der FSAA. Die FSAA<sup>Y131F</sup> Variante zeigte eine geringfügig höhere  $T_{\text{schmelz}}$  als FSAA<sup>wt</sup>. Die FSAA-Doppelvariante wies eine langsame Entfaltung auf und eine  $T_{\text{schmelz}}$  von lediglich 58 °C. Der Aminosäureaustausch in der TalB hatte lediglich geringe Effekte mit maximal 3 °C Unterschied zum WT. Trotz der

Unterschiede in den  $T_{\text{schmelz}}$  waren alle Proteine bei Standardassaybedingungen von 28 °C bzw. 30 °C korrekt gefaltet [4].



**Abb. 3.12: Thermischer Übergang für FSA (A) und TalB (B) beziehungsweise deren Varianten.**

Denaturierungskurven der Varianten (rot, grün, blau) wurden im Vergleich zu den entsprechendem WT (schwarz) dargestellt. Die Methode ist aufgeführt unter 7.10.2 [176].

**Tab. 3.7: Denaturierungstemperatur für FSA (A) und TalB (B)**

Die Bedingungen und Durchführung zur Aufnahme der CD-Denaturierungskurven sowie Berechnung der  $T_{\text{schmelz}}$  ist beschrieben in 7.10.2 [176].

Transaldolase	$T_{\text{schmelz}}$ [°C]	Aldolase	$T_{\text{schmelz}}$ [°C]
TalB <sup>wt</sup>	51,0 ± 0,2	FSA <sup>wt</sup>	76,2 ± 0,2
TalB <sup>E96Q</sup>	53,3 ± 0,1	FSA <sup>Q59E</sup>	64,6 ± 0,3
TalB <sup>F178Y</sup>	51,2 ± 0,1	FSA <sup>Y131F</sup>	78,5 ± 0,1
TalB <sup>E96Q F178Y</sup>	53,9 ± 0,2	FSA <sup>Q59E Y131F</sup>	57,7 ± 0,3

### 8.3 Mögliche Transaldolaseaktivität im Aldolasegrundgerüst

Die FSAA gehört in die Klasse der Lyasen wohingegen die TalB zu den Transferasen gehört. Die TalB gehört phylogenetisch in die SF1 [28]. Diese enthält die klassischen Transaldolasen. Aufgrund der hohen Ähnlichkeit in Größe und Struktur der kleinen Transaldolasen werden die F6P-Aldolasen in die SF5 der Transaldolasen gruppiert [28]. Ein signifikanter Unterschied zwischen der SF4 und SF5 wurde über Sequenzanalysen in den Sequenzmotiven definiert [28,47]. Das erweiterte Sequenzmotiv der SF4 besteht aus siebzehn Aminosäuren und lautet [T/S/A/R/D]-[Y/F]-[V/I]-S-P-F-[I/L/V]-G-R-[L/I/V/F]-D-D-[I/V/T/L/M/C]-[G/S/N/A/C]-[T/H/Q/E/S/V/L/M/I/W]-[D/N/E/P/R/T/S/V]-G (persönliche Mitteilung Kummer, [47]). Im Gegensatz hierzu ist das Sequenzmotiv der SF5 Y-[V/I/A/L]-A-P-Y-[V/I]-N-R-[I/V/L/M]-D-[A/N]-[Q/L/M/Y]-[G/N]-[G/Y/A/I/S/F]-[D/N/S]-G (persönliche Mitteilung Kummer, [47]). Die Einführung einer F6P-Aldolaseaktivität in der Transaldolase durch den Austausch des Tyr gegen Phe178 deutet auf die Evolution der F6P-Aldolasen aus Transaldolasen hin [1]. Bisher war es nicht gelungen, Transaldolaseaktivität im D-F6P-Aldolasegerüst durch Änderung des Wasserstoffbrückennetzwerkes einzuführen. Dies sollte mit weiteren Varianten als zweite Stufe des Rationalen Designs erzielt werden. Somit könnten weitere Aufschlüsse über die Evolution der F6P-Aldolasen aus Transaldolasen gewonnen werden.

#### 8.3.1 Auffinden neuer Mutagenesestellen

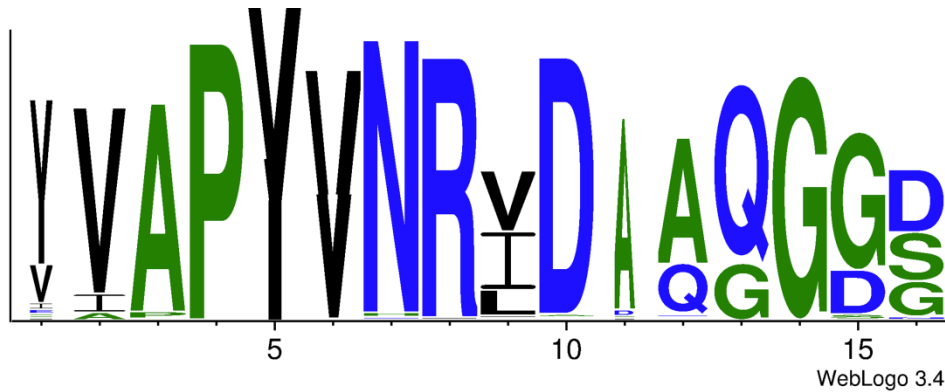
##### *Sequenzvergleiche und Sequenzmotive*

Dank der Transaldolasendatenbank (TALED) (persönliche Mitteilung Lorenz, [48]), die 4937 Nukleotidsequenzen enthält, ließen sich neue Mutagenesestellen identifizieren. Aus den 1185 Sequenzen der SF1, zu der TalB gehört, und den 246 Sequenzen der SF5, welcher die FSAA angehört, wurden neue statistische Modelle zur Aminosäurehäufigkeit erstellt (siehe Abb. 3.13 und Abb. 3.14). Diese Sequenzmotive entsprachen dem erweiterten Sequenzmotiv nach Kummer [47] unter Anwendung der Sequenzen aus der TALED [48]. Das Sequenzmotiv von TalB war „174 L-ISP-FVG-RILD-W-YKAN 189“ und als Motiv von FSAA konnte „127 YVAPYVNRIADAQGGGS 142“ ermittelt werden. Die Unterschiede wurden in einem direkten Sequenzvergleich von TalB und FSAA noch einmal verdeutlicht (siehe Abb. 3.15). Differenzen zwischen den SF mit hoher statistischer Häufigkeit waren Phe178 in TalB im Vergleich zu Tyr131, Ser176 zu Ala129 und Gly180 zu Asn133 (siehe Abb. 3.13 und Abb. 3.14).



**Abb. 3.13: Sequenzmotiv SF1 basierend auf 1185 Transaldolasesequenzen**

Als Lesebeispiel entsprach dies in der TalB dem Motiv 174 L-ISP-FVG-RILD-W-YKAN 189. Je größer der Buchstabe, desto höher die Wahrscheinlichkeit des Vorkommens der Aminosäure an dieser Position. Bei einer Lücke, beispielsweise zwischen P und F, ist die Wahrscheinlichkeit einer Aminosäure so gering, dass kein Buchstabe zu sehen ist. Dies bedeutet, dass nur wenige Sequenzen hier eine Aminosäure besitzen bzw. dass im aufgeführten Beispiel bei vielen Sequenzen auf P ein F folgt. Blau dargestellt sind hydrophile Aminosäuren (RKDENQ), grün sind neutrale Aminosäuren (SGHTAP) und schwarz hydrophobe Aminosäuren (YVMCLFIW). Die Transaldolasesequenzen sind Stand 2015.



**Abb. 3.14: Sequenzmotiv SF5 basierend auf 246 Sequenzen**

In der FSAA entsprach dies dem Motiv 127 YVAPYVNRIDAQGGGS 142. Je größer der Buchstabe, desto höher die Wahrscheinlichkeit des Vorkommens der Aminosäure an dieser Position. Blau dargestellt sind hydrophile Aminosäuren (RKDENQ), grün sind neutrale Aminosäuren (SGHTAP) und schwarz hydrophobe Aminosäuren (YVMCLFIW). Die Aldolasesequenzen sind Stand 2015.

TalB 174 LISPFVGRILDWYKAN 189  
 FSAA 127 YVAPYVNRIDAQGGGS 142

**Abb. 3.15: Sequenzvergleich von TalB und FSAA in der Länge des Sequenzmotives**

Unterschiede mit hoher statistischer Häufigkeit in der jeweiligen SF sind gelb unterlegt.

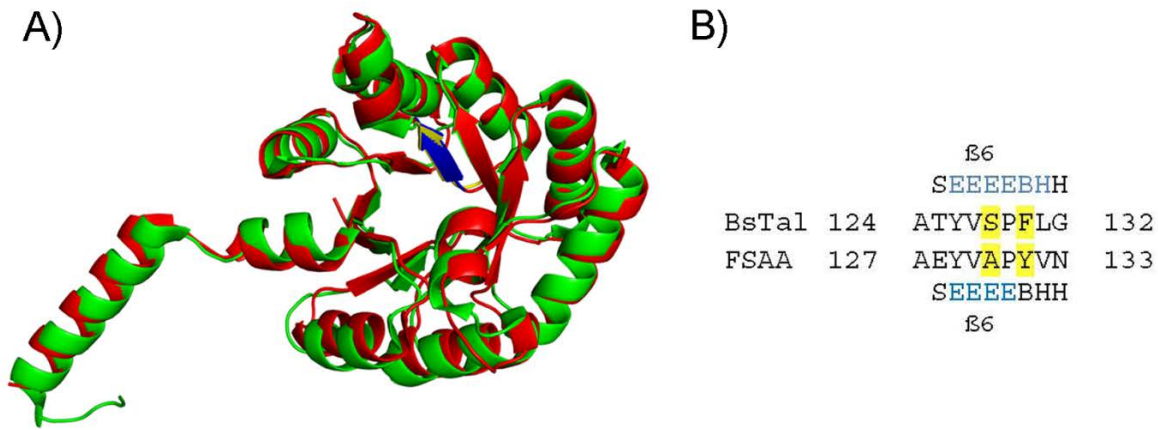
Der Austausch zu Tyr131Phe entsprach der bereits generierten Variante FSAA<sup>Y131F</sup>, die keine nachweisbare Transaldolase- oder F6P-Aldolaseaktivität aufwies (Tab. 3.2). Basierend auf vorangegangenen Ergebnissen ist Tyr131 der Säure-Base-Katalysator der F6P-Aldolasen (siehe 9.1.6). Der Austausch von Ala129 zu Ser in FSAA war ebenfalls bekannt [37,62]. Das Ser ermöglicht wahrscheinlich eine Wasserstoffbrücke zum C1-OH des Donors, wodurch diese FSAA-Variante ein von HA nach DHA verschobenes Substratspektrum aufweist. Diese zusätzliche Wasserstoffbrücke entspricht den Gegebenheiten zur Substratbindung in den Transaldolasen. Eine Mutagenese von Asn133 zu Gly in der FSAA ist, soweit bekannt, noch nicht durchgeführt worden. Der Vorschlag zur Erstellung der Variante FSAA<sup>N133G</sup> wurde bereits von Kummer [47] geäußert. Zudem wies Inoue [78] auf einen Austausch an der Stelle Asn133 zur Untersuchung der mutmaßlichen Phosphatbindestelle hin.

#### *Synergistische Effekte*

Ähnlich zu CAST (*combinatorial active site saturation test*) [180] sollte der Austausch räumlich benachbarter Reste synergistische Effekte hervorrufen. Auf eine Sättigungsmutagenese wurde hier im Vergleich zu CAST verzichtet. Es wurde stattdessen eine Angleichung der Reste an die entsprechenden Reste in der TalB vorgenommen. Aus diesen Gründen wurden die bereits genannten Austausche zur Variante FSA<sup>Q59E A129S Y131F N133G</sup> kombiniert.

#### *Aldolasechimäre*

Die FSAA ist strukturell ähnlicher zu den „kleinen“ Transaldolasen aus SF4 (Abb. 3.16 A, [41]). Diese bilden, wie die FSAA, Homodekamere und eine  $(\beta/\alpha)_8$ -Fasstruktur aus [2,41]. Das  $\beta$ 6-Faltblatt liegt innerhalb des Sequenzmotivs der SF4 und SF5, das die signifikanten Unterschiede zwischen den beiden SF aufweist. Hieraus entstand die Idee, eine Aldolasechimäre der Transaldolase mit  $\beta$ 6-Faltblatt zu generieren. Die Sequenzübereinstimmung von BsTal mit FSAA lag bei 32 %. Im Sequenzalignment des  $\beta$ 6-Faltblatts der Transaldolase aus *Bacillus subtilis* (BsTal [41]) aus SF4 mit dem der FSAA (Abb. 3.16 B) aus SF5, fiel auch hier der Austausch von Ser zu Ala und Phe zu Tyr auf. Diese beiden gezielten Austausche reichten aus um die angestrebte Aldolasechimäre zu erhalten.



### Abb. 3.16: Vergleich von SF4 mit SF5

- (A) Alignment der Monomere von BsTal (SF4) und FSAA (SF5). Die mittlere quadratische Abweichung (RMSD) von 180 C $\alpha$ -Atomen eines paarweisen Strukturalignments betrug 1,1 Å. Orange darstellt BsTal bzw.  $\beta$ 6-Strang in Blau (PDB Code 3R8R [31]) und grün FSAA (PDB Code 1L6W [2]) bzw.  $\beta$ 6-Strang in Gelb.
- (B) Sequenzvergleich des  $\beta$ 6-Faltblattes von FSAA und BsTal. Der  $\beta$ -Strang (blau) wurde durch die Kristallstrukturen [2,31] definiert. Unterschiede mit hoher statistischer Häufigkeit in der jeweiligen SF sind gelb unterlegt.

### Die potenzielle Transaldolase LmbR

Als alternativer Ansatz sollte die potenzielle Transaldolase LmbR [46] als Vorlage für Varianten genutzt werden. Interessanterweise besitzt LmbR an der Stelle des F6P-Aldolase-Säure-Base-Katalysator ein Leu. Die Auswirkung eines Tyr-Leu-Austausches sollte ebenfalls untersucht werden und zudem mit dem Transaldolase-Säure-Base-Katalysator Glu kombiniert werden. Basierend auf diesen Überlegungen wurden die Varianten FSAA<sup>Y131L</sup> und FSAA<sup>Q59E Y131L</sup> erstellt.

### Hydrophobes Cluster

In der humanen Transaldolase war ein hydrophobes Cluster an Aminosäuren beschrieben [36]. Dieses Cluster fand sich auch in der TalB in der zweiten Schale um das Aktive Zentrum (Tab. 3.8). In der FSAA hingegen befanden sich zwei polare Tyr an Stelle von hydrophoben Aminosäureresten. Da viele Protonierungsschritte in den Reaktionsmechanismen enthalten sind, ist der Einfluss der Umgebung und somit des hydrophoben Clusters auf die pK<sub>a</sub>-Werte der aktiven Reste von Bedeutung. In der FSAA wurde daher das gleiche hydrophobe Cluster durch die Mutation von Tyr112 und Tyr131 jeweils gegen ein Phe generiert.



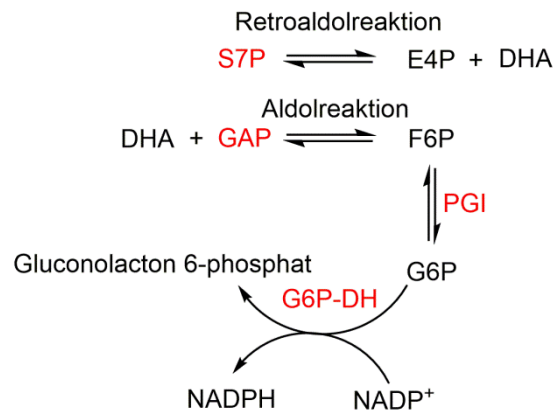
**Tab. 3.8: Aminosäuren des hydrophoben Clusters der hTal und die entsprechenden Aminosäuren in TalB und FSAA**

Die entsprechenden Aminosäuren wurden durch Strukturalignments erhalten (TalB, PDB Code 1ONR [5]; FSAA, PDB Code 1L6W [2] und hTal, PDB Code 1F05 [36]). Die Unterschiede der Aminosäuren mit unpolaren Seitenketten sind rot und mit polaren Seitenketten grün dargestellt.

hTal	TalB	FSAA
Ala122	Ala112	Ala72
Ile141	Ile131	Val84
Ile162	Ile151	Ile104
Leu168	Leu157	Ala110
Phe170	Phe159	Tyr112
Phe189	Phe178	Tyr131
Gly311	Gly298	Ala203
Phe315	Phe302	Phe207

### 8.3.2 Aktivitätsuntersuchungen der FSAA Varianten der zweiten Stufe

Als weiterer Schritt sollten die generierten Varianten der zweiten Stufe im Hinblick auf ihre F6P-Aldolase- und Transaldolaseaktivität untersucht werden. So sollte überprüft werden, ob es gelungen war, erstmals im Aldolasegrundgerüst Transaldolaseaktivität einzuführen. Beim Einsatz von D-S7P und D/L-GAP im bisher angewandten Transaldolaseassay kann das Substrat D-S7P zuerst durch eine Retroaldolaktivität gespalten werden (siehe Abb. 3.17). Dadurch würde DHA entstehen, welches gemeinsam mit dem im Assay enthaltenen D/L-GAP über eine Aldolreaktion zu D-F6P addiert werden kann. Dies würde ebenfalls zu einem Absorptionsanstieg von NADPH im gekoppelten Transaldolaseassay führen, der einem positiven Aktivitätsnachweis entspricht. Die Retroaldolaktivität der Varianten von D-S7P und D-F6P wurde unter Einsatz des gleichen Kopplungsenzym, der GldA, in Mikrotiterplatten untersucht. Dabei wurde die Bildung von DHA mit GldA über NADH detektiert. Diese Methode wurde hierzu neu etabliert (siehe 7.5.7).



**Abb. 3.17: Absorptionsanstieg im Transaldolaseassay durch F6P-Aldolaseaktivität**

In Rot dargestellt die Bestandteile des Transaldolaseassay, welcher die Bildung von D-F6P nachweist. Die Kombination auch Retroaldolreaktion von D-S7P und Aldolreaktion könnte ebenfalls zur Bildung von D-F6P führen und eine Transaldolaseaktivität vortäuschen.

Lediglich die Varianten FSAA<sup>Q59E A129S Y131F</sup> und FSAA<sup>Q59E Y131F N133G</sup> wiesen unter gleichen Bedingungen, wie für FSAA<sup>wt</sup>, eine spezifische WT-Aldolaseaktivität von ~ 1 % auf (Verwendung von 2,8 mM D/L-GAP bzw. 50 mM DHA, Tab. 3.9). Eine Aldolaseaktivität für alle anderen Varianten war nicht nachweisbar. Für die Retroaldolreaktion bei der Verwendung von 5 mM D-S7P und 50 mM D-F6P zeigte nur FSAA<sup>wt</sup> Aktivität. Im Retroaldolassay wurde ebenfalls wie im Transaldolaseassay 0,9 mM D-S7P eingesetzt. Die Varianten FSAA<sup>Q59E A129S Y131F</sup> und FSAA<sup>Q59E Y131F N133G</sup> besitzen möglicherweise Transaldolaseaktivität von 0,08 ± 0,02 und 0,07 ± 0,02 U/mg (siehe Abb. 3.19: grafische Darstellung der Transaldolaseaktivität mit 0,3 mM D-S7P). Dies lag auch unter Berücksichtigung der Standardabweichung über der Nachweisgrenze von 0,01 U/mg. FSAA<sup>wt</sup>, die eine höhere Aldol- und Retroaldolaktivität aufweist, zeigte keine nachweisbare Transaldolaseaktivität unter diesen Bedingungen.

**Tab. 3.9: Spezifische D-F6P-Aldolase- und Transaldolaseaktivitäten in Mikrotiterplatten**

Angegeben sind die Mittelwerte jeweils einer Doppelbestimmung mit Ausnahme der Transaldolaseaktivität. Hier ist der Mittelwert von vier technischen Replikaten angegeben. Die Messung der Aktivitäten wurde bei 30 °C in Mikrotiterplatten durchgeführt. Die spezifische Aktivität wurde über die Bildung von NADPH mit den koppelnden Enzymen PGI und G6PDH aus D-F6P und NADP<sup>+</sup> oder über die Bildung von NAD<sup>+</sup> mit dem Kopplungsenzym GldA aus DHA und NADH bestimmt (siehe 7.5.7). Das selbst synthetisierte Substrat D-S7P aus D-Ribo-5P und Hydroxypyruvat besaß eine durchschnittliche Reinheit von 79 % (siehe 7.7.1). Zum Vergleich wurde die Aktivität von FSAA<sup>wt</sup> bzw. TalB<sup>wt</sup> als 100 % definiert.

Protein	D-F6P- Aldolase- reaktion	D-S7P- Retroaldolase- reaktion	D-F6P- Retroaldolase- reaktion	Transaldolase- reaktion
	spezifische Aktivität [U/mg] <sup>[a]</sup>	spezifische Aktivität [U/mg] <sup>[b]</sup>	spezifische Aktivität [U/mg] <sup>[c]</sup>	spezifische Aktivität [U/mg] <sup>[d]</sup>
	DHA + D-GAP ⇌ D-F6P	D-S7P ⇌ D-E4P + DHA	D-F6P ⇌ D-GAP + DHA	D-S7P + D-GAP ⇌ D-E4P + D-F6P
TalB <sup>wt</sup>	n.d. <sup>[e]</sup>	n.d. <sup>[f]</sup>	n.d. <sup>[g]</sup>	<b>1,54 ± 0,29 (100 %)</b>
FSAA <sup>wt</sup>	<b>8,04 (100 %)</b>	<b>0,07 (100 %)</b>	<b>2,55 (100 %)</b>	n.d. <sup>[h]</sup>
FSAA <sup>Y131L</sup>	n.d. <sup>[e]</sup>	n.d. <sup>[f]</sup>	n.d. <sup>[g]</sup>	n.d. <sup>[h]</sup>
FSAA <sup>Q59E Y131L</sup>	n.d. <sup>[e]</sup>	n.d. <sup>[f]</sup>	n.d. <sup>[g]</sup>	n.d. <sup>[h]</sup>
FSAA <sup>Q59E Y112F Y131F</sup>	n.d. <sup>[e]</sup>	n.d. <sup>[f]</sup>	n.d. <sup>[g]</sup>	n.d. <sup>[h]</sup>
FSAA <sup>Q59E A129S Y131F</sup>	<b>0,07 (0,9 %)</b>	n.d. <sup>[f]</sup>	n.d. <sup>[g]</sup>	<b>0,08 ± 0,02</b>
FSAA <sup>Q59E Y131F N133G</sup>	<b>0,08 (1,0 %)</b>	n.d. <sup>[f]</sup>	n.d. <sup>[g]</sup>	<b>0,07 ± 0,02</b>
FSAA <sup>Q59E A129S Y131F N133G</sup>	n.d. <sup>[e]</sup>	n.d. <sup>[f]</sup>	n.d. <sup>[g]</sup>	n.d. <sup>[h]</sup>

[a] 2,8 mM D/L-GAP und 50 mM DHA entsprachen in etwa den bekannten K<sub>m</sub>-Werten. Der K<sub>m</sub>-Wert für DHA von FSAA<sup>wt</sup> wurde auf 31 mM bestimmt (siehe Tab. 3.3). Bezüglich des K<sub>m</sub>-Wertes für D/L-GAP war dieser für FSAA<sup>wt</sup> auf 1,9 mM bestimmt worden [38].

[b] 5 mM D-S7P wurden eingesetzt. Der K<sub>m</sub>-Wert für D-S7P von FSAA<sup>wt</sup> war bisher nicht bekannt (Bestimmung siehe folgender Absatz).

[c] 50 mM D-F6P entsprach dem sättigenden Bereich. Der K<sub>m</sub>-Wert für D-F6P von FSAA<sup>wt</sup> wurde auf 19 mM bestimmt (siehe Tab. 3.3).

[d] 0,9 mM D-S7P und 2,8 mM D/L-GAP entsprachen dem sättigenden Bereich. Der K<sub>m</sub>-Wert für D-S7P von TalB<sup>wt</sup> wurde auf 285 µM und für D/L-GAP auf 38 µM bestimmt [23].

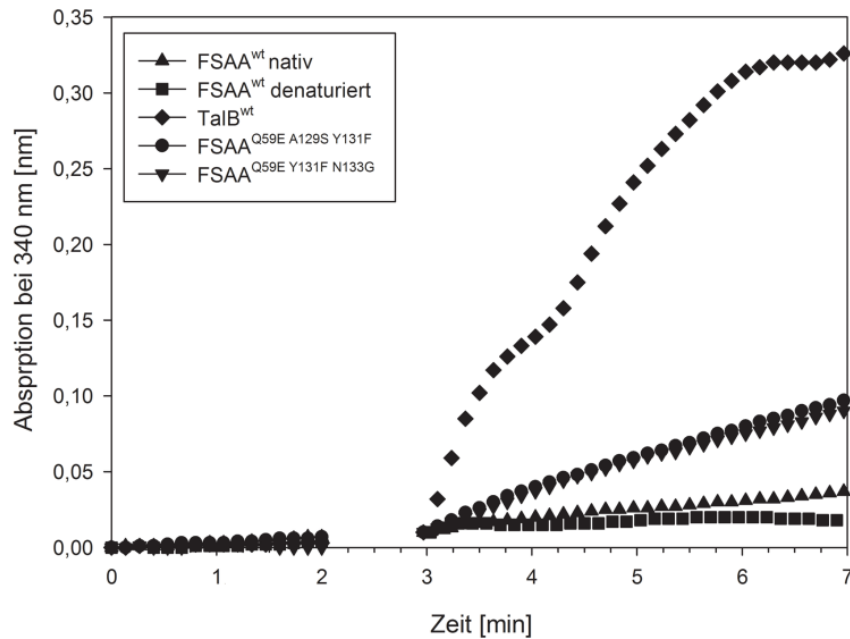
[e] n.d., nicht detektierbar, da unter der Nachweisgrenze von 0,01 U/mg unter Verwendung von 2,8 mM D/L-GAP bzw. 50 mM DHA und 8,3 µM Protein.

Weiterführende Legende zur vorhergehenden Tabelle:

- [f] n.d., nicht detektierbar, da unter der Nachweisgrenze von 0,05 U/mg unter Verwendung von 5 mM D-S7P und 40 µg Protein.
- [g] n.d., nicht detektierbar, da unter der Nachweisgrenze von 0,08 U/mg unter Verwendung von 50 mM D-F6P und 40 µg Protein.
- [h] n.d., nicht detektierbar, da unter der Nachweisgrenze von 0,03 U/mg unter Verwendung von 2,8 mM D/L-GAP bzw. 0,9 mM D-S7P und 8,3 µM Protein.

Aufgrund der eingeschränkten Aussagekraft der Assays wurde in folgenden Versuchen als zusätzliche Kontrolle hitzedenaturierte FSAA eingesetzt (10 min, 80 °C). Die Denaturierungstemperatur  $T_{\text{melt}}$  wurde zuvor mit  $76,2 \pm 0,2$  bestimmt (siehe Tab. 3.7). Durch die Spaltung des vorgelegten Substrates D-S7P (Retroaldolaktivität) zu D-E4P und D-GAP, kombiniert mit anschließender Aldolaktivität (Reaktion von D-GAP und des vorgelegten DHA) kann ebenfalls D-F6P entstehen. D-F6P wurde im indirekten Assay über die Zunahme von NADPH unter der Annahme der Äquivalenz detektiert und kann daher bei Aldolaseaktivität nicht eindeutig auf eine Transaldolaseaktivität zurückzuführen sein. Weder die hitzedenaturierte FSAA, noch die verwendeten Kopplungsenzyme PGI und G6P-DH, können einen falsch-positiven Aktivitätsnachweis führen. Die Inaktivierung wurde zur Sicherheit über die mögliche Bildung von D-F6P direkt aus DHA und D/L-GAP in Mikrotiterplatten überprüft (siehe Abb. 3.18). Die Abb. 3.18 ist exemplarisch für die durchgeführten Experimente anzusehen. Insgesamt wurde die Transaldolaseaktivität in vier technischen Replikaten über 7 Min überprüft. Dabei war die Anfangssteigung zur Berechnung der spezifischen Aktivität im Fokus. Die eingesetzten 40 µg Protein entsprechen 8 µM und damit der 10-fachen Konzentration der Positivkontrolle FSAA<sup>wt</sup> für die Aldolasereaktion.

Um zudem einen Hinweis zu erlangen, ob es sich um eine Aldolase- oder Transaldolaseaktivität handelt, sollten die Unterschiede im  $K_m$ -Wert des Substrates ausgenutzt werden. Bei D-F6P ist der  $K_m$ -Wert für die FSAA um eine Größenordnung höher. Bei Erniedrigung der D-S7P-Konzentration sollte die Transaldolasereaktion bevorzugt werden, falls die  $K_m$ -Werte für D-S7P sich ebenfalls unterscheiden. Die apparenten kinetischen Parameter der FSAA für D-S7P wurden hier erstmals bestimmt und sind  $V_{\text{max}}$  mit 0,64 U/mg und ein  $K_m$  von 15 mM. In Abb. 3.19 sind die erhaltenen Daten grafisch dargestellt.

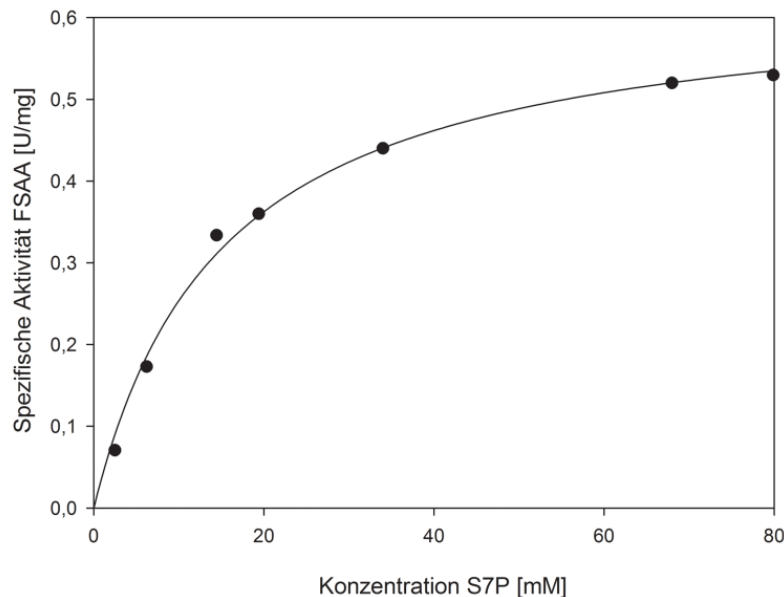


**Abb. 3.18: Spezifische Transaldolaseaktivität von TalB<sup>wt</sup>, FSAA<sup>wt</sup> nativ, FSAA<sup>wt</sup> denaturiert, FSAA<sup>Q59E A129S Y131F</sup> und FSAA<sup>Q59E Y131F N133G</sup>**

Dargestellt ist der Extinktionsverlauf der Mittelwerte aus zwei Aktivitätsbestimmungen in Mikrotiterplatten (siehe 7.5.7). Als Substrate wurden 2,8 mM D/L-GAP bzw. 0,3 mM D-S7P verwendet. Es wurden 8,3  $\mu$ M Protein FSAA/-Variante eingesetzt (entspricht 40  $\mu$ g in 200 ml). Der Start der Hintergrundmessung wurde auf die Extinktion von 0 nm normiert. Der Start der Aktivitätsmessung wurde auf 0,01 normiert. Hierdurch erfolgt keine Verlaufsänderung, jedoch eine Verdeutlichung der Ergebnisse, da Unterschiede in der Startabsorption nivelliert werden. Als Negativkontrolle wurde FSAA<sup>wt</sup> nativ (D-F6P-Bildung über F6P-Aldolaseaktivität möglich) und denaturierte FSAA<sup>wt</sup> eingesetzt (10 min, 80 °C). Die Lücke im Verlauf entspricht der Dauer der Substratzugabe zum Start der Reaktion.

Die Assays wurden weiterhin wie unter 7.5.7 beschrieben durchgeführt. Die Konzentration von D-S7P wurde zur Unterscheidung von Aldolase- oder Transaldolaseaktivität von 0,9 mM auf 0,3 mM gesenkt. Die Nachweisgrenze belief sich auf 0,01 U/mg unter Verwendung von 2,8 mM D/L-GAP, 0,3 mM D-S7P und 40  $\mu$ g Protein. Um sicher zu stellen, dass in der denaturierten Kontrolle keine Aktivität vorliegt, wurde die höhere Konzentration von 0,9 mM D-S7P verwendet. Sowohl FSAA<sup>wt</sup> nativ als auch hitzedenaturierte FSAA<sup>wt</sup> zeigten einen NADPH Anstieg größer bzw. gleich der Nachweisgrenze. TalB zeigte eine Verminderung der spezifischen Aktivität auf 1,33 U/mg (siehe Tab. 3.10). Dies entsprach einer prozentualen Abnahme von 14 % im Vergleich zur spezifischen Aktivität bei einem Substrateinsatz von 0,9 mM D-S7P. Die beiden FSAA-Dreifachvarianten zeigten auch bei 0,3 mM D-S7P eine mögliche Transaldolaseaktivität im gekoppelten Enzymassay durch die Bildung von NADPH. Die prozentuale Abnahme durch

Substratreduktion bei  $\text{FSAA}^{\text{Q59E A129S Y131F}}$  belief sich auf 63 % und bei  $\text{FSAA}^{\text{Q59E Y131F N133G}}$  auf 61 % und lag somit höher als bei  $\text{TalB}^{\text{wt}}$ . Basierend auf diesen Ergebnissen sind Hinweise vorhanden, dass es gelungen war, in den Varianten  $\text{FSAA}^{\text{Q59E A129S Y131F}}$  und  $\text{FSAA}^{\text{Q59E Y131F N133G}}$  Transaldolaseaktivität zu generieren.



**Abb. 3.19: Auftragung der spezifischen Aktivität für die Spaltung von D-S7P für  $\text{FSAA}^{\text{wt}}$**   
 Dargestellt als Michaelis-Menten-Funktion von zwei technischen Replikaten (Abweichung  $\leq 23\%$ ). Es wurde zwischen 2,5 - 80 mM D-S7P (Reinheit von 79 %) eingesetzt. Der gekoppelte Enzymassay mit GldA wurde in Mikrotiterplatten (siehe 7.5.7) durchgeführt, wobei die Bildung von DHA gemessen wurde.

**Tab. 3.10: Spezifische Transaldolaseaktivitäten bei unterschiedlicher Substratkonzentration von D-S7P**

Angegeben sind die Mittelwerte jeweils einer Doppelbestimmung beim Einsatz von 0,3 mM D-S7P und der Mittelwert von vier technischen Replikaten für den Einsatz von 0,9 mM D-S7P. Bei der Doppelbestimmung werden keine Fehlerabweichungen angegeben. Die Messung der Aktivitäten wurde bei 30 °C in Mikrotiterplatten durchgeführt. Die spezifische Aktivität wurde über die Bildung von NADPH aus D-F6P mit den Kopplungsenzymen PGI und G6PDH bestimmt (siehe 2.5.7). Das selbst synthetisierte Substrat D-S7P aus D-Ribo-5P und Hydroxypyruvat besaß eine durchschnittliche Reinheit von 79 % (siehe 2.7.1). Es wurden 40 µg Protein eingesetzt, wobei  $\text{TalB}$  eine Ausnahme mit 4 µg darstellte.

Enzym	0,9 mM D-S7P spezifische Aktivität [U/mg]	0,3 mM D-S7P spezifische Aktivität [U/mg]	Prozentuale Abnahme [%]
$\text{TalB}^{\text{wt}}$	1,54 ± 0,29	1,33	14
$\text{FSAA}^{\text{Q59E A129S Y131F}}$	0,08 ± 0,02	0,03	63
$\text{FSAA}^{\text{Q59E Y131F N133G}}$	0,07 ± 0,02	0,03	61
<b>Nachweisgrenze</b>	0,03	0,01	

## 8.4 Inhibitorkinetiken

Durch die Charakterisierung von Enzymen bezüglich ihres Verhaltens auf Strukturanaloga können Informationen zum Mechanismus gewonnen werden oder/und es kann zur Enzyminhibition kommen. Bisher sind die meisten D-F6P-Aldolasen und Transaldolasen strikt stereoselektiv für die 3*S*,4*R*-Konfiguration der neu verknüpften C-Atome [1,49,98]. Das Strukturanalogon D-T6P (4*S*) wurde im Vergleich zum Substrat D-F6P (4*R*) gewählt (siehe Abb. 1.13), um seinen Einfluss auf TalB und TalB-Varianten und die FSAA und FSAA-Variante zu untersuchen. Die Substratakzeptanz von TalB/-Variante(n) in Bezug auf D-T6P als mögliches Donorsubstrat wurde von Samland analysiert. Hierbei konnte eine Reaktion mit D-T6P als neue Synthese ausgeschlossen werden [97].

### 8.4.1 Inhibitor Tagatose-6-phosphat

Der Effekt von D-T6P auf die Retroaldolreaktion (Spaltung von D-F6P) und die Transaldolaseaktivität (Bildung von D-F6P) wurden untersucht. Insbesondere die Retroaldolreaktion war von Interesse, da hierbei das Strukturanalogon D-F6P eingesetzt wurde. Die Änderung der Aktivität der TalB-Varianten (TalB<sup>F178Y</sup> und TalB<sup>E96Q F178Y</sup>) mit Aldolaseaktivität wurde zudem betrachtet. Für die TalB<sup>F178Y</sup> war bereits gezeigt worden, dass D-T6P ein Inhibitor ist, für die TalB<sup>wt</sup> jedoch nicht [29]. Offen war, wie sich D-T6P auf die neue TalB Doppelvariante mit verbesserten Aldolaseeigenschaften auswirkt. Ferner wurden die Auswirkungen von D-T6P auf FSAA<sup>wt</sup> und die Aldolasevariante FSAA<sup>A129S</sup> erstmals analysiert. Diese Aldolasevariante besitzt ein Substratspektrum, das in Richtung DHA verschoben ist. Die katalytische Effizienz ist von 4 s<sup>-1</sup>mM<sup>-1</sup> der FSAA<sup>wt</sup> auf 69 s<sup>-1</sup>mM<sup>-1</sup> der FSAA<sup>A129S</sup> gesteigert, wohingegen die Effizienz für HA geringer ist [62]. Somit ist dieses Substratspektrum ähnlicher zu TalB als das Spektrum von FSAA<sup>wt</sup> und könnte Aufschlüsse über eventuelle Unterschiede zwischen Transaldolase und Aldolase liefern. Um auch Organismus-übergreifende Aussagen treffen zu können, wurde für die Aktivitätsuntersuchungen auch die hTal herangezogen.

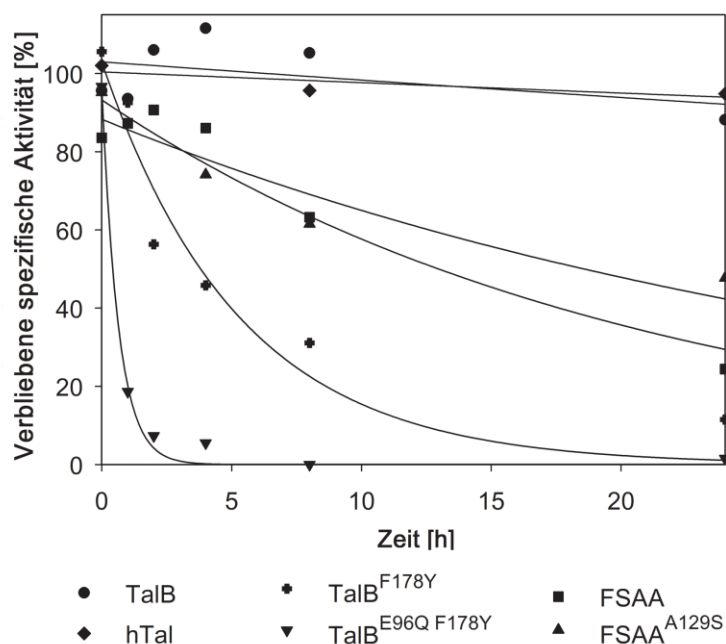
Bevor der Effekt auf die Aktivitäten untersucht werden konnte, musste D-T6P synthetisiert werden. Dies gelang unter Anwendung der FRK und einer Bariumfällung, entwickelt von Samland, Heilig, Fessner und Sanchez-Moreno (siehe 7.7.2). Es wurde eine Ausbeute von 45 % als Bariumsalz erzielt. Die Reinheit des gelösten D-T6P betrug  $\geq 95$  % (Interpretation der NMR Daten durch Fessner, TU Darmstadt, Deutschland) [10].

Vor den Aktivitätsassays wurden die Enzyme mit unterschiedlichem molarem Überschuss (1-facher, 2-facher, 5-facher und 10-facher) an D-T6P inkubiert (Durchführung siehe 7.8.1). Dieses Verfahren wurde für TalB und TalB<sup>F178Y</sup> bereits von S. Schneider [29]

beschrieben und im Rahmen dieser Arbeit weiterentwickelt. Dabei war bereits gezeigt worden, dass D-T6P ein Inhibitor ist für TalB<sup>F178Y</sup> ist, jedoch nicht für TalB<sup>wt</sup> [29]. Die Aktivitätsuntersuchungen von TalB<sup>wt</sup> in Anwesenheit oder Abwesenheit von D-T6P (Bildung von D-F6P, siehe 7.5.6) zeigten auch hier keinerlei Unterschiede (siehe Abb. 3.20). Alle Enzyme mit D-F6P-Aktivität wurden im Gegensatz dazu von D-T6P inhibiert und waren nicht, bzw. nur eingeschränkt, in der Lage D-F6P zu spalten. Die Inhibitionsrate nahm folgendermaßen ab: TalB<sup>E96Q F178Y</sup> > TalB<sup>F178Y</sup> > FSAA<sup>wt</sup> > FSAA<sup>A129S</sup>. Dieses Verhalten spiegelte sich auch in den Halbwertszeiten der Inhibition wider (siehe Tab. 3.11). Bereits nach einer Vorinkubation von 30 min mit der äquimolaren Menge an D-T6P war die Hälfte der TalB<sup>E96Q F178Y</sup> inaktiv. Im Gegensatz dazu verblieb die Hälfte von FSAA<sup>A129S</sup> auch nach 23 h und einem 10-fachen molaren Überschuss an D-T6P aktiv. Zur Kontrolle wurden die spezifischen Aktivitäten in Abwesenheit von D-T6P gemessen (siehe Tab. 3.12). Diese Referenzaktivität wurde als 100 % definiert. Die hTalF<sup>189Y</sup> war nicht lange genug stabil, um Aussagen über den Einfluss von D-T6P zu treffen. Nach einer Verdünnung 1:50 der unterschiedlichen Ansätze (TalB<sup>E96Q F178Y</sup>, TalB<sup>F178Y</sup>, FSAA<sup>wt</sup> und FSAA<sup>A129S</sup>) und einer anschließenden Inkubationszeit von 24 h konnte in keinem Ansatz die Anfangsaktivität wiederhergestellt werden. Somit ist die Inhibierung irreversibel, was bisher lediglich für TalB<sup>F178Y</sup> gezeigt worden war [29]. Die Abhängigkeit von der Inhibitorkonzentration ist in Abb. 3.21 (A) beispielhaft für TalB<sup>F178Y</sup> dargestellt.

Über eine Sekundärauftragung, Halbwertszeit der Inhibitionen gegen unterschiedliche Inhibitorkonzentrationen aufgetragen (Kitz-Wilson-Formel [168], siehe 7.8.1), kann eine Aussage über den Inaktivierungsmechanismus getroffen werden. Es kann zuerst ein reversibler Inhibitorkomplex gebildet werden, der im Anschluss irreversibel inaktiviert wird, oder es kann direkt ein irreversibler Enzym-Inhibitorkomplex entstehen [168]. Der dabei determinierte, extrapolierte lineare Fit der Sekundärauftragung kann zwei Koordinatenschnittpunkte aufweisen (Ordinate/Abszisse) oder eine Ursprungsgerade sein. Es wurde keine Ursprungsgerade ermittelt, somit wurde nicht direkt der irreversible Enzym-Inhibitorkomplex gebildet (siehe Abb. 3.21). Die Gerade ließ auf eine Inaktivierung in mindestens zwei Schritten rückschließen (Inhibitionsmechanismus, [10]).





**Abb. 3.20: Inhibition von FSAA, TalB und deren Varianten, inkubiert mit D-T6P**

Die Inkubation wurde bei 30 °C in 50 mM Glycylglycinpuffer (pH 8,5) durchgeführt. FSAA, FSAA<sup>A129S</sup> und TalB wurden mit einem 10-fachen D-T6P-Überschuss über die Enzymkonzentration inkubiert, die TalB-Varianten wurden mit einer äquimolaren Konzentration von D-T6P inkubiert. Die Aktivitäten von FSAA, FSAA<sup>A129S</sup> und TalB-Varianten wurden über die Retroaldolreaktion von D-F6P zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen. Hingegen wurde die Aktivität von TalB über die Bildung von D-F6P aus D-S7P und D/L-GAP zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen. Die verbliebene spezifische Aktivität [%] wurde im Bezug zu einer Messung ohne D-T6P berechnet. Dargestellt werden jeweils der Durchschnitt aus zwei unabhängigen Messungen mit zwei technischen Replikaten für FSAA, TalB<sup>F178Y</sup> und TalB<sup>E96Q F178Y</sup> sowie der Durchschnitt der Duplikate für TalB, hTal und FSAA<sup>A129S</sup> (verändert nach [10]).

**Tab. 3.11: Halbwertszeiten der D-T6P Inhibierung**

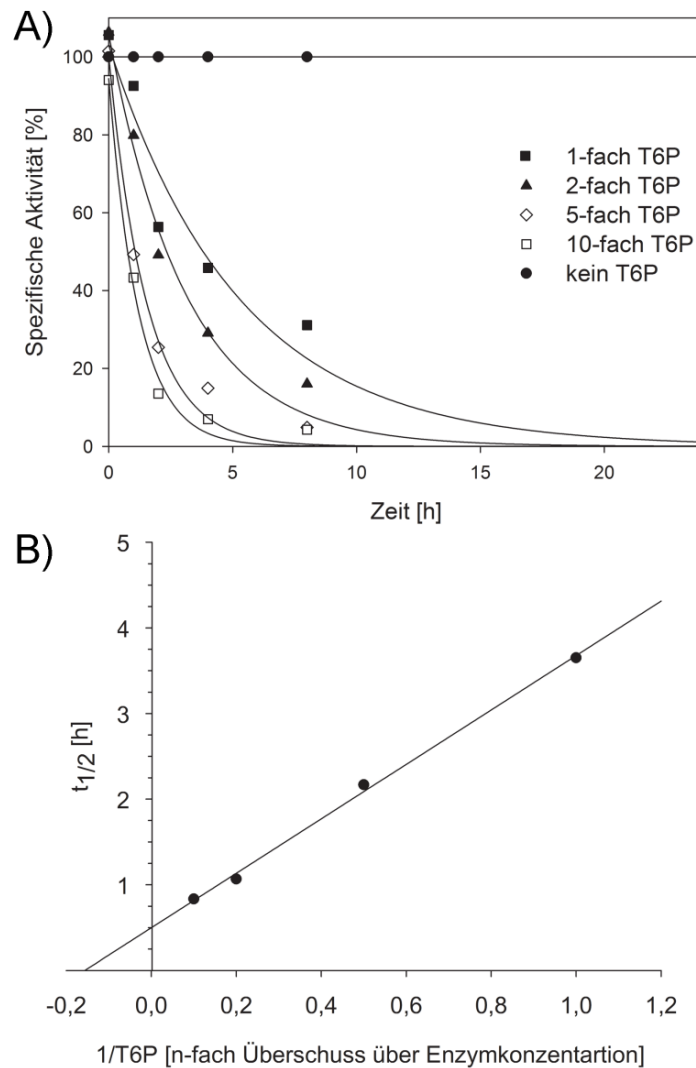
Das Bestimmtheitsmaß der Inhibitorcurven (exponentieller Abfall) wurde mit SigmaPlot bestimmt. Zur Berechnung wurden die Daten von zwei unabhängigen Messungen der Inhibition mit jeweils zwei technischen Replikaten für FSAA, TalB<sup>F178Y</sup> und TalB<sup>E96Q F178Y</sup> sowie der Durchschnitt der Duplikate für FSAA<sup>A129S</sup> verwendet. Die Durchführung der Inhibition ist beschrieben unter 7.8.1 [181].

Protein	Relativer molarer Überschuss von D-T6P zur Enzymmenge	Halbwertszeit der verbleibenden spezifischen Aktivität	R <sup>2</sup>
FSAA <sup>A129S</sup>	10-fach	22h 39 min	0,9368
FSAA	1-fach	25h 07 min	0,9793
	10-fach	14h 25 min	0,9623
TalB <sup>E96Q F178Y</sup>	1-fach	0h 27 min	0,9970
TalB <sup>F178Y</sup>	1-fach	3h 39 min	0,9650
	2-fach	2h 10 min	0,9914
	5-fach	1h 04 min	0,9932
	10-fach	0h 50 min	0,9959

**Tab. 3.12: Spezifische Aktivitäten in Abwesenheit von D-T6P**

Die Retroaldolaktivität (Spaltung von D-F6P, D-F6P 5 mM) bzw. Transaldolaseaktivität (Bildung von D-F6P, D-S7P 0,9 mM und D/L-GAP 2,8 mM) wurde bei 30 °C gemessen, wie in 7.5.6 beschrieben (ergänzt nach [10]).

Retroaldolaktivität [U/mg]		Transaldolaseaktivität [U/mg]	
TalB <sup>F178Y</sup>	0,4	TalB <sup>wt</sup>	4,4
TalB <sup>E96Q F178Y</sup>	1,3	hTal <sup>wt</sup>	0,8
FSAAs <sup>wt</sup>	1,7		
FSAAs <sup>129S</sup>	11,1		
hTal <sup>F189Y</sup>	0,1		



**Abb. 3.21: Inhibitionskinetiken von TalB<sup>F178Y</sup> mit unterschiedlichen D-T6P Konzentrationen**

(A) Die Inkubation von 143  $\mu$ M TalB<sup>F178Y</sup> wurde bei 30 °C mit 0 M (●), 0,14 M (■), 0,28 M (▲), 0,7 M (◇) und 1,4 M D-T6P (□) durchgeführt. Die jeweils verbliebene Aktivität wurde über die Retroaldolreaktion von D-F6P zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen. Die spezifische Aktivität [%] wurde in Bezug zu einem Versuch ohne Hinzufügen von D-T6P berechnet. Dargestellt ist der Durchschnitt von unabhängigen Messungen (zwei biologische Replikate, jeweils mit zwei technischen Replikaten).

(B) Auftragung der Halbwertszeit der Inaktivierung über dem Kehrwert der Inhibitorkonzentration. Die Gerade wurde mit Hilfe der Kitz-Wilson-Formel berechnet (III) [168,169] ( $R^2 = 0,9988$ ) [10].

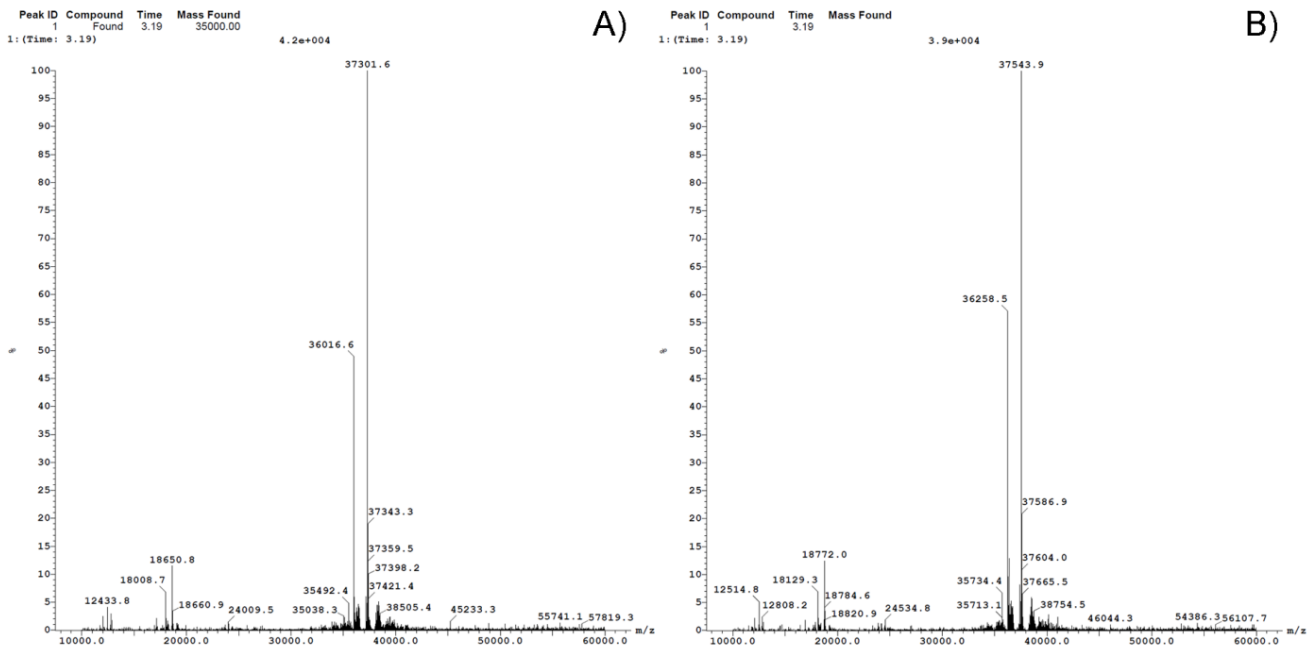
### 8.4.2 MS Analyse

Zum Nachweis ob und wenn ja, wie viele Moleküle D-T6P an das Enzym binden, wurde nach der Inhibition (Bildung des Enzym-Inhibitor-Komplexes) eine LC-ESI-MS-Analyse nach Sundqvist et al. [170] in Kooperation mit der Protein Science Facility (PSF) am Karolinska Institutet als Auftragsarbeit des Royal Institute of Technology in Stockholm/Schweden durchgeführt (siehe 7.8.2). Für alle inhibierten Enzyme wurde ein MS-Ergebnis erhalten, welches eine Masse bestehend aus der Enzymmasse und der Masse von D-T6P aufwies. Somit wurde das Verhältnis von Enzym zu D-T6P von 1:1 belegt. Zudem konnte jeweils das MS-Ergebnis des nicht inhibierten Enzyms zum Vergleich erhalten werden (siehe Tab. 3.13 und Abb. 3.22). Das Hauptsignal wurde im Vergleich von Enzym und inhibiertem Enzym um 241 bis 243 m/z verschoben. Dies entspricht einer Masse von einem gebundenen D-T6P (260 g/mol) vermindert um ein Wassermolekül (18 g/mol). Somit war D-T6P als Schiff'sche Base Intermediat gebunden. Mittels Kristallisation wurde versucht, weitere Informationen darüber zu erhalten, warum das Struktur analogon D-T6P inhibierend wirkt (siehe 9.3.2) [10].

#### Tab. 3.13: MS-Ergebnisse der Inkubation mit D-T6P

Für die Vorinkubation zur Inhibition, Überprüfung der Inhibition und LC-ESI-MS-Methode siehe 7.8.2. Bei Bindung eines Moleküls des Inhibitors als Schiff'sche Base ist eine Zunahme des Masse- zu Ladungsverhältnisses von  $242 \pm 4$  m/z zu erwarten (Molmasse D-T6P und Elimination eines Wassermoleküls) betragen [181]. Bei allen Enzymen wurde die Masse des His<sub>6</sub>-Tags berücksichtigt.

MS-Probe	Kalkulierte Masse [Da] [182]	Masse- zu Ladungsverhältnis [m/z] Hauptsignal	Unterschiede in der Masse zwischen Enzym und inhibiertem Enzym [m/z]
TalB <sup>F178Y</sup>	37297,4	37302,1	242,5
TalB <sup>F178Y</sup> + D-T6P	37541,2	37544,6	
TalB <sup>E96Q F178Y</sup>	37296,4	37301,6	242,3
TalB <sup>E96Q F178Y</sup> + D-T6P	37540,2	37543,9	
FSAA	23819,6	23823,2	242,1
FSAA + D-T6P	24061,3	24065,3	
FSAA <sup>A129S</sup>	23835,6	23839,8	241,4
FSAA <sup>A129S</sup> + D-T6P	24077,4	24081,2	



**Abb. 3.22: MS Ergebnisse exemplarisch für TalB<sup>E96Q F178Y</sup> (A) und TalB<sup>E96Q F178Y</sup> + D-T6P (B)**  
Bereits veröffentlicht in [181].

### 8.4.3 Inhibition D-GA in Kombination mit DHA

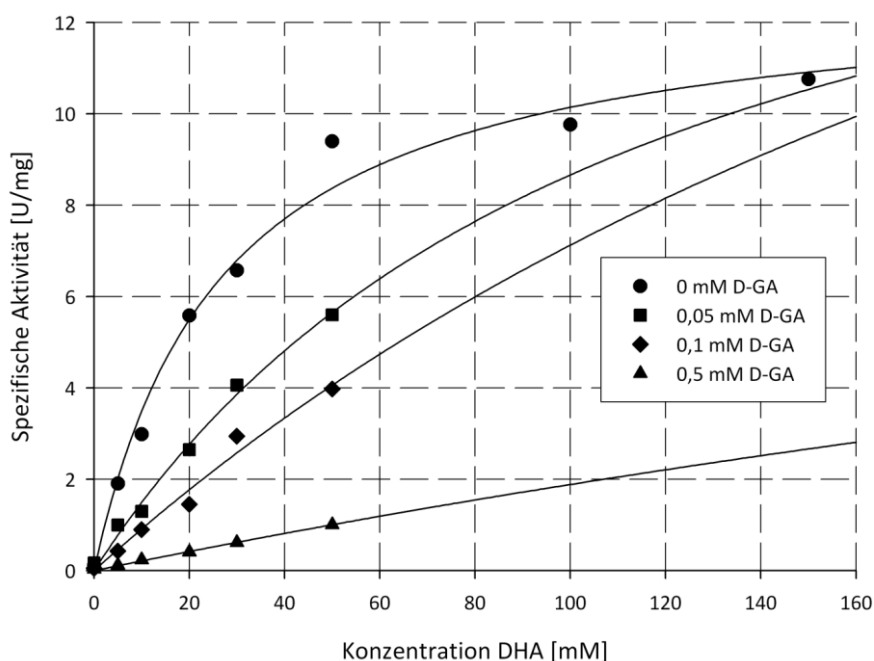
Bereits beschrieben war, dass D-GA beim Umsatz von DHA und D-GAP inhibierend wirkte. Dabei liegt in Bezug auf D-GAP eine reversible nicht-kompetitive Inhibition vor. Eine Konkurrenz um die Akzeptorbindestelle wurde somit ausgeschlossen [29]. Inzwischen war bekannt, dass auch Aldehyde als Donoren akzeptiert werden, beispielsweise GO [54]. Daher wurde hier vorliegend die Konkurrenz zur Donorbindestelle zwischen DHA und D-GA untersucht.

Die verschiedenen Auswertungsmethoden Michaelis-Menten und Lineweaver-Burk kamen jeweils zu dem Ergebnis, dass es sich um eine kompetitive Inhibition handelt. Somit bindet D-GA an die Donorbindestelle in FSAA und konkurriert mit DHA um diese. Die Aussage wurde aus dem Anstieg von  $K_M$  bei ähnlichem  $V_{max}$  (siehe Abb. 3.23 und Tab. 3.14) gefolgert. Des Weiteren zeigten die der Lineweaver-Burk-Regressionen einen gemeinsamen Schnittpunkt auf der Ordinate (siehe Abb. 3.24 A). Dies sind Kennzeichen einer kompetitiven Hemmung [153]. Der  $K_I$ -Wert belief sich auf 29  $\mu\text{M}$ . Ermittelt wurde dieser aus der sekundären Lineweaver-Burk-Auftragung (siehe Abb. 3.24 B).

**Tab. 3.14: Kinetische Konstanten der Michaelis-Menten-Auftragung der Inhibition von FSAAw<sup>t</sup> mit D-GA**

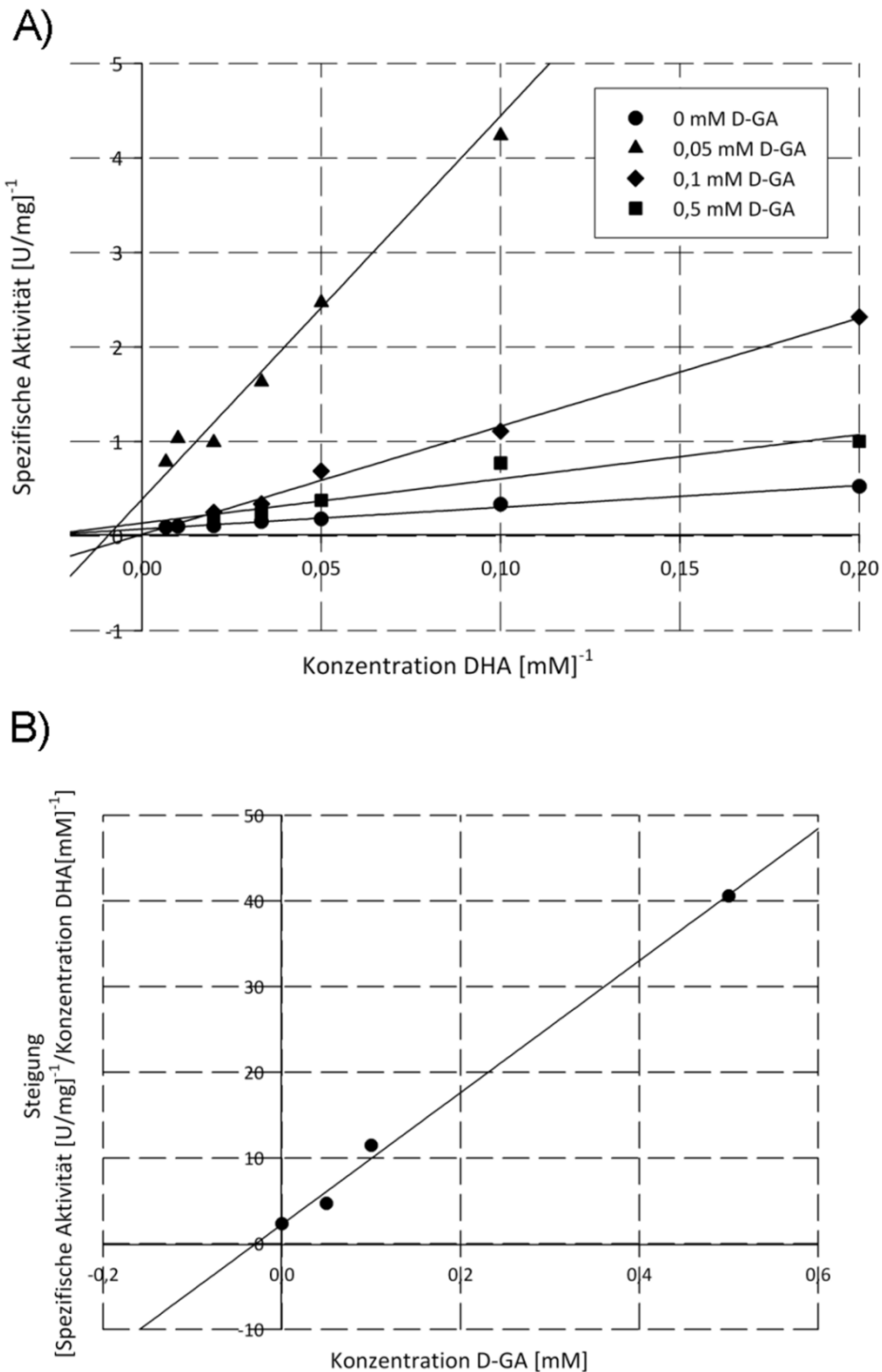
Angegeben sind die Mittelwerte aus zwei technischen Replikaten. Gemessen wurde die Bindung von unterNADPH gekoppelt an die Synthese von D-F6P, beschrieben in 7.8.3, wobei 5 - 150 mM DHA und 2,8 mM D/L-GAP, sowie 0 - 0,5 mM D-GA verwendet wurden.

D-GA [mM]	0	0,05	0,1	0,5
$V_{\max}$ [U/mg]	12,86	18,55	29,14	15,24
$K_m$ [mM]	26,72	114,13	308,93	707,95
$R^2$	0,9960	0,9987	0,9911	0,9970



**Abb. 3.23: Direkte Darstellung nach Michaelis-Menten der Inhibition von FSAAw<sup>t</sup> mit D-GA**

Die spezifischen Aktivitäten für FSAAw<sup>t</sup> bei 30 °C sind gegen die Substratkonzentration aufgetragen. Über die zwei technischen Replikate wurde eine Michaelis-Menten-Kurve gelegt. Es wurde 5 - 150 mM DHA und 2,8 mM D/L-GAP, sowie 0 - 0,5 mM D-GA eingesetzt. Die D/L-GAP-Konzentration war nicht sättigend und entsprach in etwa dem bekannten  $K_m$ -Wert von 1,9 mM [38]. Die gekoppelten Enzymassays für den Nachweis von D-F6P sind in 7.8.3 beschrieben.



**Abb. 3.24: Doppelt-reziproke Auftragung nach Lineweaver-Burk der Messwerte von FSAA<sup>wt</sup> mit D-GA**

(A) Die spezifischen Aktivitäten für FSAA<sup>wt</sup> sind gegen die Substratkonzentration doppelt reziprok aufgetragen. Über die zwei technischen Replikate wurde je D-GA Konzentration eine Gerade gelegt und die Steigung bestimmt. (B) Auftragung der ermittelten Steigung gegen die D-GA Inhibitorkonzentration. Es wurde 5 - 150 mM DHA und 2,8 mM D/L-GAP, sowie 0 - 0,5 mM D-GA eingesetzt. Die D/L-GAP-Konzentration war nicht sättigend und entsprach in etwa dem bekannten  $K_m$ -Wert von 1,9 mM [38]. Die gekoppelten Enzymassays bei 30 °C für den indirekten Nachweis von D-F6P sind in 7.8.3 beschrieben.

## 8.5 Röntgenkristallstrukturanalyse

### 8.5.1 Reduktion des Enzym-Substrat-Komplexes

Für TalB war durch Reduktion bereits erfolgreich ein Enzym-Substrat-Komplex kristallisiert worden [5]. Nach Bindung des Substrates D-F6P an TalB war diese Bindung mit Hilfe von Natriumborhydrid reduziert worden. Hierdurch entstand eine irreversible Bindung an das essenzielle Lys und damit eine Enzyminaktivierung. Dieser Enzym-Substrat-Komplex wurde im Anschluss zur Auflösung der Kristallstruktur eingesetzt und TalB mit gebundener Glyceryl-Einheit als Struktur erhalten. Für die FSAA war bislang nur die WT-Struktur bekannt [2]. Um ebenfalls einen Enzym-Substrat-Komplex der FSAA zu erhalten, wurde versucht, mittels Reduktion verschiedene Substrate vor der Kristallisation irreversibel kovalent an das Enzym zu binden. Hierzu wurde vor der Reduktion mit dem jeweiligen Substrat zur Bindung inkubiert (siehe 7.9.1). Der Erfolg wurde mittels Aldolaseaktivitätstest (siehe 7.5.6, Bildung von D-F6P) und MS-Analyse (siehe 7.8.2) überprüft.

Eine Schwierigkeit bestand darin, die Ergebnisse der Aktivitätstests zu interpretieren. Es wurde folgende Interpretationsweise angewandt: Der Aktivitätsassay ergibt die Restaktivität der Probe. Diese wird im Verhältnis zur spezifischen Aktivität der nicht reduzierten FSAA (definiert als 100 %) angegeben. Wird diese Restaktivität von der ursprünglichen Aktivität abgezogen, erhält man die Summe der Anteile an reduziertem Komplex und denaturiertem Enzym. Durch die Methode selbst wurde ein gewisser Enzymanteil denaturiert, der ebenfalls keine Aktivität zeigte. Um zwischen den Anteilen an reduziertem Komplex und denaturiertem Enzym zu unterscheiden, wurde eine Kontrolle ohne Substrat mitgeführt. Die Restaktivität der reduzierten Kontrolle ohne Substrat im Verhältnis zur spezifischen Aktivität der nicht reduzierten FSAA ergab den Anteil an denaturiertem Enzym. Somit ließ sich der Anteil an Komplex auf diesem Weg berechnen.

Die Reduktion von FSAA<sup>wt</sup> mit den Substraten HA und HB lieferte einen Komplexanteil von 64 % bzw. 63 % (siehe Tab. 3.15). Hierbei kann davon ausgegangen werden, dass die Reduktion erfolgreich durchgeführt wurde. Die Reduktion mit D-F6P, DHA und Aceton mit einem rechnerischen Anteil an Komplex zwischen 30 % und 36 % war daher nur zu einem geringen Anteil erfolgreich. Ausgehend von dem Gemisch aus reduziertem, denaturiertem und aktivem Enzym gestaltete sich eine Kristallisation schwierig: Beispielsweise könnte dadurch lediglich der Anteil an denaturiertem Enzym kristallisieren, während der Enzym-Substrat-Komplex in Lösung verbleibt. Zudem wiesen die geringeren Anteile an reduziertem Komplex von GO und D-GA (15 % bzw. 19 %) darauf hin, dass eine kovalente Bindung des Substrates nicht vorlag. Aufgrund dessen

waren dies keine geeigneten Substrate, um über den Weg der Reduktion zu einer Enzym-Substrat-Komplex-Kristallstruktur zu gelangen.

**Tab. 3.15: Ergebnisse der Reduktionsversuche von FSAA<sup>wt</sup>**

Die spezifische Aktivität der nicht reduzierten FSAA (Bildung von D-F6P 7.5.6) wurde jeweils als 100 % definiert. Die Reduktionsmethode ist beschrieben unter 7.9.1. Die Restaktivität nach der Reduktion im Verhältnis zur spezifischen Aktivität vor der Reduktion wird als Restaktivität [%] angegeben. Der Verlust an spezifischer Aktivität der Kontrolle ohne Substrat ist der methodisch bedingte denaturierte Anteil [%]. Die Gesamtaktivität von 100 % vermindert um den denaturierten Anteil und die Restaktivität ergibt rechnerisch den Anteil an Komplex [%]. Angegeben sind die Mittelwerte von mindestens zwei technischen Replikaten.

Substrat	Restaktivität [%]	Denaturierter Anteil [%]	Rechnerischer Anteil an Komplex [%]
D-F6P	34	33	34
DHA	27	37	36
HA	5	31	64
HB	2	35	63
GO	55	30	15
Aceton	41	30	30
D-GA	52	30	19

Bevor ein Kristallisationsansatz durchgeführt wurde, sollten die Ergebnisse der Aktivitätstests mittels MS überprüft werden. Als Kontrolle wurde der Reduktionskontrollansatz ohne Substrate verwendet, da durch Zugabe des Reduktionsmittels das Enzym selbst reduziert werden kann und damit eine geänderte Masse aufweisen könnte. Zudem wurde der Ansatz mit D-F6P als nicht erfolgreiche Reduktion als Negativkontrolle überprüft.

Aus den MS-Ergebnissen (siehe Tab. 3.16) ließ sich schlussfolgern, dass keine Reduktion des Enzyms selbst durch die Zugabe von Natriumborhydrid erfolgte. In den Proben mit HA und HB wurde das Hauptsignal um die Massen von HA bzw. HB verschoben und entsprach den Massen der kalkulierten reduzierten Enzym-Substrat-Komplexe. Die feste Bindung dieser Substrate an das Enzym wurde bestätigt. Die Reduktion mit D-F6P als Negativkontrolle zeigte tatsächlich nur die Masse der unmodifizierten FSAA als Hauptsignal. Im Anschluss wurde versucht den FSAA-HA-Komplex und weitere Ansätze zu kristallisieren. Das MS-Ergebnis der FSAA<sup>wt</sup> entsprach zudem den ESI-MS Daten von Schürmann und Sprenger [49].



**Tab. 3.16: MS-Ergebnisse der reduzierten Enzym-Substrat-Komplexe**

Die Durchführung der LC-ESI-MS-Analyse ist beschrieben unter 7.8.2. Genauigkeit der Methode Masse- zu Ladungsverhältnis  $\pm 4$ .

MS-Probe	Kalkulierte Masse [Da] [182]	Masse- Ladungsverhältnis [m/z] Hauptsignal	zu
FSAA	22996,8	22998,6	
FSAA mit Reduktionsmittel	22996,8	22998,8	
FSAA + HA	23052,9	23057,5	
FSAA + HB	23066,9	23071,3	
FSAA + D-F6P	23238,6	22999,3	

### 8.5.2 Kristallisation

Während des zweimonatigen Aufenthaltes von 12.08. bis 04.10.2013 in Stockholm/Schweden bei G. Schneider und Sandalova am Karolinska Institutet sollten Proteinkristallisationen, Röntgenstrukturanalysen und Strukturaufklärungen erfolgen.

Ziel war es, einen Teil der folgenden verschiedenen Kristallstrukturen der Varianten, Enzym-Substrat-Komplexe und Enzym-Inhibitor-Komplexe zu erhalten. Die Versuchsansätze und Bedingungen dazu sind in Tab. 3.17 aufgeführt.

#### *Keine nachweisbare Aktivität von FSAA<sup>Q59E Y131F</sup>*

Die inaktive FSAA<sup>Q59E Y131F</sup> (siehe Tab. 3.2) könnte einen derart verschobenen  $pK_a$ -Wert des aktiven Lysinrestes aufweisen, dass das Lys protoniert ist. Das positiv geladene Lys kann möglicherweise unter Abwesenheit des Aldolasen-Säure-Base-Katalysator Tyr131 nicht durch den neuen Säure-Base-Katalysator Glu59 deprotoniert werden. Eine Folge wäre, dass D-F6P nicht mehr kovalent gebunden werden kann. Ebenfalls könnte der Mechanismus an einer Stelle stehen bleiben, beispielweise auf Höhe des Carbinolamins. Diese Möglichkeit sollte, durch *Soaking*, überprüft werden. Die Kristallstruktur könnte eine Begründung für die nicht nachweisbare Aktivität von FSAA<sup>Q59E Y131F</sup> geben.

#### *Verbesserte Aldolaseeigenschaften in TalB<sup>E96Q F178Y</sup>*

Die neue Transaldolasevariante TalB<sup>E96Q F178Y</sup> zeigte verbesserte Aldolaseeigenschaften (siehe Tab. 3.3). Durch Strukturaufklärung konnten weitere Informationen zur Unterscheidung zwischen Transaldolase und Aldolase gewonnen werden.

### *Carbinolaminintermediat*

Kristalle von FSAA<sup>Y131F</sup> und TalB<sup>E96Q</sup> wurden in Frostschutzlösung mit D-F6P (*Soaking*lösung) eingeweicht. Die Zusammensetzung der *Soaking*lösung ist in Tab. 2.13 aufgeführt, wobei als Kryoprotektant EG verwendet wurde. Ohne Protonendonator (siehe Abb. 4.4 und Tab. 4.1) besteht bei diesen Varianten mit keiner nachweisbaren bzw. geringen Aktivität (siehe Tab. 3.2) die Möglichkeit, dass der Mechanismus auf Höhe des Carbinolamins stehen bleibt. Dies würde einen Nachweis für die Protonendonoren liefern. Diese Herangehensweise war bereits erfolgreich für eine FBPA von *Thermoproteus tenax* beschrieben [106].

### *Struktur von FSAA<sup>wt</sup>*

In der bisher bekannten Struktur von FSAA<sup>wt</sup> (PDB Code 1L6W [2]) war das aktive Lys modifiziert, wahrscheinlich durch die Applikation von Glycerin während der Kristallisation. Eine Struktur ohne Modifikation war für Vergleiche wünschenswert.

### *Inhibitorkomplex der FSAA*

Die Bindung des Inhibitors AA an FSAA<sup>wt</sup> sollte ebenfalls mit *Soaking* gezeigt werden. Der inhibitorische Effekt, der für die pK<sub>a</sub>-Bestimmung (siehe 7.6.2) genutzt wurde, könnte ebenfalls durch eine unspezifische Bindung oder Konformationsänderungen hervorgerufen werden. Diese Möglichkeiten konnten durch Strukturaufklärung ausgeschlossen werden.

### *Enzym-Substrat-Komplex der FSAA*

Es sollte über Reduktion, *Soaking* oder Cokristallisation erstmals eine Struktur des Enzym-Substrat-Komplexes der FSAA erhalten werden. Die Ergebnisse der dafür notwendigen erfolgreichen Reduktion sind in 8.5.1 beschrieben.

### *D-T6P Inhibitorkomplex*

Warum es sich bei dem Strukturanalogen D-T6P des natürlichen Substrates D-F6P (siehe 7.8) um einen Inhibitor handelt, ist unklar. Neue Erkenntnisse hierzu konnten auch durch Strukturaufklärung gewonnen werden.

**Tab. 3.17: Angestrebte Kristallstrukturen, Begründungen und Ergebnisse**

Kristallisationsbedingungen sind in 7.9.3 und die Verfeinerungsstatistiken in Tab. 3.18 beschrieben. Die Daten wurden an folgenden Synchrotrons gemessen: Beamlines I04 und I02, Diamond Light Source, Didcot, England; MX\_14.1, BESSY, Helmholtz Zentrum Berlin; ID23-1, ID29, und ID14-4, European Synchrotron Radiation Facility, Grenoble, Frankreich; *Beamline* P13, PETRA III, DESY, Hamburg

Struktur	Begründung und Fragestellung	Kristalle	Kristallstrukturen	PDB Code
FSAA <sup>Q59E Y131F</sup>		Ja	Ja	-
FSAA <sup>Q59E Y131F</sup> + D-F6P	Aufklärung, warum keine nachweisbare Aktivität vorliegt.	Ja	FSAA <sup>E96Q Y131F</sup> + D-F6P nur Phosphatgruppen sichtbar	4RZ4
TalB <sup>E96Q F178Y</sup>	Begründung für verbesserte Aldolaseeigenschaften	Ja	Ja	4RZ6
FSAA <sup>Y131F</sup> + D-F6P	Struktur des Carbinolaminintermediates	Ja	FSAA <sup>Y131F</sup> + D-F6P nur Phosphatgruppen sichtbar	4RXF
TalB <sup>E96Q</sup> + D-F6P		Ja	TalB <sup>E96Q</sup> + D-F6P TalB <sup>E96Q</sup>	4S2C 4RZ5
FSAA <sup>Q59E</sup>	Unterschiede in der Thermostabilität	Ja	Ja	4RQX
FSAA unmodifiziert	Keine Modifikation des aktiven Lys	Ja	Nicht am Synchrotron analysiert	-
FSAA + AA	Nachweis, dass AA nur an das aktive Lys bindet	Ja	Ja	4S1F
FSAA + DHA	Schiff'sche Base Intermediat Struktur	Ja	Nicht am Synchrotron analysiert	-
FSAA +HA	(siehe 7.9.1)	Nein	Nein	-
TalB <sup>E96Q F178Y</sup> + D-T6P	Inhibitorstruktur (siehe Tab. 3.13)	Nein	Nein	-
TalB <sup>F178Y</sup> + D-T6P		Ja	Ja	4S2B

Für erfolgreiche Kristallisationen wurden die Bedingungen durch die Anwendung von vier verschiedenen Kristallisationsscreenings (*JCSG+*, *PEGs*, *Wizard* und *Classic II*) überprüft (siehe 7.9.2). Um Intermediat- oder Inhibitorstrukturen erhalten zu können, war es notwendig Zusammensetzungen zu finden, sodass Bedingungen für eine enzymatische Aktivität vorliegen. Daher sollten keine inhibierenden Komponenten enthalten sein. So könnten Phosphat und Sulfat, wie für Sulfat bereits gezeigt [39], die Phosphatbindungstasche blockieren. Die Bedingungen sollten zudem einen pH-Wert im Enzymoptimum aufweisen und Glycerin sollte als Präzipitat vermieden werden (siehe 7.9.2).

Positive Resultate für TalB-Varianten und FSAA-Varianten beim Screening wurden vor allem in Anwesenheit von Chlorid-Salzen erzielt. Für die FSAA-Varianten wurden Bedingungen gefunden, die zu rundlichen Polykristallen, nadelförmigen Kristallen und Monokristallen (siehe Abb. 3.25 (A-C)) führten. Die gefundenen Bedingungen wurden für weitere Optimierungen verwendet (siehe 7.9.3). In weiteren Versuchen wurden Kristalle für fast alle angestrebten Strukturen erfolgreich gezogen, Ausnahmen sind TalB<sup>E96Q F178Y</sup> + D-T6P und FSAA + HA (siehe Tab. 3.17). Die Kristalle von TalB waren im Gegensatz zu Kristallen der FSAA plattenförmig (siehe Abb. 3.25 (C) und (D)). Am Synchrotron konnten verschiedene Kristalle analysiert, durch *Molecular Replacement* im Unterschied zu den bereits bekannten Kristallstrukturen von TalB<sup>wt</sup> (1ONR [5]) oder FSAA<sup>wt</sup> (1L6W, [2]) gelöst (siehe 5.4) und in der Proteindatenbank (PDB, <http://www.wwpdb.org/>) veröffentlicht werden (siehe Tab. 3.17). Die dazugehörigen Bedingungen sind unter 7.9.3 und die Verfeinerungsstatistiken in Tab. 3.18 aufgeführt. Die Kristalldaten der FSAA<sup>Q59E</sup> lagen bereits aus Arbeiten von Inoue und Sandalova vor und wurden im Rahmen dieser Arbeit verfeinert und weiterverarbeitet. Die Kristalle von FSAA<sup>wt</sup> mit den Bedingungen 16 % PEG3350; 0,1 M Glycylglycin pH 8 und 0,2M LiCl und die erfolgreiche Cokristallisation von FSAA + DHA mit den Bedingungen 21 % PEG3350; 0,1 M HEPES pH 8; 0,2 M LiCl und 0,31 M DHA konnten aus Zeitmangel nicht am Synchrotron analysiert werden.



**Abb. 3.25: Positive Screeningergebnisse**

- (A) Polykristalle von FSAA<sup>Q59E Y131F</sup> aus dem PACT Screen (20 % PEG 6000, 100 mM Tris, pH 8 und 200 mM Natriumchlorid) mit der Tropfenzusammensetzung 0,15 µl + 0,15 µl und einer Proteinkonzentration von 20 µg/µl nach einem Tag.
- (B) Nadelförmige Kristalle von FSAA<sup>Y131F</sup> aus dem PACT Screen (20 % PEG 3350, 100 mM Bis-Tris-Propan pH 6,5 und 200 mM Natriumnitrat) mit der Tropfenzusammensetzung 0,15 µl + 0,15 µl und der Proteinkonzentration 20 µg/µl nach 3 Tagen.
- (C) Monokristall von FSAA<sup>Q59E Y131F</sup> aus dem PACT Screen (20 % PEG 6000, 100 mM Tris pH 8 und 200 mM Ammoniumchlorid) mit der Tropfenzusammensetzung 0,1 µl + 0,2 µl und der Proteinkonzentration 20 µg/µl nach 3 Tagen.
- (D) Plattenkristalle von TalB<sup>F178Y</sup> aus dem PEG Screen (20 % PEG 3350 und 200 mM Ammoniumphosphat) mit der Tropfenzusammensetzung 0,1 µl + 0,2 µl und der Proteinkonzentration 30 µg/µl nach 21 Tagen. Durchführung ist beschrieben unter 7.9.2.

**Tab. 3.18: Datensammlung und Verfeinerungsstatistiken**

[a] RMSD – mittlere quadratische Abweichung

[b] Der Ramachandran-Plot beschreibt eine Verteilung der Torsionswinkel in der Hauptkette, die grafisch gegeneinander aufgetragen werden. Die Kombinationen der Winkel werden in „begünstigt“, „möglich“ und „ungünstig“ eingeteilt (verändert nach [10,176]).

	TalB <sup>E96Q</sup> F178Y	TalB <sup>E96Q</sup>	FSAA <sup>Q59E</sup> Y131F	FSAA <sup>Y131F</sup>	FSAA <sup>Q59E</sup>	FSAA <sup>wt</sup> + AA	TalB <sup>F178Y</sup> + D-T6P	TalB <sup>E96Q</sup> + D-F6P
<b>Mittlerer B-Faktor (Å)<sup>2</sup></b>								
Protein	31,3	26,7	18,2	27,1	23,3	42,2	23,6	27,0
Ion	33,2	33,7	37,4	54,8	-	-	20,2	-
Solvens	38,7	34,3	23,9	19,2	23,1	36,1	33,3	34,2
Ligand	39,4	-	27,2	39,4	34,5	-	20,5	28,3
<b>Datensammlung</b>								
Raumgruppe	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	I2	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
Gitterkonstanten (Å)								
a	67,8	66,8	88,4	88,4	115,4	100,5	67,3	67,7
b	89,5	90,2	133,0	136,6	126,8	130,7	91,7	91,1
c	130,5	131,9	102,3	101,6	183,4	355,2	131,0	130,7
β	90,0	90,0	92,4	92,5	90,0	90,2	90,0	90,0
Auflösung (Å)	1,80	1,80	1,75	2,40	2,41	2,25	1,46	2,20
	(1,90)	(1,84)	(1,78)	(2,44)	(2,57)	(2,29)	(1,48-1,46)	(2,26-2,20)
Gemessene Reflexe (unabhängige Reflexe)	73150 (10225)	74166 (4351)	236188 (11527)	91562 (4504)	104566 (18671)	205326 (10244)	140870 (6871)	41815 (3507)
R <sub>merge</sub>	0,09 (0,71)	0,11 (0,50)	0,09 (0,71)	0,11 (0,52)	0,12 (0,45)	0,09 (0,60)	0,079 (0,95)	0,094 (0,49)
Redundanz	4,2 (3,9)	4,4(4,5)	3,3(3,2)	5,8(6,0)	5,8(5,3)	3,2(3,0)	7,8 (7,9)	4,8 (4,5)
I / σ (I)	8,2 (1,6)	5,3(1,8)	9,5(1,8)	12,7(3,7)	10,0(3,4)	16,8(2,6)	10,6 (2,0)	12,7 (3,7)
Vollständigkeit der Daten	98,8 (95,5)	99,5 (99,8)	99,6 (98,5)	99,5 (99,1)	99,8 (99,9)	94,8 (95,6)	99,9 (100)	99,5 (97,6)

	TaIB <sup>E96Q F178Y</sup>	TaIB <sup>E96Q</sup>	FSAA <sup>Q59E Y131F</sup>	FSAA <sup>Y131F</sup>	FSAA <sup>Q59E</sup>	FSAA <sup>wt + AA</sup>	TaIB <sup>F178Y</sup> + D-T6P	TaIB <sup>E96Q</sup> + D-F6P
<b>Verfeinerung</b>								
R/R <sub>free</sub>	20,1/ 24,9	20,8/ 26,2	17,7/ 20,3	19,3/ 23,4	18,9/ 21,1	23,2/ 25,1	15,2/ 18,5	15,3/ 21,1
Anzahl Protein- atome	4968	4983	16230	16120	16130	32287	5009	4985
Anzahl Metall- atome	20	20	50	50	-	-	2	-
Anzahl Wasser- moleküle	372	374	1359	214	848	745	576	301
Anzahl Liganden- moleküle	23	-	90	28	52	30	30	34
RMSD <sup>[a]</sup>								
Bindungs- längen (Å)	0,007	0,01	0,007	0,009	0,008	0,01	0,009	0,009
RMSD <sup>[a]</sup>								
Bindungs- winkel (Å)	1,04	1,33	1,31	1,25	1,21	1,27	1,32	1,31
<b>Ramachandran-Plot (%)<sup>[b]</sup></b>								
begünstigte	97,8	98,1	97,9	97,1	97,7	97,9	98,2	97,8
mögliche	1,9	1,6	1,7	2,4	1,9	1,7	1,5	1,9
ungünstige	0,3	0,3	0,4	0,5	0,4	0,4	0,3	0,3

### 8.5.3 Ergebnisse der Kristallstrukturen

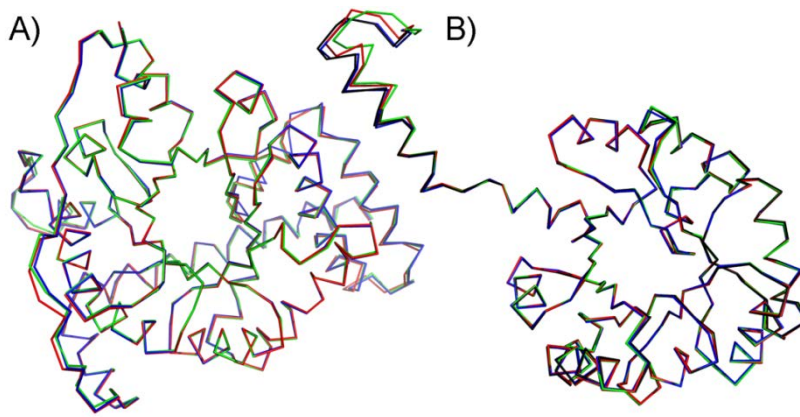
Basierend auf verschiedenen Fragestellungen (siehe Tab. 3.17), beispielsweise warum D-T6P inhibierend auf Enzyme mit D-F6P-Aldolaseaktivität wirkt (siehe 7.8), wurden die Kristallstrukturen untersucht. Hierbei wurden Vergleiche zwischen den unterschiedlichen Strukturen herangezogen oder die Anwesenheit eines Substrates bzw. Inhibitors analysiert.

#### *Qualität der Strukturen und Vergleich mit den Wildtypen*

Die Unterschiede in den detektierten Aktivitäten (Tab. 3.2) und der Thermostabilität könnten in Differenzen der Strukturen begründet sein. Daher wurden die Strukturen der Muteine TaIB<sup>E96Q F178Y</sup>, TaIB<sup>E96Q</sup>, FSAA<sup>Q59E Y131F</sup>, FSAA<sup>Y131F</sup> und FSAA<sup>Q59E</sup> auf richtige

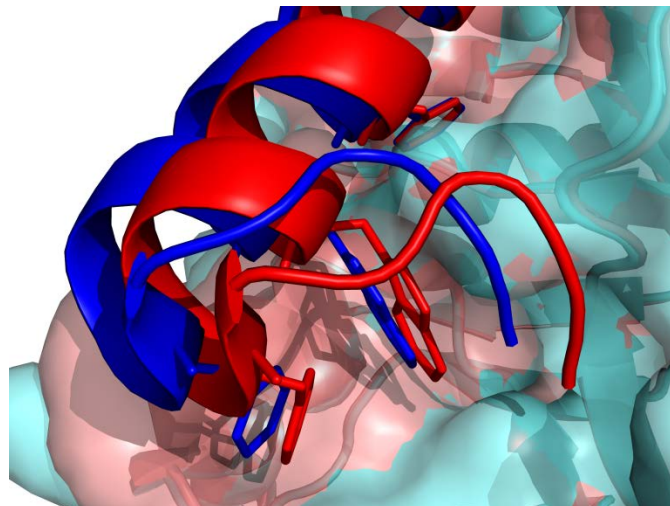
Faltung, Oligomerisierungszustand und die Architektur des Aktiven Zentrums überprüft (Durchführung siehe 7.9.3).

Für alle Strukturen war die Elektronendichte der Peptidketten gut definiert. Ausnahmen waren einige Aminosäureseitenketten an der Oberfläche. Weiterhin waren fünf Untereinheiten in der Struktur von FSAA<sup>wt</sup> + AA, die nicht AA enthalten, nicht so gut definiert wie die anderen fünfzehn Untereinheiten der Einheitszelle. Die Kristallstrukturen wurden verfeinert bis zu einer Auflösung zwischen 1,46 Å und 2,41 Å (siehe Tab. 3.18). Alle Transaldolasestrukturen, wie auch der WT [3], wiesen die orthorhombische Raumgruppe P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub> auf (siehe Tab. 3.18). Jede Elementarzelle enthielt dabei ein Dimer. Die Strukturen der D-F6P-Aldolasen gehörten insgesamt drei unterschiedlichen Raumgruppen an (siehe Tab. 3.18). Die FSAA<sup>Q59E</sup> entsprach dem WT [2]. Die Struktur wies die gleiche Raumgruppe und ein Dekamer in der Elementarzelle auf. Im Vergleich hierzu enthielten die Einheitszellen von FSAA<sup>Q59E Y131F</sup> und FSAA<sup>Y131F</sup> zwei Dekamere. Alle Varianten waren strukturell sehr ähnlich zu dem jeweiligen WT und wiesen daher eine typische RMSD von 0,3 – 0,5 Å beim Vergleich des Rückgratstruktur auf (siehe Abb. 3.27). Alle Strukturen zeigten die gleiche Architektur des (β/α)<sub>8</sub>-Fasses und des Oligomerisationszustand wie der entsprechende WT. Ebenfalls war die Topologie der aktiven Zentren konserviert. Die Varianten FSAA<sup>Q59E</sup> und FSAA<sup>Q59E Y131F</sup> wiesen darüber hinaus kleine Unterschiede in der Positionierung der C-terminalen Helix in der pentameren Grenzfläche auf. Die C-terminale Helix, die mit den hydrophoben Resten Phe206, Trp211 und Phe215 als Anker zur nächsten Untereinheit dient, war zum Teil weiter entfernt von der nächsten Untereinheit als der Anker im WT (siehe Abb. 3.27, verändert und ergänzt nach [10,176]).



**Abb. 3.26: Überlagerung der FSAA-/TalB-Varianten mit den entsprechenden WT**

- (A) Überlagerung eines Monomers von TalB<sup>wt</sup> (grün, PDB Code 1ONR [3]), TalB<sup>E96Q</sup> (rot, RMSD = 0,219 Å, 266 Cα) und TalB<sup>E96Q F178Y</sup> (blau, RMSD = 0,271 Å, 288 Cα).
- (B) Überlagerung eines Monomers von FSAA<sup>wt</sup> (grün, PDB Code 1L6W [19]), FSAA<sup>Q59E</sup> (rot, RMSD = 0,120 Å, 196 Cα), FSAA<sup>Y131F</sup> (schwarz, RMSD = 0,183 Å, 190 Cα) und FSAA<sup>Q59E Y131F</sup> (blau, RMSD = 0,226 Å, 196 Cα).



**Abb. 3.27: Unterschiedliche Positionierung der C-terminalen Helix in der pentameren Grenzfläche**

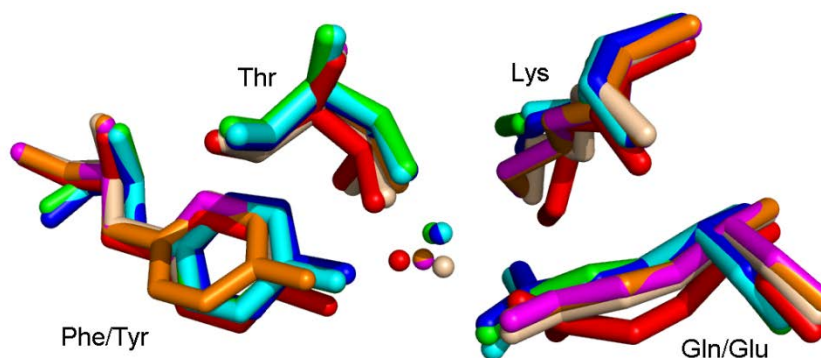
FSAA<sup>wt</sup> (PDB Code 1L6W [19]) Untereinheit A ist in rot als Sekundärstruktur und die Oberfläche von Untereinheit E ist in rosa darstellt. Die Untereinheit A von FSAA<sup>Q59E</sup> ist in blau als Sekundärstruktur und die Oberfläche von Untereinheit E ist in cyan abgebildet. Die hydrophoben Aminosäuren Phe207, Trp211 und Phe215 sind als Stäbchenmodell dargestellt.

#### *Wasserstoffbrückennetzwerk des aktiven Wassers*

Bei den generierten Varianten der ersten Stufe des iterativen Prozesses wurden die Wasserstoffbrücken-bildenden Reste zum katalytischen Wasser in der TalB und der FSAA ausgetauscht (siehe Abb. 1.12). In FSAA (PDB Code 1L6W [2]) bilden die drei Reste Gln59, Thr109 und Tyr131 und in der TalB (PDB Code 1UCW [5]) die zwei Reste Glu96 und Thr159 H-Brücken zum Wassermolekül aus. Diese Varianten wurden auf ihre Unterschiede unter anderem in deren Kristallstrukturen (Durchführung siehe 7.9.3)



untersucht. Vergleiche der verschiedenen Kristallstrukturen von TalB und -Varianten und FSAA und -Varianten zeigten, dass das katalytische Wassermolekül unterschiedlich gebunden und positioniert ist (siehe Abb. 3.28). Die Seitengruppen von Thr156, Lys132, Glu/Gln96 und Tyr176 waren mögliche Bindungspartner über Wasserstoffbrücken (Nummerierung nach TalB). Zudem variierte die Intensität der Dichteverteilung des aktiven Wassermoleküls.

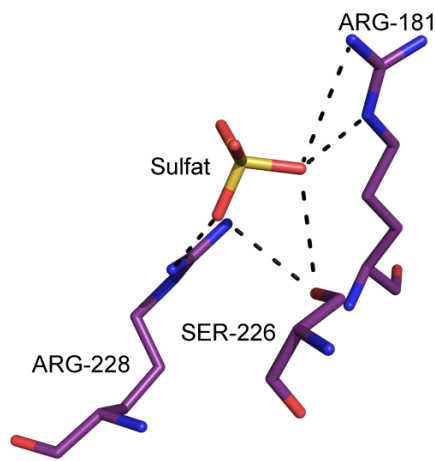


**Abb. 3.28: Bindungsmotiv des katalytischen Wassermoleküls**

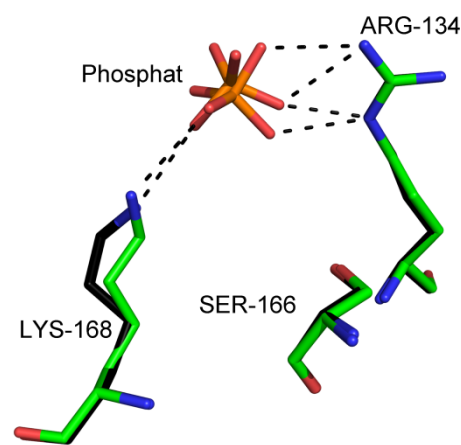
FSAA (PDB Code 1L6W [2]) und ihre Varianten sind in Blauschattierungen dargestellt, TalB (PDB Code 1UCW [5]) und ihre Varianten in Rotschattierungen. Die Position des Wassermoleküls unterscheidet sich zwischen den WT und ebenfalls innerhalb der Varianten.

### Ligandenbindung

Die Kristalle von TalB<sup>E96Q</sup>, FSAA<sup>Y131F</sup> und FSAA<sup>Q59E Y131F</sup> wurden mit einer *Soaking*-Lösung behandelt, die D-F6P enthielt (Fragestellungen siehe Tab. 3.17, Durchführung siehe 7.9.3). Für TalB<sup>E96Q</sup> war lediglich eine zusätzliche Elektronendichte in der Phosphatbindungstasche sichtbar. Das Sulfat aus dem Kristallisationspuffer band in der Phosphatbindungstasche [3,39] und blockierte diese (siehe Abb. 3.29). Ohne Sulfat konnte erfolgreich eine Intermediatstruktur TalB<sup>E96Q</sup>+D-F6P erhalten werden (siehe Abb. 3.31). In den Kristallstrukturen von FSAA<sup>Q59E Y131F</sup> und FSAA<sup>Y131F</sup> war eine zusätzliche Elektronendichte sichtbar. Diese entsprach einer Phosphatgruppe, die zu einem nicht-kovalent oder kovalent gebundenen D-F6P zugeordnet werden konnte (siehe Abb. 3.30). Die restlichen, zusätzlich vorhandenen Elektronendichten reichten nicht aus, um D-F6P ins Aktive Zentrum zu modellieren. Somit konnte keine Aussage getroffen werden, ob eine kovalente Bindung vorlag. Durch *Soaking* konnte eine Struktur von FSAA<sup>WT</sup> mit gebundenem AA erhalten werden (siehe Abb. 3.35). Vor der Kristallisation wurde TalB<sup>F178Y</sup> mit D-T6P inkubiert und hierdurch inhibiert. Die Struktur aus diesem Ansatz wies eine zusätzliche sehr gut definierte Elektronendichte für den kovalent gebundenen Inhibitor D-T6P auf (siehe Abb. 3.33, verändert und ergänzt nach [10,176]).



**Abb. 3.29: Blockierung der Phosphattasche in TalB<sup>E96Q</sup> durch ein Sulfation.**

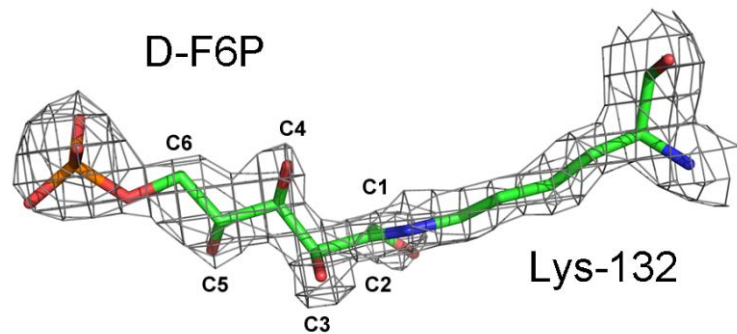


**Abb. 3.30: Phosphatgruppe von D-F6P in der Bindetasche von FSAA<sup>Q59E Y131F</sup> (grün) und FSAA<sup>Y131F</sup> (schwarz)**

#### *Enzym-Substrat-Komplex: TalB<sup>E96Q</sup> mit D-F6P*

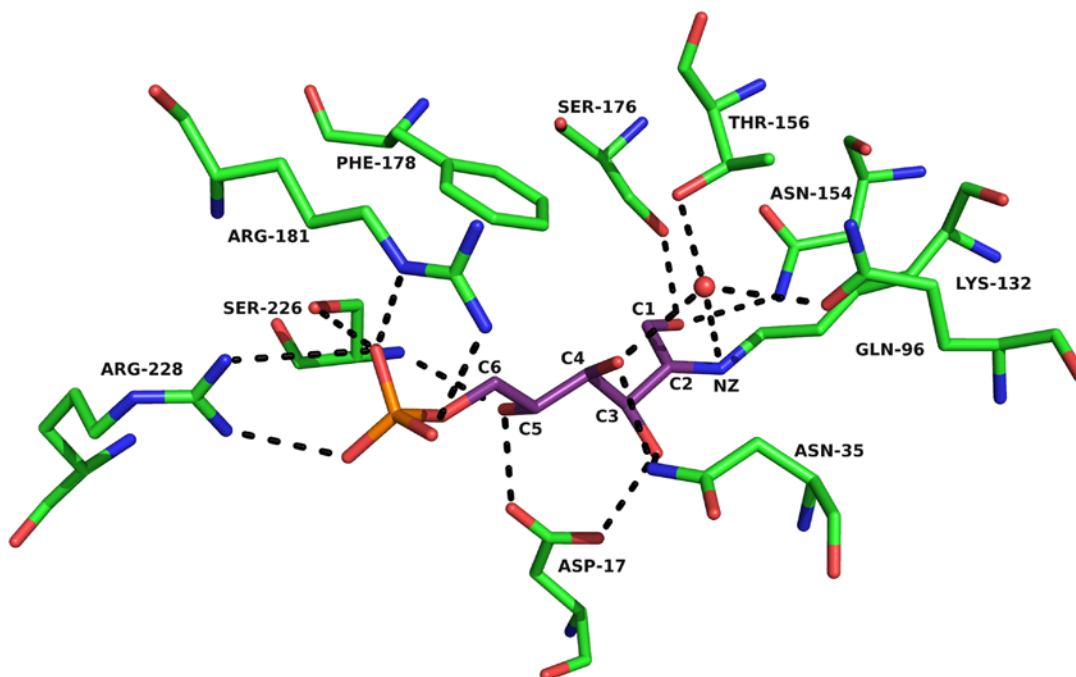
In Abwesenheit von Sulfat gelang es durch Soaking eine Intermediatstruktur mit einem C6-Substrat in der Variante TalB<sup>E96Q</sup> mit niedrigerer spezifischer Aktivität im Vergleich zum WT (siehe Tab. 3.2) zu erhalten (Durchführung siehe 7.9.3). Aufgrund der Abwesenheit des Protonendonors stellte sich die Frage, ob der Mechanismus (siehe Abb. 3.28) auf Höhe des Carbinolamins stehen bleibt. Zudem war eine Vergleichsstruktur zum inhibitorischen Stereoisomer D-T6P angestrebt.

Die Unterschiede in der Elektronendichteverteilung im Aktiven Zentrum wiesen im Vergleich zur TalB<sup>wt</sup> auf ein gebundenes D-F6P Molekül hin (siehe Abb. 3.31). Die Dichteverteilung zeigte deutlich eine kovalente Bindung von C2 des Liganden D-F6P zum N $\epsilon$  der Seitengruppe von Lys132. Das Fehlen der Hydroxylgruppe des C2 von D-F6P und die kurze Bindungslänge legten eine sp<sup>2</sup> Hybridisierung des C2-Atoms nahe. Somit war D-F6P nicht als Carbinolamin gebunden, jedoch als Schiff'sche Base Intermediat. Die Reste der Phosphatbindungstasche [3,39] – Arg181, Ser226 und Arg228 – interagierten mit dem Phosphatrest von D-F6P (siehe Abb. 3.32). Die Seitengruppe von Asp17 positionierte das Substrat über H-Brücken zu den Hydroxylgruppen von C5 und C3. Die Hydroxylgruppe von C4 ging Wechselwirkungen mit Asn35 und einem Wassermolekül ein. Dieses Wassermolekül war über vier H-Brücken gebunden;  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> der Seitengruppe von Lys132, C4-OH von D-F6P, Gln96 und Thr156. Die Hydroxylgruppe von C1 wurde durch die Seitengruppe von Ser176 und Asn154 positioniert [10].



**Abb. 3.31: D-F6P Bindung in TaIB<sup>Q96E</sup>**

Differenz-Elektronendichtekarte für D-F6P, das über den Lysinrest kovalent an TaIB<sup>Q96E</sup> gebunden ist. Die 2Fo-Fc Elektronendichtekarten wurden für das Modell vor dem Hinzufügen von D-F6P berechnet. Die Elektronendichte ist bei 1,5  $\sigma$  konturiert (verändert nach [10]).

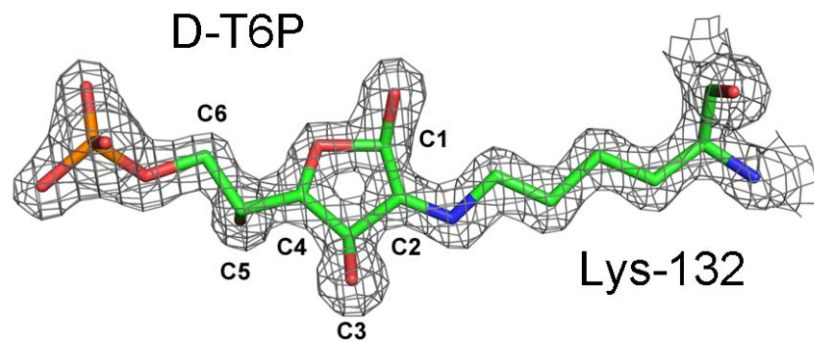


**Abb. 3.32: Wechselwirkungen von D-F6P im Aktiven Zentrum von TaIB<sup>E96Q</sup>**

Die Phosphatgruppe von D-F6P interagiert mit den Resten der Phosphatbindungstasche (Arg181, Ser226, Arg228). C5-OH und C3-OH bilden Wasserstoffbrücken mit Asp17. C1-OH interagiert mit Ser176 und Asn154. C4-OH besitzt ein H-Brückennetzwerk mit dem katalytische Wasser und Asn35. Das katalytische Wassermolekül von TaIB<sup>E96Q</sup> wird durch  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> der Seitengruppe von Lys132, C4-OH von D-F6P, Gln96 und Thr156 gebunden. Zur Analyse der Wasserstoffbrücken < 3,1 Å wurde Coot [128] verwendet [10].

#### *Enzym-Inhibitor-Komplex: TaIB<sup>F178Y</sup> mit D-T6P*

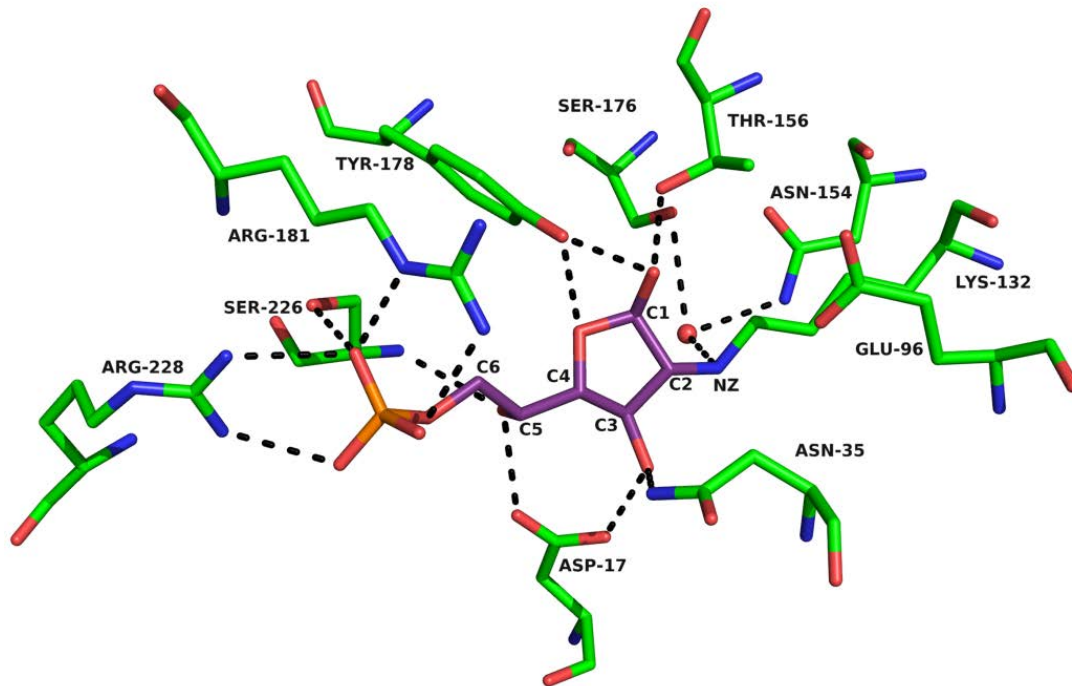
Durch Präinkubation mit dem Inhibitor D-T6P konnte erfolgreich eine Struktur des Enzym-Inhibitor-Komplexes erhalten werden (Durchführung siehe 7.9.3). Bisher war unklar, warum D-T6P, ein Strukturanalagon zum Substrat D-F6P, inhibierend wirkt. Über die Strukturaufklärung konnten neue Einblicke erzielt werden.



**Abb. 3.33: D-T6P Ligandenbindung in der TalB<sup>F178Y</sup>**

Differenz-Elektronendichtekarte für den kovalenten zyklischen Inhibitor im Aktiven Zentrum, gebildet durch die Reaktion von Lys132 mit D-T6P. Die 2Fo-Fc Elektronendichtekarten wurden für das Modell vor dem Hinzufügen von D-T6P berechnet. Die Elektronendichte ist bei  $1,5 \sigma$  konturiert (verändert nach [10]).

Die Elektronendichte für den gebundenen Liganden war sehr gut definiert, was eine eindeutige Modellierung zuließ (siehe Abb. 3.33). Interessanterweise bildet sich D-T6P nicht wie D-F6P in offenkettiger Form, sondern als Ringzucker (siehe Abb. 3.33, Abb. 3.31). D-T6P war ebenfalls durch das C2 kovalent an die  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub>-Gruppe des aktiven Lys gebunden und bildet ein N6-(2,4-dihydroxy-5-(1-hydroxy-2-(phosphonoxy)ethyl)tetrahydrofuran-3-yl)-D-Lysin aus. Das C2 war nicht planar und impliziert eine sp<sup>3</sup> Hybridisierung mit tetraedrischer Geometrie. Der Heterofuranring wurde über ein Sauerstoffatom zwischen C4 und C1 geschlossen. Der Sauerstoff des Ringsystems bildete eine H-Brücke zu Tyr178 aus (siehe Abb. 3.34). Ein Wassermolekül des Aktiven Zentrums war über das N $\epsilon$  der Seitengruppe von Lys132, Ser176 und Asn154 positioniert. Die Hydroxylgruppe von C1 bildete eine Wasserstoffbrücke mit den Seitengruppen von Thr156 und Tyr178 aus. Der Phosphatrest ging die gleichen Wechselwirkungen in der Bindetasche ein wie D-F6P in TalB<sup>E96Q</sup> (siehe Abb. 3.32). Die C3-OH und C5-OH interagieren ebenfalls mit Asp17 [10].



**Abb. 3.34: Wechselwirkungen von D-T6P im Aktiven Zentrum von TaIB<sup>F178Y</sup>**

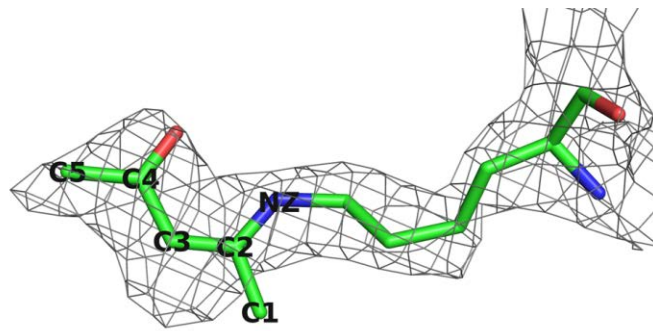
Die Phosphatgruppe von D-T6P interagiert mit den Resten der Phosphatbindungstasche (Arg181, Ser226, Arg228). C5-OH und C3-OH bilden Wasserstoffbrücken mit Asp17. C1-OH und C4-OH interagieren mit Tyr178. C1-OH bildet zusätzlich eine H-Brücke mit Ser176 aus. Das katalytische Wassermolekül fehlt. Ein Wassermolekül im Aktiven Zentrum wird durch H-Brücken von Lys132, Ser176 und Asn154 gebunden. Zur Analyse der Wasserstoffbrücken < 3,1 Å wurde Coot [128] verwendet [10].

#### *Enzym-Inhibitor-Komplex: FSAA mit AA*

Die inhibitorischen Eigenschaften von AA wurden zur  $pK_a$ -Bestimmung (siehe 7.6.2) herangezogen. Um die Bindung von AA lediglich an das aktive Lys zu belegen, wurden Kristalle der FSAA<sup>wt</sup> einem *Soaking* mit AA unterzogen. Hierzu war es erforderlich, dass unter den gewählten Kristallisationsbedingungen Enzymaktivität vorlag (Durchführung siehe 7.9.3).

Die durchgängige Elektronendichte, ausgehend von der  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub>-Gruppe des aktiven Lys, wurde in fünf von zwanzig Untereinheiten der beiden Dekamere in der Elementarzelle gefunden (siehe Abb. 3.35). Dies impliziert, dass AA kovalent an das Lys85 gebunden ist. Die *Soaking*dauer betrug 7 min; im Unterschied hierzu betrug sie in den Inhibitionsassays bis zu 21 Stunden (siehe 7.8.1). Daher ist verständlich, dass nicht alle aktiven Lysinreste modifiziert waren. Kein weiterer Rest, insbesondere kein weiterer Lysinrest, wurde durch AA modifiziert. Modifikationen an der Enzymoberfläche sind durch deren hohe Flexibilität nicht vollständig auszuschließen. Ansonsten war keine Änderung der Architektur

erkennbar. Die inhibitorischen Eigenschaften beruhen zusammenfassend auf der Modifikation des aktiven Lysins, wodurch sich AA zur  $pK_a$ -Bestimmung eignet [4].



**Abb. 3.35: Kovalente Modifikation von FSAA mit AA**

Teile der 2Fo-Fc Elektronendichtekarten von Lys85 sind gezeigt, konturiert bei  $1,5 \sigma$ . Das Stäbchenmodell des kovalent gebundenen Enamins ist dargestellt (NZ -  $\epsilon$ NH<sub>2</sub>R des Lys85, C1 bis C5 – Kohlenstoffatome des AA) [4].

## 9 Diskussion

### 9.1 Determinanten von Aldolase und Transaldolase

Die Modellenzyme FSAA und TalB weisen beide das Schiff'sche Basen Intermediat und die  $(\beta/\alpha)_8$ -Fasstruktur auf (siehe 5.5.1). Dennoch gehören sie den unterschiedlichen C-C-Bindungen knüpfenden Enzymklassen der Lyasen und der Transferasen an (siehe 5.5.2). Zudem teilen die beiden Enzyme nur eine Sequenzidentität von 27 %, und auch innerhalb des Aktiven Zentrums gibt es Abweichungen (siehe Tab. 1.5). Zentral wurde die Frage untersucht, was die Determinanten zwischen den Modellenzymen darstellen und somit die beiden Reaktionstypen von einander abgrenzt. Die bekannte Transaldolasevariante der TalB<sup>F178Y</sup> [1] besitzt bereits Aldolaseeigenschaften und war daher Ausgangspunkt für die durchgeführten Untersuchungen. Unter Stellmacher et al. [4] bzw. [176] wurden bereits Teile dieser Diskussion veröffentlicht.

#### 9.1.1 Verbesserung der Aldolaseeigenschaften im TalB-Grundgerüst

##### *Auswahl der Mutagenesestellen und Enzympräparationen*

Die bereits bekannte Transaldolasevariante TalB<sup>F178Y</sup> [1] ist in der Lage, wie die F6P-Aldolase, eine Aldoladdition zwischen einem nicht phosphorylierten Donor und einem elektrophilen Akzeptor zu katalysieren. Dies stellte die einzige Variante mit Aldolaseaktivität aus elf Bibliotheken dar, was die Wichtigkeit des konservierten Tyrosinrestes für die Aldolasefunktionalität in den Fokus stellt. Der Tyrosinrest ist an der Bindung des katalytischen Wassers in der Nähe des Schiff'sche Base bildenden Lysins beteiligt. In der Transaldolase bilden zwei Reste das Wasserstoffbrückennetzwerk dieses Wassermoleküls - Glu96 und Thr156 [5]. Das Phe178 in der TalB ist an der Stelle des Tyr131 in FSAA lokalisiert und kann nicht an der Bindung des Wassermoleküls partizipieren. Im Gegensatz dazu wird in der FSAA somit das Wassermolekül durch die drei Reste Tyr131, Gln59 und Thr109 positioniert [2]. Das Wasserstoffbrückennetzwerk des katalytischen Wassers ist in Abb. 1.12 und eine Übersicht der beteiligten Reste in Tab. 4.1 gezeigt.

Dem Glu in der Transaldolase-Familie (SF eins bis vier [28]) wird eine multiple Funktion als genereller Säure-Base-Katalysator zugeschrieben [6]. In der SF 1 ist dieser Rest zu 93 % konserviert (Konservierungsanalyse der SF1 basierend auf der TALED mit 1185 Transaldolasesequenzen, persönliche Mitteilung Lenz). Während der Katalyse ist der

konservierte Rest daran beteiligt, das aktive Lysin zu deprotonieren und das Carbinolamin Intermediat zu protonieren [6]. Dem Thr, welches in Transaldolase und Aldolase konserviert ist, wird eine stabilisierende Funktion des Sauerstoffatoms im Carbinolamin zugeschrieben [6]. Der postulierte Mechanismus für TalB ist bereits in Abb. 1.3 dargestellt.

**Tab. 4.1: Ausschnitt der Wasserstoffbrücken-bildenden Reste des aktiven Wassermoleküls der FSAA und TalB, sowie deren Funktion**

<u>TalB</u>		<u>FSAA</u>	
Rest	Funktion		Rest
Glu96	Wasserstoffbrücke zum katalytischen Wasser, Säure-Base-Katalysator – Protonentransfer	Wasserstoffbrücke zum katalytischen Wasser	Gln59
Thr156	Wasserstoffbrücke zum katalytischen Wasser Stabilisation Alkoxid		Thr109
Phe178	-	Wasserstoffbrücke zum katalytischen Wasser	Tyr131

Auf Basis dieser Datenlage wurden gezielt die Aminosäuren des Wasserstoffbrückennetzwerkes des aktiven Wassermoleküls ausgetauscht. Dies erlaubt die Untersuchung inwieweit die Bindung des Wassermoleküls zwischen Aldolase- und Transaldolase diskriminiert. Somit wurde das Wasserstoffbrückennetzwerk der TalB im Aktiven Zentrum der FSAA generiert sowie in der FSAA das Wasserstoffbrückennetzwerk der TalB eingeführt. Folgende Varianten mit His<sub>6</sub>-Tag wurden erstmals erstellt: His<sub>6</sub>-TalB<sup>E96Q</sup>, His<sub>6</sub>-TalB<sup>E96Q F178Y</sup>, His<sub>6</sub>-FSAA<sup>Q59E</sup>, His<sub>6</sub>-FSAA<sup>Y131F</sup> und His<sub>6</sub>-FSAA<sup>Q59E Y131F</sup>. Das Thr wurde keiner Mutagenese unterzogen, da es in beiden Enzymen konserviert ist [4].

Die Einzelvarianten FSAA<sup>Q59E</sup> und FSAA<sup>Y131F</sup> ohne Tag hatten in der Vergangenheit Schwierigkeiten bei der Expression und Aufreinigung gezeigt [78]. Grund dafür war vor allem die geringe Hitzestabilität, welche für die bisherige Aufreinigung nötig war. Darauf basierend wurde hier ein His-Tag-Konstrukt gewählt. Dies ermöglichte die Aufreinigung ohne Hitzefällung über Ni-NTA-Affinitätschromatographie, wie ebenfalls für die TalB und deren Varianten angewendet [4].

Alle Proteine konnten erfolgreich exprimiert werden. TalB<sup>wt</sup> wies einen Reinigungsfaktor 3,6 und eine Ausbeute von 25 % auf. Der Reinigungsfaktor für FSAA<sup>wt</sup> ist 4,9 mit einer Ausbeute von 26 % [4]. Dies passt zu den Reinigungsschemata von S. Schneider 2010 [29]. Nach Aufkonzentrierung besaßen alle Proteine eine Reinheit



von  $\geq 98\%$  (siehe Abb. 3.2, [4]). Die erzielte Reinheit von FSAA<sup>wt</sup>, TalB<sup>wt</sup> und TalB<sup>F178Y</sup> entspricht bereits früher veröffentlichten Daten [23,29].

### *Vergleich der Aktivitäten der Muteine*

Die Transaldolaseaktivität und F6P-Aldolaseaktivität der verschiedenen Muteine wurde untersucht, um die Auswirkungen der verschiedenen Mutationen unter gleichen Bedingungen zu detektieren. Der Austausch von Phe178 zu Tyr in TalB resultiert in der Abnahme der Transaldolaseaktivität um 88 % und der Einführung einer F6P-Aldolaseaktivität wie von S. Schneider et al. 2008 [1] beschrieben (siehe Tab. 3.2, [4]). Die entsprechende Tyr-Variante der TacTal zeigt eine Transaldolaseaktivität von 1 % und ebenfalls einer geringen F6P-Aldolaseaktivität [42]. Zudem kann dies auf die menschliche Transaldolase übertragen werden [1]. Der Austausch führt SF- (SF1 und SF4) und Organismus (Bakterien und Mensch) übergreifend zur Einführung der F6P-Aldolaseaktivität (zur Phylogenetik siehe 5.2.4).

In Übereinstimmung mit früheren Austauschen von Glu96 zu Gln und Ala in der TalB [6] ist dies von nachteiligem Effekt im Hinblick auf die Transaldolaseaktivität. Die Variante TalB<sup>E96Q</sup> besitzt im Vergleich zum WT, wie vorliegend gezeigt, lediglich eine Transaldolaseaktivität von 1,3 % [4]. Zudem ist dies in Konsistenz mit TacTal<sup>E60Q</sup> [42]. Dass dieser Austausch nicht zur Einführung einer F6P-Aldolaseaktivität führt, wurde hier bestätigt und früher bereits durch die Bibliothek an Position Glu96 belegt [1]. Die F6P-Aldolaseaktivität der aufkonzentrierten Muteine TalB<sup>E96Q</sup> und TalB<sup>E96A</sup> war bisher noch nicht untersucht worden. Grund hierfür war, dass FSAA und FSAB zu jener Zeit noch nicht publiziert waren (persönliche Mitteilung Sprenger).

Die neu beschriebene Kombination [4] von Glu96 zu Gln mit Phe178 zu Tyr reduziert die WT-Aktivität im Vergleich zu TalB<sup>F178Y</sup> (12 %) weiter auf 5 %. Gleichzeitig verbessert sich die F6P-Aldolaseaktivität im Transaldolasegrundgerüst von 25 % der TalB<sup>F178Y</sup> auf 40 % in TalB<sup>E96Q F178Y</sup> im Vergleich zu FSAA. Dies ist somit ein synergistischer Effekt für die Überführung in eine Aldolase. Der Austausch zu Gln allein reicht nicht aus, um eine Aldolaseaktivität zu generieren [4]. Etwa zeitgleich wurde 2015 die Verbesserung der F6P-Aldolaseaktivität durch die analogen zwei Austausche ebenfalls für die TacTal beschrieben [35].

Die FSAA Varianten FSAA<sup>Y131F</sup> und FSAA<sup>Q59E</sup> sind in der Vergangenheit nicht auf Transaldolaseaktivität untersucht worden [78]. Der Austausch Tyr131 zu Phe resultiert nicht im umgekehrten Effekt zur Einführung einer Transaldolaseaktivität. Bei keinem der

Varianten mit Tyr131-Austausch konnte eine WT-F6P-Aldolaseaktivität detektiert werden. Dies ist in Übereinstimmung mit früheren Ergebnissen im zellfreien Extrakt von FSAA<sup>Y131F</sup> [78]. Der Austausch von Gln59 zu Glu reduziert die F6P-Aldolaseaktivität (3,9 U/mg, 36 % WT-Aktivität) und generiert ebenfalls keine Transaldolaseaktivität. Auch der kombinierte Austausch in der FSAA<sup>Q59E Y131F</sup> führt nicht zur Einführung einer Transaldolaseaktivität [4]. Weitere Feinabstimmungen könnten für die Einführung entscheidend sein (siehe 9.2). Die spezifischen Aktivitäten (siehe Tab. 3.2) und die  $V_{\max}$  der Kinetiken im Fließgleichgewicht (siehe Tab. 3.3 und Abb. 3.3) für die Bildung von D-F6P über Aldolaseaktivität sind nur bedingt vergleichbar. Dies liegt daran, dass die eingesetzten Substratkonzentrationen lediglich in etwa den bekannten  $K_m$ -Werten entsprachen. Für einen aussagekräftigen Vergleich sollten diese mindestens 2x  $K_m$  betragen. Dies wird v.a. bei dem Vergleich der Reaktionsgeschwindigkeiten von FSAA<sup>wt</sup>  $V_{\max}$  22 U/mg und der spezifischen Aktivität 11 U/mg deutlich.

#### *Kinetiken im Fließgleichgewicht - Variante TalB<sup>E96Q F178Y</sup>*

Die neu beschriebene verbesserte Variante TalB<sup>E96Q F178Y</sup> wurde anhand von Kinetiken im Fließgleichgewicht näher charakterisiert (siehe Tab. 3.3 und Abb. 3.3, [4]). Die Austausche von Phe178 gegen Tyr und Glu96 gegen Gln in TalB führen zu einem kumulativen Effekt auf die D-F6P-Aldolasereaktionen. Die katalytische Effizienz für beide Richtungen der F6P-Aldolaseaktivität nimmt durch den zweiten Austausch zu. TalB<sup>F178Y</sup> weist einen  $k_{\text{cat}}$  von 2,8 s<sup>-1</sup> in Gegenüberstellung zu TalB<sup>E96Q F178Y</sup> mit 4,3 s<sup>-1</sup> auf. Der niedrigere apparente  $k_{\text{cat}}$  für TalB<sup>F178Y</sup> im Vergleich zu früheren Untersuchungen [1] ist in den leicht geänderten Reaktionsbedingungen beispielsweise der Temperatur (28 °C anstelle von 30 °C) begründet.

Daher war die gleichzeitige Untersuchung unter gleichen Bedingungen für eine Aussage wichtig. Die Bindeeigenschaften für den Donor DHA wurden durch den Aminosäureaustausch nicht beeinflusst. Dies spiegelt sich in den  $K_m$  Werten innerhalb der gleichen Größenordnung für FSAA, TalB<sup>F178Y</sup> und TalB<sup>E96Q F178Y</sup> wider. Für die F6P- Bildung ist FSAA der beste Katalysator mit 275 M<sup>-1</sup>S<sup>-1</sup>. Für die Retroaldolreaktion ist in Übereinstimmung mit S. Schneider et. al. [1] die katalytische Effizienz der FSAA geringer. Die neue Variante TalB<sup>E96Q F178Y</sup> mit 195 M<sup>-1</sup>S<sup>-1</sup> zeigt die höchste katalytische Effizienz für die Spaltung von D-F6P. Wobei die Affinität zu D-F6P mit einem  $K_m$  von 2,3 mM 8-fach höher ist als bei FSAA. Der  $K_m$  für D-F6P zwischen den beiden TalB-Varianten ist sehr ähnlich. Davon kann abgeleitet werden, dass Glu am Protonentransfer beteiligt ist jedoch nicht an der Substratbindung. Den beiden Resten ist

somit ein hoher Stellenwert in den Reaktionsmechanismen von Transaldolasen und D-F6P-Aldolasen beizumessen. Zusammenfassend ist durch den zweiten Aminosäureaustausch Gln gegen Glu eine weitere Verbesserung der D-F6P-Aldolaseeigenschaften gelungen [4].

Etwa zeitgleich publiziert wurde die entsprechende Doppelvariante TacTal<sup>E60Q F132Y</sup>. Die Abwesenheit des zusätzlichen Säure-Basen-Katalysator Glu zeigt sich auch hier als katalytischen Vorteil für die F6P-Spaltungsreaktion. Die F6P-Bildungsreaktion und die Kontrolle FSAA<sup>wt</sup> unter gleichen Bedingungen wurde nicht bestimmt [35]. Verglichen mit dem Literaturwert von FSAA<sup>wt</sup> [1] und der Einzelvariante Phe zu Tyr besitzt die TacTal<sup>E60Q F132Y</sup>, wie die TalB<sup>E96Q F178Y</sup> [4], die höchste katalytische Effizienz für die F6P-Retroaldolreaktion [35]. Beim Vergleich der katalytischen Effizienz für die F6P-Retroaldolreaktion von TalB<sup>E96Q F178Y</sup> und TacTal<sup>E60Q F132Y</sup>, zeigt die Doppelvariante der TacTal die höhere Effizienz. Im Gegensatz zu TalB<sup>E96Q F178Y</sup> ist für die TacTal<sup>E60Q F132Y</sup> keine Transaldolaseaktivität nachweisbar [4,35]. Dabei wurde D-F6P vorgelegt und D-E4P zugegeben [35]. Somit könnte das Substrat D-F6P bereits durch die Retroaldolaktivität gespalten worden sein, wodurch keine Transaldolaseaktivität mehr nachweisbar war. Basierend auf diesen Daten ist in beiden Fällen die WT-Transaldolaseaktivität geringer als die neu eingeführte F6P-Retroaldolaktivität [4,35].

#### *Kinetiken im Fließgleichgewicht – Vergleich der Literaturwerte von FSAA<sup>wt</sup>*

Aldoladditionsreaktion von DHA und D-GAP zu D-F6P: Für die Bildung wurde ein  $V_{\max}$  von 20 U/mg [1], 31 U/mg [38] und 45 U/mg beschrieben [40]. Dies ist in Übereinstimmung mit dem hier bestimmten Wert von 20 U/mg (siehe Tab. 3.3). In Bezug auf den  $K_m$  von DHA wurden 62 mM [1] und 35 mM [40] veröffentlicht. Auch hier passt dies zu dem vorliegend erhaltenen Wert von 31 mM. Der  $K_m$  von D-GAP wurde nicht für FSAA<sup>wt</sup> untersucht. In der Literatur ist für D-GAP 0,8 mM [40] und für D/L-GAP 1,9 mM bekannt [38]. Die Dopplung des  $K_m$  von D/L-GAP spiegelt wahrscheinlich die Mischung der Enantiomere D-GAP und L-GAP wieder.

Retroaldolreaktion D-F6P: Die  $V_{\max}$  für die Spaltung von D-F6P wurde mit 3,4 U/mg [1] und 7 U/mg [40] beziffert. Damit liegt der erfasste Wert von 5,7 U/mg zwischen den beiden publizierten Werten. Der  $K_m$  von D-F6P wurde mit 12 mM [1], 9 mM [40] und nochmals mit 12 mM [35] veröffentlicht. Hier liegt der bestimmte Wert von 19 mM höher als beschrieben. Es wurden die Konzentrationen 1 mM, 2 mM, 5 mM, 7 mM, 10 mM, 20 mM und 60 mM verwendet (siehe Abb. 3.3). Für eine höhere Präzision des hyperbolischen Fits wäre daher

die Durchführung der Aktivitätsbestimmung bei 15 mM wünschenswert gewesen. Zu berücksichtigen sind immer methodische Abweichungen, beispielsweise hervorgerufen durch anderen Operator oder andere Messgeräte. Die Abweichungen könnten über einen Ringversuch detektiert werden.

### 9.1.2 pH-Abhängigkeiten und Protonierungszustand des aktiven Lysins

#### *Puffersysteme und Inhibitoren*

Innerhalb des Transaldolasen und Aldolasemechanismus laufen mehrere Protonentransferschritte ab. Der Mechanismus für TalB ist in Abb. 1.3 dargestellt [3,5,6]. Daher sind der pH-Wert und die Pufferkomponente entscheidend bei der Aktivitätsmessung. In der Literatur sind bereits einige Puffer aufgrund ihrer inhibitorischen Eigenschaften als ungeeignet beschrieben. Phosphat stellt einen kompetitiven Inhibitor für beide Modellenzyme dar [23,49]. Wahrscheinlich ist dies begründet durch Bindung in der Phosphattasche. Ähnlich könnte es sich auch mit Sulfat verhalten. Beispielsweise störte Sulfat im Kristallisationspuffer die Auffindung einer Intermediatstruktur in TalB<sup>E96Q</sup> durch Blockierung der Phosphattasche (siehe Abb. 3.29). Zitrat gebunden in der Phosphattasche ist für die TacTal beschrieben [33]. Tris ist ebenfalls für TalB und FSAA als Inhibitor beschrieben [23,37]. Des Weiteren geht die Verwendung von Imidazol mit einem Aktivitätsverlust um 50 % einher [37].

Für das pH-Optimum der TalB wurden die drei Puffer Glycylglycin, HEPES, Imidazol-Puffer verwendet [23,30]. Da Imidazol aufgrund des Aktivitätsverlustes für die FSAA [37] als Puffer ungeeignet ist, ließ sich diese Kombination nicht anwenden. Welche Puffer bei der Bestimmung des pH-Optimums von FSAA in der Vergangenheit verwendet wurden, ist unklar. Es wurde lediglich die Puffertoleranz angegeben, jedoch nicht in welchen Puffern das pH-Profil gemessen wurde [37,49]. Für die TacTal wurden verschiedene Dreikomponentenpuffersysteme verwendet [42,183]. Hier wurde jedoch Tris als Komponente mit höchstem  $pK_a$  verwendet und war mit den beschriebenen inhibitorischen Eigenschaften für die Modellenzyme [23,37] ebenfalls ungeeignet. Ziel war es daher, für die Bestimmung der pH-Optima je einen Puffer im Bereich 6 - 8; 7,5 - 9,5 und 9 - 11 zu finden. Da unter der Verwendung von Glycylglycin für beide Modellenzyme die höchste spezifische Aktivität gemessen wurde [30,37], ist dieser „Goldstandard“ im Bereich von 7,5 - 9,5 anzusehen.

In Übereinstimmung mit der Literatur [30,37] stellte sich HEPES im unteren Bereich (6 - 8) als geeignet heraus (siehe Abb. 3.4). Ein Einfluss der Pufferkomponenten HEPES lag

nicht vor. Für den oberen Bereich (pH 9 – 11) war bisher kein Puffer bekannt. Als am besten geeignet im oberen pH-Bereich stellte sich der Taurin-Puffer heraus. Jedoch mit der Einschränkung, dass eine Absorptionszunahme in Anwesenheit von  $\text{NADP}^+$  und DHA bei hohen pH-Werten entstand (siehe Abb. 3.5). In Anwesenheit von  $\text{NADP}^+$  bei hohem pH-Wert war lediglich ein sehr geringer Absorptionsanstieg detektierbar. Eine NADPH-Bildung durch den hohen pH-Wert ist für die Hintergrundreaktion nicht ursächlich. Schneider [29] beobachtete ebenfalls eine deutliche Hintergrundreaktion in Anwesenheit von DHA. Dies jedoch im Glycylglycin-Puffer mit Nitroblautetrazoliumchlorid bei 540 nm. Ein Zusammenhang mit dem pH-Wert verblieb offen. Ein Einfluss auf die Stabilität von DHA durch den hohen pH-Wert kann nicht ausgeschlossen werden. Jedoch führte hier vorliegend erst die Kombination von DHA,  $\text{NADP}^+$  und einem pH-Wert von über 9 zu einer unbekanntem Hintergrundreaktion. Somit ist Taurin im Aldolaseassay über einem pH-Wert von 9,5 nicht aussagekräftig.

Im Test der Puffertoleranz von Schürmann wurde die Anwesenheit von DTT als vorteilhaft beschrieben [37]. In Abwesenheit von DTT bei Aufreinigung wurde ein Aktivitätsverlust beschrieben. Begründet wurde dies durch eine mögliche Disulfidbrücke zwischen C178 und C181, welche 4,9 Å voneinander entfernt liegen. Die Anwesenheit des Reduktionsmittels DTT wurde als Notwendigkeit zur Aufrechterhaltung der aktiven, reduzierten Form von FSAA angenommen [184]. Inwieweit  $\text{NADP}^+$  im gekoppelten Enzym durch die Anwesenheit von 1 mM DTT reduziert wird, wurde nicht untersucht. Die durchgeführten Assays wurden durch Zugabe des Substrates gestartet. Zuvor lag  $\text{NADP}^+$  gemeinsam mit DTT vor. Dies war ebenfalls bei hohen pH-Werten der Fall. Die sehr geringe Hintergrundsteigung wurde von der gemessenen Steigung nach Substratzugabe abgezogen. Der mögliche Einfluss einer Reduktion von  $\text{NADP}^+$  durch DTT oder durch einen hohen pH-Wert wurde daher in allen Assays berücksichtigt und entsprechend die Enzymaktivitäten korrigiert.

#### *pH-Profile der Transaldolase- und Aldolasereaktion im Vergleich*

Die aktiven Zentren von FSAA und TalB unterscheiden sich und weisen damit verschiedene protonierte und deprotonierte Aminosäurereste auf. Die pH-Profile der Aldolasen- und Transaldolasereaktion könnten sich daher unterscheiden. Für FSAA<sup>wt</sup> ist ein breites pH-Profil zwischen 6 - 12 mit einem Optimum von 8,5 beschrieben [49]. Das Optimum von TalB<sup>wt</sup> liegt zwischen 8,5 – 9,5 [23]. Besonders von Interesse dabei ist, ob die verschiedenen hier untersuchten Varianten Abweichungen aufzeigen. Bei dem

Vergleich unter gleichen Bedingungen zeigen die WT der Modellenzyme, ähnlich wie zuvor beschrieben, keine Unterschiede (siehe Abb. 3.6). Auch die beiden Transaldolasevarianten TalB<sup>F178Y</sup> [1] und TalB<sup>E96Q F178Y</sup> [4] mit beiden Aktivitäten führt zu keinem signifikanten Unterschied. Die Anwesenheit des neutralen Restes Gln in der Variante TalB<sup>E96Q</sup> beeinflusst die pH-Abhängigkeit nicht. Ein Unterschied im pH-Profil durch An- oder Abwesenheit beispielsweise der polaren Aminosäureseitenkette Glu ist nicht zu sehen. Diese steht im Gegensatz zu den RAMA Varianten E178Q und E178A. Diese zeigen in ihren pH-Profilen deutliche Verschiebungen im Vergleich zum WT [185]. Für die Aldolaseaktivität in den TalB-Varianten und der FSAA liegt das Optimum zwischen pH 7,5 und 9,5 und für die Transaldolaseaktivität in TalB und deren Varianten zwischen pH 8,0 - 10,5 (siehe Abb. 3.7).

Für die TacTal sowie für die RAMA ist beschrieben [42,185], dass bei halblogarithmischer Auftragung der pH-Profile den Wendepunkten die pK<sub>a</sub>-Werte wichtiger katalytischer Reste zugeordnet werden können. Dies ist an den vorliegenden Ergebnissen für die FSAA<sup>wt</sup> und TalB<sup>wt</sup> sowie deren Varianten nicht möglich. Grund hierfür ist das breite Optimum und der langsame Aktivitätsabfall. Eine Übertragung der Vorgehensweise war daher nicht möglich.

#### *Protonierungszustand des aktiven Lysins*

Um den Protonierungszustand katalytisch wichtiger Reste zu bestimmen, wurde alternativ zu den pH-Profilen nach anderen analytischen Ansätzen gesucht. Mechanistische Auswirkungen hätten vor allem Unterschiede des pK<sub>a</sub>-Wertes des Schiff'sche Base bildenden Lysins. Das Lysin muss ungeladen vorliegen, um einen nukleophilen Angriff auf das Substrat vollziehen zu können. Ist dies nicht der Fall muss eine Deprotonierung als Eingangsschritt erfolgen (siehe Abb. 1.3 Schritt 0). Für die TalB ist dieser Eingangsschritt beschrieben [3,5,6]. Im Gegensatz dazu wird der Mechanismus der TacTal ohne Eingangsschritt [42] und mit Eingangsschritt [33] postuliert. Die prinzipielle Notwendigkeit für den Transaldolasemechanismus ist jedoch allgemein definiert [34].

Zur Bestimmung des pK<sub>a</sub>-Wertes des Schiff'sche Base bildenden Lysins können verschiedene analytische Verfahren verwendet werden: PLP kann zur Bestimmung des pK<sub>a</sub>-Wertes verwendet werden (siehe 7.6.2, [165]). Eine entsprechend notwendige Inhibition der Modellenzyme wurde jedoch nicht beobachtet. Methodon stellt einen Inhibitor für de-novo Retroaldolasen dar [178]. Eine Inhibition für FSAA und TalB war nicht detektierbar (Samland, unveröffentlicht). Dies könnte durch die Größe der beiden Inhibitoren oder durch unzureichende Wasserlöslichkeit bedingt sein. Aufgrund dessen wurde ein kleiner Inhibitor gewählt, der mehr Ähnlichkeiten zum natürlichen Substrat

aufweist. Für AA ist beschrieben, dass dies in der Lage ist einen stabilen kovalenten Komplex mit einem neutral geladenen Lysin zu bilden (siehe Abb. 2.11) [7–9].

Bei Bindung von AA am aktiven Lysin von katalytischen Antikörpern wurde in früheren Studien ein Unterschied im Absorptionsspektrum festgestellt. Dieser wurde zur Detektion des  $pK_a$ -Wertes verwendet [9,179]. Eine Änderung des Absorptionsspektrums der Modellenzyme konnte nicht beobachtet werden. Alternativ wurde die inhibitorische Eigenschaft von AA durch Blockierung des aktiven Lysins verwendet, um den  $pK_a$ -Wert des aktiven Lysinrestes experimentell zu bestimmen. Erstmals wurden dafür die Inhibitionsraten bei verschiedenen pH-Werten detektiert. Dabei ergaben die Wendepunkte der Sekundärauftragung (Geschwindigkeitskonstanten der Inhibitionen gegen pH-Wert) die  $pK_a$ -Werte (siehe 7.6.2). Der Enzym-Inhibitor-Komplex von FSAA mit AA (siehe Abb. 3.35) zeigt die kovalente Bindung von AA an die  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub>-Gruppe des aktiven Lysins. Somit wurde die ausschließliche Bindung an das aktive Lysin und damit die Eignung von AA zur  $pK_a$ -Wert-Bestimmung belegt. Lediglich eine Bindung an Lysinresten, lokalisiert an der Oberfläche, kann aufgrund der Flexibilität nicht ausgeschlossen werden [4]. Für den Erfolg der Kristallisation mittels *Soaking* wurde darauf geachtet, dass die Präzipitationslösung keine inhibierenden Komponenten enthält und einen pH-Wert im Enzymoptimum aufweist sowie die Frostschutzlösung nicht Glycerin als Kryoprotektant beinhaltet. Ziel hierin war es, das Aktive Zentrum nicht durch Kristallisationskomponenten zu modifizieren.

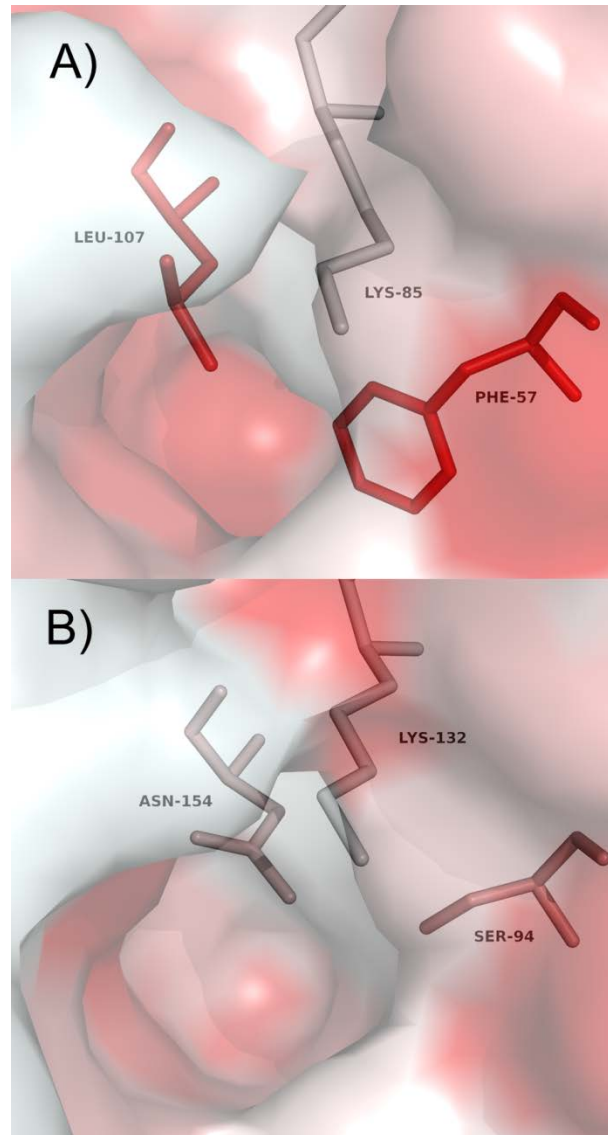
Die Auswirkung von AA auf die Kopplungsenzyme PGI und G6P-DH wurde nicht getestet. Die Inkubationszeit mit AA ist im Vergleich zu FSAA und TalB nur innerhalb des gekoppelten Enzymtestes. Im Vergleich zur Vorinkubationszeit für die Modifikation von AA von bis zu 48 h ist dies mit ca. 2 Min kurz. In der PGI ist das Lys518 ein Protonendonator im ersten Reaktionsschritt. Dies liegt für den Ablauf des Mechanismus protoniert vor. Wenn das Substrat für den Mechanismus richtig positioniert ist und der erste Schritt abgelaufen ist liegt das Lys518 neutral vor [186]. Basierend darauf ist es unwahrscheinlich, dass AA das neutrale katalytische Lys518 der PGI modifizieren kann. Bei der G6P-DH ist kein Lys im Mechanismus beteiligt [187]. Sollten zwei  $pK_a$ -Werte von Lysin-Resten durch die Modifikation von AA betroffen sein, sollte die Titrationskurve zwei Wendepunkte aufweisen, solange es sich um den identischen  $pK_a$ -Wert handelt. Keine der  $pK_a$ -Titrationskurve weist zweit mehr als einen Wendepunkt (siehe Abb. 3.9). Eine Modifikation durch AA der Hilfsenzyme ist jedoch nicht ausgeschlossen.

Die beiden Modellenzyme zeigen einen deutlichen Unterschied im  $pK_a$ -Wert des aktiven Lysins (siehe Tab. 3.6). In der TalB mit einem  $pK_a$ -Wert von 9,3 liegt das aktive Lysin unter Assaybedingungen (pH 8,5) protoniert vor. Dies ist in Übereinstimmung mit den Berechnungen mittels PROPKA ( $pK_a$ -Wert 9,75). Dies ist vier pH-Einheiten azider als für ein entsprechendes Ketimin [188]. Der deutlich niedrigere  $pK_a$ -Wert von 5,5 der FSAA impliziert, dass das aktive Lysin im Gegensatz zur TalB bereits deprotoniert vorliegt. Auch hier stimmt die Vorhersage von PROPKA ( $pK_a$ -Wert 6,67), wobei der experimentell bestimmte Wert um eine pH-Einheit niedriger liegt. Diese neuen experimentellen Erkenntnisse sind im postulierten Mechanismus dargestellt (siehe Abb. 4.4). Hierbei läuft in der TalB Schritt 0 ab, wohingegen in der FSAA die Deprotonierung entfällt [4].

Der Austausch von Glu96 zu Gln in der TalB senkt den  $pK_a$ -Wert auf 6,2, ähnlich zur FSAA. Die negative Ladung des Glutamatrestes könnte daher die positive Ladung des Lysinrestes stabilisieren. Hierdurch ist der Eingangsschritt 0 in der TalB<sup>E96Q</sup>, wie in der FSAA, nicht notwendig. Beim Vorhandensein des neutralen Glutaminrestes wird hingegen ein neutrales Lysin bevorzugt. Die TalB<sup>E96Q F178Y</sup> weist einen  $pK_a$ -Wert des aktiven Lysins zwischen TalB<sup>wt</sup> und FSAA<sup>wt</sup> auf. Möglicherweise ist Tyr178 teilweise in der Lage die positive Ladung des Lysinrestes zu stabilisieren und verursacht somit die verbesserten Aldolaseeigenschaften der TalB<sup>E96Q F178Y</sup> im Vergleich zu TalB<sup>F178Y</sup>. In der FSAA<sup>Q59E</sup> bewirkt der Austausch keine Änderungen des  $pK_a$ -wertes im Vergleich zum WT. Dieser Unterschied könnte in der hydrophoben Umgebung des aktiven Lysins in der FSAA begründet sein (siehe Abb. 4.1). Dabei sind Phe57 und Leu107 in der unmittelbaren Umgebung lokalisiert. In der TalB sind an diesen Stellen Ser194 und Asn154 lokalisiert. Somit liegt eine günstige Umgebung in der FSAA für ein neutrales Lysin vor [4]. Der Effekt, dass eine hydrophobe Umgebung den  $pK_a$ -Wert des aktiven Lysins erniedrigen kann, wurde bei dem Design von Retroaldolasen angewandt [189].

FSAA<sup>L107N</sup> war bereits bekannt. Die Variante zeigte eine Steigerung der Affinität von D-F6P, 2,4 mM im Vergleich zu 9 mM beim WT. Hierdurch wurde belegt, dass dieser Rest bei der Donorbindung eine Rolle spielt [37]. Dies stellte auch eine Annäherung an den  $K_m$ -Wert der TalB für D-F6P von 1,2 mM [23] dar. Beschrieben wurde auch, dass das Leu107 gemeinsam mit Ala129 und Leu163 in der FSAA eine hydrophobe Tasche für das variable Strukturelement der Donoren DHA, HA und HB darstellt. In der TalB sind hier die polaren Reste Asn154 und S176 lokalisiert [190]. An der Position von Leu163 in der FSAA ist in der TalB das ebenfalls unpolare Met222 lokalisiert. Die Unterschiede in der Hydrophobizität zwischen TalB und FSAA sind somit auch für die unterschiedliche Donorsubstratselektivität von Bedeutung.





**Abb. 4.1: Hydrophobizität der Umgebung des katalytischen Lysinrestes in FSAA (A) und TalB (B)**

Höhere Hydrophobizität wird durch dunklere Rottöne dargestellt (Hydrophobizitätsskala nach Eisenberg et al. [191]) [176].

### 9.1.3 Thermische Stabilität

Die Auswirkungen des Austausches der katalytischen Reste auf die Thermostabilität wurden näher untersucht. Weiter waren die genauen  $T_{\text{schmelz}}$  der WT bisher nicht bestimmt worden. Dies wurde unter Anwendung der CD-Spektroskopie in Kombination mit Temperaturerhöhung realisiert. Bekannt ist, dass FSAA bei 75 °C eine Halbwertszeit von 16 Stunden aufweist [49]. Das Temperaturoptimum der TalB liegt dagegen bei 15-40 °C und sie verliert bei über 55 °C an Aktivität [23]. Die kompakte Struktur der FSAA im Vergleich zur TalB soll ursächlich für die Thermostabilität der FSAA sein [2].

Die Denaturierungstemperatur  $T_{\text{schmelz}}$  von FSAA beträgt 76 °C und von TalB 51 °C (siehe Tab. 3.7, [4]). Diese stimmen mit den genannten Literaturdaten überein [23,49]. Die TalB-Varianten (TalB<sup>F178Y</sup>, TalB<sup>E96Q</sup> und TalB<sup>E96Q F178Y</sup>) zeigen ein ähnliches Temperaturprofil (siehe Abb. 3.12). Anders liegt der Fall bei den FSAA-Varianten: Der Austausch Gln59Glu resultiert in einem destabilisierenden Effekt von 12 °C bzw. von 18 °C bei der Doppelvariante FSAA<sup>Q59E Y131F</sup>. Die neu eingeführte negative Ladung von Glu könnte zu ungünstigen Interaktionen innerhalb und zwischen den Untereinheiten führen. In der FSAA wird eine hydrophobe Umgebung durch Pro29 und Pro87 innerhalb der Untereinheit und Phe207 der Nachbareinheit generiert (siehe Abb. 4.2). Phe207 ist in der Mitte der C-Terminal  $\alpha$ C-Helix lokalisiert und stellt gemeinsam mit Trp211 und Phe215 eine Art Anker zur nächsten Untereinheit dar (siehe Abb. 4.2). Die hydrophoben Wechselwirkungen sind die Basis zur Ausformung von Pentameren. Diese könnten durch die Anwesenheit von Glu59 gestört werden [4].

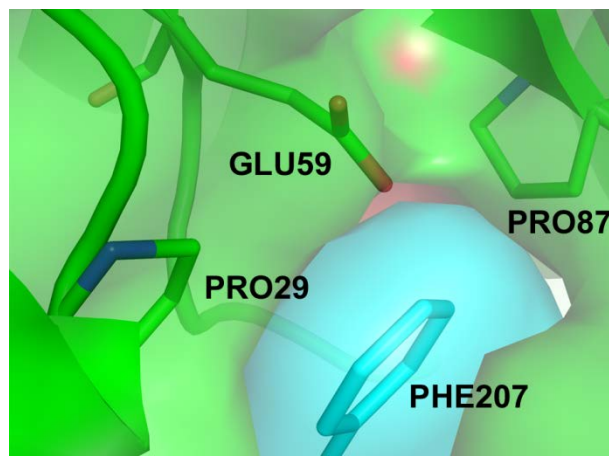
### 9.1.4 Kristallstrukturen und 3D-Aufbau

Die Faltung, die Oligomerisierung und der korrekte Aufbau des Aktiven Zentrums sind entscheidend für die katalytische Aktivität. Es ist wichtig auszuschließen, dass die Aktivitäten der Varianten TalB<sup>E96Q</sup>, TalB<sup>F178Y</sup>, TalB<sup>E96Q F178Y</sup>, FSAA<sup>Q59E</sup>, FSAA<sup>Y131F</sup> und FSAA<sup>Q59E Y131F</sup> durch fehlerhaften 3D-Aufbau beeinflusst sind. Dies gilt insbesondere bei den FSAA-Varianten ohne messbare Aktivität.

Mittels CD- und DLS-Spektren wurde geprüft, ob die Faltung und die Oligomerisierung der Varianten mit denen der WT übereinstimmen. Aus den Kristallstrukturen der WT [2,3] ist bekannt, dass eine  $(\alpha/\beta)_8$  Fassetstruktur ausgebildet wird. Die erhaltenen Mischsignale aus  $\alpha$ -Helix und  $\beta$ -Faltblatt sind daher typisch für den Proteinaufbau von TalB und FSAA (siehe Abb. 3.10). Es sind keine Unterschiede zwischen den Varianten und den WT sichtbar. Änderung der Sekundärstrukturelemente durch die vorgenommene Mutagenese ist somit nicht anzunehmen [4]. Das Dekamer der Kristallstruktur der FSAA besitzt einen Durchmesser von  $\sim 100 \text{ \AA}$  (siehe Abb. 3.11 B, [2]). Das Hauptsignal der

DLS-Größenverteilung der FSAA<sup>wt</sup> und aller FSAA-Varianten entspricht einem hydrodynamischen Radius von ~10 nm. Somit ist belegt, dass der WT [2], wie auch die Varianten in Lösung, Homodekamere ausbilden [4].

Zur genaueren Analyse waren die Kristallstrukturen der Varianten angestrebt. Die Strukturen der Muteine TalB<sup>E96Q</sup>, TalB<sup>E96Q F178Y</sup>, FSAA<sup>Q59E</sup>, FSAA<sup>Y131F</sup> und FSAA<sup>Q59 EY131</sup> wurden erfolgreich gelöst. Alle Transaldolaseproteine, einschließlich der bereits bekannten Strukturen TalB<sup>wt</sup> und TalB<sup>F178Y</sup> [1,3], bilden die gleiche orthorhombische Raumgruppe P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub> mit je einem Dimer in der Elementarzelle aus. Die Kristallstrukturen der Varianten weisen bis auf den Aminosäureaustausch eine große Ähnlichkeit zum WT, sowie eine gut definierte Elektronendichte bis auf wenige Seitengruppen an der Oberfläche auf (siehe Abb. 3.26). Dies ist in Übereinstimmung mit der beschriebenen Variante TalB<sup>F178Y</sup> [1]. Für die FSAA war vor dieser Arbeit und den daraus resultierenden Veröffentlichungen bisher lediglich der WT veröffentlicht. Aus den Rohdaten der Kristalle aus Arbeiten von Inoue und Sandalova konnte FSAA<sup>Q59E</sup> verfeinert werden. FSAA<sup>wt</sup> [2] und FSAA<sup>Q59E</sup> bilden die gleiche Raumgruppe P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub> aus. Im Vergleich dazu bilden FSAA<sup>Y131F</sup> und FSAA<sup>Q59 EY131</sup> die andere Raumgruppe P2 aus. Die Struktur von FSAA<sup>wt</sup> gebunden mit AA bildet die weitere, dritte Raumgruppe I2 aus. Dies könnte an den neuen Kristallisationsbedingungen (siehe Tab. 2.13) oder dem His<sub>6</sub>-Tag liegen bzw. durch den Inhibitor AA begründet sein. Die FSAA-Varianten sind ebenfalls dem WT sehr ähnlich. Als Ergebnis wurde ein geringer Unterschied in der Positionierung der C-terminalen Helix in der pentameren Grenzfläche bei den Varianten FSAA<sup>Q59E</sup> und FSAA<sup>Q59E Y131F</sup> erhalten (siehe Abb. 3.27). Dies belegt die im vorangegangenen Abschnitt vermutete destabilisierende Interaktion zwischen Phe207 der Nachbareinheit und dem ausgetauschten Glu59 (siehe Abb. 4.2). Abhängig von der Positionierung des Phenylrings ist beschrieben, dass schwach stabilisierende bis abstoßende Wechselwirkungsenergien auftreten [192]. Zudem könnte die Tasche, in welcher der Anker Phe207 sitzt, durch Interaktion zwischen Glu59 und den hydrophoben Resten Pro29 und Pro87 innerhalb des Monomers aufgeweitet werden und dadurch destabilisierend sein. Diese inter- und intramonomeren Interaktionen könnten die Änderung der Positionierung des Ankers zwischen den Untereinheiten begründen. Sie stellen eine mögliche Begründung für die Unterschiede in der Thermostabilität dar. Zusammenfassend ist jedoch sichergestellt, dass Unterschiede in der katalytischen Aktivität der Varianten unter Assaybedingungen nicht durch Unterschiede im 3D-Aufbau beziehungsweise der Oligomerisierung oder Konformationsänderungen im Aktiven Zentrum verursacht werden (ergänzt nach [4]).



**Abb. 4.2: Destabilisierende Interaktion zwischen Phe207 aus der Untereinheit A (blau) und Glu59 aus der Untereinheit B (grün) von FSAA<sup>Q59E</sup>**

Die Destabilisierung wird durch die Interaktion zwischen dem negativ geladenen Glu59 und den umgebenden hydrophoben Resten verursacht. Glu59 ist zwischen Pro29 und Pro87 (Untereinheit B, grün) angeordnet und liegt ebenfalls nahe an Phe207 (3,4 Å, Untereinheit A, blau). Die Monomere A und B sind mit halbtransparenter Proteinoberfläche abgebildet [176].

### 9.1.5 Wasserstoffbrückennetzwerk des aktiven Wassermoleküls

Basis der Auswahl der Mutagenesestellen (siehe 8.1 und 9.1.1) war es, das Wasserstoffbrückennetzwerk des aktiven Wassermoleküls zu verändern und dessen Funktion zu analysieren. Die unterschiedlichen H-Brücken zum aktiven Wassermolekül werden in der FSAA durch Gln59, Thr109, sowie Tyr131 und in der TalB durch Glu96 sowie Thr156 gebildet (Abb. 1.12). Aus den erhaltenen Kristallstrukturen der Muteine zeigt sich, dass die Intensität der Dichteverteilung des aktiven Wassermoleküls variiert. Zudem ist das katalytische Wassermolekül unterschiedlich gebunden und positioniert (siehe Abb. 3.28). Somit gibt es keine klare Korrelation zwischen der Positionierung des Wassermoleküls und der D-F6P-Aldolase- bzw. Transaldolaseaktivität. Daher ist davon auszugehen, dass nicht das H-Brückennetzwerk bestimmt, wie von Thorell et al. [2] postuliert, ob Transaldolase- oder Aldolaseaktivität vorliegt. Vielmehr ist davon auszugehen, dass die Funktionen der Reste, welche am H-Brückennetzwerk beteiligt sind, zwischen den beiden Aktivitäten diskriminieren.

Eine Beteiligung von Asn35 an der Positionierung des Wassermoleküls in der TalB wird von Schörken 2001 für möglich erachtet [6]. Der Abstand zwischen Asn35 und dem Wassermolekül, ermittelt aus TalB<sup>wt</sup> [5], ist 4,4 Å. Eine Beteiligung von Asn ist daher unwahrscheinlich. Dies belegen die neuen Kristallstrukturen, in denen das aktive Wassermolekül nicht von Asn35 gebunden wird.

In der Struktur der Variante TacTal<sup>F132Y</sup> ist kein katalytisches Wasser auffindbar. Dabei wurde davon ausgegangen, dass Tyr132 durch den erhöhten Raumbedarf dieses verdrängt hat [42]. In der Struktur der TalB<sup>F178Y</sup> [1] ist das katalytische Wassermolekül hingegen, wie in der FSAA, präsent und durch drei Reste gebunden. Die TacTal durchläuft einen *induced-fit* Mechanismus mit Konformationsänderung. Dabei wird der Substratkanal verbreitert bzw. verengt [33]. Dies könnte ursächlich dafür sein, dass die Positionierung des Tyr und die Präsenz des katalytischen Wassers sich unterscheiden.

Ausgehend von der Variante TalB<sup>E96Q</sup> wurde erstmals auch das Schiff'sche Base Intermediat des natürlichen Substrates D-F6P erhalten (siehe 9.3.2 bezüglich der Beschreibung des Substratkomplexes und dem Vergleich zu anderen D-F6P-Intermediatstrukturen). Das aktive Wassermolekül wird in dieser Struktur zusätzlich durch H-Brücken zu C4-OH und zu der  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> des Lys132 positioniert (siehe Abb. 3.32). Dies ist in Übereinstimmung mit dem H-Brückennetzwerk in der TacTal<sup>wt</sup> + D-F6P [33].

Bezüglich des aktiven Wassermoleküls ist offen, ob es eine Unterscheidung zwischen dem Wassermolekül in Ruhephase und dem Wassermolekül mit gebundenem Liganden gibt. Für die TacTal wurde die Überlegung postuliert, dass das aktive Wassermolekül in Ruhephase bei Ligandenbindung verdrängt werden könnte. Im Anschluss daran könnte durch Ausbildung der Schiff'sche Base das freigesetzte Wasser an dessen Stelle gebunden werden [33,34,42,183]. In dem Modell der FSAA mit kovalent gebundenem D-F6P als Carbinolamin (siehe Abb. 4.3 A) wird die ungünstige Positionierung der C2-OH Gruppe zum katalytischen Wasser in der FSAA ebenfalls sichtbar (Abstand 1.2 Å). Die Möglichkeit einer Verdrängung durch Bildung des Carbinolamins besteht somit auch für die FSAA. Sollte dies ebenfalls für die TalB gelten, wäre kein katalytisches Wassermolekül zur Vermittlung der Protonierung des Carbinolamins durch Glu96 vorhanden (Schritt 3, siehe Abb. 4.3). Dann müsste der Mechanismus direkt ablaufen. Denkbar ist jedoch, ähnlich wie bei dem Unterschied in der Präsenz des Wassermoleküls zwischen TacTal<sup>F132Y</sup> und TalB<sup>F178Y</sup>, dass die Platzrestriktion durch den induced-fit Mechanismus in der TacTal und Tyr im Vergleich zu Phe größer ist. Unabhängig davon ist das katalytische Wasser in der TacTal [33] als auch in der TalB für die Proton-Vermittlung zur Spaltung notwendig (Schritt 4, siehe Abb. 4.4).

### 9.1.6 D-F6P als Schiff'sche Base und ihre mechanistische Implikation

Aus der Positionierung der neu erhaltenen Struktur des Schiff'sche Base Intermediates von D-F6P in TalB<sup>E96Q</sup> können mechanistische Implikationen abgeleitet werden (siehe 9.3.2 bezüglich der Beschreibung des Substratkomplexes und dem Vergleich zu anderen D-F6P-Intermediatstrukturen). In dieser Struktur des Schiff'sche Base Intermediates bildet Asp17 je einer Wasserstoffbrücke zur C3 und C5 Hydroxylgruppe von D-F6P aus (siehe Abb. 3.32, [10]). Die Interaktion zu C3 wurde bereits an einer Modellstruktur von TalB<sup>wt</sup> mit D-F6P, die auf TalB<sup>wt</sup> mit gebundenem Glyceryl-Rest basiert, postuliert. Zudem wird angenommen, dass Asp17 in Wasserstoffbrückenreichweite von C4-OH ist [5]. Im Vergleich zur RAMA befindet sich in deren 3D-Struktur ein entsprechendes Asp33 an dieser Position, der während der Katalyse eine Proton vom Schiff'sche Base Intermediat akzeptiert [3,5,193]. Diese Funktion wurde durch die kinetischen Ergebnisse der TalB<sup>D17A</sup> unterstützt [6]. Bisher wurde daher für die TalB als katalytische Funktion von Asp17 die Deprotonierung der C4-OH Gruppe in Schritt 4 angenommen (siehe Abb. 1.3, [3,5,6]). Im Gegensatz dazu wurden für die TacTal die Funktion des Protonenakzeptors von C4-OH für den Rest Glu60 unter Beteiligung des katalytischen Wassermoleküls postuliert [33,42]. Eine ähnliche Funktion ist für Glu187 in der RAMA bekannt [100]. Asp6 im Schiff'sche Base Intermediat der TacTal mit D-F6P entspricht bezüglich der Wasserstoffbrücken Asp17 in der TalB<sup>E96Q</sup> mit D-F6P [33]. Somit ist Asp17 mit Wasserstoffbrücken zu C3-OH und C5-OH auch in der TalB nicht richtig positioniert, um eine Deprotonierung zur Bildung eines Schiff'sche Base Intermediates zu vollziehen, wie zuvor postuliert [5,6]. In der FSAA werden die Wasserstoffbrückenbindungen zu C3-OH und C5-OH von Asp6 eingegangen und waren daher Mutageneseziele für weitere Donoren [57,90]. Die richtige Ausrichtung von Asp wird durch Thr26 in der FSAA [91] und Thr33 in der TalB sichergestellt. In der TalB übernimmt, wie in der TacTal, die Deprotonierung der C4-OH Gruppe Glu96 unter Beteiligung des katalytischen Wassermoleküls (siehe Abb. 4.4 und Tab. 4.1, [4,10]). Folglich ähneln sich in dieser Deprotonierung des C4-OH zur Spaltung der C-C-Bindung und Freisetzung des ersten Produktes die Mechanismen der archäalen FBPA im Vergleich zu den Transaldolasen.

In der TacTal mit gebundenem D-F6P als Schiff'sche Base weist das C1-OH unterschiedliche Positionierungen auf. Dabei wird eine Wasserstoffbrücke zum Thr110 (*Up*-Konformation) oder zwei Wasserstoffbrücken zum Ser130 und zum Asn108 (*Down*-Konformation) ausgebildet [33]. Anhand der TacTal<sup>N108A S130A</sup> wurde der Einfluss der Koordination der C1-OH Gruppe näher untersucht. Auch die Kristallstruktur dieser Variante besitzt beide Positionierungen, unabhängig von der Abwesenheit der

Wasserstoffbrückenbindungspartner [183]. In der TalB mit D-F6P ist diese Hydroxylgruppe durch das entsprechende Ser176 und Asn154 koordiniert. Das Thr156 ist an dem Wasserstoffbrückennetzwerk des aktiven Wassermoleküls beteiligt und nicht an der Koordination der C1-OH Gruppe (siehe Abb. 3.32, [10]). Dies entspricht der bereits beschriebenen Koordination von C1-OH in der Kristallstruktur von TalB + DHA [5] und der *Down*-Konformation in der TacTal. Eine unterschiedliche Positionierung der C1-OH Gruppe ist somit in allen bekannten Intermediatstrukturen der TalB nicht zu beobachten. Die Variante TalB<sup>S176A</sup> besitzt lediglich 2,5 % Restaktivität [6]. Die TacTal<sup>N108A S130A</sup> zeigt ebenfalls eine starke Beeinträchtigung der ersten Donorhalbreaktion [183]. Die richtige Positionierung von C1-OH könnte Einfluss auf die Positionierung der Carbonylfunktion des Donorsubstrates haben [6]. Damit ist SF-übergreifend die Bedeutung des Wasserstoffbrückennetzwerkes von C1-OH durch Ser und Asn für die Transaldolaseaktivität belegt.

Weitere Informationen aus der Kristallstruktur, welche nicht mechanistisch relevant sind, werden in 9.3.2 diskutiert.

### 9.1.7 Protonendonator und Funktion als generelle Base

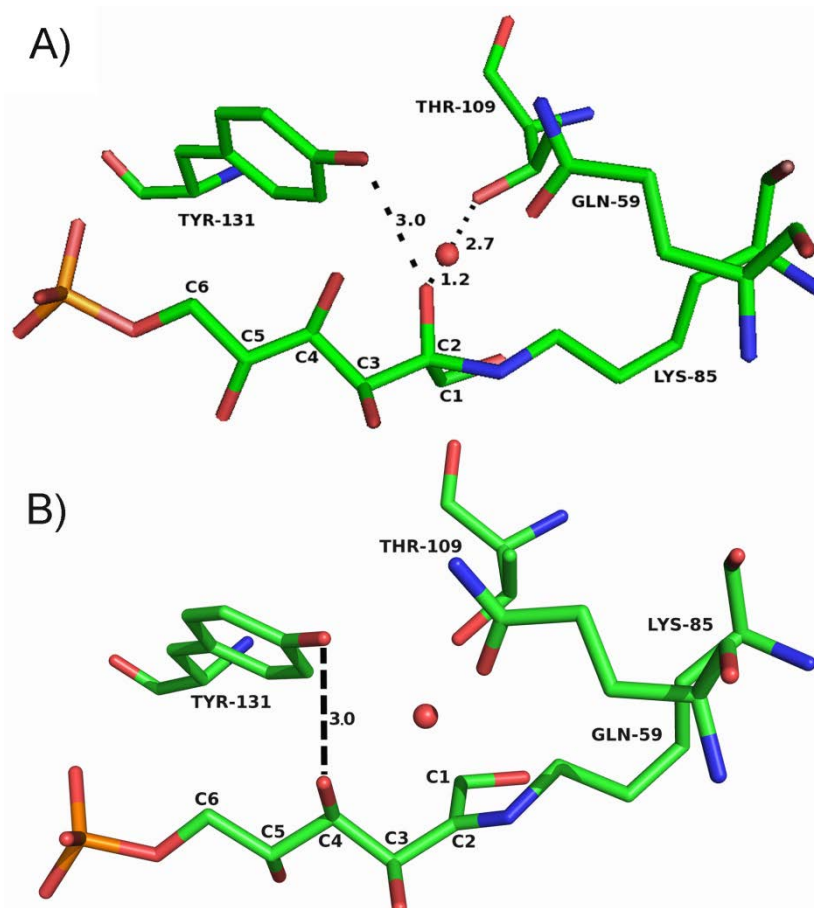
In der TalB werden dem aktiven Rest Glu96 verschiedene Funktionen als genereller Säure-Base-Katalysator zugeordnet (siehe Abb. 1.3, [3,5,6]). Beispielsweise stellt Glu96 im Eingangsschritt 0 eine generelle Base dar. Diese nimmt ein Proton des positiven aktiven Lysins auf, um den Angriff auf das Substrat zu ermöglichen. Als Protonendonator fungiert Glu96 beispielsweise in Schritt 3 zur Bildung der Abgangsgruppe Wasser (siehe Abb. 4.4). Basierend auf massenspektrometrischen Untersuchungen der TacTal wird für das äquivalente Glu zusätzlich eine Rolle bei der Positionierung des Carbinolamin postuliert [42]. In der RAMA ist, wie bei der TalB, das Glu187 der generelle Säure-Base-Katalysator [100,185,194]. Hierbei ist Glu so positioniert, dass die Katalyse nicht über ein Wassermolekül vermittelt werden muss [100]. Der korrespondierende Rest Gln59 in der FSAA kann sich jedoch nicht an einem solchen Protonentransfersystem beteiligen (blau markierter Reste in Abb. 1.11, [2]). Ein anderer Rest muss daher in der FSAA diese Funktion übernehmen. Somit muss FSAA einen anderen Mechanismus im Vergleich zur TalB aufweisen. Durch die Unterschiede im den pK<sub>a</sub>-Werten des aktiven Lysins ist ein Protonenakzeptor für den Eingangsschritt in der FSAA nicht notwendig. In der FSAA ist das neutral Lysin in der Lage, direkt das Substrat anzugreifen (siehe 9.1.2 und Schritt 0 Abb. 4.4). Offen ist jedoch, welcher Rest die weiteren Funktionen (Schritt 3 und 4 Abb. 4.4) des aktiven Rests Glu96 in der FSAA übernimmt (ergänzt nach [4])[4].

Das im Aktiven Zentrum hoch konservierte Thr ist in beiden Modellenzymen an der Bindung des Wassermoleküls beteiligt. In der Subfamilie 5, zu welcher FSAA gehört, ist Thr zu 100 % konserviert (siehe Tab. 1.5). Mechanistisch wird dem Thr in der TalB eine Rolle bei der Stabilisierung des Alkoxides zugesprochen [5,6]. Untersuchungen der TalA legen eine Beteiligung durch Thr159-Carbonyl-Interaktion an der initialen Substratbindung nahe [44]. Im Gegensatz dazu weisen die Kristallstrukturen der TacTal auf Asp6-Carbonyl-Interaktion hin und daher eine Rolle bei der Protonierung des Alkoxides [42]. Im FSAA Carbinolaminmodell (siehe Abb. 4.3 A). beträgt der Abstand zwischen der Hydroxylfunktion des C2 bis zu Thr109 2,7 Å. Diese Wasserstoffbrückenbindung ist ebenfalls im Modell von Tittmann [34] dargestellt. Somit könnten in der FSAA diese Funktionen der korrekten Substratpositionierung für den nukleophilen Angriff auf das Thr109 und der Stabilisierung des Alkoxides übertragen werden. Thr ist jedoch nicht bekannt dafür, als Säure-Base- Katalysator zu agieren (ergänzt nach [4]).

Interessanterweise agiert das Tyr363 in der RAMA über ein konserviertes Wassermolekül teilweise anstelle des Glu187 als Protonendonator bzw. -akzeptor [104]. In den TtFBPA stellt Tyr146, positioniert an Stelle des katalytischen Glu von eukaryotischen FBPA, den Protonendonator. Tyr146 ist ferner an der Protonierung des Carbinolamins über die C2-OH Gruppe (Schritt 3 Abb. 4.4) beteiligt [105,106]. In der FSAA ist das Tyr131 im Aktiven Zentrum lokalisiert und wie das Thr109 an der Positionierung des aktiven Wassers beteiligt. Aus dem FSAA Carbinolaminmodell (siehe Abb. 4.3 A) wird ersichtlich, dass in der FSAA ebenfalls eine Wasserstoffbrücke zu C2-OH in D-F6P (3 Å) möglich ist. Daher könnte diese Funktionalität von Tyr ebenfalls in der FSAA vorliegen. Ebenfalls wäre FSAA damit in der Lage den Ladungsausgleich des bipolaren Alkoxides zum Carbinolamin zu vermitteln (Schritt 2). Des Weiteren ist das Tyr 3,0 Å vom C4-OH des Schiff'sche Base Modells entfernt (siehe Abb. 4.3 B). Diese beiden Interaktionen des Tyr werden von weiteren Modellen bestätigt [34]. Somit kann Tyr131 über direkten Kontakt als genereller Säure-Base- Katalysator in der FSAA agieren. Eine Vermittlung über das Wassermolekül wie mit der „Glu-Wasser-Dyade“ in der TalB ist nicht notwendig. Dies stellt damit einen weiteren Unterschied zwischen den beiden Modellenzymen dar. Die Varianten FSAA<sup>Q59E Y131F</sup> und FSAA<sup>Y131F</sup> zeigen keine nachweisbare Aktivität (siehe Tab. 3.2). Dieser Verlust ist nicht in der 3D-Struktur begründet (siehe 9.1.4). Daher wird hier experimentell belegt, dass Tyr131 als Protonendonator bzw. –Akzeptor in der FSAA fungiert (ergänzt nach [4]). Zudem belegen die Mutagenesestudien zur F6P-Aldolaseaktivität von S. Schneider et al. [1] mit der Variante TalB<sup>F178Y</sup>, dass Tyr eine katalytische Schlüsselfunktion inne hat. Dies begründet auch die verbesserten Aldolaseeigenschaften der TalB<sup>E96Q F178Y</sup>, da hier der



ursprüngliche Protonendonator Glu96 nicht mehr vorhanden ist. Die Rolle als Säure-Base-Katalysator von Tyr131 in der F5AA wurde ebenfalls von Tittmann [34] postuliert. Dies basierte auf Kristallstrukturmodellen von D-F6P Intermediaten. Ferner wurde diese Rolle durch die Variante TacTal<sup>E60Q F132Y</sup> belegt [35]. In der Retroaldolase RA95.5–8F, generiert durch Gerichtete Evolution, spielt das Tyr als katalytische Base ebenfalls eine zentrale Rolle [195].



**Abb. 4.3: Modelle der F5AA mit kovalent gebundenen D-F6P Intermediaten**

Die Modelle basieren auf der F5AA<sup>wt</sup>-Struktur [2]. (A) Das Carbinolamin von D-F6P mit tetragonalem C2 ist abgebildet. Der Abstand von Tyr131 bis zur Hydroxylgruppe von C2 beträgt 3,0 Å und der Abstand bis zu Thr109 beträgt 2,7 Å. Das katalytische Wasser ist 1,2 Å von Tyr131 entfernt (B) Die Schiff'sche Base von D-F6P weist eine planare Symmetrie zwischen dem C2 und dem Lys85 auf. Der Abstand zwischen Tyr131 und der Hydroxylgruppe von C2 beläuft sich auf 3,0 Å (verändert nach [176]).

Eine Funktion als Säure-Base-Katalysator für Tyr wurde ebenfalls für weitere Enzyme postuliert, beispielsweise eine Ketosteroid-Isomerase [196], eine N-Acetylneuraminsäure-Lyase [197] und eine Alanin-Racemase [198,199]. Die Anwesenheit von Argininresten in der Nähe von Tyr ist in der Lage den pK<sub>a</sub>-Wert von Tyr um 2-3 Einheiten zu verschieben und damit eine Funktion als Protonendonator zu ermöglichen. Die Verschiebung des pK<sub>a</sub>-Wertes spiegelt sich in den Berechnungen mittels PROPKA wieder. Der pK<sub>a</sub>-Wert des Tyr

liegt bei 12,48 wohingegen dieser in Wasser bei 10,00 liegt. Im Vergleich der FSAA und der TalB<sup>F178Y</sup> befinden sich entsprechende Argininreste (Arg134 3,5 Å bzw. Arg181 3,8 Å) [4].

Die Positionierung des Säure-Base-Katalysators in den Enzymfamilien Transaldolase und Aldolase kann aufgrund der Lokalisation im Enzym in zwei Gruppen unterteilt werden. Zum einen die Gruppe „*co-aligned*“, in welcher der Protonendonator und das Schiff'sche Base bildende Lysin auf der gleichen Seite des Aktiven Zentrums lokalisiert sind. Zum anderen die Gruppe „*opposite faced*“, in der der Protonendonator auf der gegenüberliegenden Seite positioniert ist und in Richtung des Schiff'sche Base bildenden Lysins zeigt [34]. Daher weisen die beiden Modellenzyme auch hier einen Unterschied auf. TalB gehört zu der Gruppe „*co-aligned*“ und FSAA zu der Gruppe „*opposite faced*“ (siehe Abb. 1.12, [4])

### 9.1.8 Postulierter Mechanismus

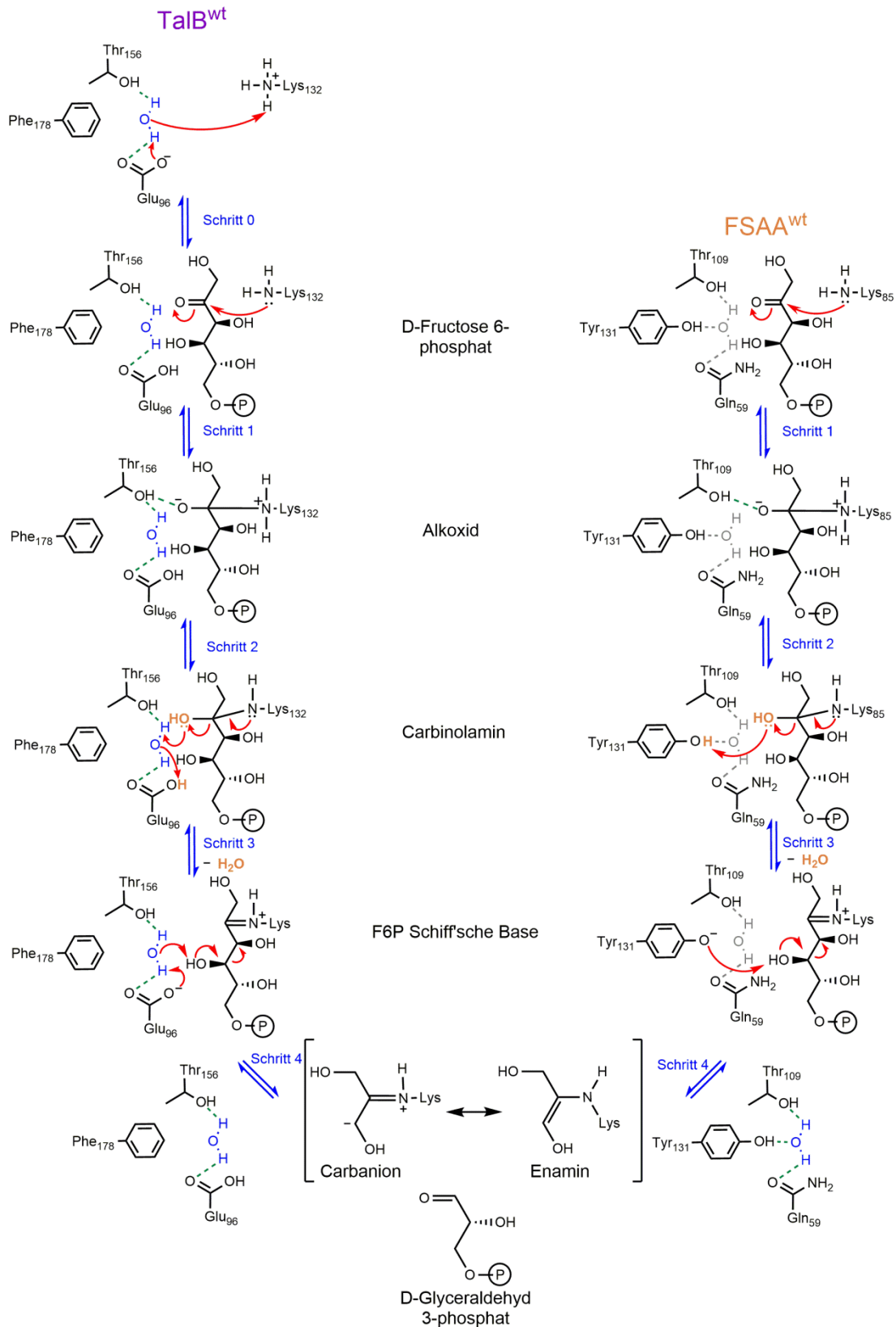
Die diskutierten Ergebnisse resultieren in einem neuen postulierten Mechanismus für die FSAA und einer Anpassung für die TalB (siehe Abb. 4.4), sowie in einer Aktualisierung der Übersicht über die katalytischen Reste (siehe Tab. 4.2):

#### *Schritt 0*

In der TalB liegt das Lysin geladen vor (siehe 9.1.3). Aufgrund dessen muss der Eingangsschritt 0 ablaufen, im Gegensatz zu der FSAA, wo das Lysin neutral vorliegt. Dabei wird vermittelt über das katalytisch aktive Wassermolekül eine Deprotonierung des Lysins durch den negativ geladenen Rest Glu96 vollzogen [4].

#### *Schritt 1*

Das Thr156 in der TalB bzw. Thr109 in der FSAA bildet eine Wasserstoffbrücke zum Carbonyl von C2 aus und positioniert das Substrat korrekt für den nukleophilen Angriff (siehe 9.1.7). Zudem wird die Positionierung des Donorsubstrates über H-Brücken zu C3-OH und C5-OH durch Asp17 in der TalB bzw. Asp6 in der FSAA in Kombination mit Thr33 bzw. Thr26 beeinflusst (siehe 9.1.6, dies ist in Abb. 4.4 nicht gezeigt). Somit kann der nukleophile Angriff des freien Elektronenpaares von Lys132 auf das elektrophile Kohlenstoffatom C2 des Donorsubstrates D-F6P erfolgen. Das entstandene bipolare Alkoxid wird durch das Thr156 in der TalB bzw. Thr106 in der FSAA stabilisiert (siehe 9.1.7, ergänzt [4,10]).



**Abb. 4.4: Postulierter Mechanismus für die FSAA (rechte Spalte) und TalB (linke Spalte)**

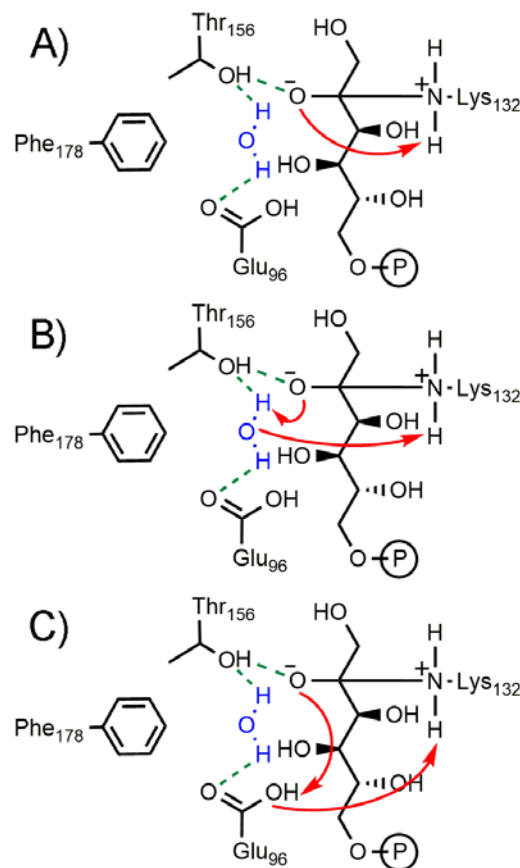
Das Wasserstoffbrückennetzwerk des katalytischen Wassermoleküls (blau) mit H-Brücken (grün) als grün gestrichelte Linien dargestellt. Der Protonierungsstatus der katalytischen Reste ist unter Assaybedingungen (pH 8,5) abgebildet. Die Reaktionsschritte der Wassereliminierung (orange),

Weiterführende Legende zur vorhergehenden Abbildung:

Bildung des Schiff'schen Base Intermediates und die Freisetzung des ersten Produktes werden gezeigt. Die Reaktion der FSAAs kann direkt durch das Tyr131 als Säure-Base-Katalysator vollzogen werden. In der TalB hingegen ist das katalytische Wasser als Mediator zwischen Substrat und Protonendonator Glu96 notwendig [4].

### Schritt 2

Es folgt der Ladungsausgleich des bipolaren Alkoxides zum Carbinolamin, wobei das NH<sub>2</sub>R als Protonenquelle verwendet wird. Für diesen Schritt gibt es mehrere Möglichkeiten: Zum einen kann die Protonierung direkt ablaufen (siehe Abb. 4.5 A, [5,33,34]). Zum anderen ist eine Vermittlung über das katalytische Wassermolekül (siehe Abb. 4.5 B, [6]) oder den Säure-Base-Katalysator Glu96 bzw. Tyr131 (siehe Abb. 4.5 C und siehe 9.1.7, [34]) denkbar [4].



**Abb. 4.5: Mögliche Protonierungswege des Alkoxides in TalB**

Direkt (A) [5,33,34] vermittelt durch das katalytische Wassermolekül (B) [6] und vermittelt durch den Säure-Base-Katalysator (C) [34]. Bereits veröffentlicht in [176].

### Schritt 3

Zur Bildung der Abgangsgruppe Wasser wird die C2-OH-Gruppe protoniert. In der TalB ist Glu96 der Protonendonator wohingegen in der FSAAs das Tyr131 diese Rolle übernimmt. Zudem erfolgt dieser Schritt in der TalB vermittelt über das katalytische Wassermolekül. In

der FSAA agiert der Protonendonor Tyr131 direkt (siehe 9.1.7). Im Anschluss wird ein Wassermolekül eliminiert und das Schiff'sche Base Intermediat gebildet [4].

#### *Schritt 4*

Das gebildete Schiff'sche Base Intermediat wird am C4-OH deprotoniert. Hierdurch wird das erste Produkt D-GAP durch heterolytische Spaltung freigesetzt. In der TalB stellt Glu96 die Base vermittelt über das katalytische Wassermolekül. In der FSAA erfolgt dieser Schritt katalysiert durch das Tyr131 direkt (siehe 9.1.7). Die Glyceryl-Einheit verbleibt resonanzstabilisiert als Carbanion bzw. Enamin am katalytischen Lysin gebunden [4].

#### *Weitere Schritte*

In der Transaldolase wird die verbleibende Glyceryl-Einheit auf den Akzeptor übertragen. Solange verbleibt dieser resonanzstabilisiert am Lysin. Das C3 des Enamins ist für eine Protonierung durch die „Glu-Wasser-Dyade“ geringfügig zu weit entfernt und erklärt somit die Stabilität des Enamins. Basierend auf der Kristallstruktur von TalB<sup>wt</sup> als Schiff'sche Base Intermediat mit DHA [5] beträgt der Abstand ca. 3,7 Å [34]. Bei der Positionierung des Akzeptors und der Stabilisierung des Enamins ist Asp17 in der TalB durch Wasserstoffbrückenbindung beteiligt (siehe 9.1.6). Ist der Akzeptor D-E4P gebunden, reagiert das Enamin mit der Carbonylfunktion und der abgebildete Mechanismus läuft in umgekehrter Reihenfolge ab (nicht in Abb. 4.4 gezeigt). Somit wird in der zweiten Halbreaktion die Glyceryl-Einheit übertragen und es entsteht als zweites Produkt D-S7P [3,5,6].

In der FSAA wird dagegen bei der Spaltung die Glyceryl-Einheit als zweites Produkt freigesetzt und nicht übertragen. Wahrscheinlich weist das Intermediat eine geringere Stabilität als in der TalB auf [2]. Für die Hydrolyse wird das Carbanion durch Tyr131 protoniert, wodurch ein DHA Schiff'sche Base Intermediat entsteht. Dies ist nicht in der Lage, einen nukleophilen Angriff auf einen Akzeptor zu vollziehen. Im Anschluss wird das zweite Produkt DHA vom aktiven Lysin abgespalten (nicht in Abb. 4.4 gezeigt, [34,35,183]).

**Tab. 4.2: Aktualisierte Übersicht über die katalytischen Reste der FSAA und TalB**

Aufgeführt sind die Funktionen und die Konservierung der Aminosäurereste. Die entsprechenden Reste der FSAA im Vergleich zur TalB wurden über Strukturalignment (FSAA, PDB Code 1L6W [2] und TalB PDB 1ONR [3],) bestimmt. Konservierungsanalyse der SF1 basierend auf der TALED mit 1185 Transaldolasesequenzen und der SF5 basierend auf der TALED [48] mit 246 Sequenzen (persönliche Mitteilung Lorenz). Die neuen Erkenntnisse sind in rot dargestellt.

<u>TalB</u>			<u>FSAA</u>		
Konserv. [%]	Rest	Funktion	Rest	Konserv. [%]	
95	Asp17	Wasserstoffbrücke zur Hydroxylgruppe des C3-OH und <b>C5-OH</b> – Positionierung des Substrates, <b>keine Deprotonierung zur Bildung des Schiff'sche Base Intermediates</b> (Schritt 4), Stabilisierung Carbanion/Enamin, Bindung des Akzeptorsubstrates	Asp6	98	
97	Thr33	Wasserstoffbrücke zu Asp17 für optimale räumliche Ausrichtung von Asp17	Thr26	99	
97	Asn35	Wasserstoffbrücke zur Hydroxylgruppe des C3-OH, <b>keine Bindung katalytischen Wasser</b>	Asn28	99	
92	Pro36		<b>Hydrophober Anker von Phe207 der nächsten Untereinheit</b>	Pro29	99
93	Ser94	<b>Hydrophile Umgebung von Lys132</b>	<b>Hydrophobe Umgebung von Lys85</b>	Phe57	69
93	Glu96	Wasserstoffbrücke zum katalytischen Wasser, Säure-Base-Katalysator – Protonentransfer <b>einschließlich Deprotonierung der C4-OH</b>	Wasserstoffbrücke zum katalytischen Wasser	Gln59	99
100	Lys132	Schiff'sche Base Intermediat bildendes Lysin	Lys85	100	
86	Ala134		<b>Hydrophober Anker von Phe207 der nächsten Untereinheit</b>	Pro87	99
93	Asn154	Wasserstoffbrücke zur Hydroxylgruppe des C1-OH, Bindung Donorsubstrat, <b>Hydrophile Umgebung von Lys132</b>	<b>Hydrophobe Umgebung von Lys85</b>	Leu107	76
99	Thr156	Wasserstoffbrücke zum katalytischen Wasser Stabilisation Alkoxid, <b>Substratbindung</b>	Thr109	100	

<u>TalB</u>			<u>FSAA</u>		
Konserv. [%]	Rest	Funktion		Rest	Konserv. [%]
96	Ser176	Wasserstoffbrücke zur Hydroxylgruppe des C1-OH, Bindung Donorsubstrat	-	Ala129	99
93	Phe178	-	Wasserstoffbrücke zum katalytischen Wasser, Säure-Base-Katalysator – Protonentransfer ohne Vermittlung über das Wasser	Tyr131	100
93	Arg181	Phosphatbindung	Phosphatbindung, Beeinflussung des pK <sub>a</sub> -Wertes von Tyr131	Arg134	99
88	Met222	Platzrestriktion Substrat		Leu163	90
98	Ala225	Beteiligung an der Akzeptor-Bindetasche		Ala165	99
97	Ser226	Phosphatbindung		Ser166	99
93	Arg228	Phosphatbindung		Lys168	86
	-		Hydrophober Anker in der vorangegangenen Untereinheit	Phe207	98
	-		Hydrophober Anker in der vorangegangenen Untereinheit	Trp211	76
	-		Hydrophober Anker in der vorangegangenen Untereinheit	Phe215	67
72	Arg300	Dimerisierung		-	

## 9.2 Versuch der Einführung einer Transaldolaseaktivität im Aldolasegrundgerüst

Die beiden Modellenzyme FSAA und TalB weisen einige Gemeinsamkeiten auf (siehe 5.5.1). Trotz hoher Ähnlichkeit des 3D-Aufbaus und der aktiven Reste unterscheiden sich die Mechanismen der Transferase und der Aldolase (siehe 9.1.8). Mit den Varianten TalB<sup>F178Y</sup> [1] und TalB<sup>E96Q F178Y</sup> [4] ist es gelungen, auf dem Transaldolasegrundgerüst F6P-Aldolaseaktivität einzuführen, sowie die WT-Aktivität auf 5 % der ursprünglichen Aktivität zu senken. Es gelang bisher jedoch noch nicht das Aldolasegrundgerüst so zu ändern, dass Transaldolaseaktivität vorlag. Hierbei wurden die Wasserstoffbrückenbildenden Reste zum aktiven Wasser ausgetauscht. Da die beiden Modellenzyme nur eine Sequenzübereinstimmung von 27 % besitzen, ist das Auffinden von Mutagenesestellen erschwert (siehe Abb. 1.11). Im Vergleich dazu liegt die Sequenzübereinstimmung zwischen FSAA und BsTal bei 32 %. Die stärkere Ähnlichkeit von BsTal und FSAA spiegelt sich ebenfalls in dem Protein-Ähnlichkeitsnetzwerk (siehe Abb. 1.5) wieder, in welchem die beiden Enzyme bzw. SF gemeinsam in Cluster A aufzufinden sind. Die Sequenzmotive, -vergleiche und deren statistischer Häufigkeit wurden zur Auffindung von Mutagenesestellen verwendet (siehe Abb. 3.13 bis Abb. 3.15). Feinabstimmungen um das Tyr an nicht konservierten Stellen und in der zweiten Schale könnten für die Transaldolaseaktivität im Aldolasegrundgerüst entscheidend sein. Basis der Untersuchungen waren u.a. die FSAA-Varianten FSAA<sup>Q59E</sup> und FSAA<sup>Q59E Y131F</sup> [4,78] aus der ersten Stufe (siehe 8.1 und 9.1.1).

### 9.2.1 Auswahl der Mutagenesestellen und Enzympräparationen

Zuerst wurde der Stand der Wissenschaft für die FSAA aus der Bioinformatik und der Strukturbiologie ausgewertet. Hierzu wurden Sequenz-/Strukturvergleiche und Sequenzmotive erstellt (siehe 8.3). Alle neuen Varianten sollten den Transaldolase-Säure-Base-Katalysator Glu (siehe Tab. 1.5) enthalten und keinen Säure-Base-Katalysator der FSAA (siehe 9.1.6), weshalb die FSA<sup>Q59E Y131F</sup> als Basis diene. Eine Ausnahme stellten die Varianten auf Basis der potenziellen Transaldolase LmbR [46] dar. Als Resultat entstanden verschiedene Ideen:

Die Sequenzmotive mit Berücksichtigung der Wahrscheinlichkeit des Vorkommens zwischen der SF1 der TalB und der SF5 der FSAA wiesen auf eine Bedeutung der Stellen Ala129 und Asn133 hin. Der Austausch des Ala zu Ser in der FSAA ist bereits bekannt. Das Ser besitzt die Funktion, eine Wasserstoffbrücke zur Hydroxylgruppe des C1-OH auszubilden [37,62]. Ein Austausch des Asn133 war noch nicht beschrieben. Weiter war



die Idee, eine Aldolasechimäre mit dem  $\beta$ 6-Faltblatt der Transaldolase *Bacillus subtilis* [41] zu erstellen. Hierauf basierend waren die Reste Ala129 und Tyr131 zusätzlich zum Transaldolasedonor Mutageneseziele. Weiter sollten die Auswirkungen des hydrophoben Clusters aus der TalB bzw. hTal [36] untersucht werden, indem dieses in der FSAA durch gezielten Austausch Y112F und Y131F generiert wird. Eine Mutation des Tyr112 ist, soweit bekannt, noch nicht durchgeführt worden. Um synergistische Effekte zu nutzen, wurde abschließend noch die Vierfach-Variante FSAA<sup>Q59E A129S Y131F N133G</sup> erstellt. Zudem fungierte die potentielle Transaldolase LmbR [46] als Vorbild. Diese potenzielle Transaldolase weist an Stelle des Protonendonors ein Leu auf. Daher wurden die Variante FSAA<sup>Y131L</sup> generiert. Die neu Variante FSAA<sup>Q59E Y131L</sup> enthält das Leu aus der LmbR mit dem Transaldolase-Protonendonor der TalB. Zusammenfassend wurde als Ziel die Generierung der Varianten FSAA<sup>Y131L</sup>, FSAA<sup>Q59E Y131L</sup>, FSAA<sup>Q59E A129S Y131F</sup>, FSAA<sup>Q59E Y112F Y131F</sup>, FSAA<sup>Q59E Y131F N133G</sup> und FSAA<sup>Q59E A129S Y131F N133G</sup> angestrebt.

Alle neuen Muteine mit His<sub>6</sub>-Tag konnten erfolgreich exprimiert und aufkonzentriert werden. Die Ausbeuten lagen dabei zwischen 10 % und 30 %, ähnlich zur FSAA<sup>wt</sup> mit 26 %. Nach Aufkonzentrierung besaßen alle Proteine eine Reinheit von  $\geq 98$  % (siehe Abb. 3.2). Die erzielten Reinheiten entsprechen damit den Aufkonzentrierungen des WT ohne His<sub>6</sub>-Tag aus der Literatur [1,49].

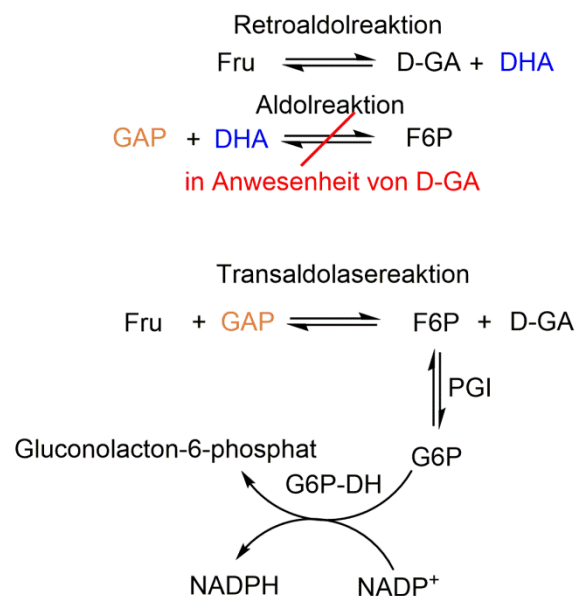
### 9.2.2 Einführung einer Transaldolaseaktivität?

Die besondere Schwierigkeit liegt im Nachweis der Transaldolaseaktivität bei gleichzeitigem Vorliegen einer F6P-Aktivität. Bei Versuchen mit FSAA<sup>wt</sup> im Rohextrakt war die spezifische F6P-Aktivität mit D-F6P genauso hoch wie bei der Verwendung der Substrate D-F6P und D-E4P zum Nachweis der Transaldolaseaktivität [37]. Problematisch hierbei ist, dass der Nachweis über das Substrat D-GAP erfolgt. Dies wird bei der Transaldolasereaktion aus D-F6P und D-E4P, sowie bei der Retroaldolspaltung der FSAA gebildet. Daher kann mit dem bisher bekannten Nachweis nicht zwischen Aldolase und Transaldolase unterschieden werden. Diese Schwierigkeit wurde in der Literatur beschrieben [35].

In der vorliegenden Arbeit wurde der Transaldolaseassay ausgehend von den beiden Substraten D-S7P und D/L-GAP angewendet. Die Detektion erfolgt enzymgekoppelt über den Nachweis von NADPH unter der Voraussetzung, dass D-F6P gebildet wird (siehe Abb. 2.3). Liegt ebenfalls F6P-Aldolaseaktivität vor, kann in einer Retroaldolreaktion D-S7P zu DHA und D-E4P gespalten werden. Somit würden DHA und D-GAP zur Bildung von D-F6P über die Aldolaseaktivität vorliegen (siehe Abb. 3.17). Damit kann auch dieser

Nachweis falsch-positiv sein. Daher wurde zusätzlich die Retroaldolaktivität der Varianten getestet. Damit die Spaltungen von D-S7P und D-F6P besser vergleichbar sind, wurden diese mit dem gleichen Kopplungsenzym, der GldA, untersucht.

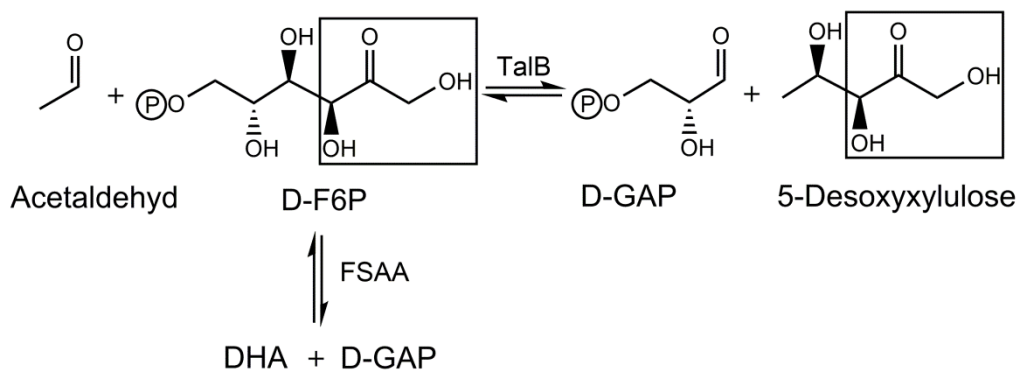
Als Transaldolasesubstrate kämen auch Fructose und D-GAP zu Synthese von D-F6P und D-GA in Frage [23]. Fructose kann ebenso in einer Retroaldolreaktion mit einer spezifischen Aktivität von FSAA<sup>WT</sup> 0,01 U/mg zu DHA und D-GA gespalten werden (siehe Abb. 4.6., [37]). Somit würden DHA (blau) und D-GAP (orange) zur Bildung von D-F6P vorliegen. In Anwesenheit von D-GA und DHA kam es zu einer kompetitiven Inhibition des Umsatzes von DHA mit D-GAP (siehe 8.4.3). Dies spricht dafür, dass D-GA in der Donorbinderegion mit einer höheren Affinität als DHA bindet. Somit kann DHA in Anwesenheit von D-GA nicht an die Donorbindestelle binden. D-F6P kann daher nicht aus der F6P-Aldolaseaktivität aus DHA und D-GAP in Anwesenheit von D-GA gebildet werden. Für einen eindeutigen Nachweis einer Transaldolaseaktivität wäre jedoch eine D-GA Konzentration oberhalb des K<sub>i</sub> von 29 µM notwendig. Ferner müsste für Fructose eine höhere Affinität als zu D-GA vorliegen. Die spezifische Retroaldolaktivität für D-S7P von FSAA<sup>WT</sup> liegt mit 2,3 U/mg höher als für Fructose. Basierend darauf wäre die Aussagekraft des Transaldolaseassays mit Fructose und D-GAP besser als mit D-S7P und D-GAP. Dies wurde jedoch nicht durchgeführt.



**Abb. 4.6: Möglicher Transaldolaseassay ohne falsch-positiven Aktivitätsnachweis**

D-GAP (orange) aus der Transaldolaseaktivität stammend. DHA (blau) aus der Retroaldolaseaktivität stammende unerwünschte Nebenreaktion. Kompetitive Inhibition der Aldolaseaktivität zur Bildung von D-F6P in Anwesenheit von D-GA und DHA, wodurch ein falsch-positiver Aktivitätsnachweis für die Transferreaktion entstünde.

Eine weitere Möglichkeit der Untersuchung auf Transaldolaseaktivität wäre der Umsatz von Acetaldehyd (Ethanal). TalB akzeptiert Acetaldehyd wobei 5-Desoxyxylulose entsteht, auch wenn  $V_{\max}$  lediglich 1 % der WT-Aktivität des Umsatzes von D-E4P und D-F6P beträgt [30]. Acetaldehyd ist jedoch nach bestem Wissen nicht als Substrat für die FSAA<sup>wt</sup> bekannt. Diese Ausnahme wurde von Junker 2018 publiziert [184]. Die 2-Desoxyribose-5-phosphate Aldolase (DERA), welche seit 1951 bekannt ist, katalysiert hingegen den Umsatz der beiden Aldehyde Acetaldehyd und D-GAP [200–202]. Das durch Retroaldolaktivität (siehe Abb. 4.7) entstehenden Substrat DHA könnten als Donor fungieren und einen kompetitiven Inhibitor darstellen, jedoch ist die Affinität von FSAA zu D-F6P höher. Eine Bindung von Acetaldehyd als Schiff'sche Base kann aufgrund seiner Polarität ebenfalls nicht ausgeschlossen werden [184]. Dies könnte nach Präinkubation von FSAA mit Acetaldehyd über eine Reduktion (siehe 7.9.1) mit anschließenden LC-ESI-MS-Messungen überprüft werden (siehe 7.8.2). Zudem ist für FSAA-Varianten (FSAA<sup>D6H</sup> [57], FSAA mit Modifikationen an Asp6, Leu107, Leu163, A168 als Einzel-/Doppelvarianten und FSAA<sup>L107Y A129G R134S A165G S166G</sup> [69]) der Umsatz von Acetaldehyd gezeigt worden. Bei Mutationen für die Einführung einer Transaldolaseaktivität könnte Acetaldehyd als Aldolasesubstrat zugänglich gemacht werden, wodurch der Nachweis nicht eindeutig wäre. Final wäre mit diesem Ansatz die direkte Detektion von 5-Desoxyxylulose mittels Dünnschichtchromatographie (Anisaldehyd) oder Hochleistungsflüssigkeitschromatographie als Nachweis für Transaldolaseaktivität möglich. Die Abnahme von Acetaldehyd wäre ebenfalls eine Detektionsmöglichkeit, beispielsweise mit Hilfe der Aldehyd-Dehydrogenase. Dies wurde jedoch nicht durchgeführt. Ferner bleiben die Möglichkeiten der direkten Detektion über Massenspektrometrie, sowie ein Nachweis mittels C<sup>13</sup>-Markierung.



**Abb. 4.7: Mögliche Transaldolasereaktion ohne falsch-positiven Nachweis durch Anwendung von Acetaldehyd**

Wichtig war bei dem in dieser Arbeit durchgeführten Transaldolaseassay, den WT als Kontrolle mitzuführen. Damit alle Aktivitäten unter gleichen Bedingungen mit wenig Material untersucht werden konnten, wurde der Transaldolaseassay erfolgreich auf den Mikrotiterplattenmaßstab übertragen. Die Versuchsbedingungen sind in 7.5.7 dargelegt.

Die FSAA<sup>wt</sup> ist in der Lage D-F6P zu bilden [49], sowie D-S7P [37] und D-F6P [49] zu spalten. Diese Aktivität konnte enzymatisch gekoppelt über die Bildung von D-F6P oder über die Bildung von DHA als Positivkontrolle im Mikrotiterplattenmaßstab detektiert werden (siehe Tab. 3.9).

Eine spezifische Aldolaseaktivität von ~ 1 % (0,08 bzw. 0,07 U/mg) für die Bildung von D-F6P konnte lediglich für die Varianten FSAA<sup>Q59E A129S Y131F</sup> und FSAA<sup>Q59E Y131F N133G</sup> indirekt über NADPH nachgewiesen werden. Interessanterweise konnte zuvor in der Variante FSAA<sup>Q59E Y131F</sup> im Küvettenmaßstab keine Aktivität nachgewiesen werden (siehe Tab. 3.2). Als Ursache hierfür wurde das Fehlen des generellen Säure-Basen-Katalysators Tyr angenommen (siehe 9.1.7). Inwieweit der neue Protonendonator Glu diese Funktion zum Teil in der Aldolaseaktivität übernehmen kann ist offen. Die Substratkonzentrationen (D/L-GAP 2,8 mM und DHA 50 mM) entsprachen sich und lagen um den sättigenden Bereich für die FSAA<sup>wt</sup> ( $K_m$ -Wert für D/L-GAP 1,9 mM [38], D-GAP 0,9 mM [49] und 62 mM DHA [1]). Jedoch wurden die Temperatur von 28 °C auf 30 °C erhöht, sowie die Enzymkonzentration und der Maßstab geändert. Eine Retroaldolaktivität war für alle Varianten nicht detektierbar. Ob die nicht nachweisbare F6P-Aldolaseaktivität durch Änderungen des 3D-Aufbaus verursacht wird oder durch die ausgetauschten Aminosäuren, wurde nicht überprüft.

Für die Transaldolaseaktivität wurde D-S7P und D/L-GAP im gekoppelten Enzymassay eingesetzt. Hierbei zeigt die Positivkontrolle TalB<sup>wt</sup> wie in der Literatur beschrieben eine spezifische Aktivität [23]. In dem so durchgeführten Transaldolaseassay zeigt die FSAA<sup>wt</sup> keine nachweisbare Aktivität. Für die beiden Varianten FSAA<sup>Q59E A129S Y131F</sup> und FSAA<sup>Q59E Y131F N133G</sup> konnte unter den gleichen Bedingungen eine Transaldolaseaktivität indirekt über NADPH nachgewiesen werden. Die Transaldolaseaktivitäten liegen mit 0,9 mM D-S7P bei  $0,08 \pm 0,02$  U/mg, bzw.  $0,07 \pm 0,02$  U/mg. Dies lag auch unter Berücksichtigung der Standardabweichung über der Nachweisgrenze von 0,03 U/mg und war daher als signifikant zu betrachten. Die Reinheit von D-S7P lag im Durchschnitt bei 79 % (siehe 7.7.1). Ein Restgehalt von Rib5P und HPA war daher nicht auszuschließen. Für Rib5P mit FSAA<sup>wt</sup> wurde keine Retroaldolaktivität gezeigt [49]. In einer Enzymkaskade unter der Anwendung einer Transaminase und FSAA<sup>wt</sup> wurden die Substrate (HPA und Aldehyd) für die weitere Umsetzung mittels Transketolase zu

(3S,4S) Ketosen hergestellt. Dabei wurden die Aldehyde lediglich aufgrund der Nebenreaktion der Transaminase mit dieser separat hergestellt [203]. Zudem wurden Aldolasen gesucht, welche in der Lage sind, HPA umzusetzen. Obwohl FSAA als Kandidat in Frage kam, stellte FSAA im weiteren Verlauf der Untersuchung keinen Treffer da. Dies könnte auch durch die Klonierungs- oder Aufkonzentrierungsbedingungen begründet sein [204]. HPA stellt daher wahrscheinlich kein Substrat für die FSAA dar.

Der  $K_m$ -Wert für D-F6P unterscheidet sich zwischen TalB (1,2 mM, [23]) und FSAA (19 mM, [4]) um eine Größenordnung. Dies könnte ebenfalls für das Substrat D-S7P aus dem Transaldolaseassay zutreffen. Hierzu wurde erstmals der  $K_m$ -Wert von D-S7P für die FSAA<sup>wt</sup> mit 19 mM bestimmt. Für die FSAA<sup>wt</sup> lag die D-S7P-Konzentration damit weit unter dem  $K_m$ -Wert und war nicht sättigend. Somit war die Geschwindigkeit des Umsatzes geringer als die halbe  $V_{max}$ . Damit könnte ein geringerer Absorptionsanstieg (Bildung NADPH gekoppelt an die Bildung von D-F6P aus D-S7P) innerhalb Messzeit von max. 10 Min einhergehen. Nicht sättigende Bedingungen könnten daher auch für die Kopplungsenzyme vorgelegen haben. Lediglich der  $K_M$ -Wert (G6P) von 0,7 mM für die PGI konnte bei Roche in Erfahrung gebracht werden [111]. Eine längere Reaktionszeit oder eine Vorinkubation könnte daher eine bessere Aussagekraft besitzen. Zudem könnte eine höhere Proteinkonzentration eingesetzt werden. Der  $K_m$ -Wert für TalB beträgt 0,3 mM [23] und ist somit ähnlich wie bei den  $K_m$ -Werten für D-F6P um eine Größenordnung niedriger. In Enzymen mit Transaldolase- und Aldolaseaktivität sollte eine Verringerung der Substratkonzentration an D-S7P daher die Transaldolasereaktion gegenüber der Aldolaseaktivität begünstigen. Zudem wurde zum Vergleich der hitzedenaturierte WT als Negativkontrolle eingesetzt. In dieser Konstellation zeigten die FSAA<sup>wt</sup> und der hitzedenaturierte WT eine spezifische Aktivität um die Nachweisgrenze von 0,01 U/mg. Auch mit geringerer Substratkonzentration zeigen die beiden Varianten einen Absorptionsanstieg (mögliche Transaldolaseaktivität) oberhalb der Nachweisgrenze (siehe Tab. 3.10). Jedoch ist die Abnahme durch geringere Substratkonzentration nicht analog zur TalB<sup>wt</sup>.

Dennoch lassen diese Ergebnisse vermuten, dass es erstmals gelungen ist, Transaldolaseaktivität in der FSAA einzuführen. Dies würde die Theorie unterstützen, dass die F6P-Aldolasen evolutionär enger mit den Transaldolasen verwandt sind [28].

Die Variante FSAA<sup>Q59E A129S Y131F</sup> legt nahe, dass nicht nur der Austausch des Säure-Basen-Katalysators, sondern auch die Wasserstoffbrücke von Ser129 zur Hydroxylgruppe des C1-OH von Bedeutung ist. Diese ist wesentlich für die Bindung des Donorsubstrates.

Eine Verbesserung des Umsatzes von DHA ist für die FSAA<sup>A129S</sup> beschrieben [78]. Zudem könnte Ser das Enamin in der FSAA stabilisieren, sodass eine Transferreaktion möglich ist. Wasserstoffbrücken zum C1-OH sind in der TalB durch die Reste Asn154 [37] und Ser176 [6,30] möglich. Die entsprechenden Reste in der FSAA (Leu und Ala) können diese Wechselwirkung nicht eingehen. Die FSAA<sup>Q59E Y131F N133G</sup> besitzt zusätzlich zum Transaldolasen-Protonendonator noch den Austausch N133G. Dieser wurde auf Basis der Sequenzmotive der zwei unterschiedlichen SF ausgetauscht bzw. ist auch bei der Aldolasechimäre (Austausch des  $\beta$ 6-Faltblattes) ein Austausch kandidat (siehe 8.3.1). Sowohl die BsTal als auch die TalB weisen sequenzbasiert an dieser Stelle ein Gly auf. Gly ist in der Nähe der Phosphatbindestelle lokalisiert. Dies könnte zu einer Optimierung der Phosphatbindestelle durch geringere Platzrestriktion führen. So könnte der Akzeptor schneller gebunden werden, wodurch die Glyceryl-Einheit anstelle der Freisetzung von DHA übertragen werden könnte. Eine Überprüfung des  $K_m$ -Wertes für den Akzeptor erfolgte jedoch aus Zeitgründen nicht. Die FSAA<sup>Q59E A129S Y131F N133G</sup>, welche die Kombination aus den beiden positiven Muteinen darstellt, zeigt keine nachweisbare Aktivität. Ein synergistischer Effekt ist nicht aufgetreten. Möglich wäre eine Änderung des 3D-Aufbaus als Ursache. Dies wurde jedoch nicht geprüft.

### 9.3 Tagatose-6-phosphat – Furanringbildung am aktiven Lysinrest

D-T6P mit der 4S Stereokonfiguration ist ein Epimer zum natürlichen Substrat D-F6P mit 4R Stereokonfiguration der Transaldolase TalB und Fructose-6-phosphat-Aldolase FSAA. Die beiden Zuckerphosphate unterscheiden sich lediglich in einem Stereozentrum (Abb. 1.13). Beide Modellenzyme sind strikt stereoselektiv für 3S,4R. Um weitere Informationen über die Stereoselektivität, die Funktionalität der aktiven Reste und den Mechanismus zu gewinnen, wurde die Auswirkung von D-T6P auf die Aktivität näher untersucht. Bereits bekannt ist, dass D-T6P kein Substrat für TalB<sup>wt</sup> und deren Variante(n) darstellt [97]. Für die Variante TalB<sup>F178Y</sup> ist D-T6P ein irreversibler Inhibitor in Bezug auf die Transaldolase- und F6P-Aldolaseaktivität [29]. Ziel dieser Arbeit war es daher, vor allem die Auswirkungen auf die F6P-Aldolaseaktivität zu untersuchen. Dies erfolgte an der neuen Doppelvariante TalB<sup>E96Q F178Y</sup> mit verbesserter Aldolaseaktivität, sowie FSAA und der FSAA Variante Ala129Ser. Die FSAA<sup>A129S</sup> wurde aufgrund ihrer verbesserten katalytischen Effizienz beim Umsatz von DHA, und damit größerer Ähnlichkeit zu TalB<sup>wt</sup>, herangezogen [37,62]. Die hTal wurde verwendet, um auch Organismus-übergreifende Aussagen treffen zu können. Große Teile dieser Ergebnisse und Diskussion wurden bereits veröffentlicht unter Stellmacher et al. ([10] bzw. [181]).

Für die Analyse konnte D-T6P erfolgreich synthetisiert werden (siehe 8.4.1). Inzwischen ist D-T6P auch kommerziell als Lithiumsalz mit einer Reinheit von  $\geq 95\%$  (TLC) erhältlich [205]. Diese Reinheit entspricht der bestimmten Reinheit des hier vorliegenden Syntheseansatzes von  $\geq 95\%$  (Interpretation der NMR Daten durch Fessner, TU Darmstadt, Deutschland) [10].

#### 9.3.1 Zeitabhängige irreversible Inhibition

Eine direkte Vergleichbarkeit der Ergebnisse der Auswirkung auf die Transaldolaseaktivität der TalB von S. Schneider [29] ist nicht möglich, da die D-E4P nicht mehr zugänglich war. Somit musste die Transaldolaseaktivität in der vorliegenden Arbeit über die Bildung von D-F6P bestimmt werden. Dennoch konnte in Übereinstimmung gezeigt werden, dass TalB<sup>wt</sup> nicht durch D-T6P inhibiert wird. Zudem wurde belegt, dass Organismus-übergreifend die hTal ebenfalls nicht durch D-T6P inhibiert wird [10].

Für die Auswirkungen auf die Aldolaseaktivität wurde, wie auch bei S. Schneider [29], die Retroaldolaktivität (Spaltung D-F6P) untersucht. Dabei wurden die Assay-Bedingungen optimiert auf TalB<sup>E96Q F178Y</sup> angewendet. So wurde unter anderem mit 5 mM D-F6P im sättigenden Bereich gearbeitet (TalB<sup>E96Q F178Y</sup>  $K_m$  von 2,3 mM, Tab. 3.3). Zudem wurden die Enzymkonzentrationen so gewählt, dass ausreichend Messpunkte vorlagen, um

jeweils die Anfangssteigungen zu ermitteln. Somit ergaben sich im Vergleich zu S. Schneider [29] Abweichungen (10 mM D-F6P, 46  $\mu$ M TalB<sup>F178Y</sup>) zur Ermittlung der Inhibition auf TalB<sup>F178Y</sup>. Zur genaueren Charakterisierung des inhibitorischen Verhaltens wurde die verbliebene spezifische Aktivität gegen die Zeit aufgetragen und einem exponentiellen Fit unterzogen (siehe Abb. 3.19). Weiter wurden daraus die Halbwertszeiten berechnet (siehe Tab. 3.11) und eine Sekundärauftragung nach der Kitz-Wilson-Formel vorgenommen (siehe exemplarisch für TalB<sup>F178Y</sup> Abb. 3.21). Eine mathematische Auswertung fand erstmalig statt.

Alle Enzyme mit F6P-Aldolaseaktivität wurden von D-T6P inhibiert. Die Inhibition weist folgende zeitabhängige Reihenfolge auf: TalB<sup>E96Q F178Y</sup> > TalB<sup>F178Y</sup> > FSAA<sup>wt</sup> > FSAA<sup>A129S</sup>. Die hTalF<sup>189Y</sup> war nicht lange genug stabil, um Aussagen über den Einfluss von D-T6P zu treffen. TalB<sup>F178Y</sup> wurde bereits bei äquimolarer Konzentration (0,14 mM) von D-T6P inhibiert [10]. Eine Aktivitätsabnahme bei äquimolarer Konzentration wurde in der Vergangenheit nicht beobachtet [29]. Dies kann in den bereits genannten Unterschieden begründet sein. Bestätigt wurde, dass durch die Verdünnung 1:50 der Präinkubation und eine erneute Inkubation die Inhibition nicht aufgehoben werden konnte. Die Irreversibilität der Inhibition deutet darauf hin, dass D-T6P fest bindet. Die Bindung von einem Äquivalent D-T6P je Untereinheit konnte für alle inhibierten Enzyme mittels LC-ESI-MS belegt werden. Da die Hauptsignale alle um ca. 242 Da (siehe Tab. 3.13) verschoben waren, wird bei der Bindung ein Wassermolekül eliminiert [10]. Für TalB<sup>F178Y</sup> wurde die Bindung an Hand eines Trypsin-Verdau mit anschließender Massenspektrometrie gezeigt [29]. Zudem legt diese Untersuchung mittels Verdau nahe, dass D-T6P an das katalytische Lys132 gebunden, aber nicht umgesetzt wird, beispielsweise als Schiff'sche Base [97]. Da alle Enzyme mit F6P-Aldolaseaktivität inhibiert werden, weist dies auf eine Rolle des Säure-Base-Katalysator Tyr178 in den TalB-Varianten bzw. Tyr131 in der FSAA-Variante bei der Bindung von D-T6P hin. Durch die Auftragung nach Kitz-Wilson (siehe 7.8.1 und Abb. 3.21) konnte ein weiterer Aufschluss über die Art der Inhibierung gewonnen werden. Im ersten Schritt wird ein reversibler Enzym-Inhibitor-Komplex gebildet, welcher sich erst im Anschluss in einen irreversiblen Komplex umformt [10]. Die Reihenfolge der Inhibition könnte darauf hindeuten, dass Ser129 in der FSAA<sup>A129S</sup> einen stabilisierenden Effekt auf den reversiblen Enzym-Inhibitor-Komplex hat.

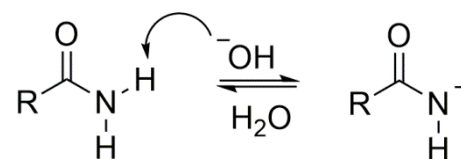
### 9.3.2 Inhibitor- und Substratkomplexe

Für weitere Einblicke in den Inhibitormechanismus wurde die Kristallstruktur von TalB<sup>F178Y</sup> mit D-T6P gelöst. Als Vergleich wurde die Variante TalB<sup>E96Q</sup> mit geringer Transaldolaseaktivität und dem Substrat D-F6P kristallisiert [10].



### D-F6P in TalB<sup>E96Q</sup> als Schiff'sche Base

Die erhaltene Kristallstruktur der TalB<sup>E96Q</sup> ist bis auf die starke Differenz im Aktiven Zentrum (siehe 8.5.3, [10]) dabei sehr ähnlich zur WT-Struktur ohne Ligand [3]. Die Elektronendichteverteilung der TalB<sup>E96Q</sup> zeigt ein kovalent gebundenes D-F6P Molekül über das C2 an das Lys132 (siehe Abb. 3.31). Die Daten (Fehlen der Hydroxylgruppe am C2 und kurze Bindungslänge) deuten des Weiteren darauf hin, dass eine sp<sup>2</sup> Hybridisierung des C2-Atoms vorliegt. Somit liegt D-F6P als Schiff'sche Base vor [10]. Ausgehend vom postulierten Mechanismus (siehe Abb. 4.4) wird in der TalB für den Eingangsschritt ein Säure-Base-Katalysator benötigt. Der pK<sub>a</sub> für die TalB<sup>E96Q</sup> liegt bei 6,2 (siehe Tab. 3.6) und somit liegt das Lys132 unter Kristallisationsbedingungen (siehe Tab. 2.13) neutral vor. Der Eingangsschritt ist in dieser Variante damit nicht notwendig. Überdies wird ein Säure-Base-Katalysator für den Reaktionsschritt der Ausbildung der Schiff'schen Base aus den Carbinolamin-Intermediat benötigt. Daher resultierte die Annahme, dass D-F6P als Carbinolamin-Intermediat vorliegen müsste, da in der TalB<sup>E96Q</sup> Glu96, welcher diese Aufgaben übernimmt, durch Gln substituiert ist. Die geringe Restaktivität der Variante und das Auffinden der Schiff'schen Base lässt die Frage offen, ob Gln in der Lage ist, diese Funktionen partiell zu übernehmen. Für Carbonsäureamide (funktionelle Seitengruppe von Gln) sind Deprotonierungen zu Amidaten möglich (siehe Abb. 4.8), beispielsweise ist dies der erste Schritt einer Hoffmann-Umlagerung [110].



**Abb. 4.8: Deprotonierung eines Carbonsäureamids zum Amidat**

### Vergleich zu anderen D-F6P-Intermediatstrukturen

Der Erfolg des *Soaking*-Verfahrens ist für die Lösung der Kristallstruktur von FBPA in Varianten der FBPA von *Thermoporeus tenax* (TtFBPA) und der FBPA aus dem Kaninchenmuskel (RAMA) beschrieben [100,106]. Dies konnte hier auf die TalB<sup>E96Q</sup> übertragen werden [10]. Bereits bekannt sind die D-F6P Komplexe mit den Transaldolasen *Francisella tularensis* (Tala) [44] und *Thermoplasma acidophilum* (TacTal) [33] (siehe Tab. 1.3). Die Strukturen Tala + D-F6P und TacTal<sup>wt</sup> + D-F6P wurden durch Cokristallisation erhalten. In beiden Fällen liegt das Substrat als Schiff'sche Base Intermediat vor.

Für die TacTal mit D-F6P wurde ein *induced-fit* Mechanismus und somit eine Konformationsänderung durch Substratbindung festgestellt [33]. Die Tala durchläuft bei

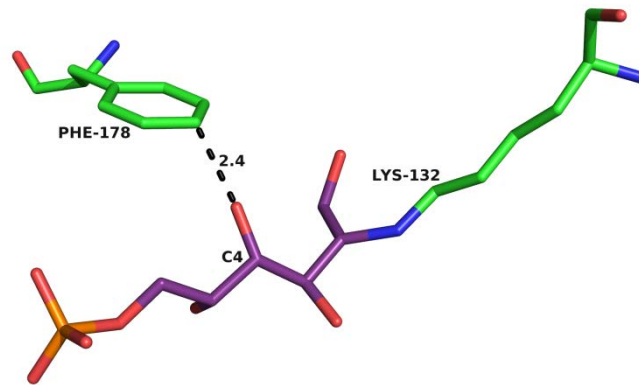
Substratbindung keine Konformationsänderung zwischen offen und geschlossen, wie für die kleine Transaldolase TacTal beschrieben. Jedoch ändert sich die Positionierung der Phosphatbindestelle bei Substratbindung. Die Änderung der Phosphatbindestelle ist spezifisch für die TalA. Diese Unterschiede basieren auf zusätzlichen Schleifen in der klassischen TalA [44]. In TalB konnte in Übereinstimmung mit der Kristallstruktur mit gebundenem DHA keine Konformationsänderung festgestellt werden. Dies könnte darauf hinweisen, dass diese klassische Transaldolase eine optimale Größe und einen optimalen räumlichen Aufbau aufweist, sodass keine Konformationsänderung bzw. ein *induced-fit* Mechanismus durchlaufen werden muss.

Abhängig vom angewandten Verfeinerungsprotokoll zeigt D-F6P in der TalB<sup>E96Q</sup> eine planare Geometrie oder eine Distorsion von der planaren Geometrie [10]. Für die Struktur der TalA ist ebenfalls eine planare Geometrie des Intermediates beschrieben [44]. Die Distorsion wird als treibende Kraft für die Katalyse in der TacTal postuliert [33]. In Übereinstimmung mit Light et al. [44] reflektieren bei den vorliegenden Auflösungen der Kristallstrukturen die Unterschiede in den Geometrien die Unterschiede in den Verfeinerungsprotokollen. Diese spiegeln keine eindeutigen Strukturdetails wider [10].

#### *D-T6P in TalB<sup>F178Y</sup> als Inhibitor-Komplex*

Die Struktur des Inhibitor-Komplexes der TalB<sup>F178Y</sup> + D-T6P ist ebenfalls sehr ähnlich zur Kristallstruktur von TalB<sup>wt</sup> ohne Ligand [3] (siehe 8.5.3, [10]). Die starke Differenz in der Elektronendichte für den gebundenen Inhibitor im Aktiven Zentrum ist sehr gut definiert (siehe Abb. 3.33). Überraschenderweise liegt D-T6P nicht offenkettig vor, sondern als geschlossene Ringstruktur, die kovalent über das C2 in sp<sup>3</sup>-Hybridisierung an das Lys132 gebunden ist. Somit wird D-T6P in ein gebundenes β-D-Galactofuranose 6-phosphat überführt [10].

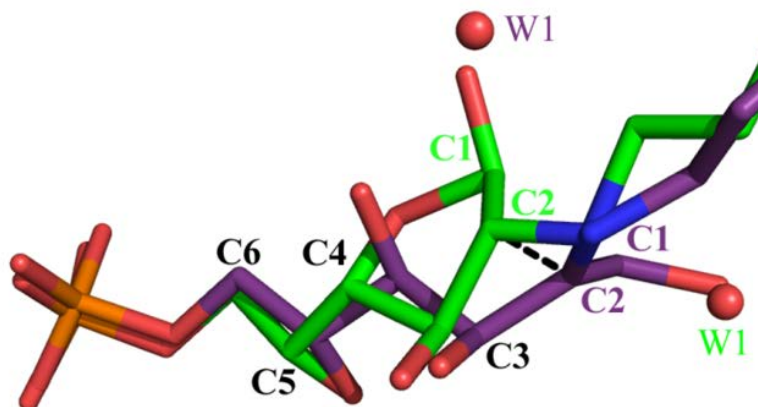
Im Gegensatz zum natürlichen Substrat D-F6P unterscheidet sich das Epimer D-T6P lediglich in der Stereokonfiguration der C4 Hydroxylgruppe. Dieser Unterschied würde zu ungünstigen Wechselwirkungen zur Seitenkette Phe178 und damit zu einem Verlust an Bindungsenergie führen (siehe Abb. 4.9). Dieser Rest wurde zu einem Tyr ausgetauscht und scheint eine Voraussetzung für die Inhibition darzustellen. In der FSAA ist an der entsprechenden Stelle ebenso Tyr131 lokalisiert [10].



**Abb. 4.9: Modell der offenkettigen Form von D-T6P in TalB<sup>E96Q</sup>**

Basierend auf dem Strukturmodell von TalB<sup>E96Q</sup> + D-F6P [10]. Der Abstand von 2,4 Å zwischen der Hydroxylgruppe des C4 der D-T6P (violett) und des Phe178 von TalB<sup>E96Q</sup> (grün) deutet auf ungünstige Interaktionen hin.

Der größte Unterschied zwischen D-F6P und D-T6P liegt in der Ausbildung eines zyklischen kovalenten Adduktes für D-T6P über ein Sauerstoffatom zwischen C4 und C1. Die Überlagerung der beiden Strukturen ist in Abb. 4.10 dargestellt. Hierbei sind C1, C2 und C3 im Vergleich zu D-F6P von ihren Positionen verschoben. Der restliche Teil des Inhibitors verbleibt ähnlich gebunden. Die Hydroxylgruppe des C1 von D-T6P verdrängt das katalytische Wassermolekül (W1, violett), wobei ein Wassermolekül (W2, grün) an der Stelle der Hydroxylgruppe des C1 von D-F6P vorhanden ist [10]. Das Ser176 geht im Inhibitor-Komplex zu diesem Wassermolekül eine Wasserstoffbrückenbindung ein (siehe Abb. 3.34). Beim Substratkomplex hingegen liegt eine H-Brücke zur Hydroxylgruppe des C1 vor (siehe Abb. 3.32) [10]. Dies könnte die offenkettige Form stabilisieren und erklären, warum FSAA<sup>A129S</sup> langsamer inhibiert wird als FSAA<sup>wt</sup>.



**Abb. 4.10: Überlagerung der Strukturmodelle von D-F6P (violett) gebunden an TalB<sup>E96Q</sup> mit dem kovalenten Inhibitor, gebildet aus D-T6P (grün) in TalB<sup>F178Y</sup>**

Das katalytische Wassermolekül (rote Kugel, violett W1) von TalB<sup>E96Q</sup> und ein Wassermolekül des Aktiven Zentrums (rote Kugel, grün W1) von TalB<sup>F178Y</sup> sind ebenfalls dargestellt [10].

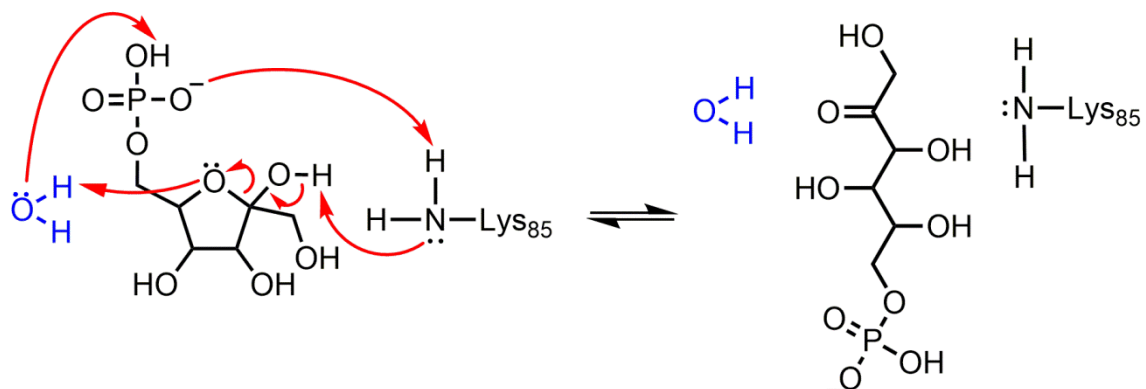
#### *Vergleich zu anderen Inhibitorkomplexstrukturen*

Zum Vergleich mit Tagatose-1,6-bisphosphat in DHAP-Aldolasen liegt bisher keine Struktur vor. Bekannt ist die Struktur der RAMA aus dem Kaninchenmuskel im Komplex mit dem kompetitiven Inhibitor Tagatose-1,6-bisphosphat. Hier sind jedoch lediglich die Phosphatgruppen sichtbar [100]. Als kompetitiver Inhibitor für die FSAA ist Arabinose-5-phosphat (A5P) bekannt [49]. Jedoch kann D-A5P auch als Substrat fungieren [54]. Für die TalB ist D-A5P ebenfalls als Inhibitor beschrieben [23]. Für die Transaldolasen *Francisella tularensis* ist A5P ebenso ein Inhibitor. Die gelöste Kristallstruktur zeigt A5P gebunden als Schiff'sche Base Intermediat. Im Vergleich zum natürlichen Substrat D-F6P fehlt bei A5P das entsprechende C1 der Hydroxylgruppe. An der Stelle der Hydroxylgruppe von D-F6P befindet sich in der Struktur von A5P ein Wassermolekül und das C1 ist um 0,6 Å verschoben. Basierend auf der Kristallstruktur ist diese subtile Änderung des Konformationszustandes ursächlich für die Inhibition bzw. das Stehenbleiben des Mechanismus auf der Höhe des Schiff'sche Base Intermediates [43]. Im Vergleich zum Inhibitorkomplex der TalB<sup>F178Y</sup> mit D-T6P in Ringform liegt hier ein anderer Mechanismus der Inhibition zu Grunde [10].

#### *Das Auffinden von zyklischen Zuckern und deren mechanistische Implikation*

Die Ketophosphatsubstrate der Modellenzyme FSAA und TalB, beispielsweise D-F6P, liegen zu ~ 98 - 99 % in den thermodynamisch stabilen zyklischen Formen vor [206]. In den ersten Schritten der Mechanismen (siehe Abb. 4.4) und basierend auf den bisherigen

Kristallstrukturen wird D-F6P in offenkettiger Form enzymatisch umgesetzt (siehe Tab. 1.3 und Tab. 1.4). Bisher wird davon ausgegangen, dass selektiv die offenkettige Form gebunden wird. Die neu erhaltene Inhibitorstruktur zeigt, dass TalB in der Lage ist, mit einer geschlossenen Ringstruktur im Aktiven Zentrum zurechtzukommen [10]. Diese Fähigkeit FBP in geschlossener Ringstruktur nicht-kovalent zu binden, wurde ebenfalls für die *Thermoporeus tenax* Variante TtFBPA<sup>W144E Y146F</sup> beschrieben. Dies lässt ein Postulat zur enzymatischen Ringöffnung unter Beteiligung eines katalytischen Wassermoleküls, des katalytischen Lysinrestes und dem Phosphat der C1-Substrat-Phosphatgruppe zu [106]. Dies belegt nicht, dass die Ringöffnung Teil des enzymatischen Mechanismus ist, jedoch dass eine Bindung des zyklischen Substrates möglich ist. Für die FBPA wurde eine enzymkatalysierte Öffnung anhand von *Presteady-state* Kinetiken und der Bevorzugung eines Anomers ebenfalls postuliert [34,194,207]. In der FSAA und der TalB sind ebenfalls alle drei an der Ringöffnung beteiligten katalytischen Komponenten vorhanden. Somit wäre eine Übertragung der substratunterstützten enzymatischen Ringöffnung auf die untersuchten Modellenzyme denkbar (siehe Abb. 4.11). In der Struktur TalA<sup>K135M</sup> im Komplex mit D-F6P akkumuliert jedoch ohne Anwesenheit des katalytischen Lysins die azyklische Form von D-F6P [44]. Somit wäre in der TalA das katalytische Lysin nicht für die Ringöffnung notwendig [34]. Inwieweit sich dies auf die TalB und FSAA übertragen lässt, ist offen. Zudem ist das Phosphat am C6 lokalisiert, daher könnte ein anderer, noch nicht identifizierter Rest an der substratunterstützten enzymatischen Ringöffnung beteiligt sein.



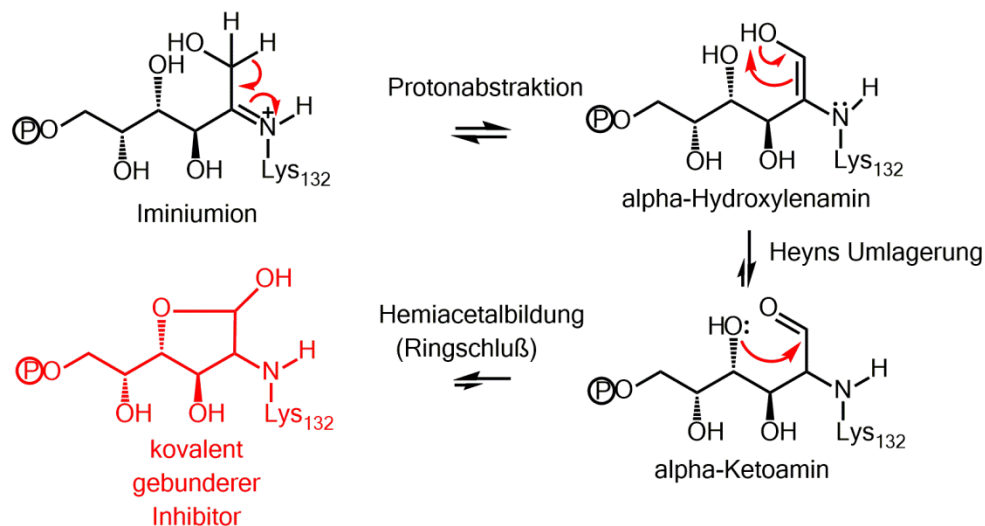
**Abb. 4.11: Postulierter Mechanismus für die Ringöffnung in FSAA**

Die Öffnung verläuft enzymkatalysiert und unter Einbezug des Substrates ab.

### 9.3.3 Inhibitionsmechanismus – Furanringbildung über Heyns-Umlagerung

Der Mechanismus für die Umsetzung von D-F6P für TalB und FSAA ist in Abb. 4.4 dargestellt. Für D-T6P läuft der Mechanismus bis zur Ausbildung des protonierten Schiff'sche Base Intermediates (Iminiumion) und einer deprotonierten Tyr-Seitenkette analog ab. Die Ausbildung des kovalent gebundenen Inhibitors geht anschließend über eine basenkatalysierte Heyns-Umlagerung vonstatten [10]. Diese Umlagerung beschreibt die Umwandlung eines  $\alpha$ -Hydroxyimins und einer Schiff'schen Base über ein  $\alpha$ -Hydroxylenamin-Intermediat zu stabilen  $\alpha$ -Carbonylverbindungen [208]. Diese Reaktion und die verwandte Amadori-Umlagerung spielen eine wichtige Rollen bei der Konversion von  $\alpha$ -Hydroxyaminosucker in der Lebensmittelchemie [209].

Die Abstraktion eines Protons von C1 vom Iminiumion wird in TalB<sup>F178Y</sup> durch die negativ geladene Seitenkette des Tyr178 katalysiert. Dies führt zur Ausbildung des  $\alpha$ -Hydroxylenamin-Intermediates (siehe Abb. 4.12). Dieses Intermediat wird in ein stabiles  $\alpha$ -Ketoamin umgewandelt. Das gebildete, kovalent gebundene D-Galactose-6-phosphat durchläuft im letzten Schritt den Ringschluss über eine Hemiacetalbildung. Dies stellt einen typischen Schritt von Heyns-Komponenten dar [208]. Somit wird nicht der thermodynamisch bevorzugte sechsgliedrige Ringzucker, sondern eine Furanose gebildet. Dies trägt der starken Bindung der Phosphatgruppe Rechnung, die die dafür notwendige räumliche Nähe der C5 Hydroxylgruppe zur C1 Carbonylgruppe verhindert [10].



**Abb. 4.12: Postulierter Mechanismus der D-T6P Inhibition in TalB<sup>F178Y</sup>**

Protonabstraktion vom Iminiumion (protoniertes Schiff'sche Base Intermediat) vermutlich katalysiert durch die Seitenkette des Tyr178 (nicht dargestellt), die in einem  $\alpha$ -Hydroxylenamin resultiert. Dieses Intermediat durchläuft eine Heyns-Umlagerung zu einem stabilen  $\alpha$ -Ketoamin. Über die Ausbildung eines Hemiacetales entsteht der geschlossene Furanosering, der kovalent über das C2 an das aktive Lysin gebunden ist [10].

Alternativ kann das kovalent gebundene D-Galactose-6-phosphat durch eine Keto-Aldolisomerisierung ablaufen. Der 1,2 Hydridshift zu einem  $\alpha$ -Ketoamin würde durch die Protonabstraktion an der Hydroxylgruppe des C1 erfolgen. Dies lässt sich auf Basis der Datenlage nicht ausschließen. Jedoch ist der Ablauf für eine Heyns-Umlagerung wahrscheinlicher, da das Carbanion im ersten Reaktionsschritt durch die Ausbildung des  $\alpha$ -Hydroxylenamin-Intermediates stabilisiert werden kann. Das bei der Isomerisierung gebildete Alkoxid nach der Protonabstraktion wird nicht stabilisiert [10].

Der vorgeschlagene Mechanismus ist in Konsens mit der Auswertung der Sekundärauftragung nach Kitz-Wilson (siehe Abb. 3.21 (B) beispielhaft für TalB<sup>F178</sup>). Hieraus ließ sich schließen, dass zunächst ein reversibler Enzym-Inhibitor-Komplex gebildet wird und im Anschluss daran eine irreversible Inaktivierung erfolgt. Ursächlich für die Ausbildung des kovalent gebundenen Inhibitors ist die Ausbildung von thermodynamisch stabileren Komplexen, wie das  $\alpha$ -Ketoamin und die Furanose [10].

Die Inhibition wird nur für D-T6P und nicht für D-F6P in Enzymen mit D-F6P-Aldolaseaktivität beobachtet. Somit lassen sich folgende notwendige Bedingungen folgern: Ein Säure-Basen-Katalysator (beispielsweise Tyr) muss vorhanden sein. Die Hydroxylgruppe des C1 muss in Richtung des Katalysators weisen, sodass eine Protonabstraktion für den Start der Heyns-Umlagerung möglich ist. Drittens muss für den Ringschluss die C4 Hydroxylgruppe in räumliche Nähe zum C1 zeigen. Alle diese Bedingungen werden nur durch den Inhibitor D-T6P erfüllt, als C4-Epimer zum natürlichen Substrat D-F6P. Bei D-T6P sind die Positionierung und die Wechselwirkungen von C1 und C2 (siehe Abb. 4.10, Abb. 3.32 und Abb. 3.33) passend für die Inhibition, wahrscheinlich da ein zu dichter Kontakt mit der Seitenkette von Tyr178 vermieden wird [10].





## 10 Literaturverzeichnis

- 1 Schneider S, Sandalova T, Schneider G, Sprenger GA & Samland AK (2008) Replacement of a phenylalanine by a tyrosine in the active site confers fructose-6-phosphate aldolase activity to the transaldolase of *Escherichia coli* and human origin. *J. Biol. Chem.* **283**, 30064–30072.
- 2 Thorell S, Schürmann M, Sprenger GA & Schneider G (2002) Crystal structure of decameric fructose-6-phosphate aldolase from *Escherichia coli* reveals inter-subunit helix swapping as a structural basis for assembly differences in the transaldolase family. *J. Mol. Biol.* **319**, 161–171.
- 3 Jia J, Huang W, Schörken U, Sahn H, Sprenger GA, Lindqvist Y & Schneider G (1996) Crystal structure of transaldolase B from *Escherichia coli* suggests a circular permutation of the alpha/beta barrel within the class I aldolase family. *Structure* **4**, 715–724.
- 4 Stellmacher L, Sandalova T, Leptihn S, Schneider G, Sprenger GA & Samland AK (2015) Acid-Base Catalyst Discriminates between a Fructose 6-Phosphate Aldolase and a Transaldolase. *ChemCatChem* **7**, 3140–3151.
- 5 Jia J, Schörken U, Lindqvist Y, Sprenger GA & Schneider G (1997) Crystal structure of the reduced Schiff-base intermediate complex of transaldolase B from *Escherichia coli*: mechanistic implications for class I aldolases. *Protein Sci.* **6**, 119–124.
- 6 Schörken U, Thorell S, Schürmann M, Jia J, Sprenger GA & Schneider G (2001) Identification of catalytically important residues in the active site of *Escherichia coli* transaldolase. *Eur. J. Biochem.* **268**, 2408–2415.
- 7 Hoffmann T, Zhong G, List B, Shabat D, Anderson J, Gramatikova S, Lerner RA & Barbas CF (1998) Aldolase antibodies of remarkable scope. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 2768–2779.
- 8 Barbas C, Lerner A, Zhong G & List B (2001) U.S. Patent - Aldol condensations by catalytic antibodies. , Application No. US 6,326,176 B1.
- 9 Wagner J, Lerner RA & Barbas CF (1995) Efficient aldolase catalytic antibodies that use the enamine mechanism of natural enzymes. *Science* **270**, 1797–1800.
- 10 Stellmacher L, Sandalova T, Schneider S, Schneider G, Sprenger GA & Samland AK (2016) Novel mode of inhibition by D-tagatose-6-phosphate through a Heyns rearrangement in the active site of transaldolase B variants. *Acta Crystallogr.* **D72**, 467–476.
- 11 Brovotto M, Gamenara D, M PS & Seoane GA (2011) C - C Bond-Forming Lyases in Organic Synthesis. *Chem. Rev.* **111**, 4346–4403.
- 12 Samland AK & Sprenger GA (2015) Synthetic potential of dihydroxyacetone utilizing aldolases. In *Industrial Biocatalysis* (Grunwald P, ed), pp. 783–816. Pan Stanford Publishing Pte. Ltd., Singapore.
- 13 Kourist R, Höhne M & Bornscheuer U (2009) Gerichtete Evolution und rationales Design. Maßgeschneiderte Enzyme. *Chemie unserer Zeit* **43**, 132–142.
- 14 Pleiss J (2012) Rational Design of Enzymes. In *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis, Third Edition* pp. 89–117.
- 15 The Royal Swedish Academy of Sciences (2018) The nobel prize in chemistry. *Press Release*.
- 16 Chen K & Arnold FH (1993) Tuning the activity of an enzyme for unusual environments: Sequential random mutagenesis of subtilisin E for catalysis in dimethylformamide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 5618–5622.
- 17 Schmidth J (1926) Zusammenhang von carboligatischer Synthese mit carboxylatischem Abbau. In *Synthetisch-organische Chemie der Neuzeit 2.*, p. 40 ff.

Springer Fachmedien Wiesbaden GmbH.

- 18 Hanč O & Kakáč B (1956) Hefecarboxylase und die Bildung von Phenylacetylcarbinol. *Naturwissenschaften* **43**, 498.
- 19 Khersonsky O & Tawfik DS (2010) Enzyme Promiscuity: A Mechanistic and Evolutionary Perspective. *Annu. Rev. Biochem.* **79**, 471–505.
- 20 Hauer B, Breuer M, Rogers P, Sandford V & Rosche B (2001) Deutsches Patent - Verfahren zur Herstellung von R-Phenylacetylcarbinol durch ein enzymatisches Verfahren in einem Zweiphasensystem. , Aktenzeichen DE 101 42 574 A1.
- 21 Horecker BL & Smyrniotis PZ (1953) Transaldolase: The formation of fructose-6-phosphate from sedoheptulose-7-phosphate. *J. Am. Chem. Soc.* **75**, 2021–2022.
- 22 Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology Enzyme Nomenclature and supplements. <https://www.qmul.ac.uk/sbcs/iubmb/enzyme/>, Zuletzt besucht 14.05.2020.
- 23 Sprenger GA, Schörken U, Sprenger G & Sahm H (1995) Transaldolase B of *Escherichia coli* K-12: cloning of its gene, talB, and characterization of the enzyme from recombinant strains. *J. Bacteriol.* **177**, 5930–5936.
- 24 Yura T, Mori H, Nagai H, Nagata T, Ishihama A, Fujita N, Isono K, Mizobuchi K & Nakata A (1992) Systematic sequencing of the *Escherichia coli* genome: analysis of the 0-2.4 min region. *Nucleic Acids Res.* **20**, 3305–3308.
- 25 Horecker BL & Smyrniotis PZ (1955) Purification and properties of yeast transaldolase. *J. Biol. Chem.* **212**, 811–825.
- 26 Horecker BL (2002) The pentose phosphate pathway. *J. Biol. Chem.* **277**, 47965–47971.
- 27 Sprenger GA (1995) Genetics of pentose-phosphate pathway enzymes of *Escherichia coli* K-12. *Arch. Microbiol.* **164**, 324–330.
- 28 Samland AK & Sprenger GA (2009) Transaldolase: from biochemistry to human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **41**, 1482–1494.
- 29 Schneider S (2010) Änderung der Substratspezifität von Transaldolasen. *Dissertation*, Universität Stuttgart.
- 30 Schörken U (1997) Untersuchungen zu Struktur und Funktion von Transketolase und Transaldolase, sowie biochemische Charakterisierung der Enzyme aus *Escherichia coli*. *Dissertation*, Forschungszentrum Jülich.
- 31 UniProt [www.uniprot.org](http://www.uniprot.org), Zuletzt besucht am 02.06.2020.
- 32 Schörken U, Jia J, Sahm H, Sprenger GA & Schneider G (1998) Disruption of *Escherichia coli* transaldolase into catalytically active monomers: evidence against half-of-the-sites mechanism. *FEBS Lett.* **441**, 247–250.
- 33 Lehwess-Litzmann A, Neumann P, Parthier C, Lüdtke S, Golbik R, Ficner R & Tittmann K (2011) Twisted Schiff base intermediates and substrate locale revise transaldolase mechanism. *Nat. Chem. Biol.* **7**, 678–684.
- 34 Tittmann K (2014) Sweet siblings with different faces: The mechanisms of FBP and F6P aldolase, transaldolase, transketolase and phosphoketolase revisited in light of recent structural data. *Bioorg. Chem.* **57**, 263–280.
- 35 Sautner V, Friedrich MM, Lehwess-Litzmann A & Tittmann K (2015) Converting Transaldolase into Aldolase through Swapping of the Multifunctional Acid–Base Catalyst: Common and Divergent Catalytic Principles in F6P Aldolase and Transaldolase. *Biochemistry* **54**, 4475–4486.
- 36 Thorell S, Gergely P, Banki K, Perl A & Schneider G (2000) The three-dimensional structure of human transaldolase. *FEBS Lett.* **475**, 205–208.
- 37 Schürmann M (2001) Biochemische Charakterisierung und Struktur-Funktionsbeziehungen bakterieller Transaldolasen und Fruktose-6-Phosphat Aldolasen. *Dissertation*, Universität Düsseldorf.
- 38 Rale M, Schneider S, Sprenger GA, Samland AK & Fessner WD (2011) Broadening

- deoxysugar glycodiversity: Natural and engineered transaldolases unlock a complementary substrate space. *Chem. - A Eur. J.* **17**, 2623–2632.
- 39 Schneider S, Gutiérrez M, Sandalova T, Schneider G, Clapés P, Sprenger GA & Samland AK (2010) Redesigning the active site of transaldolase TalB from *Escherichia coli*: new variants with improved affinity towards nonphosphorylated substrates. *ChemBioChem* **11**, 681–690.
- 40 Soderberg T & Alver RC (2004) Transaldolase of *Methanocaldococcus jannaschii*. *Archaea* **1**, 255–262.
- 41 Samland AK, Baier S, Schürmann M, Inoue T, Huf S, Schneider G, Sprenger GA & Sandalova T (2012) Conservation of structure and mechanism within the transaldolase enzyme family. *FEBS J.* **279**, 766–778.
- 42 Lehweß-Litzmann A (2011) Biochemische, kinetische und strukturelle Untersuchungen der Transaldolase aus *Thermoplasma acidophilum*. *Dissertation*, Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg.
- 43 Light SH & Anderson WF (2014) Arabinose 5-phosphate covalently inhibits transaldolase. *J. Struct. Funct. Genomics* **15**, 41–44.
- 44 Light SH, Minasov G, Duban M-E & Anderson WF (2014) Adherence to Bürgi-Dunitz stereochemical principles requires significant structural rearrangements in Schiff-base formation: insights from transaldolase complexes. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **70**, 544–552.
- 45 Peschke U, Schmidt H, Zhang H-Z & Piepersberg W (1995) Molecular characterization of the lincomycin-production gene cluster of *Streptomyces lincolnensis* 78-11. *Mol. Microbiol.* **16**, 1137–1156.
- 46 Sasaki E, Lin C-I, Lin K-Y & Liu H-W (2012) Construction of the Octose 8-Phosphate Intermediate in Lincomycin A Biosynthesis: Characterization of the Reactions Catalyzed by LmbR and LmbN. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 17432–17435.
- 47 Kummer S (2013) Expression und Charakterisierung kleiner Proteine der Transaldolasefamilie. *Bachelorarbeit*, Universität Stuttgart.
- 48 Lorenz L (2013) Die Modulare Struktur von Aldolasen und Transaldolasen. *Bachelorarbeit*, Universität Stuttgart.
- 49 Schürmann M & Sprenger GA (2001) Fructose-6-phosphate aldolase is a novel class I aldolase from *Escherichia coli* and is related to a novel group of bacterial transaldolases. *J. Biol. Chem.* **276**, 11055–11061.
- 50 Samland AK & Sprenger GA (2006) Microbial aldolases as C-C bonding enzymes - unknown treasures and new developments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **71**, 253–264.
- 51 Bednarski MD, Simon ES, Bischofberger N, Fessner W-D, Kim M-J, Lees W, Saito T, Waldmann H & Whitesides GM (1989) Rabbit muscle aldolase as a catalyst in organic synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 627–635.
- 52 Fessner W-D & Sinerius G (1994) Synthesis of Dihydroxyacetone Phosphate ( and Isosteric Analogues ) by Enzymatic Oxidation ; Sugars from Glycerol. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **33**, 209–212.
- 53 Sánchez-Moreno I, Nauton L, Théry V, Pinet A, Petit J-L, de Berardinis V, Samland AK, Guérard-Hélaine C & Lemaire M (2012) FSAB: A new fructose-6-phosphate aldolase from *Escherichia coli*. Cloning, over-expression and comparative kinetic characterization with FSAA. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **84**, 9–14.
- 54 Garrabou X, Castillo J, Guérard-Hélaine C, Parella T, Joglar J, Lemaire M & Clapés P (2009) Asymmetric self- and cross-aldol reactions of glycolaldehyde catalyzed by D-fructose-6-phosphate aldolase. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **48**, 5521–5525.
- 55 Sugiyama M, Hong Z, Liang P, Dean SM, Whalen LJ, Greenberg WA & Wong C (2007) D-Fructose-6-Phosphate Synthesis of Iminocyclitols. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 14811–14817.

- 56 Meyer H-P, Eichhorn E, Hanlon S, Lütz S, Schürmann M, Wohlgemuth R & Coppolecchia R (2013) The use of enzymes in organic synthesis and the life sciences: perspectives from the Swiss Industrial Biocatalysis Consortium (SIBC). *Catal. Sci. Technol.* **3**, 29–40.
- 57 Roldán R, Sanchez-Moreno I, Scheidt T, Hélaïne V, Lemaire M, Parella T, Clapés P, Fessner WD & Guérard-Hélaïne C (2017) Breaking the Dogma of Aldolase Specificity: Simple Aliphatic Ketones and Aldehydes are Nucleophiles for Fructose-6-phosphate Aldolase. *Chem. - A Eur. J.* **23**, 5005–5009.
- 58 Schürmann M, Schürmann M & Sprenger GA (2002) Fructose 6-phosphate aldolase and 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase from *Escherichia coli* as tools in enzymatic synthesis of 1-deoxysugars. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **19–20**, 247–252.
- 59 Concia A, Lozano C, Castillo J, Parella T, Joglar J & Clapés P (2009) D-fructose-6-phosphate aldolase in organic synthesis: cascade chemical-enzymatic preparation of sugar-related polyhydroxylated compounds. *Chem. - A Eur. J.* **15**, 3808–3816.
- 60 Fessner W, Heyl D & Rale M (2012) Multi-enzymatic cascade synthesis of d-fructose 6-phosphate and deoxy analogs as substrates for high-throughput aldolase screening. *Catal. Sci. Technol.* **2**, 1596–1601.
- 61 Sánchez-Moreno I, Hélaïne V, Poupard N, Charmantray F, Légeret B, Hecquet L, García-Junceda E, Wohlgemuth R, Guérard-Hélaïne C & Lemaire M (2012) One-Pot Cascade Reactions using Fructose-6-phosphate Aldolase: Efficient Synthesis of D-Arabinose 5-Phosphate, D-Fructose 6-Phosphate and Analogues. *Adv. Synth. Catal.* **354**, 1725–1730.
- 62 Castillo J, Guérard-Hélaïne C, Gutiérrez M, Garrabou X, Sancelme M, Schürmann M, Inoue T, Hélaïne V, Charmantray F, Gefflaut T, Hecquet L, Joglar J, Clapés P, Sprenger GA & Lemaire M (2010) A Mutant D-Fructose-6-Phosphate Aldolase (Ala129Ser) with Improved Affinity towards Dihydroxyacetone for the Synthesis of Polyhydroxylated Compounds. *Adv. Synth. Catal.* **352**, 1039–1046.
- 63 Guérard-Hélaïne C, Debacker M, Clapés P, Szekrenyi A, Hélaïne V & Lemaire M (2014) Efficient biocatalytic processes for highly valuable terminally phosphorylated C5 to C9 d-ketoses. *Green Chem.*, 6–10.
- 64 Clapés P, Fessner WD, Sprenger GA & Samland AK (2010) Recent progress in stereoselective synthesis with aldolases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **14**, 154–167.
- 65 Concia AL, Gómez L, Bujons J, Parella T, Vilaplana C, Cardona PJ, Joglar J & Clapés P (2013) Chemo-enzymatic synthesis and glycosidase inhibitory properties of DAB and LAB derivatives. *Org. Biomol. Chem.* **11**, 2005–2021.
- 66 Ma H, Engel S, Enugala TR, Al-Smadi D, Gautier C & Widersten M (2018) New Stereoselective Biocatalysts for Carbonylation and Retro-Aldol Cleavage Reactions Derived from d-Fructose 6-Phosphate Aldolase. *Biochemistry* **57**, 5877–5885.
- 67 Gutierrez M, Parella T, Joglar J, Bujons J & Clapés P (2011) Structure-guided redesign of d-fructose-6-phosphate aldolase from *E. coli*: remarkable activity and selectivity towards acceptor substrates by two-point mutation. *Chem. Commun. (Camb)*. **47**, 5762–5764.
- 68 Fanton J, Camps F, Castillo J, Guérard-Hélaïne C, Lemaire M, Charmantray F & Hecquet L (2012) Enzymatic and Organocatalyzed Asymmetric Aldolization Reactions for the Synthesis of Thiosugar Scaffolds. *European J. Org. Chem.* **2012**, 203–210.
- 69 Roldán R, Hernández K, Joglar J, Bujons J, Parella T, Fessner WD & Clapés P (2019) Aldolase-Catalyzed Asymmetric Synthesis of N-Heterocycles by Addition of Simple Aliphatic Nucleophiles to Aminoaldehydes. *Adv. Synth. Catal.* **361**, 2673–2687.
- 70 Castillo J, Calveras J, Casas J, Mitjans M, Vinardell M, Parella T, Inoue T, Sprenger GA, Joglar J & Clapés P (2006) Fructose-6-phosphate aldolase in organic synthesis: preparation of D-fagomine, N-alkylated derivatives, and preliminary biological assays. *Org. Lett.* **8**, 6067–6070.

- 71 Clapés P, Joglar J, Castillo JA & Lozano C (2008) WO Patent - Chemoenzymatic process for the preparation of iminocyclitols. , International Publication No WO/2008/025826.
- 72 Sudar M, Findrik Z, Szekrenyi A, Clapés P & Vasić-Rački Đ (2019) Reactor and microreactor performance and kinetics of the aldol addition of dihydroxyacetone to benzyloxycarbonyl-N-3-aminopropanal catalyzed by D-fructose-6-phosphate aldolase variant A129G. *Chem. Eng. Commun.* **206**, 927–939.
- 73 Schürmann M, Mink D & Hyett DJ (2008) Preparation of 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-2,3-dihydrofuran-3-one. *Patentschrift*, WO/2008/067997.
- 74 Sudar M, Findrik Z, Vasić-Rački D, Clapés P & Lozano C (2013) Aldol addition of dihydroxyacetone to N-Cbz-3-aminopropanal catalyzed by two aldolases variants in microreactors. *Enzyme Microb. Technol.* **53**, 38–45.
- 75 Magnusson AO, Szekrenyi A, Joosten HJ, Finnigan J, Charnock S & Fessner WD (2019) nanoDSF as screening tool for enzyme libraries and biotechnology development. *FEBS J.* **286**, 184–204.
- 76 Guérard-Hélaine C, Légeret B, Fernandes C, Prévot V, Forano C & Lemaire M (2011) Efficient immobilization of fructose-6-phosphate aldolase in layered double hydroxide: improved stereoselective synthesis of sugar analogues. *New J. Chem.* **35**, 776–779.
- 77 Samland AK (2012) Biokatalyse: Stereoselektive Knüpfung von C-C-Bindungen mit Aldolasen. *BioSpektrum* **18**, 254–256.
- 78 Inoue T (2006) Microbial aldolases as C-C bonding enzymes: investigation of structural-functional characteristics and application for streoselective reactions. *Dissertation*, Universität Stuttgart.
- 79 Simon G, Eljezi T & Legeret B (2013) Synthesis of Specially Designed Probes to Broaden Transketolase Scope. *ChemCatChem* **5**, 784–795.
- 80 Samland AK, Rale M, Sprenger GA & Fessner W-D (2011) The transaldolase family: new synthetic opportunities from an ancient enzyme scaffold. *ChemBioChem* **12**, 1454–1474.
- 81 Mifsud M, Szekrényi A, Joglar J & Clapés P (2012) In situ aldehyde generation for aldol addition reactions catalyzed by d-fructose-6-phosphate aldolase. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **84**, 102–107.
- 82 Camps Bres F, Guérard-Hélaine C, Fernandes C, Castillo J a. & Lemaire M (2013) Fructose-6-phosphate aldolases as versatile biocatalysts for nitrocyclitol syntheses. *Tetrahedron: Asymmetry* **24**, 1075–1081.
- 83 Hernández K, Parella T, Joglar J, Bujons J, Pohl M & Clapés P (2015) Expedient Synthesis of C-Aryl Carbohydrates by Consecutive Biocatalytic Benzoin and Aldol Reactions. *Chem. - A Eur. J.* **21**, 3335–3346.
- 84 Clapés P & Garrabou X (2011) Current Trends in Asymmetric Synthesis with Aldolases. *Adv. Synth. Catal.* **353**, 2263–2283.
- 85 Szekrenyi A, Soler A, Garrabou X, Guérard-Hélaine C, Parella T, Joglar J, Lemaire M, Bujons J & Clapés P (2014) Engineering the donor selectivity of D-fructose-6-phosphate aldolase for biocatalytic asymmetric cross-aldol additions of glycolaldehyde. *Chem. - A Eur. J.* **20**, 12572–12583.
- 86 Szekrenyi A, Garrabou X, Parella T, Joglar J, Bujons J & Clapés P (2015) Asymmetric assembly of aldose carbohydrates from formaldehyde and glycolaldehyde by tandem biocatalytic aldol reactions. *Nat. Chem.* **7**, 724–729.
- 87 Soler A, Gutiérrez ML, Bujons J, Parella T, Minguillon C, Joglar J & Clapés P (2015) Structure-guided engineering of D-fructose-6-phosphate aldolase for improved acceptor tolerance in biocatalytic aldol additions. *Adv. Synth. Catal.* **357**, 1787–1807.
- 88 Ma H (2015) Aldolases for Enzymatic Carboligation. *Dissertation*, Uppsala Universitet.
- 89 Güçlü D, Szekrenyi A, Garrabou X, Kickstein M, Junker S, Clapés P & Fessner W-D

- (2016) Minimalist protein engineering of an aldolase provokes unprecedented substrate promiscuity. *ACS Catal.* **6**, 1848–1852.
- 90 Roldán R, Hernandez K, Joglar J, Bujons J, Parella T, Sánchez-Moreno I, Hélaine V, Lemaire M, Guérard-Hélaine C, Fessner WD & Clapés P (2018) Biocatalytic Aldol Addition of Simple Aliphatic Nucleophiles to Hydroxyaldehydes. *ACS Catal.* **8**, 8804–8809.
- 91 Junker S, Roldan R, Joosten HJ, Clapés P & Fessner WD (2018) Complete Switch of Reaction Specificity of an Aldolase by Directed Evolution In Vitro: Synthesis of Generic Aliphatic Aldol Products. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **57**, 10153–10157.
- 92 Clapés P, Joglar J, Vilás J, Roldan Garcia R, Fessner WD, Junker S & Dominguez de Maria P (2018) WO Patent - Fructose-6-phosphate aldolase variants for aldol carboligations. , International Publication Number WO 2018/189026 A1.
- 93 Grochowski LL, Xu H & White RH (2005) Ribose-5-phosphate biosynthesis in *Methanocaldococcus jannaschii* occurs in the absence of a pentose-phosphate pathway. *J. Bacteriol.* **187**, 7382–7389.
- 94 Samland AK, Wang M & Sprenger GA (2008) MJ0400 from *Methanocaldococcus jannaschii* exhibits fructose-1,6-bisphosphate aldolase activity. *FEMS Microbiol. Lett.* **281**, 36–41.
- 95 Tangney M, Brehm JK, Minton NP & Mitchell WJ (1998) A gene system for glucitol transport and metabolism in *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 1612–1619.
- 96 Wang Y, Li X, Mao Y & Blaschek HP (2011) Single-nucleotide resolution analysis of the transcriptome structure of *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 using RNA-Seq. *BMC Genomics* **12**, 1–10.
- 97 Samland AK (2014) Untersuchungen zu Struktur-Funktionsbeziehungen in der Enzymfamilie der Transaldolasen. *Habilitationsschrift*, Universität Stuttgart.
- 98 Guérard-Hélaine C, de Berardinis V, Besnard-Gonnet M, Darii E, Debacker M, Debard A, Fernandes C, Hélaine V, Mariage A, Pellouin V, Perret A, Petit J-L, Sancelme M, Lemaire M & Salanoubat M (2015) Genome Mining for Innovative Biocatalysts: New Dihydroxyacetone Aldolases for the Chemist's Toolbox. *ChemCatChem* **7**, 1871–1879.
- 99 Gamblin SJ, Cooper B, Millar JR, Davies GJ, Littlechild J a & Watson HC (1990) The crystal structure of human muscle aldolase at 3.0 Å resolution. *FEBS Lett.* **262**, 282–286.
- 100 St-Jean M, Lafrance-Vanasse J, Liotard B & Sygusch J (2005) High resolution reaction intermediates of rabbit muscle fructose-1,6-bisphosphate aldolase: substrate cleavage and induced fit. *J. Biol. Chem.* **280**, 27262–27270.
- 101 Minasov G, Wawrzak Z, Skarina T, Gordon E, Peterson SN, Savchenko A & Anderson WF (2009) 1.85 Angstrom Resolution Crystal Structure of Transaldolase B (talA) from *Francisella tularensis*. <http://www.rcsb.org/pdb>, Zuletzt besucht 14.05.2020.
- 102 PDB [www.wwpdb.org](http://www.wwpdb.org), Zuletzt besucht am 02.06.2020.
- 103 Sygusch J, Beaudry D & Allaire M (1987) Molecular architecture of rabbit skeletal muscle aldolase at 2.7 Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 7846–7850.
- 104 St-Jean M & Sygusch J (2007) Stereospecific proton transfer by a mobile catalyst in mammalian fructose-1,6-bisphosphate aldolase. *J. Biol. Chem.* **282**, 31028–31037.
- 105 Lorentzen E, Pohl E, Zwart P, Stark A, Russell RB, Knura T, Hensel R & Siebers B (2003) Crystal structure of an archaeal class I aldolase and the evolution of (beta-alpha)8 barrel proteins. *J. Biol. Chem.* **278**, 47253–47260.
- 106 Lorentzen E, Siebers B, Hensel R & Pohl E (2005) Mechanism of the Schiff base forming fructose-1,6-bisphosphate aldolase: structural analysis of reaction intermediates. *Biochemistry* **44**, 4222–4229.
- 107 Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, Lopez R, McWilliam H,

- Remmert M, Söding J, Thompson JD & Higgins DG (2011) Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* **7**, 1–6.
- 108 Goujon M, McWilliam H, Li W, Valentin F, Squizzato S, Paern J & Lopez R (2010) A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI. *Nucleic Acids Res.* **38**, W695–W699.
- 109 Kabsch W & Sander C (1983) Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers* **22**, 2577–2637.
- 110 Vollhardt KPC & Schore NE (2000) *Organische Chemie*, 3. Auflage Wiley-VCH, Weinheim.
- 111 Roche Diagnostics GmbH (2019) Produktdatenblatt für Phosphoglucose Isomerase from yeast (Cat. No.10 128 139 001). .
- 112 Whitmore L & Wallace BA (2004) DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Res.* **32**, W668–W673.
- 113 Whitmore L & Wallace BA (2008) Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases. *Biopolymers* **89**, 392–400.
- 114 Lobley A, Whitmore L & Wallace BA (2002) DICHROWEB: an interactive website for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *Bioinformatics* **18**, 211–212.
- 115 Brenda [www.brenda-enzymes.org](http://www.brenda-enzymes.org), Zuletzt besucht 02.06.2020.
- 116 ExPASy [www.expasy.org](http://www.expasy.org), Zuletzt besucht am 02.06.2020.
- 117 Holert J, Kulić Ž, Yücel O, Suvekbala V, Suter MJ-F, Möller HM & Philipp B (2013) Degradation of the acyl side chain of the steroid compound cholate in *Pseudomonas* sp. strain Chol1 proceeds via an aldehyde intermediate. *J. Bacteriol.* **195**, 585–95.
- 118 Winn MD, Ballard CC, Cowtan KD, Dodson EJ, Emsley P, Evans PR, Keegan RM, Krissinel EB, Leslie AGW, McCoy A, McNicholas SJ, Murshudov GN, Pannu NS, Potterton E a, Powell HR, Read RJ, Vagin A & Wilson KS (2011) Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **67**, 235–242.
- 119 Evans PR & Murshudov GN (2013) How good are my data and what is the resolution? *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **69**, 1204–1214.
- 120 Vagin A & Teplyakov A (2010) Molecular replacement with MOLREP. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **66**, 22–25.
- 121 McCoy AJ, Grosse-Kunstleve RW, Adams PD, Winn MD, Storoni LC & Read RJ (2007) Phaser crystallographic software. *J. Appl. Crystallogr.* **40**, 658–674.
- 122 Leslie AG (2006) The integration of macromolecular diffraction data. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **62**, 48–57.
- 123 Kabsch W (2010) Xds. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **66**, 125–132.
- 124 Murshudov GN, Skubák P, Lebedev AA, Pannu NS, Steiner RA, Nicholls RA, Winn MD, Long F & Vagin AA (2011) REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **67**, 355–367.
- 125 Chen VB, Arendall WB 3rd, Headd JJ, Keedy DA, Immormino RM, Kapral GJ, Murray LW, Richardson JS & Richardson DC (2010) MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **66**, 12–21.
- 126 Krissinel E & Henrick K (2007) Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J. Mol. Biol.* **372**, 774–797.
- 127 Krissinel E & Henrick K (2004) Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions. *Acta Crystallogr. D. Biol.*

- Crystallogr.* **60**, 2256–2268.
- 128 Emsley P, Lohkamp B, Scott WG & Cowtan K (2010) Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **66**, 486–501.
  - 129 Waterhouse AM, Procter JB, Martin DM a, Clamp M & Barton GJ (2009) Jalview Version 2-A multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* **25**, 1189–1191.
  - 130 Crooks G, Hon G, Chandonia J & Brenner S (2004) WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res* **14**, 1188–1190.
  - 131 Hanahan D (1983) Studies on Transformation of Escherichia coli with Plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557–580.
  - 132 Fürste JP, Pansegrau W, Frank R, Blöcker H, Scholz P, Bagdasarian M & Lanka E (1986) Molecular cloning of the plasmid RP4 primase region in a multi-host-range tacP expression vector. *Gene* **48**, 119–131.
  - 133 Novy R, Drott D, Yaeger K & Mierendorf R (2001) Overcoming the codon bias of E. coli for enhanced protein expression. *Innovations*, 4–6.
  - 134 Künzler M, Gerstberger T, Stutz F, Bischoff R & Hurt E (2000) Yeast Ran-Binding Protein 1 (Yrb1) Shuttles between the Nucleus and Cytoplasm and Is Exported from the Nucleus via a CRM1(XPO1)-Dependent Pathway. *Mol. Cell. Biol.* **1**, 4295–4308.
  - 135 Schürmann M (2001) 1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat Synthase von Escherichia coli: Biochemische Charakterisierung und Struktur-Funktionsbeziehungen. *Dissertation*, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
  - 136 Bertani G (1951) Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic Escherichia coli. *J. Bacteriol.* **62**, 293–300.
  - 137 Sambrook J & Russell DW (2001) *Molecular cloning.*, 3 ed Cold Spring Harbor, New York.
  - 138 Zheng L, Baumann U & Reymond J-L (2004) An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol. *Nucleic Acids Res.* **32**, 1–5.
  - 139 Vovis GF & Lacks S (1977) Complementary action of restriction enzymes endo R-DpnI and Endo R-DpnII on bacteriophage f1 DNA. *J. Mol. Biol.* **115**, 525–538.
  - 140 Sanger F, Nicklen S & Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463–5467.
  - 141 Eid J, Fehr A, Gray J, Luong K, Lyle J, Otto G, Peluso P, Rank D, Baybayan P, Bettman B, Bibillo A, Bjornson K, Chaudhuri B, Christians F, Cicero R, Clark S, Dalal R, DeWinter A, Dixon J, Foquet M, Gaertner A, Hardenbol P, Heiner C, Hester K, Holden D, Kearns G, Kong X, Kuse R, Lacroix Y, Lin S, Lundquist P, Ma C, Marks P, Maxham M, Murphy D, Park I, Pham T, Phillips M, Roy J, Sebra R, Shen G, Sorenson J, Tomaney A, Travers K, Trulson M, Vieceli J, Wegener J, Wu D, Yang A, Zaccarin D, Zhao P, Zhong F, Korlach J & Turner S (2009) Real-Time DNA Sequencing from Single Polymerase Molecules. *Science (80-. )*. **323**, 133–138.
  - 142 Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, Smith GP, Milton J, Brown CG, Hall KP, Evers DJ, Barnes CL, Helen R, Boutell JM, Bryant J, Carter RJ, Cheetham RK, Cox AJ, Ellis DJ, Flatbush MR, Gormley NA, Sean J, Irving LJ, Karbelashvili MS, Kirk SM, Li H, Maisinger KS, Murray LJ, Obradovic B, Ost T, Michael L, Pratt MR, Rasolonjatovo IMJ, Reed MT, Rigatti R, Rodighiero C, Ross MT, Sabot A, Sankar S V, Schroth GP, Smith ME, Smith VP, Spiridou A, Peta E, Tzonev SS, Vermaas EH, Walter K, Wu X, Zhang L, Banerjee S, Barbour SG, Baybayan PA, Benoit VA, Bridgham A, Brown RC, Brown AA, Buermann DH, Bundu AA, Cooley RN, Crake NR, Dada OO & Konstantinos D (2009) Accurate Whole Human Genome Sequencing using Reversible Terminator Chemistry. *Nature* **456**, 53–59.
  - 143 Cohen SN, Chang AC & Hsu L (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of Escherichia coli by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **69**, 2110–2114.



- 144 Tabor S & Richardson CC (1985) A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**, 1074–1078.
- 145 Müller-Hill B, Crapo L & Gilbert W (1968) Mutants that make more lac repressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **59**, 1259–1264.
- 146 Smith DB & Johnson KS (1988) Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* **67**, 31–40.
- 147 Hochuli E, Bannwarth W, Döbeli H, Gentz R & Stüber D (1988) Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel metal chelate adsorbent. *Nat. Biotechnol.* **6**, 1321–1325.
- 148 Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- 149 Kleber H, Schlee D & Schöpp W (1997) *Biochemisches Praktikum* Gustav Fischer, Jena.
- 150 Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254.
- 151 Compton SJ & Jones CG (1985) Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal. Biochem.* **151**, 369–374.
- 152 Engel PC (1977) *Enzyme Kinetics* Chapman & Hall, London.
- 153 Bisswanger H (2008) *Enzyme Kinetics*, 2. edn. Wiley-VCH, Weinheim.
- 154 DIN 32645 (2008) *Chemische Analytik - Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze unter Wiederholbedingungen - Begriffe, Verfahren, Auswertung* Beuth Verlag GmbH, Berlin.
- 155 Horecker BL & Smyrniotis PZ (1955) [55] Transaldolase: Sedoheptulose-7-P + Glyceraldehyde-3-P  $\rightleftharpoons$  Fructose-6-P + Tetrose-P. In *Methods in Enzymology* pp. 381–383. Elsevier Inc.
- 156 Sprenger GA, Schörken U, Sprenger G & Sahn H (1995) Transketolase A of *Escherichia coli* K12. Purification and properties of the enzyme from recombinant strains. *Eur. J. Biochem.* **230**, 525–532.
- 157 Tang CT, Ruch FE & Lin ECC (1979) Purification and properties of a nicotinamide adenine dinucleotide-linked dehydrogenase that serves an *Escherichia coli* mutant for glycerol catabolism. *J. Bacteriol.* **140**, 182–187.
- 158 Dawson R, Elliott D, Elliott W & Jones K (1986) *Data for biochemical research*, 3. edn. Oxford University Press, Oxford.
- 159 Bas DC, Rogers DM & Jensen JH (2008) Very fast prediction and rationalization of pKa values for protein-ligand complexes. *Proteins* **73**, 765–783.
- 160 Li H, Robertson AD & Jensen JH (2005) Very fast empirical prediction and rationalization of protein pKa values. *Proteins* **61**, 704–721.
- 161 Olsson M (2011) PROPKA3: consistent treatment of internal and surface residues in empirical pKa predictions. *J. Chem. Theory Comput.* **7**, 525–537.
- 162 Søndergaard CR, Olsson MHM, Rostkowski M & Jensen JH (2011) Improved Treatment of Ligands and Coupling Effects in Empirical Calculation and Rationalization of pKa Values. *J. Chem. Theory Comput.* **7**, 2284–2295.
- 163 Krekel F, Samland AK, Macheroux P, Amrhein N & Evans JN (2000) Determination of the pKa value of C115 in MurA (UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyltransferase) from *Enterobacter cloacae*. *Biochemistry* **39**, 12671–12677.
- 164 Schmidt DE & Westheimert FH (1971) pK of the lysine amino group at the active site of acetoacetate decarboxylase. *Biochemistry* **10**, 1249–1253.
- 165 Dax C, Coinçon M, Sygusch J & Blonski C (2005) Hydroxynaphthaldehyde phosphate derivatives as potent covalent Schiff base inhibitors of fructose-1, 6-bisphosphate

- aldolase. *Biochemistry* **44**, 5430–5443.
- 166 Anai M, Lai C & Horecker B (1973) The pyridoxal phosphate-binding site of rabbit muscle aldolase. *Arch. Biochem. Biophys.* **156**, 712–719.
- 167 Charmantray F, Hélaine V, Legeret B & Hecquet L (2009) Preparative scale enzymatic synthesis of d-sedoheptulose-7-phosphate from  $\beta$ -hydroxypyruvate and d-ribose-5-phosphate. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **57**, 6–9.
- 168 Chabot N, Vinatier V, Gefflaut T, Baudoin C, Rodriguez F, Blonski C & Hoffmann P (2008) Irreversible inhibition of aldolase by a phosphorylated alpha-dicarbonyl compound. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **23**, 21–27.
- 169 Kitz R & Wilson I (1962) Esters of methanesulfonic acid as irreversible inhibitors of acetylcholinesterase. *J. Biol. Chem.* **237**, 3245–3249.
- 170 Sundqvist G, Stenvall M, Berglund H, Ottosson J & Brumer H (2007) A general, robust method for the quality control of intact proteins using LC-ESI-MS. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **852**, 188–194.
- 171 Herbert C & Johnstone R (2003) *Mass spectrometry basics* CRC Press LLC, Boca Raton.
- 172 Horecker B, Pontremoli S & Ricci C (1961) On the nature of the transaldolase-dihydroxyacetone complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **47**, 1949–1955.
- 173 Schneider G & Sprenger GA (2002) Transaldolase B: Trapping of schiff base intermediate between dihydroxyacetone and  $\epsilon$ -amino group of active-site lysine residue by borohydride reduction. *Methods Enzymol.* **354**, 197–201.
- 174 Jachimska B, Wasilewska M & Adamczyk Z (2008) Characterization of globular protein solutions by dynamic light scattering, electrophoretic mobility, and viscosity measurements. *Langmuir* **24**, 6866–6872.
- 175 Kelly SM, Jess TJ & Price NC (2005) How to study proteins by circular dichroism. *Biochim. Biophys. Acta* **1751**, 119–139.
- 176 Stellmacher L, Sandalova T, Leptihn S, Schneider G, Sprenger GA & Samland AK (2015) Supporting Information: Acid-base catalyst discriminates between a fructose 6-phosphate aldolase and a transaldolase. *ChemCatChem* **7**, 3140–3151.
- 177 AppliChem GmbH (2010) Biological Buffers. *AppliCations* **2**.
- 178 Giger L, Caner S, Obexer R, Kast P, Baker D, Ban N & Hilvert D (2013) Evolution of a designed retro-aldolase leads to complete active site remodeling. *Nat Chem Biol* **9**, 494–498.
- 179 Barbas CF, Heine A, Zhong G, Hoffmann T, Gramatikova S, Björnstedt R, List B, Anderson J, Stura EA, Wilson IA & Lerner RA (1997) Immune versus natural selection: antibody aldolases with enzymic rates but broader scope. *Science* **278**, 2085–2092.
- 180 Reetz MT, Bocola M, Carballeira JD, Zha D & Vogel A (2005) Expanding the range of substrate acceptance of enzymes: Combinatorial active-site saturation test. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **44**, 4192–4196.
- 181 Stellmacher L, Sandalova T, Schneider S, Schneider G, Sprenger GA & Samland AK (2016) Supporting Information: Novel mode of inhibition by D-tagatose 6-phosphate through a Heyns rearrangement in the active site of transaldolase B variants. *Acta Crystallogr. Sect. D Struct. Biol.* **72**, 467–476.
- 182 Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D. & Bairoch A (2005) Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In *The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press* (Walker JM, ed), pp. 571–607. Humana Press, Totowa, New Jersey.
- 183 Sautner V (2016) Mechanistic Characterization of Transaldolase from *Thermoplasma Acidophilum* and Preliminary Analysis of the QncN / L-M Protein System from *Streptomyces Melanovinaceus*. *Dissertation*, Universität Göttingen.
- 184 Junker SA (2018) Entwicklung neuartiger Aldolasevarianten für nicht hydroxylierte

- Donorsubstrate mittels gelenkter Evolution. *Dissertation*, Technischen Universität Darmstadt zur.
- 185 Maurady A, Zdanov A, de Moissac D, Beaudry D & Sygusch J (2002) A conserved glutamate residue exhibits multifunctional catalytic roles in D-fructose-1,6-bisphosphate aldolases. *J. Biol. Chem.* **277**, 9474–9483.
- 186 Jeffery CJ, Hardré R & Salmon L (2001) Crystal structure of rabbit phosphoglucose isomerase complexed with 5-phospho-D-arabinonate identifies the role of Glu357 in catalysis. *Biochemistry* **40**, 1560–1566.
- 187 Cosgrove MS, Naylor C, Paludan S, Adams MJ & Levy HR (1998) On the mechanism of the reaction catalyzed by glucose 6-phosphate dehydrogenase. *Biochemistry* **37**, 2759–2767.
- 188 Fersht A (1999) *Structure and mechanism in protein science: a guide to enzyme catalysis and protein folding* W. H. Freeman and Company., New York.
- 189 Lassila JK, Baker D & Herschlag D (2010) Origins of catalysis by computationally designed retroaldolase enzymes. *PNAS* **107**, 4937–4942.
- 190 Hernández K, Szekrenyi A & Clapés P (2018) Nucleophile Promiscuity of Natural and Engineered Aldolases. *ChemBioChem*, 1353–1358.
- 191 Eisenberg D, Schwarz E, Komaromy M & Wall R (1984) Analysis of Membrane and Surface Protein Sequences with the Hydrophobic Moment Plot. *J. Mol. Biol.* **179**, 125–142.
- 192 Philip V, Harris J, Adams R, Nguyen D, Spiers J, Baudry J, Howell EE & Hinde RJ (2011) A Survey of Aspartate - Phenylalanine and Glutamate - Phenylalanine Interactions in the Protein Data Bank: Searching for Anion -  $\pi$  Pairs. *Biochemistry* **50**, 2939–2950.
- 193 Morris AJ & Tolan DR (1993) Site-directed mutagenesis identifies aspartate 33 as a previously unidentified critical residue in the catalytic mechanism of rabbit aldolase A. *J. Biol. Chem.* **268**, 1095–1100.
- 194 Choi KH, Shi J, Hopkins CE, Tolan DR & Allen KN (2001) Snapshots of catalysis: the structure of fructose-1,6-(bis)phosphate aldolase covalently bound to the substrate dihydroxyacetone phosphate. *Biochemistry* **40**, 13868–13875.
- 195 Schafer JW, Zoi I, Antoniou D & Schwartz SD (2019) Optimization of the Turnover in Artificial Enzymes via Directed Evolution Results in the Coupling of Protein Dynamics to Chemistry. *J. Am. Chem. Soc.* **141**, 10431–10439.
- 196 Schwans JP, Sunden F, Gonzalez A, Tsai Y & Herschlag D (2013) Uncovering the Determinants of a Highly Perturbed Tyrosine pKa in the active site of ketosteroid isomerase. *Biochemistry* **52**, 7840–7855.
- 197 Daniels AD, Campeotto I, Van Der Kamp MW, Bolt AH, Trinh CH, Phillips SE V, Pearson AR, Nelson A, Mulholland AJ & Berry A (2014) Reaction mechanism of N - acetylneuraminic acid lyase revealed by a combination of crystallography, QM/MM simulation, and mutagenesis. *ACS Chem. Biol.* **9**, 1025–1032.
- 198 Sun S & Toney MD (1999) Evidence for a two-base mechanism involving tyrosine-265 from arginine-219 mutants of alanine racemase. *Biochemistry* **38**, 4058–4065.
- 199 Höhne M, Schätzle S, Jochens H, Robins K & Bornscheuer UT (2010) Rational assignment of key motifs for function guides in silico enzyme identification. *Nat. Chem. Biol.* **6**, 807–813.
- 200 Racker E (1952) Enzymatic synthesis and breakdown of desoxyribose phosphate. *J. Biol. Chem.* **196**, 347–365.
- 201 Racker E (1951) Enzymatic synthesis of deoxypentose phosphate. *Nature* **167**, 408–409.
- 202 Barbas CF, Wang YF & Wong CH (1990) Deoxyribose-5-phosphate Aldolase as a Synthetic Catalyst. *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 2013–2014.

- 203 Lorillière M, Guérard-Hélaine C, Gefflaut T, Fessner WD, Clapés P, Charmantray F & Hecquet L (2020) Convergent in situ Generation of Both Transketolase Substrates via Transaminase and Aldolase Reactions for Sequential One-Pot, Three-Step Cascade Synthesis of Ketoses. *ChemCatChem* **12**, 812–817.
- 204 De Berardinis V, Guérard-Hélaine C, Darii E, Bastard K, Hélaine V, Mariage A, Petit JL, Poupard N, Sánchez-Moreno I, Stam M, Gefflaut T, Salanoubat M & Lemaire M (2017) Expanding the reaction space of aldolases using hydroxypyruvate as a nucleophilic substrate. *Green Chem.* **19**, 519–526.
- 205 Sigma-Aldrich (2018) Certificate of Analysis - D-Tagatose 6-phosphate lithium salt (product number 50661). .
- 206 Pierce J, Serianni A & Barker R (1985) Anomerization of furanose sugars and sugar phosphates. *J. Am. Chem. Soc.* **107**, 2448–2456.
- 207 Choi KH & Tolan DR (2004) Presteady-State Kinetic Evidence for a Ring-Opening Activity in Fructose-1,6-(bis)phosphate Aldolase. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 3402–3403.
- 208 Wang Z (2009) Heyns Rearrangement. In *Comprehensive Organic Name Reactions and Reagents* pp. 1403–1407. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey.
- 209 Westphal G & Kroh L (1985) Zum Mechanismus der „frühen Phase“ der MAILLARD-Reaktion 1. Mitt. Einfluß der Struktur des Kohlenhydrats und der Aminosäure auf die Bildung des N-Glycosids. In *Die Nahrung* pp. 757–764.

# 11 Anhang

## 11.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Reaktionsschema der Transaldolasen und Eingliederung in den Stoffwechsel....	4
Abb. 1.2: TalB-katalysierte Reaktionen mit verschiedenen Aldehydakzeptoren .....	6
Abb. 1.3: Postulierter Mechanismus für TalB (Stand Beginn dieser Arbeit) .....	7
Abb. 1.4: Phylogenetischer Baum der Transaldolase-Familie .....	12
Abb. 1.5 Protein-Ähnlichkeitsnetzwerk aller Sequenzen der Transaldolase Datenbank....	13
Abb. 1.6: Aldolasegruppen nach Donorsubstrat klassifiziert .....	15
Abb. 1.7: Stereoisomere der DHAP-Aldolasen .....	15
Abb. 1.8 Reaktionsschema der Fructose-6-phosphat-Aldolase .....	17
Abb. 1.9 Donorbeispiele der FSAA [49,54–56] .....	18
Abb. 1.10: Synthesebeispiele der FSAA .....	19
Abb. 1.11: Sequenzvergleich von FSAA und TalB.....	31
Abb. 1.12: H-Brückennetzwerk des katalytischen Wassers im Aktiven Zentrum .....	36
Abb. 1.13: Verschiedene Arten von Isomerie und Stereokonfiguration.....	38
Abb. 2.1: Übersicht über die QuikChange XL zielgerichtete Mutagenese .....	53
Abb. 2.2: Stufengradient der Ni-NTA-Affinitätschromatographie.....	59
Abb. 2.3: Transaldolase Assay .....	65
Abb. 2.4: D-F6P-Aldolase Assay .....	66
Abb. 2.5: FRK Assay.....	66
Abb. 2.6: GatD Assay .....	67
Abb. 2.7: GldA Assay.....	67
Abb. 2.8: TKT Assay .....	67
Abb. 2.9: Pipettierschema für die Verdünnungsreihe zur Kalibrierung in Mikrotiterplatten	68
Abb. 2.10: Retroaldolassay mit GldA .....	69
Abb. 2.11: Reaktionsschema von AA mit dem aktiven Lys von FSAA.....	71
Abb. 2.12: Synthesereaktion D-S7P .....	72
Abb. 2.13: Tagatose-Umsatzassay .....	73
Abb. 2.14: Reaktionsschema der Reduktion des Schiff'sche Base Intermediates, .....	77
Abb. 2.15: Mischungsverhältnisse in Mikrotiterscreeningplatte.....	79
Abb. 2.16: <i>Hanging-drop</i> Methode.....	80
Abb. 3.1: Aktives Zentrum mit Mutagenesestellen.....	86
Abb. 3.2: SDS-PAGE der gereinigten His <sub>6</sub> -FSAA- und His <sub>6</sub> -TalB-Varianten .....	88
Abb. 3.3: Bestimmung der apparenten kinetischen Parameter .....	91
Abb. 3.4: TalB-Aktivitäten in verschiedenen Puffern.....	94
Abb. 3.5: Hintergrundreaktion bei hohen pH-Werten im Aldolaseassay .....	95
Abb. 3.6: Vergleich der pH-Abhängigkeit des Reaktionstyps und der Puffersysteme .....	96
Abb. 3.7: Dargestellt sind die pH-Profile .....	97
Abb. 3.8: Inhibition von FSAA <sup>wt</sup> durch AA.....	99
Abb. 3.9: Bestimmung der pK <sub>a</sub> -Werte des aktiven Lys .....	100
Abb. 3.10: CD-Spektren des fernen Spektralbereichs .....	102
Abb. 3.11: Quartärstruktur der FSAA.....	103
Abb. 3.12: Thermischer Übergang.....	104
Abb. 3.13: Sequenzmotiv SF1 basierend auf 1185 Transaldolasesequenzen.....	106
Abb. 3.14: Sequenzmotiv SF5 basierend auf 246 Sequenzen.....	106

Abb. 3.15: Sequenzvergleich von TalB und FSAA in der Länge des Sequenzmotives....	106
Abb. 3.16: Vergleich von SF4 mit SF5.....	108
Abb. 3.17: Absorptionsanstieg im Transaldolaseassay durch F6P-Aldolaseaktivität .....	110
Abb. 3.18: Spezifische Transaldolaseaktivität.....	113
Abb. 3.19: Auftragung der spezifischen Aktivität für die Spaltung von D-S7P für FSAA <sup>wt</sup>	114
Abb. 3.20: Inhibition von FSAA, TalB und deren Varianten, inkubiert mit D-T6P.....	117
Abb. 3.21: Inhibitionskinetiken von TalB <sup>F178Y</sup> .....	118
Abb. 3.22: MS Ergebnisse exemplarisch .....	120
Abb. 3.23: Direkte Darstellung nach Michaelis-Menten der Inhibition.....	121
Abb. 3.24: Doppelt-reziproke Auftragung nach Lineweaver-Burk der Messwerte.....	122
Abb. 3.25: Positive Screeningergebnisse .....	128
Abb. 3.26: Überlagerung der FSAA-/TalB-Varianten mit den entsprechenden WT .....	132
Abb. 3.27: Unterschiedliche Positionierung der C-terminalen Helix.....	132
Abb. 3.28: Bindungsmotiv des katalytischen Wassermoleküls .....	133
Abb. 3.29: Blockierung der Phosphat tasche in TalB <sup>E96Q</sup> durch ein Sulfation. ....	134
Abb. 3.30: Phosphatgruppe von D-F6P in der Bindetasche.....	134
Abb. 3.31: D-F6P Bindung in TalB <sup>Q96E</sup> .....	135
Abb. 3.32: Wechselwirkungen von D-F6P im Aktiven Zentrum von TalB <sup>E96Q</sup> .....	135
Abb. 3.33: D-T6P Ligandenbindung in der TalB <sup>F178Y</sup> .....	136
Abb. 3.34: Wechselwirkungen von D-T6P im Aktiven Zentrum von TalB <sup>F178Y</sup> .....	137
Abb. 3.35: Kovalente Modifikation von FSAA mit AA.....	138
Abb. 4.1: Hydrophobizität der Umgebung des katalytischen Lysinrestes .....	149
Abb. 4.2: Destabilisierende Interaktion .....	152
Abb. 4.3: Modelle der FSAA mit kovalent gebundenen D-F6P Intermediaten .....	157
Abb. 4.4: Postulierter Mechanismus .....	159
Abb. 4.5: Mögliche Protonierungswege des Alkoxides in TalB .....	160
Abb. 4.6: Möglicher Transaldolaseassay ohne falsch-positiven Aktivitätsnachweis .....	166
Abb. 4.7: Mögliche Transaldolase-reaktion ohne falsch-positiven Nachweis.....	167
Abb. 4.8: Deprotonierung eines Carbonsäureamids zum Amidat .....	173
Abb. 4.9: Modell der offenkettigen Form von D-T6P in TalB <sup>E96Q</sup> .....	175
Abb. 4.10: Überlagerung der Strukturmodelle.....	176
Abb. 4.11: Postulierter Mechanismus für die Ringöffnung in FSAA.....	177
Abb. 4.12: Postulierter Mechanismus der D-T6P Inhibition in TalB <sup>F178Y</sup> .....	178

## 11.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1: Übersicht über die Transaldolase B.....	5
Tab. 1.2: Übersicht über die Fructose-6-phosphat-Aldolase.....	16
Tab. 1.3: Übersicht über relevante Kristallstrukturen von Transaldolasen .....	27
Tab. 1.4: Übersicht über relevante Kristallstrukturen von Aldolasen.....	29
Tab. 1.5: Übersicht über die katalytischen Reste der FSAA und TalB.....	34
Tab. 2.1: Verwendete <i>E. coli</i> Stämme mit relevanten Genotypen und Marker.....	46
Tab. 2.2: Verwendete und konstruierte Plasmide .....	47
Tab. 2.3: Oligonukleotide für zielgerichtete Mutagenese und Sequenzierung .....	48
Tab. 2.4: Nährmedien (nach [137], Appendix 2) .....	50
Tab. 2.5: Antibiotika und Induktor .....	50
Tab. 2.6: Primerdesign.....	52
Tab. 2.7: PCR Reaktionsgemisch.....	52
Tab. 2.8: PCR-Programm .....	53
Tab. 2.9: Verwendete Expressionsvektoren/-stämme .....	56

Tab. 2.10: Verwendete Reinigungsmethoden und Lysepuffer .....	56
Tab. 2.11: Zusammensetzung der SDS-Gele (Angaben für 6 Gele).....	63
Tab. 2.12: BSA-Standards für Bradford-Kalibrierung .....	64
Tab. 2.13: Erfolgreich getestete Kristallisationsbedingungen .....	81
Tab. 3.1: Reinigungsschema für alle charakterisierten Proteine.....	87
Tab. 3.2: Spezifische Aktivitäten für die D-F6P-Aldolase- und Transaldolasereaktion. ....	90
Tab. 3.3: Apparente kinetische Parameter.....	92
Tab. 3.4: pK <sub>a</sub> -Werte der verwendeten Puffersysteme .....	95
Tab. 3.5: pK <sub>a</sub> -Werte der wichtigen katalytischen Reste .....	98
Tab. 3.6: Experimentell bestimmte pK <sub>a</sub> -Werte des aktiven Lys .....	101
Tab. 3.7: Denaturierungstemperatur für FSAA (A) und TalB (B).....	104
Tab. 3.8: Aminosäuren des hydrophoben Clusters der hTal.....	109
Tab. 3.9: Spezifische D-F6P-Aldolase- und Transaldolaseaktivitäten in Mikrotiterplatten	111
Tab. 3.10: Spezifische Transaldolaseaktivitäten .....	114
Tab. 3.11: Halbwertszeiten der D-T6P Inhibierung .....	117
Tab. 3.12: Spezifische Aktivitäten in Abwesenheit von D-T6P.....	118
Tab. 3.13: MS-Ergebnisse der Inkubation mit D-T6P .....	119
Tab. 3.14: Kinetische Konstanten der Michaelis-Menten-Auftragung .....	121
Tab. 3.15: Ergebnisse der Reduktionsversuche von FSAA <sup>wt</sup> .....	124
Tab. 3.16: MS-Ergebnisse der reduzierten Enzym-Substrat-Komplexe.....	125
Tab. 3.17: Angestrebte Kristallstrukturen, Begründungen und Ergebnisse.....	127
Tab. 3.18: Datensammlung und Verfeinerungsstatistiken.....	129
Tab. 4.1: Ausschnitt der Wasserstoffbrücken-bildenden Reste .....	140
Tab. 4.2: Aktualisierte Übersicht über die katalytischen Reste der FSAA und TalB .....	162





## 12 Danksagung

Mein großer Dank gilt Herrn Professor Dr. Sprenger, welcher mir als Doktorvater am Institut für Mikrobiologie der Universität Stuttgart das Thema überlassen hat. Zudem möchte ich mich für die Denkanstöße, die Unterstützung, die Teilnahme an Tagungen, sowie die Geduld herzlich bedanken.

Privatdozentin Dr. Samland gilt mein besonderer Dank für die Hilfe bei der Planung und der Durchführung der Arbeiten, anregende Diskussionen und Motivation.

I would also like to take this opportunity to thank Dr. Inoue for the expression and concentration of FSAAQ59E for crystallisation in previous work at the institute.

Ebenfalls möchte ich mich bei Dr. S. Schneider für die Arbeiten zur Inhibition mit D-T6P bedanken.

Ich danke meinen Kollegen Frau Frisch (Expression und Aufreinigung TKT, D-S7P-Synthese), Frau Guitart-Font (Inhibition), Herrn Lorenz (Konservierungsanalyse), Frau Kummer (Sequenzmotive), Herrn Schmidtke (Aufkonzentrierungen) und Herrn Garcia. Auch für die Begleitung auf meinem Weg möchte ich mich beim Büro 3, der frühen Mensa-Truppe und Labor 5, insbesondere Herrn Wolf, Herrn Baumgärtner, Herrn Birke und Frau Bürger bedanken. Nicht zuletzt vielen Dank für die Unterstützung an die wissenschaftliche Hilfskräften und Studenten, besonders an Herrn Eppinger und Herrn Wirth.

Für die freundliche Übernahme des Korreferats möchte ich mich bei apl. Professor Dr. Pleiss vom Institut für Biochemie und Technische Biochemie der Universität Stuttgart bedanken.

Für die NMR Analyse bedanke ich mich beim Institut für Organische Chemie der Universität Stuttgart.

Additionally, my thanks go to Professor G. Schneider, Professor Achour, Dr. Schnell, Dr. Sandalova and Dr. Moche at the Karolinska Institute, Stockholm, Sweden for the opportunity to solve the crystal structures. I also want to thank the other colleagues from

the group around Professor G. Schneider. Moreover, my thanks go to the beam line staff at DESY, Hamburg / Diamond Light Source, Oxfordshire, United Kingdom / BESSY, Berlin and European Synchrotron Radiation Facility, Grenoble, France. I want to thank the Protein Science Facility (PSF) at the Karolinska Institute, Stockholm, Sweden for the cooperation and Dr. Srivastava at the Royal Institute of Technology, Stockholm Sweden for the LC-ESI-MS analysis.

Ich möchte Professor Kuhn der Universität Hohenheim, Stuttgart und Professor Leptihn der Zhejiang University, China meinen Dank äußern für die Zusammenarbeit an den CD-/DLS-Spektren. Außerdem möchte ich mich bei Dr. Pfannstiel für die MS-Analyse mit tryptischem Verdau bedanken.

My thanks also go to Professor Lemaire at the Université Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand, France for providing the pET22bfsaA. As well, my thanks go to Dr. Sanchez-Moreno for the help with the synthesis of D-S7P.

Außerdem möchte ich mich bei Frau Heilig und Herrn Professor Fessner der Technischen Universität Darmstadt für die Hilfe mit der FRK zur Synthese der D-S7P, der Interpretation der NMR-Daten, sowie der Überlassung von HB, Methodon und PEP bedanken.

Auch möchte ich InnoSweet, Braunschweig meinen Dank für die D-Tag aussprechen.

Für die finanzielle Unterstützung gilt mein Dank der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG SA 1848/3-1) sowie der Erwin Riesch Stiftung. In addition, my thanks for financial support go to the Swedish Science Council.

Abschließend möchte ich mich sehr bei meiner Familie, meinem Mann, meinem Sohn und meinen Freunden bedanken. Diese haben mich unterstützt, mitgefiebert und waren immer für mich da. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.