Neue Wege der Folsäurebiosynthese
-
Untersuchungen zum Katalysemechanismus der Aminodesoxychorismat-Synthase des Modellorganismus *Bacillus subtilis*

vorgelegt von

Diplom-Biochemiker

Heiko Schadt

aus Freiburg im Breisgau

Von der Fakultät II – Mathematik und Naturwissenschaften

der Technischen Universität Berlin

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender:	Prof. Dr. phil. nat. T. Friedrich
Berichter/Gutachter:	Prof. Dr. rer. nat. R. D. Süssmuth
Berichter/Gutachter:	PD Dr.-Ing. U. Keller

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 9. Februar 2009

Berlin 2009

D83

für Simone

Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der *para*-Aminobenzoesäurebiosynthese (*p*ABA) als Teil der Folsäurebiosynthese des Modellorganismus *Bacillus subtilis*. Sequenzvergleiche der Aminodesoxychorismat (ADC) Synthase von *B. subtilis*, die den ersten Schritt der *p*ABA-Biosynthese katalysiert, mit dem bereits charakterisierten homologen Enzym aus *E. coli* hatten ergeben, dass der wichtigste katalytische Rest des *E. coli* Enzyms, Lysin 274, bei *B. subtilis* sowie einigen weiteren Mikroorganismen durch ein Alanin ersetzt ist, welches keinesfalls die Aufgabe des Lysins übernehmen kann. Bei *E. coli* bildet Lys-274 ein kovalentes Addukt mit dem Substrat Chorismat aus, und aktiviert dieses dadurch für einen nukleophilen Angriff von Ammoniak auf C4 des Chorismats, so dass 4-Amino-4-desoxychorismat (ADC) gebildet und freigesetzt wird. Dieses ADC wird dann durch ein weiteres Enzym, die ADC-Lyase, unter Abspaltung von Pyruvat zu *p*ABA aromatisiert.

Die Untersuchung des Katalysemechanismus wurde auf der Basis verschiedener Experimente durchgeführt: So wurde mittels massenspektrometrischer Vermessung des kompletten Proteins gezeigt, dass im Gegensatz zum *E. coli* Katalysemechanismus tatsächlich kein kovalentes Substrat-Enzym-Intermediat gebildet wird, und bei *B. subtilis* ein grundlegend anderer Katalysemechanismus vorliegt. Ein weiteres Experiment zur Untersuchung des Katalysemechanismus basierte auf der massenspektrometrischen Analyse der Reaktions-produkte der ADC-Synthase von *B. subtilis* im Vergleich zu *E. coli*. Auch hier zeigten sich grundlegende Unterschiede: Während bei *E. coli* ausschließlich ADC gebildet wird, entsteht bei der *B. subtilis* Reaktion noch ein weiteres Reaktionsprodukt, welches als 2-Amino-2-desoxyisochorismat (ADIC) identifiziert werden konnte. Auf der Grundlage dieser und weiterer Experimente wurde ein Katalysemechanismus für die *B. subtilis* ADC-Synthase als Vertreter der alaninhaltigen ADC-Synthasen postuliert: Chorismat wird durch einen nukleophilen Angriff von Ammoniak, der aus Glutamin stammt, zu ADIC. Ammoniak übernimmt also die Funktion, die im *E. coli* Enzym die Seitenkette Lys-274 ausübt. ADIC wird dann durch einen zweiten nukleophilen Angriff von Ammoniak, der ebenfalls aus Glutamin stammt, zu ADC. Beide Schritte werden durch die ADC-Synthase katalysiert. In einem dritten, von der ADC-Lyase katalysierten Schritt, wird ADC schließlich zu *p*ABA aromatisiert.

Zur Bestimmung der enzymkinetischen Parameter wurde ein geeignetes Assay-System entwickelt, das es ermöglichte, die kinetischen Parameter der ADC-Synthase-Reaktion von *E. coli* aus der Literatur zu reproduzieren, und die der ADC-Synthase-Reaktion von *B. subtilis* zu bestimmen.

1 EINLEITUNG 1
1.1 Die Bedeutung der Folsäure 1
1.2 Der Folsäuremetabolismus als Target von Antibiotika und Chemotherapeutika 2
1.2.1 Abyssomicin C und atrop-Abyssomicin C 4
1.3 Die Funktion der Folsäure 9
1.4 Die Folsäurebiosynthese 11
1.5 Das Folat-Operon von *Bacillus subtilis* 13
1.6 Die *p*-Aminobenzoesäurebiosynthese 14
1.6.1 Die Glutamin-Amidotransferase (PabA) 16
1.6.2 Die Aminodesoxychorismat-Synthase (PabB) 17
1.6.3 Die Aminodesoxychorismat-Lyase (PabC) 19

2 GRUNDLAGEN 21
2.1 Chromatographie und Massenspektrometrie 21
2.1.1 Chromatographiesystem zur Proteinreinigung 21
2.1.2 Elektrospray-Ionisierung (ESI) in der Massenspektrometrie 23
2.1.3 Der Triple-Quadrupol-Analysator 25
2.1.4 Das MDS Sciex QTrap 2000-Massenspektrometer 26
2.1.5 Der TOF-Analysator 28
2.1.6 Das Micromass Q-TOF2-Massenspektrometer 30
2.1.7 LC-ESI-MS-Kopplung 32
2.2 Enzymkinetik 33

3 ZIELSETZUNG 37

4 MATERIAL UND METHODEN 38
4.1 Material 38
4.1.1 Geräte 38
4.1.2 Chemikalien 39
4.1.3 Enzyme 40
4.1.4 Medien 40
4.1.5 Medienzusätze 41
4.1.6 Lösungen 41
4.1.7 Bakterienstämme 48
4.1.8 Vektoren 49
4.1.9 Konstrukte 50
4.1.10 Primer 58
4.1.11 Primer für die Mutagenese 59
4.2 Molekularbiologische Methoden 59
4.2.1 Agarose-Gelelektrophorese 59
4.2.2 Polymerasekettenreaktion (PCR) 59
4.2.3 Restriktionsverdau, Phosphatase-Reaktionen und Ligationen 60
4.2.4 Reinigung von DNA-Fragmenten 61
4.2.5 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen 61
4.2.6 Transformation von kompetenten *E. coli*-Zellen mit Plasmid-DNA 61
4.2.7 Isolierung von Plasmid-DNA 61
4.2.8 Mutagenese 62

4.3 Proteinbiochemische Methoden 63
4.3.1 Proteinexpression und Reinigung 63
4.3.2 Proteinbestimmung 65
4.3.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) 66
4.3.4 Western Blot 66
4.3.5 Vorbereitung und Messung von Proteinen über ESI-MS 66
4.3.6 Analyse der Reaktionsprodukte über ESI-MS 67
4.3.7 *Steady State*-Kinetik der ADC-Synthase-Reaktion 68
4.4 Synthese, Reinigung und NMR-Analyse des Zwischenprodukts der ADC-Synthasereaktion 70

5 ERGEBNISSE 71
5.1 Phylogenetische Analyse der ADC-Synthasen verschiedener Mikroorganismen 71
5.2 TOF-Messungen des Proteins 73
5.3 Massenspektrometrische Analyse der Reaktionsprodukte 81
5.4 Aufreinigung und Charakterisierung der Reaktionsprodukte 83
5.5 Markierungsexperimente 86
5.6 Untersuchung von mutierten ADC-Synthasen 88
5.7 Untersuchungen zur *B. subtilis* ADC-Synthase und Anthranilat-Synthase 89
5.7.1 Vergleich *B. subtilis* ADC-Synthase und Anthranilat-Synthase 89
5.7.2 Untersuchungen zur Tryptophan-Abhängigkeit der *B. subtilis* ADC-Synthase 92
5.8 Enzymkinetische Charakterisierung 93
5.8.1 Entwicklung und Validierung des MRM-basierten Assays 93
5.8.2 *E. coli* ADC-Synthase 96
5.8.3 *B. subtilis* ADC-Synthase 98

6 DISKUSSION 102
6.1 Katalysemechanismus der *B. subtilis* ADC-Synthase 102
6.1.1 Der Katalysemechanismus der ADC-Synthase bei *E. coli* nach Bartlett 102
6.1.2 Der Katalysemechanismus der ADC-Synthase bei *E. coli* nach Toney und Abell 107
6.1.3 Der Katalysemechanismus der ADC-Synthase bei *B. subtilis* 110
6.1.4 Kinetische Konstanten der ADC-Synthase bei *B. subtilis* 115
6.2 Literaturbekannte ADIC-Synthasen 120
6.3 Mutagenese bei der *B. subtilis* ADC-Synthase 124
6.4 Folsäurebiosynthese und Tryptophanbiosynthese bei *B. subtilis* 127
6.4.1 Genetische Organisation 127
6.4.2 Proteinstruktur und Katalyse der Anthranilat-Synthase und ADC-Synthase von *B. subtilis* 128
6.5 Die ADC-Lyase bei *E. coli* und *B. subtilis* 132
6.6 Zusammenfassung und Ausblick 135

7 LITERATUR 136

8 ABBILDUNGSVERZEICHNIS 146

9 TABELLENVERZEICHNIS 153

ACN	Acetonitril
ADC	4-Amino-4-desoxychorismat
ADIC	2-Amino-2-desoxyisochorismat
Amp	Ampicillin
API	*Atmospheric Pressure Ionisation*
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Anthranilat-Synthase
ADCL	Aminodesoxychorismat-Lyase
ADCS	Aminodesoxychorismat-Synthase
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Rinderserumalbumin
CRM	*Charged Residue Model*
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
dTMP	Desoxythymidinmonophosphat
DTT	Dithiothreitol
dUMP	Desoxyuridinmonophosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EIC	*Extracted ion chromatogram*
EMS	*Enhanced MS*
EPI	*Enhanced Product Ion Scan*
ES	Elektrospray
ESI	Elektrospray-Ionisation
eV	Elektronenvolt
GATase	Glutamin-Amidotransferase
HPLC	*High performance liquid chromatography*
IEM	*Ion Evaporation Model*
IMP	Inositolmonophosphat
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kDa	Kilodalton
LC	*Liquid chromatography*

MRM	*Multiple Reaction Monitoring*
MCP	*Multi Channel Plate*
MCS	*Multiple cloning site*
MS	Massenspektrometrie
m/z	Verhältnis Masse zu Ladung
NL	*Neutral Loss* / Neutralverlust
OD	Optische Dichte
ORF	*Open reading frame*
*p*ABA	*p*-Aminobenzoesäure
PabA	β-Untereinheit der ADC-Synthase
PabB	α-Untereinheit der ADC-Synthase
PabC	ADC-Lyase
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PC	*Precursor Ion Scan*
PCR	Polymerasekettenreaktion
PI	*Product Ion Scan* / Produktionen *Scan*
PLP	Pyridoxal-5'-phosphat
TOF	*Time of flight*
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	*Revolutions per Minute*
SDS	Natriumdodecylsulfat
TDC	*Time to Digital Converter*
TEMED	*N,N,N',N'*-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofolsäure
TIC	Totalionen-Chromatogramm
TRAP	Tryptophan-RNA-Binding Attenuation Protein
TrpE	α-Untereinheit der Anthranilat-Synthase
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

Für Aminosäuren wurde entsprechend den Vorschlägen der IUPAC-IUB-Kommission (1984) für biologische Nomenklatur der Ein- oder Dreibuchstaben-*Code* verwendet.

1 Einleitung

"*Am Abend Süßkartoffeln essen, schlafen gehen,*
am Morgen Süßkartoffeln essen, arbeiten,
am Mittag geht es auch ohne,"
sagt ein armer Mann aus Vietnam.

Die Ernährung vieler Menschen in den Entwicklungsländern ist einseitig. Viele ernähren sich Tag für Tag nur von Reis, Mais, Weizen oder anderen Grundnahrungsmitteln. Sie enthalten zwar genug Nährstoffe, aber nicht das ganze Spektrum der Vitamine und Mineralstoffe, die ein Mensch benötigt. Wenn der Körper zu wenig Vitamine, Mineralstoffe oder Proteine erhält, hat das auf Dauer ernsthafte gesundheitliche Folgen. Eine Mangelernährung wird deshalb oft als "versteckter Hunger" bezeichnet. (...) Das Kinderhilfswerk der Vereinten Nationen (UNICEF) hat 2004 den ersten Bericht zu den weltweiten Auswirkungen von Vitamin- und Mineralstoffmangel veröffentlicht. Danach leiden rund zwei Milliarden Kinder und Erwachsene unter Mangelernährung. Jedes zweite Kind in Entwicklungsländern ist dadurch geschwächt. (...) Folsäuremangel in der Schwangerschaft führt in Entwicklungsländern jedes Jahr zur Geburt von rund 200.000 Kindern mit schweren Behinderungen." (Bundesministerium für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, http://www.bmz.de/de/themen/ernaehrung/hunger/zahlen_und_fakten/mangelernaehrung/index.html, 18.12.2008)

1.1 Die Bedeutung der Folsäure

Folsäure (lateinisch *Folium*, Blatt), auch Vitamin B9, Vitamin M oder Pteroylglutamat genannt, gehört zu den Vitaminen der B-Gruppe und besteht aus einem Pteridinring, *para*-Aminobenzoesäure und Glutamat (Abbildung 1-1). Während der menschliche Organismus Folsäure nicht synthetisieren kann und seinen Bedarf über die Nahrung decken muss, verfügen Pflanzen, Bakterien und einige Protozoen wie z.B. *Plasmodien* über die zur Biosynthese erforderlichen Enzyme. Nahrungsmittel, die besonders viel Folsäure enthalten, sind Vollkornprodukte, grünes Blattgemüse, Spinat, Brokkoli, Rosenkohl, Karotten und Spargel. Reis, das Hauptnahrungsmittel von etwa 3 Milliarden Menschen, enthält hingegen kaum Folsäure. Daher ist Folsäuremangel insbesondere in Entwicklungsländern weit verbreitet. Folsäuremangel kann zu einer Reihe von Erkrankungen führen, insbesondere zu Neuralrohrdefekten wie spina bifida bei Kindern und Megaloblastischer Anämie

(Storozhenko *et al.*, 2007). In den USA und in Kanada ist gesetzlich vorgeschrieben, dass Mehl mit Folsäure versetzt werden muss. Da nahezu jeder Mensch täglich Brot, Nudeln, Kekse oder andere mehlhaltige Produkte zu sich nimmt, verbesserte sich in diesen Ländern die Folsäureversorgung: Seit dem das Mehl mit Folsäure supplementiert wird, werden in diesen Ländern nur noch etwa halb so viele Kinder mit Fehlbildungen, die durch Folsäuremangel verursacht sind, geboren.

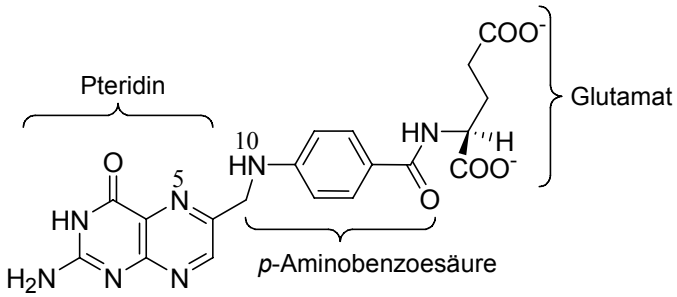


Abbildung 1-1. Struktur der Folsäure.

1.2 Der Folsäuremetabolismus als Target von Antibiotika und Chemotherapeutika

Da Folsäure nur von Bakterien und Pflanzen, nicht aber von Mensch und Tier synthetisiert werden kann, bietet sich ihre Biosynthese als Wirkort für Antibiotika an. Tatsächlich waren die ersten chemisch-synthetischen Antibiotika, die kurz nach dem Penicillin entdeckt wurden die Sulfonamid-Antibiotika. Im Jahr 1932 wurde Gerhard Domagk bei der Untersuchung neu synthetisierter Azofarbstoffe die antibiotische Wirkung des Prontosils (Abbildung 1-2) auf *Streptokokken* aufmerksam (Domagk, 1935). Prontosil selbst besitzt zwar keine antibiotische Aktivität, wird jedoch nach Aufnahme durch den Säugetierorganismus zum wirksamen Sulfanilamid (Abbildung 1-2) metabolisiert (Fuller, 1937). Für die Entdeckung der antibakteriellen Effekte des Prontosils erhielt Gerhard Domagk 1939 den Nobelpreis, den er jedoch erst 1947 tatsächlich entgegennehmen konnte, da die nationalsozialistische Regierung ihm nicht gestattet hatte, die Auszeichnung anzunehmen.

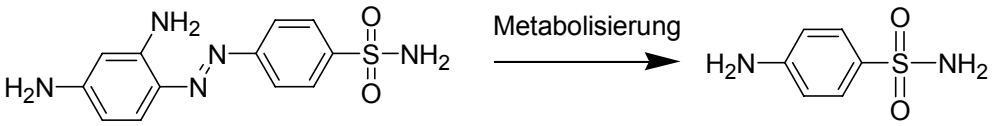


Abbildung 1-2. Struktur von Prontosil rubrum (A) und Sulfanilamid (B), dem antibiotisch wirksamen Metaboliten des Prontosils..

Durch chemische Modifikation der Prontosil-Grundstruktur wurde eine große strukturelle Vielfalt an Sulfonamiden entwickelt, die bei unterschiedlichen pharmakokinetischen und toxikologischen Eigenschaften eine einheitliche Wirkung zeigten. Entscheidend für die antibiotische Wirkung ist die freie Aminogruppe in *para*-Stellung (Northey, 1940), da Sulfonamide kompetitiv die *p*-Aminobenzoesäure verdrängen. Damit diese Verdrängung in ausreichendem Maße verläuft, müssen Sulfonamide in relativ hohen Dosen (im Gramm-Bereich) verabreicht werden. Da Bakterien *p*-Aminobenzoesäure zwar zur Vermehrung benötigen, durch einen Mangel aber nicht abgetötet werden, wirken Sulfonamide bakteriostatisch und nicht bakterizid. Durch umfangreichen Einsatz von Sulfonamid-Antibiotika bildeten sich rasch Resistenzen aus, so dass ihre Anwendung stark eingeschränkt wurde. Heutzutage werden Sulfonamide nur noch in Kombination mit Diaminobenzylpyrimidinen verabreicht, deren prominentester Vertreter Trimethoprim (Abbildung 1-3) ist, das die Dihydrofolsäure-Reduktase hemmt (Nichol und Welch, 1950; Burchall und Hitchings, 1965). Diese katalysiert die Reduktion der bei der Thymidinsynthese entstehenden Dihydrofolsäure zur Tetrahydrofolsäure. Wird die Dihydrofolsäure-Reduktase gehemmt, so kann Tetrahydrofolsäure nicht regeneriert werden, was eine Störung der Purin- und Thymidinbiosynthese verursacht. Da beides elementare Bausteine der Replikation aber auch der Transkription sind, wird so das Bakterienwachstum gehemmt. Die menschliche Dihydrofolsäure-Reduktase unterscheidet sich strukturell so stark vom bakteriellen Enzym, dass sie durch Trimethoprim kaum gehemmt wird (Burchall und Hitchings, 1965).

Durch die Kombination von Sulfonamiden mit Trimethoprim lässt sich eine geringe Toxizität für den Wirtsorganismus sowie eine stärkere Wirksamkeit und verringerte Tendenz der Resistenzbildung erzielen. Ein Hauptanwendungsgebiet für solche Kombinationen sind Harnwegsinfektionen und, in höherer Dosis eingesetzt, die *Pneumocystis carinii*-Pneumonie. Der breite Einsatz dieser Kombinationspräparate führte jedoch in starkem Maße zu Resistenzbildungen. Den Resistenzen gegen Sulfonamide und Trimethoprim liegen mehrere verschiedene Mechanismen zu Grunde. So kann durch Überexpression der an der *p*-Aminobenzoesäurebiosynthese beteiligten Enzyme eine Unempfindlichkeit des Bakteriums gegen Sulfonamide hervorgerufen werden. Auch durch Überexpression der Dihydropteroatsynthase und Dihydrofolsäurereduktase, oder durch Veringerung ihrer Affinität zu Sulfonamiden und Trimethoprim kann deren Wirkung herabgesetzt werden (Sköld, 2001). Daneben existieren Resistenzen, die auf der Aufnahme von Folaten oder Endprodukten wie Thymin aus der Umgebung basieren (Sköld, 2001). Auch Resistenzen, die

auf einer Undurchlässigkeit der äußeren Zellmembran für die beiden Substanzen beruhen (Then, 1982), sind bekannt.

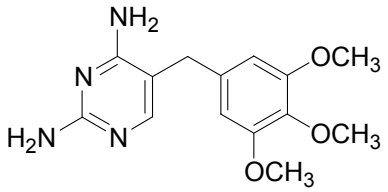


Abbildung 1-3. Struktur des Dihydrofolsäurereduktase-Inhibitors Trimethoprim.

Ein weiterer Wirkstoff, der in den Folsäurestoffmetabolismus eingreift, jedoch nicht als Antibiotikum wirkt, ist Methotrexat (Abbildung 1-4). Wie bei der Betrachtung der Strukturformel zu erkennen ist, handelt es sich bei Methotrexat um einen Folsäureantagonisten. Als solcher inhibiert Methotrexat die menschliche Dihydrofolsäure-Reduktase und dient der Therapie von Autoimmunerkrankungen sowie, hoch dosiert, zur Behandlung von Tumoren und Leukämie, indem es deren Wachstum hemmt.

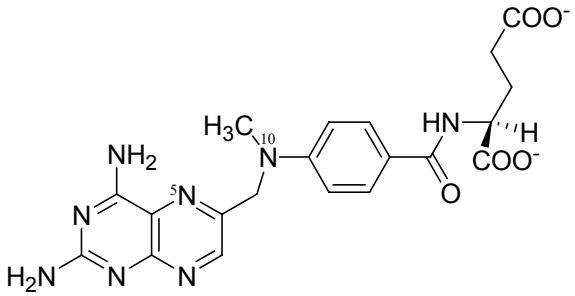


Abbildung 1-4. Struktur des Folsäureantagonisten Methotrexat.

1.2.1 Abyssomicin C und atrop-Abyssomicin C

Ein gerichtetes Screening von bakteriellen Extrakten nach Inhibitoren der Arenbiosynthese führte zur Isolierung der Abyssomicine B, C, D, G, H und atrop-Abyssomicin C, die vom marinen *Gram*-positiven *Actinomyceten Verrucosispora* AB-18-032 produziert werden und die *p*ABA-Biosynthese inhibieren (Riedlinger *et al*., 2004, Bister *et al.*, 2004, Keller *et al.*, 2007a,b).

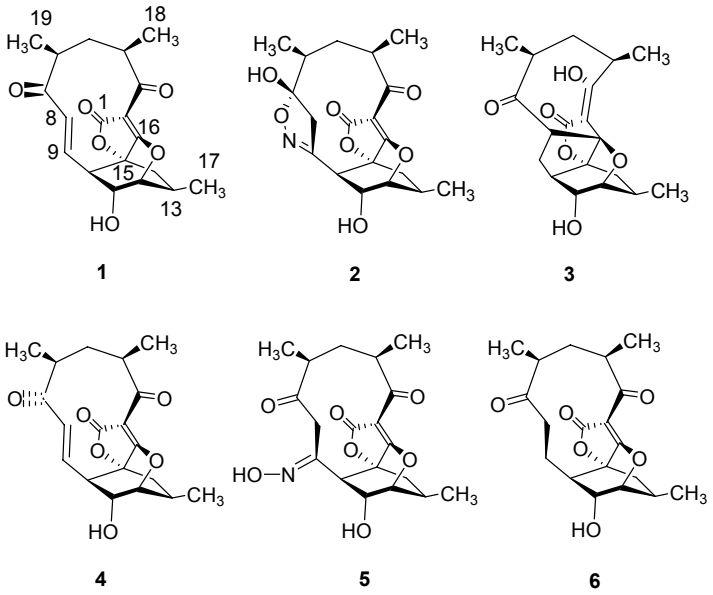


Abbildung 1-5. Strukturformeln der Abyssomicine C (1) B (2), D (3), G (5), H (6), and atrop-Abyssomicin C (4).

Das biologische Screening war darauf ausgelegt, Inhibitoren der Biosynthese aromatischer Aminosäuren und der *p*-Aminobenzoesäure zu finden. Hierzu wurden 930 Extrakte von 201 *Actinomyceten* in einem zweistufigen Prozess getestet. Im ersten Schritt wurde ein Hemmhoftest durchgeführt, bei dem der Stamm *Bacillus subtilis* DSM 10 auf zwei verschiedenen Agarplatten kultiviert wurde. Für die erste Platte wurde Minimalmedium verwendet, für die zweite Platte wurde dasselbe Minimalmedium mit L-Tryptophan (5 mM), L-Phenylalanin (5 mM), L-Tyrosin (5 mM) und *p*ABA (5 mM) supplementiert. Extrakte, die nur auf der ersten Platte einen Hemmhof zeigten, nicht aber auf den supplementierten Platten, wurden einem zweiten Test unterzogen, da bei diesen eine Hemmung einer der drei Biosynthesen zu erwarten war. Im zweiten Schritt wurde ein Antagonismus-Test durchgeführt. Hierzu wurden zwei Filterstreifen über Kreuz auf eine Agarplatte gelegt, wobei einer der Filterstreifen mit dem antibiotischen Extrakt, der zweite Filterstreifen in einer Lösung des vermuteten Antagonisten (Tyr + Phe, Trp, *p*ABA) getränkt wurde. Die folgenden Kombinationen von Antagonisten (jeweils 50 µl, Konzentration der einzelnen Komponenten = 5 mg/ml) wurden verwendet: 1. Tyr + Trp + Phe + *p*ABA (Kontrolle), 2. Tyr + Phe, 3. Trp, 4. *p*ABA. Bei Vorliegen von Antagonismus wurde die Wachstumshemmung aufgehoben.

Im Falle des Extrakts aus dem Bakterienstamm *Verrucosispora* AB 18-032 wurde die Aufhebung der Wachstumshemmung durch *p*ABA beobachtet. Dies ließ darauf schließen, dass ein Schritt in der Biosynthese von *p*ABA ausgehend von Chorismat inhibiert wurde. Daraufhin wurden sechs Sekundärmetabolite des Actinomyceten *Verrucosispora* AB-18-032 isoliert, Abyssomicin B, C, D, G, H und atrop-Abyssomicin C (Abbildung 1-5), und ihre

Struktur aufgeklärt (Bister *et al.*, 2004, Keller *et al.*, 2007a). Die Untersuchung der analysenreinen Abyssomicine B, C, D, G, H und atrop-Abyssomicin C durch einen Agarplattendiffusionstest zeigte, dass nur Abyssomicin C und atrop-Abyssomicin C antibiotisch aktiv sind und inhibitorische Aktivität gegen *Gram*-positive Bakterien zeigen. *Gram*-negative Bakterien und Pilze reagieren nicht sensitiv auf Abyssomicin C. Das Wirkspektrum von Abyssomicin C ist in Tabelle 1-1 dargestellt.

Tabelle 1-1. Antibakterielles Spektrum von Abyssomicin C. Angegeben sind die Hemmhöfe des Plattendiffusionstests [mm] bei Verwendung von Komplexmedium (Riedlinger *et al.*, 2004).

	Abyssomicin C (mg/ml)		
Organismus	**1**	**0,3**	**0,1**
Arthrobacter aurescens DSM 20166	14	10	-
Brevibacillus brevis DSM 30	17	12	9
Bacillus subtilis DSM 10	16	12	10
Micrococcus luteus ATCC 381	-	-	-
Mycobacterium phlei DSM 750	-	-	-
Staphylococcus aureus DSM 20231	19	11	9
Rhodococcus erythropolis DSM 1069	27	18	15
Streptomyces viridochromogenes Tü 57	11	9	-

Aufgrund der hochinteressanten Strukturen der Abyssomicine ist es nicht erstaunlich, dass einige synthetisch arbeitende Gruppen sich an der Totalsynthese des Abyssomicin C versucht haben. Die erste erfolgreiche Totalsynthese wurde von der Gruppe Erik Sorensens (Zapf *et al*., 2005) veröffentlicht, die zweite und dritte von K.C. Nicolaou (Nicolaou und Harrison, 2006, 2007).

Im Jahr 2007 konnte der Wirkmechanismus von atrop-Abyssomicin C und Abyssomicin C als Inhibitor der *p*-Aminobenzoesäurebiosynthese aufgeklärt werden (Keller *et al.,* 2007b). Am Beispiel der ADC-Synthase des Abyssomicin-sensitiven Bakteriums *Bacillus subtilis* wurde die kovalente Bindung von atrop-Abyssomicin C an PabB anhand von Bindungsstudien und inhibitionskinetischen Untersuchungen gezeigt.

Für inhibitionskinetische Untersuchungen irreversibler Inhibitoren wird typischerweise das Enzym mit variierenden Inhibitorkonzentrationen unterschiedlich lange inkubiert. In diesem Falle wurde die ADC-Synthase mit atrop-Abyssomicin C (50–500 µM) bei konstanter Enzymkonzentration und unterschiedlichen Inkubationszeiten präinkubiert, und dann die

Enzymreaktion durch Zugabe von Puffer und Chorismat (5 mM) gestartet. Anschließend wurde die beobachtete Geschwindigkeitskonstante k_{obs} als Funktion der Inhibitorkonzentration aufgetragen, so dass eine hyperbole Kurve erhalten wurde, die charakteristisch für irreversible Inhibitoren ist und auf eine kovalente Bindung des Inhibitors an das Protein hindeutet (Abbildung 1-6).

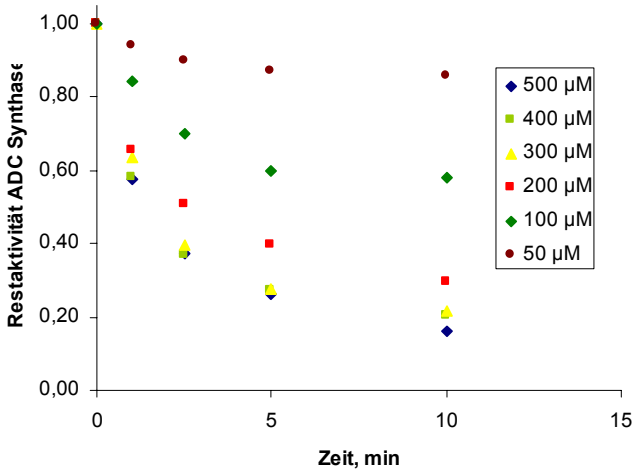


Abbildung 1-6: Enzyminaktivierung der ADC-Synthase durch atrop-Abyssomicin C in Abhängigkeit von der Präinkubationszeit und der Inhibitorkonzentration.

Für atrop-Abyssomicin C wurde ein K_i^{app} von etwa 390 µM und ein k_{inact} von 0.8 min^{-1} ermittelt. Inhibitionsexperimente mit Abyssomicin C belegen, dass dieses im Vergleich zu atrop-Abyssomicin C PabB in signifikant geringerem Ausmaß inhibiert, was mit dem geringeren antibakteriellen Effekt in MIC-Tests von Abyssomicin C im Vergleich zu atrop-Abyssomicin C einhergeht.

Um die Bindestelle von atrop-Abyssomicin C im Protein zu lokalisieren, wurde PabB mit atrop-Abyssomicin C inkubiert. Durch Verdau von PabB mit Endoproteinase GluC wurde mit HPLC-ESI-Massenspektrometrie ein zweifach geladenes Peptid bei *m/z* 827,0 [M = 1651,7] beobachtet, das im Kontrollverdau ohne Inhibitor nicht detektiert wurde (Abbildung 1-7).

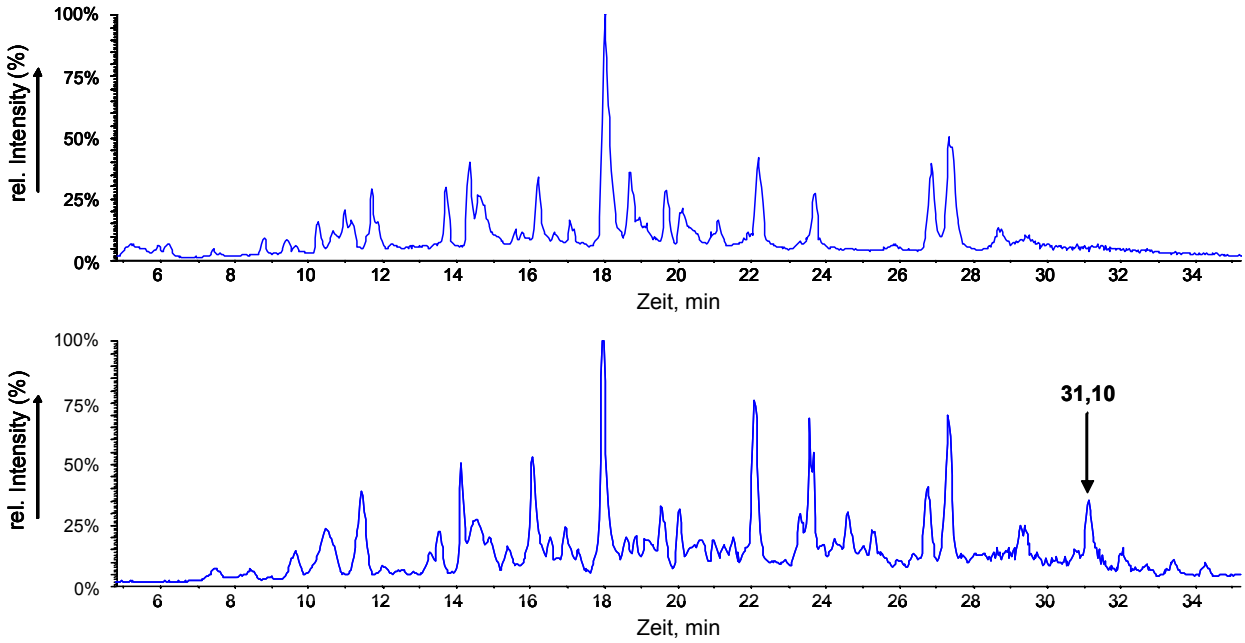


Abbildung 1-7: HPLC-MS-Chromatogramm der Peptide aus dem GluC-Verdau von PabB (oben) und PabB + atrop-Abyssomicin C (unten). Mit dem Pfeil markiert ist das zusätzlich auftretende Peptid von *m/z* 827 bei der Retentionszeit R_t = 31,1 min.

Durch massenspektrometrische Fragmentierung (ESI-MS/MS) konnte gezeigt werden, dass atrop-Abyssomicin C kovalent an die Sulfhydrylseitenkette von Cys-263 im Peptid TPDFQIICGSPE gebunden hatte (Abbildung 1-8). Durch NMR-basierte Untersuchungen konnte außerdem gezeigt werden, dass durch die Bindung von atrop-Abyssomicin C an Cystein eine interessante Umlagerung zu einer Abyssomicin D-artigen Struktur stattfindet.

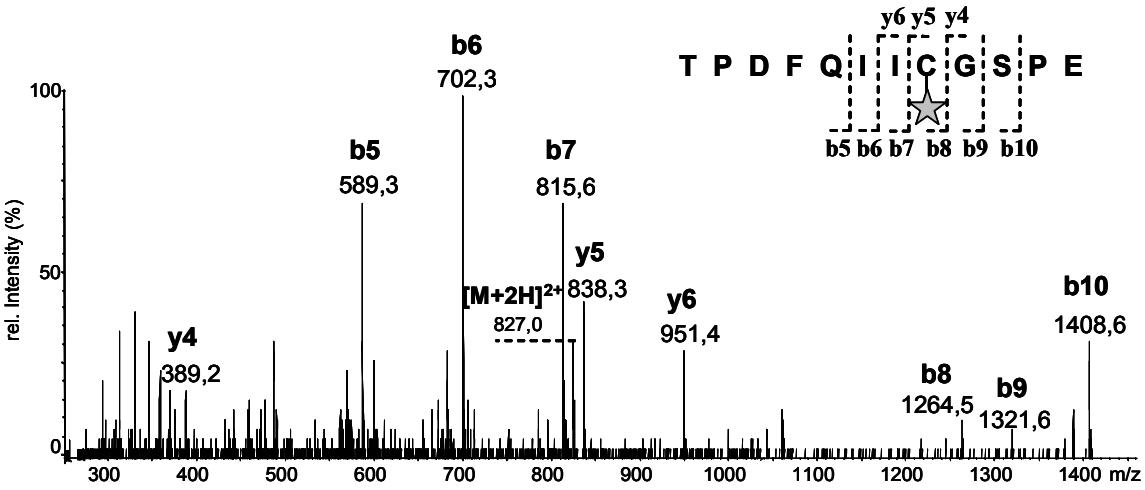


Abbildung 1-8: MS/MS-Spektrum des atrop-Abyssomicin C-Adduktpeptids *m/z* 827.

1.3 Die Funktion der Folsäure

Die biologisch aktive Form der Folsäure ist die durch Reduktion entstehende 5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure (THF), die ein chirales Zentrum in der *S*-Konfiguration an C6 trägt und als Cofaktor bei Einkohlenstoffübertragungsreaktionen dient. Tetrahydrofolsäure kann Kohlenstoff in drei Oxidationsstufen übertragen (Abbildung 1-9).

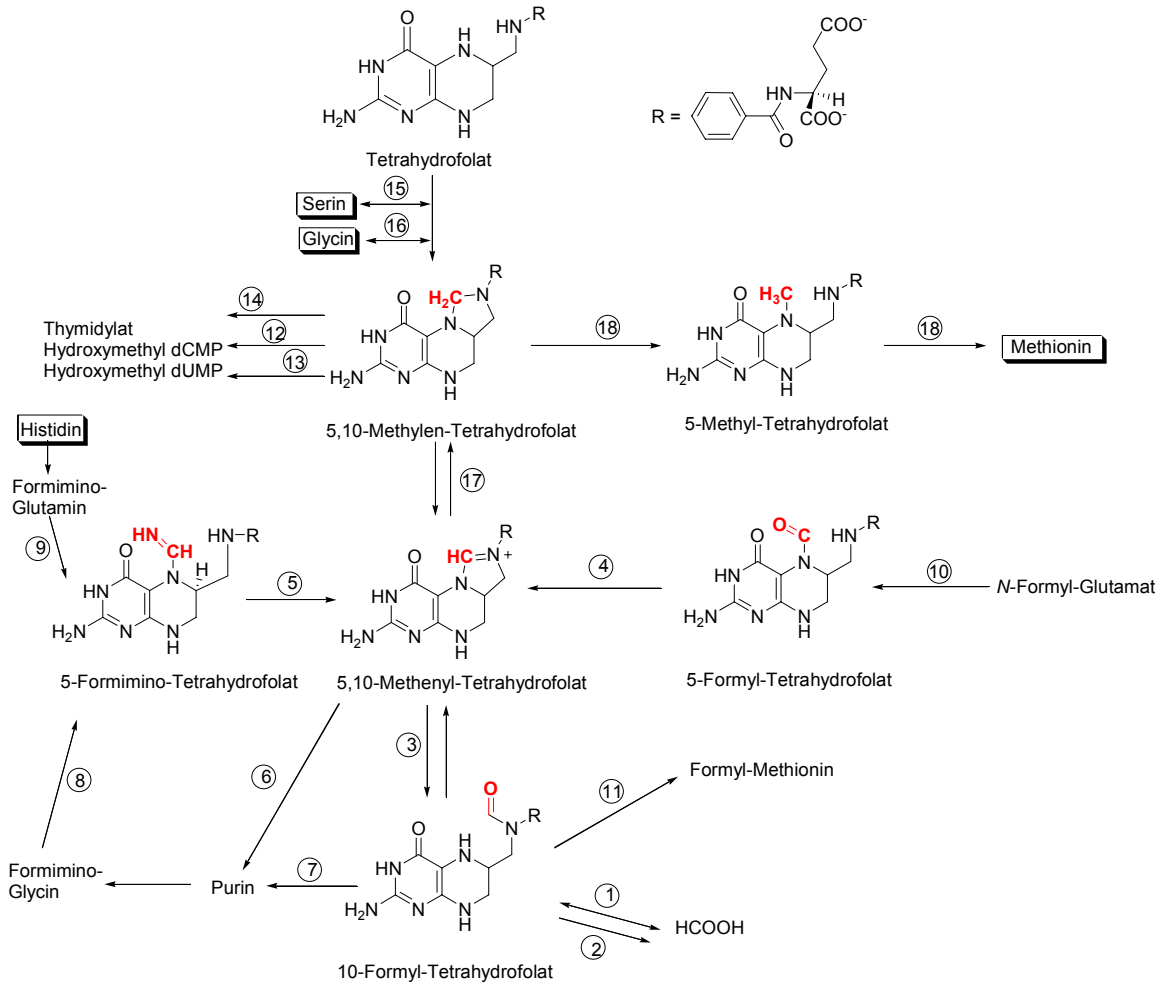


Abbildung 1-9. Einkohlenstoffübertragungsreaktionen der Tetrahydrofolsäure. Die Nummern beziehen sich auf folgende Enzyme: (1) 10-Formyltetrahydrofolat Synthetase, (2) 10-Formyltetrahydrofolat Deacylase, (3) 5,10-Methenyltetrahydrofolat Cyclohydrolase, (4) 5-Formyltetrahydrofolat Cyclodehydrase, (5) 5-Formiminotetrahydrofolat Cyclodeaminase, (6) Glycinamidribonucleotid Transformylase, (7) 5-Amino-4-imidazolcarboxamid-ribonucleotid Transformylase, (8) Formiminoglycin Formiminotransferase, (9) Formiminoglutamat Formiminotransferase, (10) *N*-Formylglutamat Transformylase, (11) Methionyl-tRNA Transformylase, (12) Deoxycytidylat-Hydroxymethyltransferase, (13) Deoxyuridylat-Hydroxymethyltransferase, (14) Thymidylat-Synthetase, (15) Serinhydroxymethyl-Transferase, (16) Glycin Decarboxylase-Synthetase System (P-Protein, H-Protein, T-Protein, Dihydrolipamid Dehydrogenase), (17) 5,10-Methylentetrahydrofolat Dehydrogenase, (18) 5,10-Methylentetrahydrofolat Reduktase, (19) 5-Methyltetrahydrofolat-Homocystein Transmethylase (Abbildung nach Rader und Huennekens, 1973).

Eine wichtige Quelle für C1-Einheiten ist Serin, dessen β-Kohlenstoff in Form von Formaldehyd unter Bildung von Methylen-THF auf THF übertragen wird, wobei zusätzlich Glycin entsteht. Auch Glycin kann als C1-Quelle dienen, dabei entsteht in einer von einem Multienzym-Glycindecarboxylase-Synthetase-System katalysierten Reaktion neben Methylen-THF noch CO_2 und NH_3. Methylen-THF kann dann entweder zu 5,10-Methenyl-THF und 10-Formyl-THF oxidiert werden, oder zu Methyl-THF reduziert werden.

Eine wichtige Rolle kommt der Tetrahydrofolsäure beim Nucleotidstoffwechsel zu: Sowohl zum Aufbau der Purinnucleotide (Abbildung 1-10) als auch zur Umwandlung von dUMP zu dTMP (Abbildung 1-11) wird Tetrahydrofolat benötigt.

Bei der Purinbiosynthese wird an zwei Stellen eine Formylgruppe von N^{10}-Formyl-Tetrahydrofolat auf eine Aminogruppe des Zwischenprodukts übertragen (Benkovic, 1984; Mueller und Benkovic, 1981), wobei N^{10}-Formyl-Tetrahydrofolat zu Tetrahydrofolat (s. Abbildung 1-10) wird. Dies ist zum ersten die Formylierung von Glycinamid-β-D-ribofuranosyl-5'-mono-phosphat (GAR) zu Formylglycinamid-β-D-ribofuranosyl-5'-monophosphat (FGAR) durch das Enyzm Glycinamidribonucleotid Transformylase, und zum zweiten die Synthese von 1'-[(5-Formylamino)-4-(aminocarbonyl)-1-imidazolyl]-β-D-ribofuranosyl-5'-monophosphat (FAICAR) aus 5-Amino-4-imidazolcarboxamid-β-1-D-ribofuranosyl-5'-monophosphat (AICAR) durch das Enzym 5-Amino-4-imidazolcarbox-amid-ribonucleotid Transformylase (s. Abbildung 1-10).

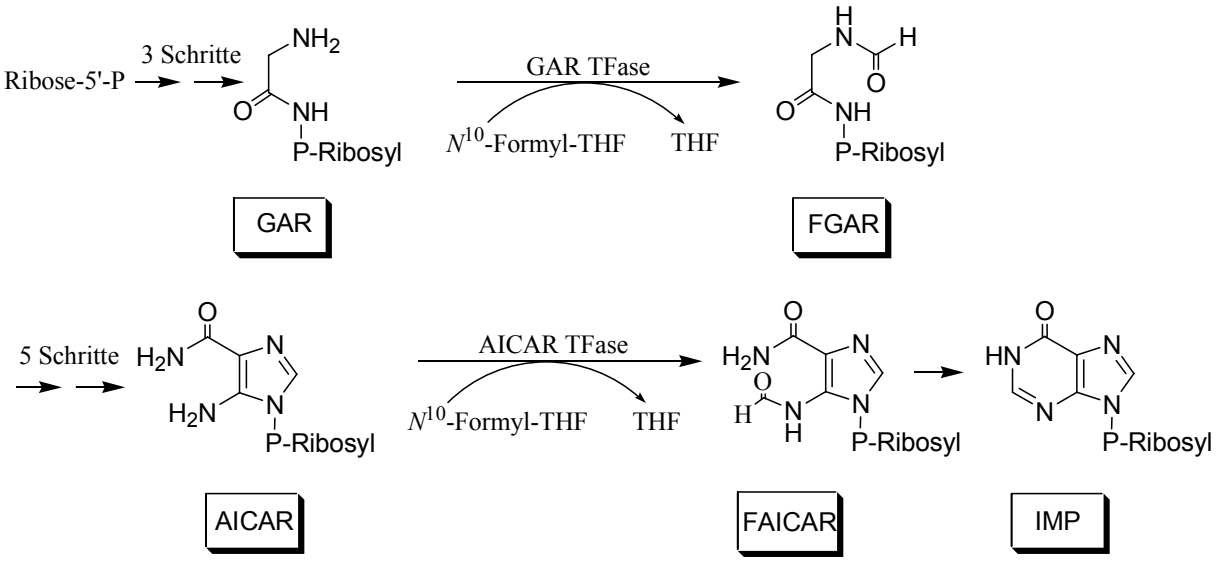


Abbildung 1-10. Schritte der Purinbiosynthese, an denen THF beteiligt ist. GAR = Glycinamid-β-D-ribofuranosyl-5'-monophosphat; FGAR = Formylglycinamid-β-D-ribofuranosyl-5'-mono-phosphat; GAR TFase = Glycinamidribonucleotid Transformylase; AICAR = 5-Amino-4-imidazolcarboxamid-β-1-D-ribofuranosyl-5'-monophosphat; FAICAR = 1'-[(5-Formylamino)-4-(aminocarbonyl)-1-imidazolyl]-β-D-ribofuranosyl-5'-monophosphat; AICAR TFase = 5-Amino-4-imidazolcarboxamid-ribonucleotid Transformylase

Ein weiterer Biosyntheseweg, der unter Beteilung von Tetrahydrofolat stattfindet ist die Thymidylat (dTMP)-Synthese aus dUMP (s. Abbildung 1-11), die durch die Thymidylat-Synthase katalysiert wird. Hierbei wird eine Methylengruppe von N^5,N^{10}-Methylen-Tetrahydrofolat auf dUMP übertragen. Bei der anschließenden Reduktion der Methylen- zur Methylgruppe wird Tetrahydrofolat zu Dihydrofolat oxidiert und muss durch Dihydrofolat-Reduktase wieder zu Tetrahydrofolat reduziert werden (Carreras und Santi, 1995).

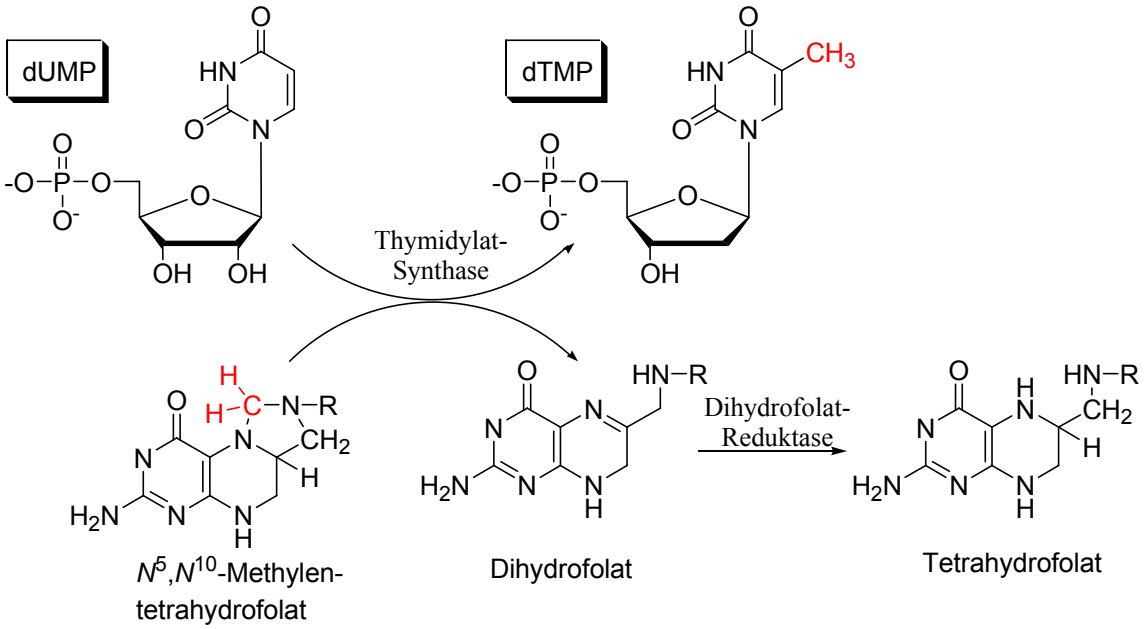


Abbildung 1-11. Die Biosynthese von dTMP aus dUMP durch Thymidylat-Synthase. Alle drei Wasserstoffatome der Methylgruppe stammen von N^5,N^{10}-Methylentetrahydrofolat (rot). Deshalb muss das bei der dTMP-Biosynthese entstehende 7,8-Dihydrofolat durch Dihydrofolat-Reduktase wieder zu Tetrahydrofolat reduziert werden. Der mit Glutamat verknüpfte *p*-Aminobenzoesäure des Tetrahydrofolats ist in der Abbildung mit R bezeichnet.

1.4 Die Folsäurebiosynthese

Die Folsäurebiosynthese, die am Modellorganismus *E. coli* untersucht wurde (Abbildung 1-12), beginnt mit der Umwandlung von Guanosinmonophosphat zu Dihydroneopterin (Mathis und Brown, 1980; Burg und Brown, 1986; Brown und Williamson, 1987; Bracher *et al.*, 2001). Bis auf C8 bleiben dabei alle Atome des Purinringes erhalten. Der erste Schritt ist die Öffnung des Fünfrings und die hydrolytische Abspaltung von Formiat. Darauf folgt eine Amadori-Umlagerung und ein einfacher Ringschluss zwischen der resultierenden Carbonylgruppe und der Aminogruppe. Diese Reaktionsschritte zum 7,8-Dihydroneopterintriphosphat werden von der GTP Cyclohydrolase katalysiert.

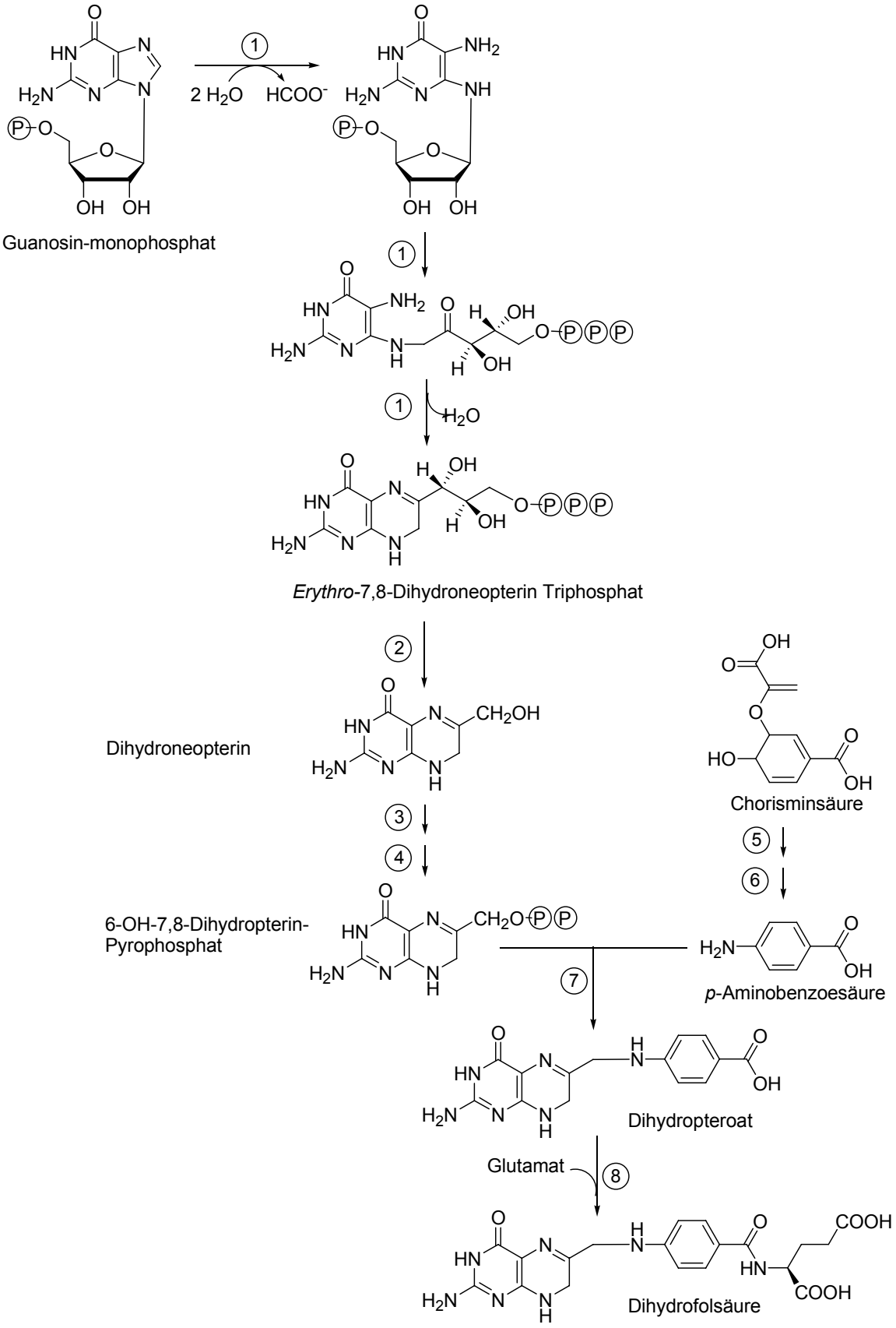


Abbildung 1-12. Folsäurebiosynthese. Die Nummern beziehen sich auf folgende Enzyme: (1) GTP-Cyclohydrolase, (2) Dihydroneopterintriphosphat-Pyrophosphohydrolase, (3) Dihydroneopterin Aldolase, (4) Pyrophosphokinase, (5) Aminodesoxychorismat-Synthase, (6) Aminodesoxychorismat-Lyase, (7) Dihydropteroat Synthase, (8) Dihydrofolat Synthase.

Dihydroneopterin ist ein zentrales Zwischenprodukt im Pterinmetabolismus, und neben Folsäure kann daraus unter anderem auch Biopterin, das in der Leber und anderen Geweben als Coenzym bei aromatischen Hydroxylierungen eine Rolle spielt, gebildet werden. Dihydroneopterin wird durch eine Aldolspaltung und anschließende Pyrophosphorylierung mit ATP aktiviert und durch eine Reaktion mit *p*-Aminobenzoesäure, deren Biosynthese in Kapitel 1.6 beschrieben ist, zum Dihydropteroat verknüpft. Durch ATP-abhängige Reaktion der Carboxygruppe mit der Aminogruppe von Glutamat entsteht schließlich Dihydrofolsäure (Abbildung 1-12) (Green *et al.*, 1996). Die aktive Form der Folsäure ist die Tetrahydrofolsäure. Diese entsteht durch Reduktion der Dihydrofolsäure durch Dihydrofolat-Reduktase (Charlton *et al.*, 1979).

1.5 Das Folat-Operon von *Bacillus subtilis*

Bei *B. subtilis* sind die Gene der Folsäurebiosynthese in einem Operon angeordnet (Slock *et al.*, 1990), beginnend mit den Genen der *p*-Aminobenzoesäure-Synthese *pabB, pabA* und *pabC* (Abbildung 1-13), während bei *E. coli* diese Gene ohne Verbindung zueinander auf dem Chromosom liegen (Blattner *et al.*, 1997). Das Folat-Operon enthält zwei Promotoren, einer liegt vor dem ersten Gen *pabB* und der zweite vor *lysS*. Bisher wurden vier mögliche Transkripte identifiziert, die die ersten zwei, die ersten acht, alle neun bzw. das letzte Gen umfassen (de Saizieu *et al*., 1997).

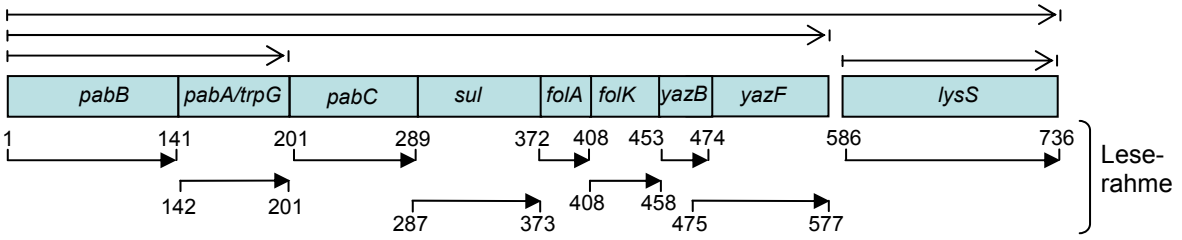


Abbildung 1-13. Genorganisation des Folat-Operons von *B. subtilis*. Nur die ersten sechs Gene, *pabB, pabA, pabC, sul, folA* und *folK* sind an der Folsäurebiosynthese beteiligt. Die Transkription erfolgt von links nach rechts. Die kodierenden Sequenzen sind durch Pfeile gezeigt, die Zahlen bezeichnen die Position der ersten Base des Startcodons ATG und der letzten Base des Stoppcodons. Oberhalb des Folat-Operons sind die vier möglichen Transkripte eingezeichnet.

Die ersten drei Gene des Operons kodieren für Enzyme, die an der *p*ABA-Synthese beteiligt sind: *pabB* kodiert für die α-Untereinheit, *pabA* für die β-Untereinheit der Aminodesoxychorismat-Synthase (5) und *pabC* für die Aminodesoxychorismat-Lyase (6). Interessanterweise kodiert das Gen *pabA*, das auch als *trpG* bezeichnet wird, für eine amphibole GATase, die sowohl zur Synthese von Folsäure als auch von Tryptophan nötig ist (Kane et al., 1972). Das Gen *sul* codiert für die Dihydropteroat-Synthase (7), *folA* für die

Dihydroneopterin-Aldolase (3) und *folK* für die Pyrophosphokinase (4). Eine Übersicht über die Aufgabe dieser Enzyme in der Folsäurebiosynthese gibt Abbildung 1-12, auf diese Abbildung beziehen sich auch die Nummern in Klammern hinter den Enzymen. Die beiden Enzyme, die zur Biosynthese von Dihydroneopterin als Vorstufe der Folsäure nötig sind, die GTP-Cyclohydrolase (1) und die Dihydroneopterintriphosphat-Pyrophosphohydrolase (2), liegen nicht im Folsäureoperon. Dies ist nicht verwunderlich angesichts der Tatsache, dass Dihydroneopterin ein zentrales Zwischenprodukt im Pterinmetabolismus, und unter anderem Vorläufer von Folsäure, Biopterin, Sepiapterin, Drosopterin und Methanopterin ist. Interessanterweise liegt das Gen der GTP-Cyclohydrolase (1) im *mtrAB*-Operon, wobei *mtrA* die GTP-Cyclohydrolase codiert und *mtrB* den Regulator der Tryptophanbiosynthese TRAP (Tryptophan-RNA-Binding Attenuation Protein). TRAP wird durch L-Tryptophan aktiviert, und reguliert durch eine sogenannte *feedback*-Inhibition die Transkription des *trp*-Operons sowie die von *pabA*, und beeinflusst damit nicht nur die Tryptophan-Biosynthese, sondern auch die *p*ABA-Biosynthese (de Saizieu *et al.*, 1997).

1.6 Die *p*-Aminobenzoesäurebiosynthese

Die Biosynthese von *p*ABA aus Chorismat erfolgt bei *E. coli* und den meisten bisher bekannten Organismen in zwei Schritten unter Beteiligung der Enzyme Aminodesoxychorismat-Synthase (ADCS) und Aminodesoxychorismat-Lyase (ADCL) (Huang und Gibson, 1970; Ye *et al.*, 1990; Green und Nichols, 1991). Die Aminodesoxychorismat-Synthase ist ein heterodimeres Enzym aus den Untereinheiten PabA und PabB. PabA ist eine Glutamin-Amidotransferase, die Glutamin in Glutamat und Ammoniak spaltet, welches von PabB auf Chorismat übertragen wird, sodass 4-Amino-4-desoxychorismat (ADC) entsteht.

Neben *p*-Aminobenzoesäure und den aromatischen Aminosäuren Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan werden noch eine Reihe weiterer vorwiegend aromatischer Verbindungen wie Ubichinon, Enterobactin und einige aromatische Sekundärmetabolite über den Shikimat-Biosyntheseweg (Abbildung 1-14) gebildet. Shikimat wird bei Bakterien, Pilzen und Pflanzen aus D-Erythrose-4-phosphat und Phosphoenolpyruvat synthetisiert und zu Chorismat umgewandelt.

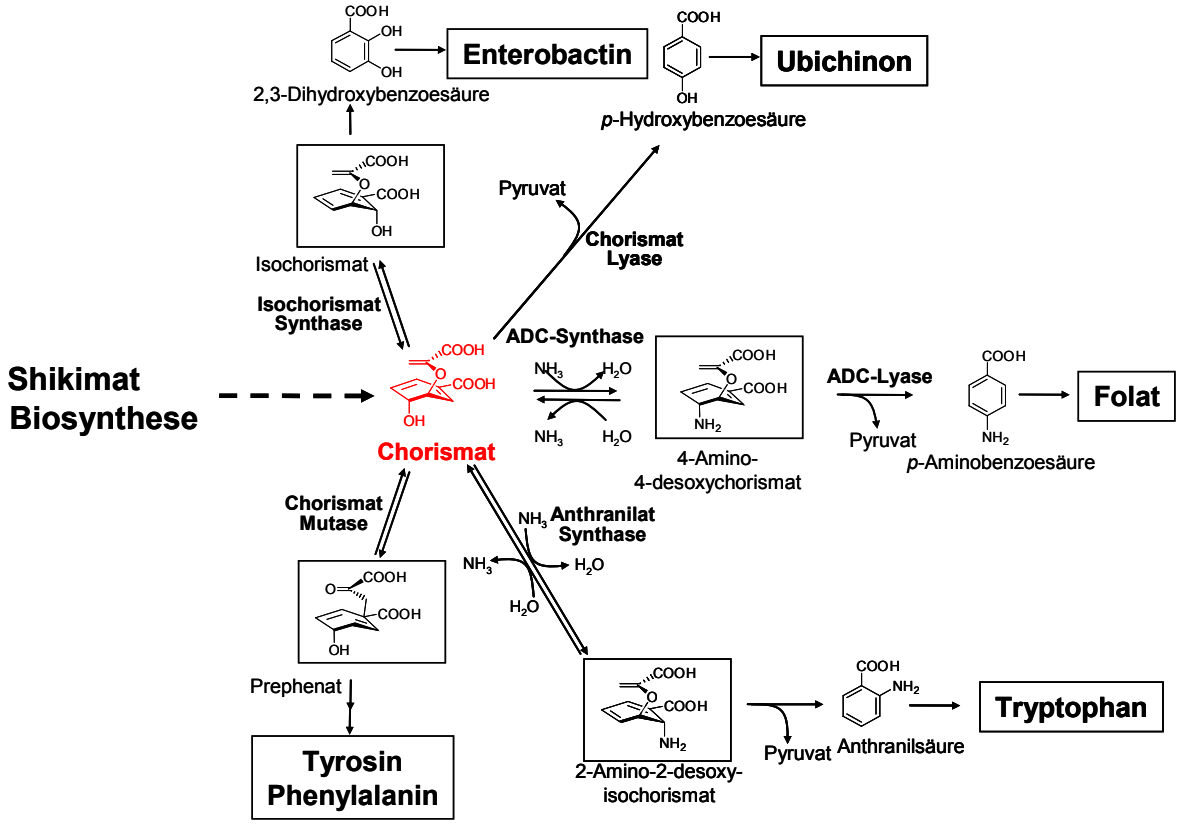


Abbildung 1-14. Biosynthesewege ausgewählter Stoffwechselprodukte, die von Chorismat ausgehen.

Drei der in Abbildung 1-14 abgebildeten Enzyme, die Anthranilat-Synthase (AS), Aminodesoxychorismat-Synthase (ADCS) und Isochorismat-Synthase (IS) besitzen eine hohe Sequenzhomologie, ähnliche Kristallstrukturen und katalysieren ähnliche Reaktionen (He *et al.*, 2004). Alle drei Enzyme katalysieren eine Substitution der C4-Hydroxygruppe von Chorismat durch ein Sauerstoffnukleophil im Fall der Isochorismat-Synthase und durch ein Stickstoffnukleophil im Fall der Anthranilat-Synthase und der Aminodesoxychorismat-Synthase. Die beiden letzteren Enzyme verwenden Glutamin als Stickstoffquelle und bestehen beide aus zwei nicht identischen Untereinheiten α und β, die zu αβ-Heterodimeren assoziieren. Die kleinere β-Untereinheit ist eine Glutamin-Amidotransferase (GATase), die die Amidgruppe von Glutamin zur größeren α-Untereinheit transferiert, die diese auf Chorismat überträgt. Die größere α-Untereinheit kann auch ohne die β-Untereinheit Chorismat aminieren, sofern NH_3 zur Verfügung steht.

Die enge Verknüpfung der beiden Enzyme zeigt sich bei *E. coli* auch auf genetischer Ebene. Es wird angenommen, dass die Gene der Enzyme durch Duplikation und divergente Entwicklung aus einem gemeinsamen Vorläufer hervorgehen (Dosselaere und Vanderleyden, 2001). Bei *B. subtilis, Acinetobacter calcoaceticus* und *Pseudomonas acidovorans* (Sawula und Crawford, 1972; Sawula und Crawford, 1973; Buvinger *et al.*, 1981; Kane *et al.*, 1972;

Kane, 1977) existiert für beide Enzyme eine amphibolische GATase, d.h. es gibt nur eine GATase, die sowohl mit Anthranilat-Synthase als auch mit Aminodesoxychorismat-Synthase assoziieren kann. Bei *B. subtilis* liegt das Gen, das für die amphibole GATase kodiert, im Folat-Operon (Kane *et al.*, 1972) und wird entweder mit *pabA* oder *trpG* bezeichnet (s. Kapitel 1.5).

1.6.1 Die Glutamin-Amidotransferase (PabA)

Es gibt zwei Klassen von Glutamin-Amidotransferasen, die Ntn-Amidotransferasen und die Triade-Amidotransferasen. Die Ntn-Amidotransferasen besitzen als ***N*-t**erminales **Nukleophil** (Ntn) ein Cystein, während die Triade-Amidotransferasen eine katalytische Triade aus Cystein, Histidin und Glutamat aufweisen. Einer älteren Nomenklatur folgend werden die Ntn-Amidotransferasen als F-Typ und die Triade-Amidotransferasen als G-Typ bezeichnet. Dies geht auf die *E. coli*-Gene *purF*, das für die Glutamin PRPP-Amidotransferase kodiert und *trpG*, das für die Amidotransferase der Anthranilat-Synthase kodiert, zurück (Zalkin und Smith, 1998).

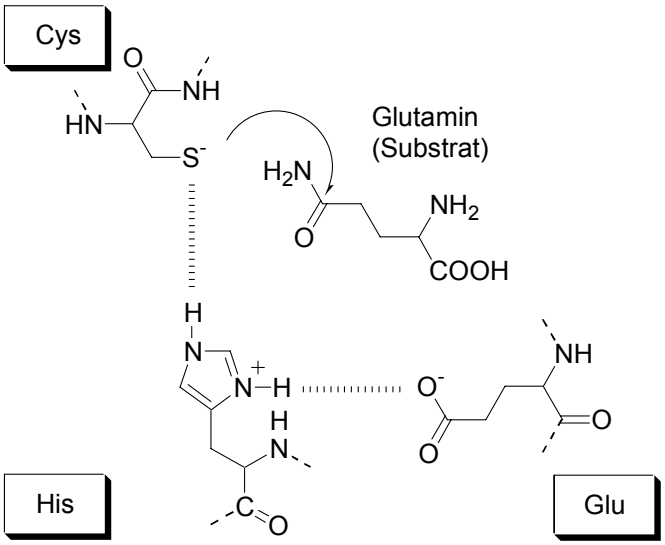


Abbildung 1-15. Die katalytische Triade von Glutamin-Amidotransferasen. Der Cysteinrest greift nukleophil an der Seitenkette von Gln (Substrat) an, der Histidinrest wirkt als Protonendonor bei der Hydrolysereaktion, und der Glutamatrest stabilisiert das protonierte Histidin.

Die etwa 20 kDa große GATase der Aminodesoxychorismat-Synthase (PabA) gehört zum Typ der Triade-Amidotransferasen. Die katalytische Triade (Abbildung 1-15) besteht aus Cys, His und Glu und ist vergleichbar mit der katalytischen Triade der Cysteinprotease Papain. Die Cysteinseitenkette greift nukleophil am Glutamin an, während der Histidinrest als

Protonendonor bei der Hydrolysereaktion wirkt, und der Glutamatrest das protonierte Histidin stabilisiert (Zalkin und Smith, 1998).

Die GATase PabA ist nur funktionsfähig, wenn sie in einem 1:1-Komplex mit der α-Untereinheit der Aminodesoxychorismat-Synthase (PabB) assoziiert vorliegt (Roux und Walsh, 1992; Viswanathan *et al.*, 1995). PabB induziert vermutlich eine Konformationsänderung bei PabA, die zu dessen Aktivierung führt.

1.6.2 Die Aminodesoxychorismat-Synthase (PabB)

Die etwa 50 kDa große β-Untereinheit der ADC-Synthase katalysiert eine Mg^{2+}-abhängige Reaktion, durch die Chorismat zu 4-Amino-4-desoxychorismat (ADC) aminiert wird. Parsons *et al.* veröffentlichten 2002 eine Kristallstruktur von PabB, die in Abbildung 1-16 gezeigt ist.

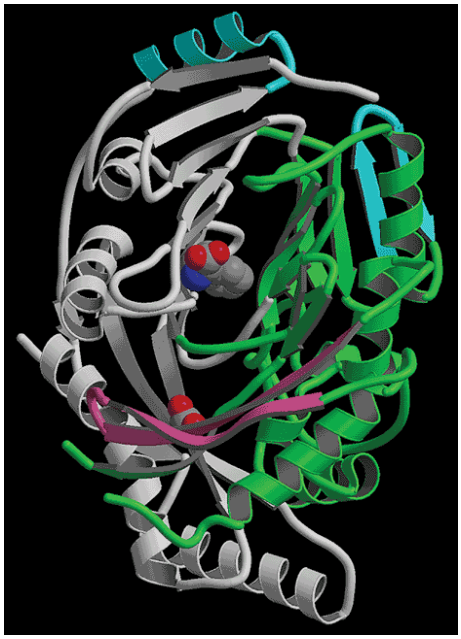


Abbildung 1-16. Bändermodell von PabB aus *E. coli*. Die Kristalle wurden in 2M Natriumformiat und 0,1 M Natriumacetat gezüchtet. Im Kalottenmodell dargestellt sind ein Molekül Ameisensäure und ein Molekül Tryptophan, das möglicherweise stabilisierende Funktion besitzt (Quelle: Parsons *et al.*, 2002).

Die Reaktion der ADC-Synthase verläuft analog der Anthranilat-Synthase- und der Isochorismat-Synthase-Reaktion. In allen drei Fällen wird eine Substitution der C4-Hydroxygruppe von Chorismat katalysiert, indem an C2 von Chorismat nukleophil angegriffen wird. Bei der Isochorismat-Synthase greift H_2O nukleophil an C2 an, die Hydroxygruppe an C4 wird abgespalten. Bei der Anthranilat-Synthase greift in gleicher Weise NH_3 nukleophil an C2 an, die Hydroxygruppe an C4 wird abgespalten, und das dabei entstehende 2-Amino-2-desoxyisochorismat (ADIC) wird sofort vom gleichen Enzym zu

Anthranilat aromatisiert (Abbildung 1-14). Bei der ADC-Synthase greift ebenfalls ein Stickstoffnukleophil an C2 an, allerdings handelt es sich in diesem Fall um die ε-Aminogruppe einer Lysinseitenkette von PabB (Lys-274 bei *E. coli*), wie in Abbildung 1-17 dargestellt ist.

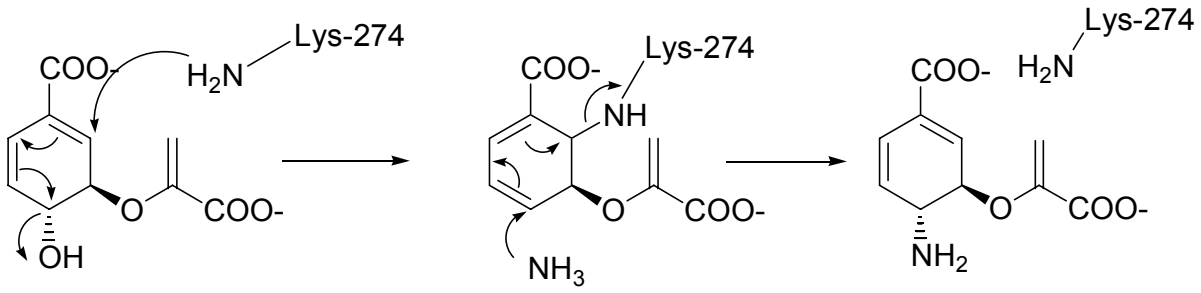


Abbildung 1-17: Mechanismus der ADC-Synthese nach Kozlowski *et al.*, 1995 und He *et al.*, 2004.

Ein Sequenzvergleich der ADC-Synthase von *E. coli* und *B. subtilis* (Abbildung 1-18) zeigt, dass das aktive Zentrum fast vollständig konserviert ist. Einzige Ausnahme ist der wichtigste Rest der *E. coli* ADC-Synthase, Lys-274, das kovalent an Chorismat bindet. An dieser Stelle steht bei *B. subtilis* ein Alaninrest. Die ADC-Synthase vermittelte Katalyse bei *B. subtilis* muss also prinzipiell anders verlaufen als bei *E. coli.*

```
B.s. : 219 FQVNLSIRQSQSLSVHPYQIYKTLREVNPSPYMAYLETPDFQIICGSPELLVSKKGKLLE 278
           +QVNL+ R   + S   +Q +  L + N +P+ A+L      I+  SPE  +      ++
E.c. : 210 YQVNLAQRFHATYSGDEWQAFLQLNQANRAPFSAFLRLEQGAILSLSPERFILCDNSEIQ 269

B.s.: 279 TRPIAGTRSRGKTNEEDEALANELIHNEKERAEHVMLVDLERNDLGRVSRYGSVRVNEFM 338
          TRPI GT  R    +ED   A +L ++ K+RAE++M+VDL RND+GRV+  GSV+V E
E.c.: 270 TRPIKGTLPRLPDPQEDSKQAVKLANSAKDRAENLMIVDLMRNDIGRVAVAGSVKVPELF 329

B.s.: 339 AIEKYSHVMHIVSNVQGELQDGYDAVDIIHAVFPGGTITGAPKVRTMEIIEELEPTRRGL 398
           +E +  V H+VS +  +L +   A D++ A FPGG+ITGAPKVR MEII+ELEP RR
E.c.: 330 VVEPFPAVHHLVSTITAQLPEQLHASDLLRAAFPGGSITGAPKVRAMEIIDELEPQRRNA 389

B.s.: 399 YTGSIGWFGYNHDLQFNIVIRTIYATGGQAFMQSGAGVVIDSVPKHEYKESFKKAFAMQR 458
          + GSIG+  +  ++  +I IRT+ A  GQ F  +G G+V DS  + EY+E+F K   + +
E.c.: 390 WCGSIGYLSFCGNMDTSITIRTLTAINGQIFCSAGGGIVADSQEEAEYQETFDKVNRILK 449

B.s.: 459 ALE 461
           LE
E.c.: 450 QLE 452
```

x = übereinstimmende Reste der *active site*
x = ähnliche Reste der *active site*
x = sich unterscheidende Reste der *active site*

Abbildung 1-18: Ausschnitt aus dem Alignment der PabB Sequenz von *B. subtilis* und *E. coli*.

1.6.3 Die Aminodesoxychorismat-Lyase (PabC)

Im Gegensatz zur Anthranilat-Biosynthese, bei der das Zwischenprodukt 2-Amino-2-desoxyisochorismat unter Abspaltung von Pyruvat direkt zu *o*-Aminobenzoesäure aromatisiert, ist zur Biosynthese von *p*-Aminobenzoesäure noch ein weiteres Enzym notwendig (Nichols *et al.*, 1989), die Aminodesoxychorismat-Lyase (Ye *et al.*, 1990). Im Jahr 2000 veröffentlichten Nakai *et al*. eine Kristallstruktur der ADC-Lyase von *E. coli* (s. Abbildung 1-19).

Abbildung 1-19. Bändermodell des PabC-Homodimers mit dem Cofaktor PLP. Eine der Untereinheiten ist in grau dargestellt, die große und kleine Domäne der anderen Untereinheit sind in weiß bzw. schwarz abgebildet (Quelle: Nakai *et al*., 2000).

Die etwa 30 kDa große Aminodesoxychorismat-Lyase ist sowohl strukturell als auch in der Stereospezifität der Wasserstoffabstraktion der D-Aminosäure-Aminotransferase und der Verzweigtkettigen-L-Aminosäure-Aminotransferase homolog (Jhee *et al*., 2000).

Die ADC-Lyase katalysiert die Aromatisierung von 4-Amino-4-desoxychorismat zu *p*-Aminobenzoesäure unter Abspaltung von Pyruvat. Das Enzym liegt als Homodimer vor (Green *et al*., 1992; Nakai *et al*., 2000) und benötigt als Coenzym Pyridoxal-5'-phosphat (PLP) (Green *et al*., 1992). Nach einem von Nakai *et al*. (2000) vorgeschlagenen Mechanismus bildet Aminodesoxychorismat zunächst eine Schiff-Base mit PLP, wodurch eine katalytisch aktive Lysinseitenkette frei wird. Dieses bildet eine Wasserstoffbrücke mit einer Threoninseitenkette aus. Die basische Aminoseitenkette des Lysins eliminiert dann ein Proton von C4 des ADC, wodurch ein chinoides Zwischenprodukt entsteht. Aus diesem wird

Pyruvat eliminiert, dabei wird ein Proton der Seitenketten von Threonin auf den olefinischen Teil des 4-Amino-4-desoxychorismat-Intermediats übertragen (Abbildung 1-20).

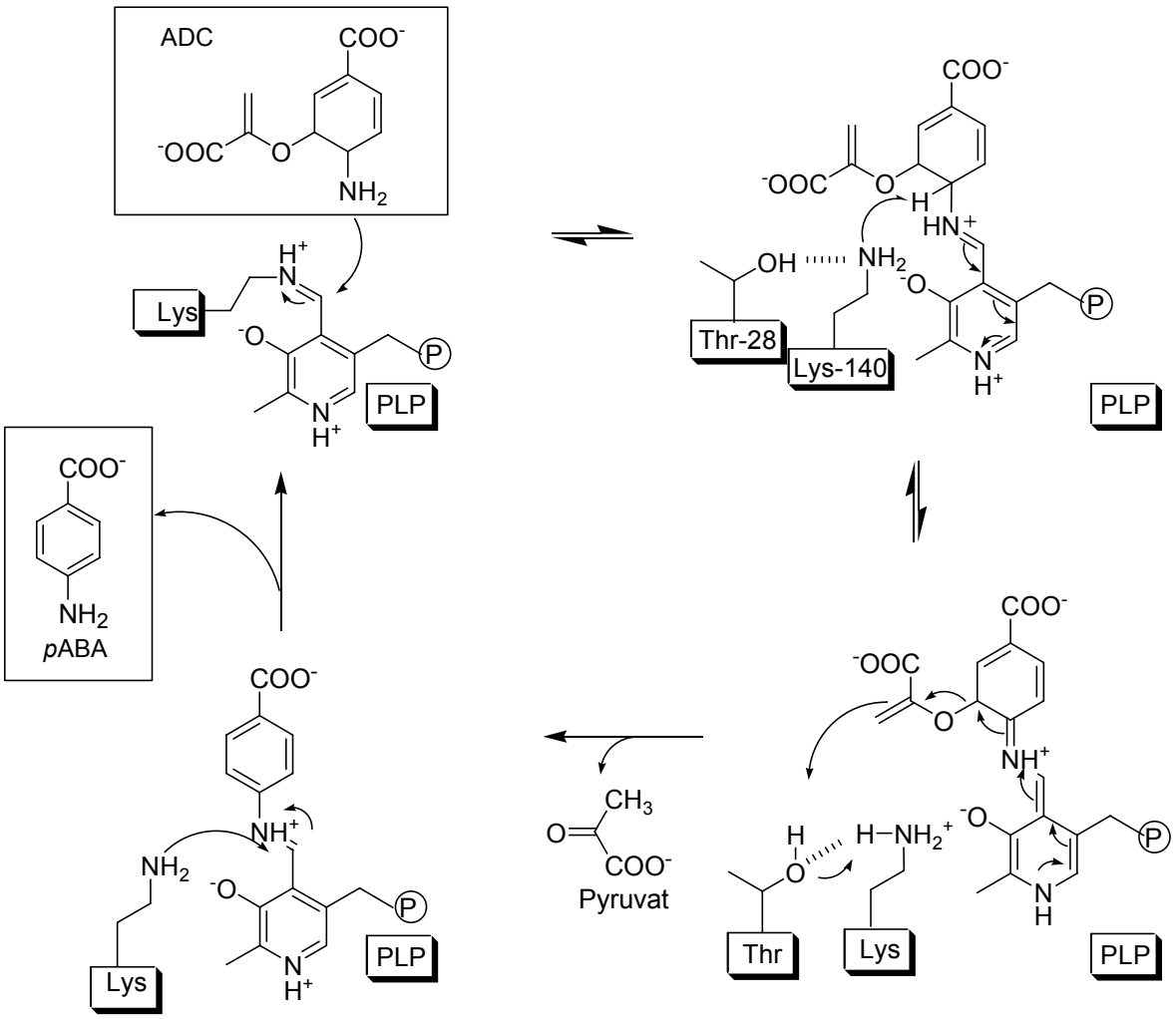


Abbildung 1-20. Mechanismus von PabC nach Nakai *et al.* (2000). Aminodesoxychorismat bildet eine Schiff-Base mit PLP, wodurch eine katalytisch aktive Lysinseitenkette frei wird, die eine Wasserstoffbrücke mit einer Threonseitenkette ausbildet. Die basische Aminogruppe des Lysins eliminiert ein Proton von ADC, wodurch ein chinoides PLP-Zwischenprodukt entsteht. Nun kann nach Rearomatisierung des Cofaktors Pyruvat abgespalten werden, wobei ein Proton von der Threoninseitenkette auf den olefinischen Teil des 4-Amino-4-desoxychorismat-Intermediats übertragen wird.

2 Grundlagen

2.1 Chromatographie und Massenspektrometrie

2.1.1 Chromatographiesystem zur Proteinreinigung

Für die präparative Reinigung von Proteinen wurde ein GE Healthcare Äkta Purifier 10 UPC System eingesetzt. Hierbei handelt es sich um ein HPLC-System für Anwendungen im „*life science*"-Bereich zur Reinigung von Peptiden, Oligonukleotiden und anderen Biomolekülen wie z.B. Proteinen. Das Pumpensystem P-903 besteht aus zwei Pumpenköpfen, die separat angesteuert werden können. Sie erlauben einen maximalen Druck von 250 bar und eine maximale Flussrate von 10 ml/min sowohl bei isokratischer Chromatographie als auch bei Gradientenchromatographie. Die 0,6 ml Volumen umfassende Mischkammer befindet sich dabei auf der Hochdruckseite. Die Festwellendetektion erfolgt bei λ=280 nm oder optional bei λ=254 nm in einer UV-Durchflusszelle mit 5 mm Schichtdicke über eine Quecksilberdampflampe für die Detektion. Das System bietet zusätzlich die Möglichkeit über eine Leitfähigkeitsmesszelle die Leitfähigkeit der mobilen Phase zu bestimmen, was für die Ionenaustauschchromatographie von großer Bedeutung ist. Der Fraktionssammler Frac-950 erlaubt das Sammeln von Fraktionen mit einer Flussrate von 0,001 ml/min bis zu 100 ml/min sowohl in Mikrotiterplatten als auch in unterschiedliche Fraktionsröhrchen. Die Proteinreinigung über das Äkta Purifier UPC System erfolgte ausschließlich bei 4°C in einem speziell dafür vorgesehenem Unichromat 1500 Laborkühlschrank.

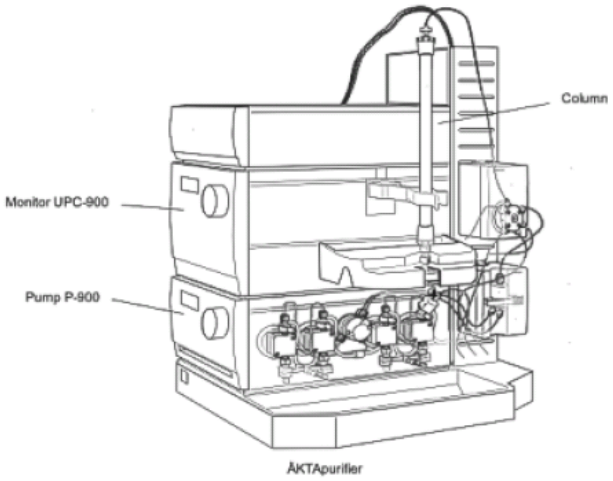


Abbildung 2-1. Äkta Purifier UPC Chromatographiesystem (Quelle: www.gehealthcare.com).

Im Zuge dieser Arbeit wurde das Äkta Purifier System für die Aufreinigung von Proteinen mittels Nickel-Affinitätschromatographie, Anionenaustauschchromatographie sowie Gelfiltrations-Größenausschlusshromatographie eingesetzt.

Bei der Affinitätschromatographie beruht das Trennprinzip auf der hochspezifischen und reversiblen Adsorption eines Moleküls an einen Matrix-immobilisierten Bindungspartner. Für die Elution wird der gebundene Analyt kompetitiv verdrängt. Im Falle der Nickel-Affinitätschromatographie besteht eine Affinität zwischen Ni^{2+}-Ionen, die an der Matrix immobilisiert werden und dem His-*Tag* des Fusionsproteins. Die Elution erfolgt über Imidazol. Man spricht in diesem Sonderfall von immobilisierter Metallchelat Affinitätschromatographie (IMAC).

Die Ionenaustauschchromatographie macht sich die kompetitive Wechselwirkung zwischen unterschiedlich geladenen Molekülen um eine ebenfalls geladenen Bindungsstelle auf der Trennmatrix zu Nutze. Die verantwortlichen Kräfte sind im Wesentlichen Coulomb-Kräfte. Durch die Wahl eines geeigneten Puffersystems (pH) kann die Nettoladung eines Proteins in Abhängigkeit seines isoelektrischen Punktes (pI) beeinflusst werden. Für die Anionenaustauschchromatograhie muss die Nettoladung des Proteins negativ, für die Kationenaustauschchromatographie entsprechend positiv sein.

Die Größenausschlusschromatographie, auch Gelfiltration genannt, macht sich das unterschiedliche Permeationsverhalten von Molekülen unterschiedlicher Größe im Trägermaterial mit definierter Porengröße zu Nutze. Aufgrund dieses Trennprinzips können Proteine beispielsweise über Gelfiltration entsalzt oder andere niedermolekulare Moleküle abgetrennt werden.

Die wichtigste Gleichung in der Chromatographie ist die Van-Deemter-Gleichung, die die theoretische Bodenhöhe H in Abhängigkeit von der Flussrate u der mobilen Phase widergibt. Ziel einer Chromatographie ist es, eine möglichst kleine Bodenhöhe und somit schmale, scharf aufgelöste Peaks zu erhalten. Die theoretische Bodenhöhe H ergibt sich einerseits aus dem Quotienten von Länge der Säule L durch die theoretische Bodenzahl N ($H = \frac{L}{N}$) und hängt andererseits von Diffusionserscheinungen und der Flussrate u ab, was durch die Van-Deemter-Gleichung berücksichtigt wird.

$$H(u) = A + \frac{B}{u} + C \cdot u$$

Gleichung 2-1. Van-Deemter-Gleichung

Die Konstante A gibt den Anteil der Eddy-Diffusion und somit den Anteil an der Bandenverbreiterung wider, der durch die unterschiedlichen Flusswege der Probenmoleküle durch die Säule zustande kommt. Diese Konstante ist somit von der mittleren Korngröße, der Korngrößenverteilung und der Homogenität der Säulenpackung abhängig.

Der Quotient $\frac{B}{u}$ beschreibt die Longitudinal-Diffusion und damit den Massenaustausch zwischen mobiler und stationärer Phase. Dieses Phänomen ist abhängig von der Flussrate *u* und spiegelt mathematisch betrachtet eine Hyperbel wider. Das Produkt $C \cdot u$ gibt den Anteil der Radialdiffusion und somit den Massentransfer in die stationäre Phase wider. Auch dieser ist von der Flussrate der mobilen Phase abhängig. Je höher die Flussrate, desto weniger Zeit bleibt dem Analyten mit der stationären Phase in Wechselwirkung zu treten und retardiert zu werden.
Für jede Chromatographie gibt es somit eine optimale Flussrate *u*, bei der die Peaks der Analyten maximal aufgelöst werden können.

2.1.2 Elektrospray-Ionisierung (ESI) in der Massenspektrometrie

Bei der Elektrospray-Ionisation werden unter Atmosphärendruck Ionen erzeugt, indem eine Hochspannung (2-6 kV) an der Ionisierungsquelle angelegt und ein elektrisches Feld zwischen der Kapillare und einer Gegenelektrode ausgebildet wird. Aufgrund ihrer Ladung bewegen sich die in der Analytlösung vorhandenen Ionen auf die Gegenelektrode zu. An der Spitze der Kapillare bildet sich ein Überschuss gleichartig geladener Ionen, die sich gegenseitig abstoßen und einen *Taylor-Cone* formen, bis sie schließlich in Form feiner Tropfen die Kapillare verlassen (Abbildung 2-2).

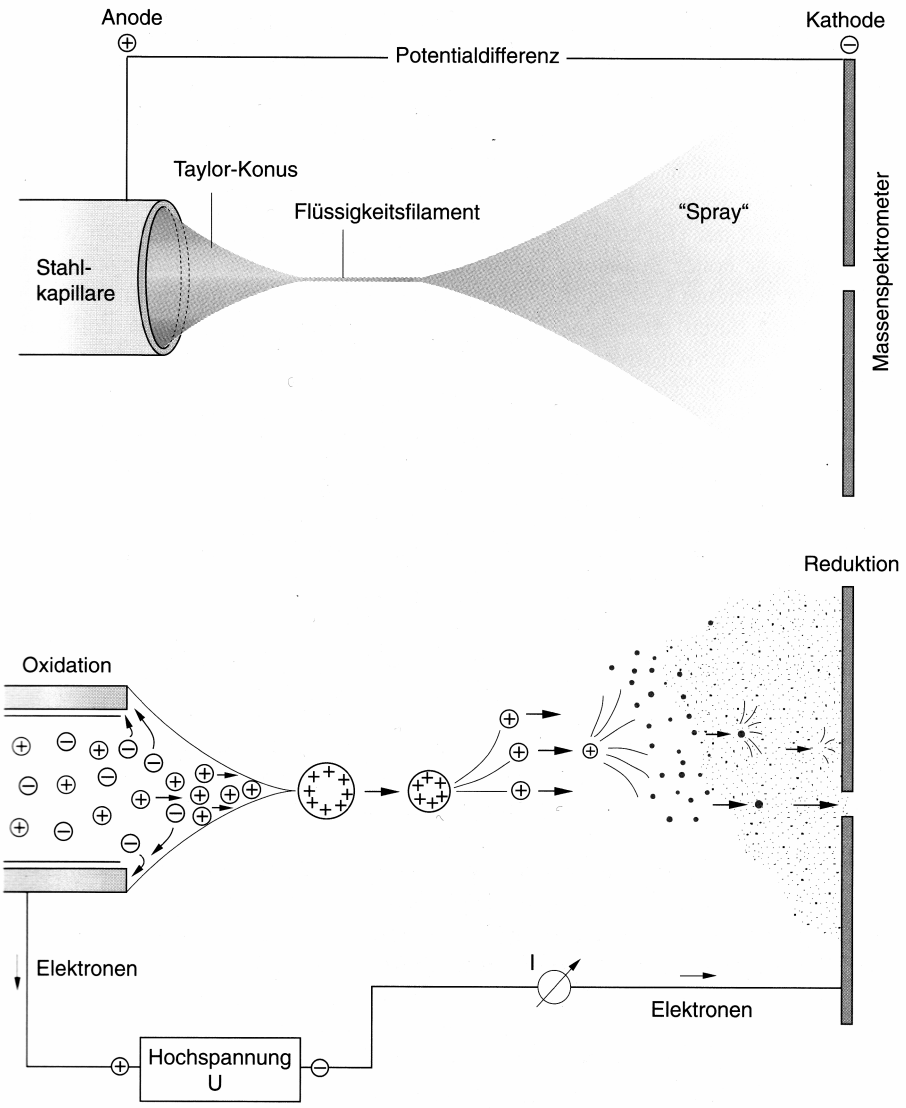


Abbildung 2-2: Schematische Darstellung des ESI-Prozesses (Quelle: Lottspeich, F. und Zorbas, H., 1998).

Bei neueren ESI-Quellen wird unterstützend Stickstoff als neutrales Trägergas eingesetzt, das die Vernebelung der Lösung und die Verdampfung des Lösungsmittels fördert. So verkleinert sich die Tropfengröße, während zugleich die Dichte der Ladungen auf der Tropfenoberfläche zunimmt. Wegen der Abstoßung gleichnamiger Ladungen zerplatzen die Tropfen, sobald sie eine kritische Größe, das sogenannte Rayleigh-Limit, erreicht haben durch Coulomb-Explosion in kleinere Tröpfchen. Dieser Prozess wiederholt sich, bis aus den verbleibenden Tröpfchen freie Ionen entstehen. Zwei Modellsysteme werden herangezogen, um diesen Prozess zu erklären, das *Charge Residue Model* (CRM) und das *Ion Evaporation Model* (IEM) (Kebarle, 2000). Nach dem CRM wiederholen sich Coulomb-Explosion und Verkleinerung der Tröpfchen so lange, bis nur noch ein einziges ionisiertes Analytmolekül übrig bleibt, das durch Verdampfen des restlichen Lösungsmittel freigesetzt wird. Das IEM

hingegen sieht vor, dass die Freisetzung von Ionen in die Gasphase bereits auf der Stufe größerer geladener Tropfen stattfindet. Durch Elektrospray-Ionisierung war erstmals die massenspektrometrische Charakterisierung großer Biomolekülen möglich, wofür John B. Fenn 2002 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet wurde.

2.1.3 Der Triple-Quadrupol-Analysator

Die Funktionsweise eines Quadrupol-Analysators basiert auf vier parallelen Elektrodenstäben die in einem quadratischen Querschnitt angeordnet sind. An diese Elektrodenstäbe werden Wechsel- und Gleichspannungen angelegt, und zwar so, dass an den gegenüberliegenden Stäben (A und C, B und D) sowohl die gleiche Polarität der Gleichspannung als auch die gleiche Phase der Wechselspannung anliegt. Der Einfachheit halber sollen zunächst nur die zwei gegenüberliegenden Stäbe A und C betrachtet werden. Wird an diese Stäbe eine Wechselspannung gelegt, so bauen sich abwechselnd positive und negative Felder relativ zur Mittelachse auf. Ein positives Ion, das sich in paralleler Richtung durch das Stabsystem bewegt, wird im positiven Feld zur Mittelachse, und im negativen Feld zu dem Stab, der am nächsten liegt, beschleunigt. Wie weit ein Ion von seiner geradlinigen Bahn seitlich abgelenkt wird, hängt von der angelegten Spannung und der Spannungsfrequenz sowie vom *m/z*–Verhältnis ab. In der Regel wird bei Quadrupol-Analysatoren die Wechselspannung mit einer positiven Gleichspannung überlagert. Aufgrund der Abstoßung gleichnamiger Ladungen bewirkt diese eine generelle Ablenkung zur Mittelachse hin. Bei Ionen mit hohem *m/z* überwiegt der Einfluss der Gleichspannung: Sie werden zur Mittelachse hin abgelenkt, und können das Stabsystem passieren. Ionen mit niedrigem *m/z* hingegen werden so stark beschleunigt, dass sie auf die Stäbe treffen und entladen werden. An die beiden verbleibenden Stäbe B und D wird nun eine um π verschobene Wechselspannung und eine negative Gleichspannung angelegt. Durch die negative Gleichspannung werden die positiv geladenen Ionen nun zu den Stäben B und D hin abgelenkt. Wieder überwiegt bei Ionen mit hohem *m/z* der Einfluss der Gleichspannung, sodass diese zu den Stäben B und D abgelenkt und entladen werden. Bei Ionen mit niedrigen *m/z* reicht das positive Feld der Wechselspannung aus, sie in die Mitte des Stabsystems zu ziehen. Somit filtern die Stäbe A und C niedrige *m/z*, und die Stäbe B und D hohe *m/z* aus. Durch geeignete Abstimmung der Gleich- und Wechselspannungen erreicht man, dass jeweils nur Ionen eines *m/z* das Stabsystem durchfliegen können (Budzikiewicz und Schäfer, 2005).

Der *Triple-Quadrupol*-Analysator besteht aus vier in Reihe geschalteten Quadrupolen, Q0, Q1, Q2 und Q3. Die Quadrupole Q1 und Q3 werden als Messquadrupole bezeichnet, und

wenden das oben beschriebene Prinzip der Kombination von Gleich- und Wechselspannung zum Einstellen der Stabilitätsbedingungen für Ionen mit unterschiedlichen *m/z*-Verhältnissen an. Quadrupole können aber auch im Totaltransmissionsmodus eingesetzt werden, d.h. es liegt nur eine Wechselspannung an (*RF only*) und alle Ionen gelangen durch den Quadrupol. Dieses Prinzip kommt bei Q0 immer, bei Q1, Q2 und Q3 im Bedarfsfall zum Einsatz. Q2 wird auch als Kollisionszelle bezeichnet, da messtechnisch in diesem Quadrupol auch die Fragmentierung von Ionen möglich ist. Aus der Kombination verschiedener Modi der drei Quadrupole Q1, Q2 und Q3 ergibt sich die experimentelle Bandbreite des *Triple-Quadrupol*-Analysators: Beim *Full Scan* wird entweder im Q1 ein Massenbereich gescannt, während Q2 und Q3 auf den Totaltransmissionsmodus eingestellt sind (Q1 Scan), oder im Q3 ein Massenbereich gescannt, während Q1 und Q2 sich im Totaltransmissionsmodus befinden (Q3 Scan). Beim Produktionenscan (*Product Ion Scan*) wird in Q1 das Mutterion selektiert, in Q2 fragmentiert und in Q3 die Fragmente gescannt. Beim Vorläuferionenscan (*Precursor Ion Scan*) wird in Q1 ein Massenbereich gescannt, in Q2 fragmentiert, während in Q3 ein spezifisches Ion selektiert wird, das ein charakteristisches geladenes Fragment des Mutterions darstellt. Ähnlich ist der Neutralverlustscan (*Neutral Loss Scan*). Hier wird wieder in Q1 ein Massenbereich gescannt und in Q2 fragmentiert, in Q3 jedoch wird nun jedoch gescannt, um Fragmente zu finden, die um die Masse eines bestimmten Neutralteilchens leichter sind. Wichtig für Quantifizierungsexperimente ist das *Multiple Reaction Monitoring* (MRM). Hierzu wird in Q1 ein spezifisches *m/z-Verhältnis* selektiert, in Q2 erfolgt die Fragmentierung dieses Ions, und in Q3 wird das *m/z-Verhältnis* eines spezifischen Fragments gefiltert. Durch diese Anordnung kombiniert das Experiment hohe Selektivität mit hoher Empfindlichkeit.

2.1.4 Das MDS Sciex QTrap 2000-Massenspektrometer

Für die quantitative Massenspektrometrie wurde in dieser Arbeit ein QTrap 2000 Massenspektrometer von Applied Biosystems/MDS Sciex verwendet. Die Ionisierung erfolgt bei diesem Gerät über eine TurboIon-Quelle, die eine spezielle Form der *Elektrospray*-Ionisation darstellt und in Abbildung 2-3 schematisch dargestellt ist.

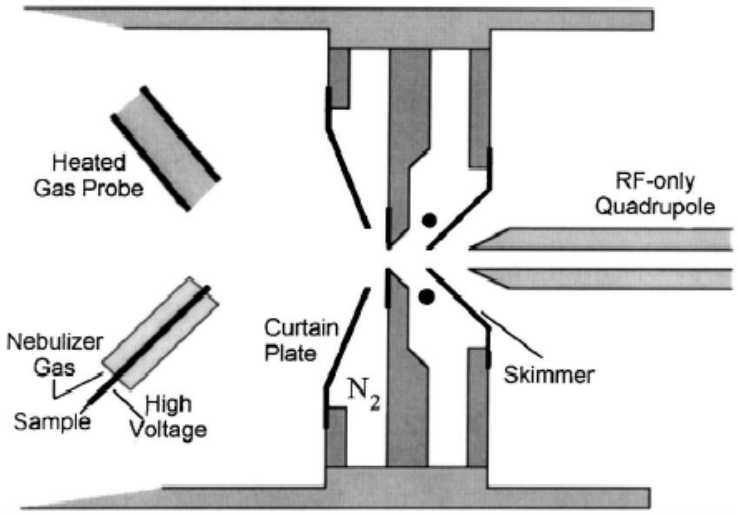


Abbildung 2-3: Schematische Abbildung der TurboIon-Quelle der QTrap 2000 (Quelle: W.M.A. Niessen, 1999).

Von der Spraykapillare gelangen die Ionen durch *Orifice* und *Skimmer* in den Quadrupol Q0, der dem Transport der Ionen in den Vakuumbereich dient. Die QTrap 2000 besteht aus vier in Reihe geschalteten Quadrupolen (Q0, Q1, Q2, Q3), von denen der letzte, Q3, auch als *linear ion trap* (LIT) verwendet werden kann. In der LIT können die Ionen in einem Potentialtopf gefangen werden, indem eine Wechselspannung am Quadrupol angelegt wird, und eine Gleichspannung an den beiden Enden des Quadrupols.

Mit der QTrap 2000 sind alle typischen *Triple-Quadrupol*-Experimente wie Produktionen°(PI)-, Neutralverlust (NL)-, Vorläuferionenscans (PC) sowie *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) möglich. Für diese Arbeit wurde die Quantifizierung der Reaktionsprodukte der Enzymreaktionen über *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) durchgeführt. Für dieses Experiment wird Q1 auf ein spezifisches *m/z*-Verhältnis gesetzt, in Q2 erfolgt die Fragmentierung dieses Ions, und Q3 wird auf das *m/z*-Verhältnis eines bestimmten Fragments gesetzt. Der Begriff *Multiple* wird verwendet, da mehrere Paare von *m/z*-Verhältnissen in Q1 und Q2 in einem Experiment betrachtet werden können. Im Allgemeinen wird auch von MRM gesprochen, wenn nur der Übergang eines einzigen Ions betrachtet wird. Eine alternative, wenn auch weniger gebräuchliche Bezeichnung in diesem Falle ist *Single Reaction Monitoring* (SRM). Ein wesentlicher Vorteil bei der Quantifizierung mittels MRM besteht in der hohen Selektivität und Empfindlichkeit dieser Methode.

2.1.5 Der TOF-Analysator

Das Prinzip des *time of flight* (TOF) Massenanalysators basiert darauf, dass Ionen der gleichen kinetischen Energie

$$E_{kin} = \frac{1}{2} \cdot m \cdot v^2$$

Gleichung 2-2

proportional zu ihrer Masse *m* unterschiedliche Fluggeschwindigkeiten *v* besitzen. Die Bestimmung des Verhältnisses von Masse-zu-Ladung beruht somit auf der Messung der Flugzeit von Ionen in einem Flugrohr definierter Länge unter Hochvakuum. Beim Eintritt der Ionen in das Flugrohr wird ein elektrisches Beschleunigungspotential *V* angelegt, wodurch diese die potentielle Energie

$$E_{pot} = z \cdot e \cdot V$$

Gleichung 2-3

erfahren. Dabei ist *z* die Anzahl der Ladungen des Ions, *e* die Elementarladung und *V* die angelegte Spannung. Die angelegte Beschleunigungsspannung ist entgegengesetzt zur Ladung der Ionen, tragen die Ionen eine positive Ladung, so wird ein negatives Potential angelegt und umgekehrt. Die potentielle Energie wird aufgrund der Anziehungskraft des elektrischen Beschleunigungspotential *V* gegenüber den invers geladenen Ionen in kinetische Energie

$$E_{kin} = \frac{1}{2} \cdot m \cdot v^2$$

Gleichung 2-4

umgewandelt. Somit gilt

$$E_{pot} = E_{kin} \text{ und } z \cdot e \cdot V = \frac{1}{2} \cdot m \cdot v^2 .$$

Gleichung 2-5

Aus dem Beschleunigungspotential *V* und der gemessenen Flugzeit *TOF* der Ionen zum Detektor, welche mit der zurückgelegten Wegstrecke *L* (Länge des Flugrohrs) in die Geschindigkeit *v* einfließt, lassen sich die relativen Massen der Ionen über die Gleichung

$$TOF = \frac{L}{v} = L \cdot \left(\frac{m}{2 \cdot z \cdot e \cdot V} \right)^{\frac{1}{2}}$$

Gleichung 2-6

bestimmen und anhand eines Kalibrierstandards in absolute *m/z*-Werte umwandeln. Diese Gleichung gibt die inverse quadratische Beziehung zwischen der Fluggeschwindigkeit *v* und dem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis *m/z* wieder.

Da dieses Messprinzip auf der Bestimmung der Flugzeit von Ionen zum Detektor beruht, gibt es theoretisch kein oberes Limit für die Detektion von Ionen mit hohen *m/z*-Werten, wodurch sich dieser Analysatortyp hervorragend für die hochempfindliche Messung von Makromolekülen wie Proteinen eignet. Ein weiterer Vorteil dieses Analysators besteht darin, dass über jeden Beschleunigungsimpuls *V* alle Ionen direkt zum Detektor beschleunigt werden und ein Massenspektrum erzeugt wird. Es handelt sich beim TOF-Analysator somit um eine kontinuierliche Analyse und nicht um einen scannenden Breitband-Massenfilter, wie dies beim Quadrupol-Analysator der Fall ist, wodurch die Sensitivität im *Full-Scan*-Modus deutlich erhöht ist.

Um das Auflösungsvermögen des TOF-Analysators zu erhöhen, kann zusätzlich ein Ionenspiegel in das Flugrohr eingebaut werden. In diesem Falle spricht man auch von TOF-Reflektron-Analysator. Da Ionen trotz gleicher *m/z*-Werte aufgrund einer energetischen Unschärfe nicht exakt die gleiche kinetische Energie aufweisen, treffen diese im linearen TOF-Analysator zeitlich leicht versetzt am Detektor an, was sich im Massenspektrum durch eine Peakverbreiterung und somit durch ein schlechteres Auflösungsvermögen bemerkbar macht. Um dem entgegen zu wirken wird beim TOF-Reflektron-Analysator am Ende des Flugrohrs zusätzlich ein Ionenspiegel in Form eines elektrischen Gitters angebracht, welches dem Beschleunigungsfeld entgegengesetzt ist. Die in das Reflektron eintretenden Ionen werden im entgegengesetzten elektrischen Feld zunächst abgebremst bis ihre kinetische Energie null wird und schließlich, vergleichbar mit einem Spiegel, in entgegengesetzte Richtung beschleunigt und somit reflektiert. Ionen mit höherer kinetischer Energie treten tiefer in das elektrische Gegenfeld ein, als Ionen geringerer Energie, bevor beide reflektiert werden. Durch diese Reflektion im elektrischen Gegenfeld wird die energetische Unschärfe von Ionen gleicher *m/z*-Verhältnisse aber leicht unterschiedlichen kinetischen Energien ausgeglichen. Die Ionen gleicher *m/z*-Werte verlassen nun das Reflektron mit der gleichen kinetischen Energie und der gleichen Geschwindigkeit und treffen folglich zeitgleich auf den Detektor, wodurch die Peakbreite deutlich verringert und somit das Auflösungsvermögen deutlich verbessert wird. Um eine Reflektion der Ionen in Richtung des Detektors zu ermöglichen, muss der Ionenspiegel in einem Winkel von kleiner 180° zum eintretenen Ionenstrom angebracht werden. Damit es im Flugrohr zu keiner ungewollten Kollision der

Ionen mit weiteren Molekülen kommt, steht der TOF-Reflektron-Analysator unter Hochvakuum, wodurch die mittlere freie Wegstrecke der Ionen erhöht wird.

2.1.6 Das Micromass Q-TOF2-Massenspektrometer

Zur Analyse von Proteinen und kleinen Molekülen wurde ein Q-TOF2 *hybrid Quadrupol Time Of Flight*-Massenspektrometer ausgerüstet mit einer *Electrospray Ionisation* Quelle (ESI) eingesetzt. Der in der ESI-Quelle ionisierte Analyt gelangt durch eine sogenannte Z-Spray-Anordnung in das Hochvakuum. Die Z-Spray-Ionenquelle ist so aufgebaut, dass die Ionen orthogonal in die Ionenoptik hinein abgelenkt werden, während ungeladenen Moleküle auf eine Ablenkplatte („*baffle plate*“) treffen und somit nicht in den Analysator eintreten. Durch eine zweite orthogonale Ablenkung gelangen die Ionen in die Ionenoptik des Massenspektrometers, wo sie zunächst durch eine Hexapol-Fokussierlinse im *RF*-Modus fokussiert werden. Der Name Z-Spray stammt von der Z-förmigen Bauweise der Ionenquelle, wie aus Abbildung 2-4 ersichtlich ist.

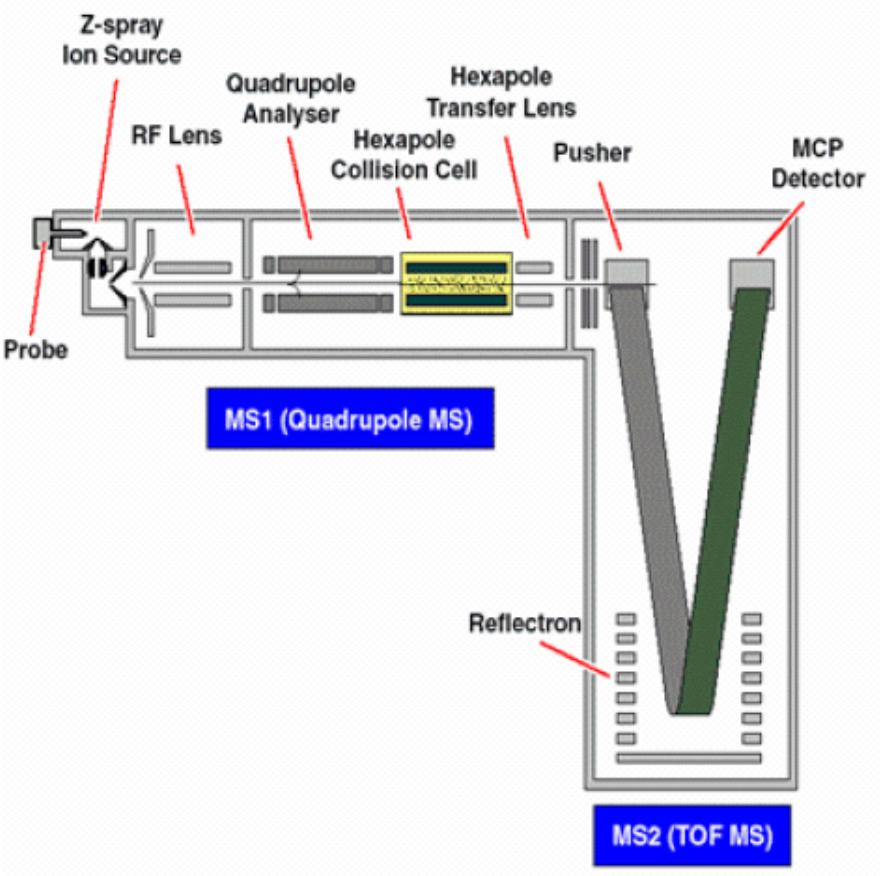


Abbildung 2-4. Q-TOF2-Massenspektrometer von Waters/Micromass (Quelle: www.waters.com).

Der erste Analysator besteht aus einem Quadrupol-Analysator, dem eine Hexapol-Kollisionszelle nachgeschaltet ist. Theoretisch können Ionen bis zu *m/z* 4000 durch den Quadrupol transmittiert werden. Die Hexapol-Kollisionszelle steht permanent unter Helium-Gas, um die Auflösung auch im Full-Scan-Modus durch sogenanntes *Collisional Cooling* zu erhöhen. Im MS/MS-Modus können Mutterionen im Quadrupol-Analysator isoliert und anschließend in der Kollisionszelle in Abhängigkeit von der Kollisionsenergie fragmentiert werden. Der aus der Kollisionszelle austretende Ionenstrahl wird über ein weiteres Hexapol-Transferlinsensystem in den *Pusher* des orthogonalen *time of flight (TOF)*-Analysators mit integriertem Reflektron transportiert. Zur Optimierung der Ionisierung und der Ionen-Transmission durch den ersten Analysator kann der aus der Kollisionszelle austretende Ionenstrom an der Eintrittstelle in den zweiten Analysator alternativ über einen Photomultiplier-Detektor detektiert werden. Hierbei treffen die Ionen nach Umlenkung über eine Konversionsdynode auf eine Phosphorplatte, wodurch Lichtquanten emittiert und diese anschließend über den Photomultiplier detektiert werden.

Für die Analyse im zweiten Analysator, dem TOF-Reflektron-Analysator, werden die Ionen im *Pusher* durch das Beschleunigungspotential *V* orthogonal in das Flugrohr in Richtung Reflektron-Gitter beschleunigt und erhalten dadurch ihre kinetische Energie. Der *Pusher* kann mit einer Frequenz von bis zu 20000 *Hz* arbeiten, das bedeutet, dass in diesem Fall im zeitlichen Abstand von 0,05 ms Ionenpakete in den TOF-Reflektron-Analysator beschleunigt werden. Bei einer Scanzeit von 1 s werden am Detektor somit 20000 Einzelspektren detektiert und zu einem Spektrum aufsummiert. Das sich am einen Ende des Flugrohres befindliche Reflexionsgitter gleicht minimale Unterschiede in der kinetischen Energie gleicher Ionen aus und beschleunigt diese wiederum in entgegengesetzte Richtung zum Detektor. Dort werden die ankommenden Ionen detektiert. Das Startsignal für die Messung der Flugzeit der Ionen gibt der *Pusher*, durch Aufprall der Ionen auf dem Detektor wird das Ende bestimmt. Das Q-TOF2-Massenspektrometer verwendet einen *Multi Channel Plate* Detektor (MCP). Dieser besteht aus einer Vielzahl von Röhren, auf deren Innenseiten die Ionen auftreffen und das Signal über einen Sekundärelektronenverstärkung weitergeleitet wird.

Die Umwandlung des Signals erfolgt durch einen Analog-Digitalumwandler und nimmt eine gewisse minimale Zeit in Anspruch. Beim Datenakquirierungssystem für dieses Instrument spricht man von *Time to Digital Converter* (TDC). Bei diesem System wird ein Massenspektrum generiert, indem die Anzahl aller am Detektor ankommenden Ionen sowie deren Ankunftszeiten bestimmt und in einem Zwischenspeicher gesammelt werden. Treffen zu viele Ionen gleichzeitig ein, so gelangt das System in einen Sättigungsbereich hinein, in

dem keine weiteren ankommenden Ionen detektiert werden können. Man spricht dabei auch vom Totzeitverhalten des TDC. Die Konsequenz dieses Totzeitverhaltens ist, dass bei hohen Ionenströmen nicht alle in der Quelle generierten Ionen am Detektor registriert werden können, wodurch es zu einer Verschiebung zu geringeren Massen kommt. Um bei der Messung nicht in dieses Totzeitverhalten zu gelangen, sollte bei einer Scanzeit von 1 s die Intensität aller Signale deutlich unter 250 *counts* liegen.

2.1.7 LC-ESI-MS-Kopplung

Bei der HPLC-MS-Kopplung wird der Ausgang der Chromatographiesäule über die Kapillare mit der ESI-Quelle des Massenspektrometers verbunden. Bei atmosphärischem Druck (API = *Atmospheric Pressure Ionisation*) gelangen die aufgetrennten Komponenten über die Sprühkapillare in die Quelle und werden dort ionisiert. Die *m/z*-Verhältnisse werden in Form eines rekonstruierten Totalionenstroms (TIC) registriert. Während oder im Anschluss an die Messung kann die Masseninformation aller zu einem bestimmten Zeitpunkt eluierten Verbindungen, die als *Peak* im TIC erkennbar sind, erhalten werden.

Für die HPLC-MS Kopplung an das QTrap 2000-Massenspektrometer von Applied Biosystems/MDS Sciex wurde ein Agilent 1100 HPLC-System mit einem binären *Capillary*-Pumpensystem, einem *Dioden Array Detector* (DAD) und einem temperierbaren *MicroWell Plate Autosampler* (WMP-Sampler) verwendet. Dieses System eignet sich hervorragend für die im Zuge dieser Arbeit durchgeführten enzymkinetischen Untersuchungen, da aufgrund der Volumenlimitierung bei den Reaktionsansätzen auch minimalste Volumina (1 µl) über den *Micro Well Plate Autosampler* injiziert und die entsprechenden Reaktionsprodukte mit kleinen RP-C18-Säulen und geringen Flussraten (60 µl/min) aufgetrennt werden konnten. Aufgrund der geringen Flussraten werden sogenannte *fused-silica* Kapillaren mit einem Innendurchmesser von 75 µm eingesetzt. Das Messvolumen der UV-Messzelle des DAD beträgt 500 nl.

Für die HPLC-MS-Kopplung an das Q-TOF2-Massenspektrometer von Waters/Micromass wurde ein analytisches Agilent 1100 HPLC-System mit binärer Pumpe eingesetzt. Je nach Säule wurde die Anlage entweder direkt mit einer Flussrate von 200 µl/min an die ESI-Quelle gekoppelt oder aber, bei höheren Flussraten, Anteile über ein T-Stück in den Abfallbehälter (*Waste*) abgetrennt.

2.2 Enzymkinetik

Enzyme sind Biokatalysatoren, die eine chemische Reaktion beschleunigen, indem sie die Aktivierungsenergie für die entsprechende Reaktion herabsetzen. Die chemische Reaktion würde prinzipiell auch ohne Enzym ablaufen, allerdings wäre die Aktivierungsenergie ohne Katalysator und somit der Zeitbedarf für die unkatalysierte Umsetzung von Reaktant zu Produkt um ein Vielfaches höher, wie aus dem Energieprofil in Abbildung 2-5 ersichtlich wird. Um einen gerichteten Ablauf von Stoffwechselprozessen innerhalb von biologischen Systemen wie Zellen zu gewährleisten, die allesamt auf biochemischen Reaktionen beruhen, sind Biokatalysatoren wie Enzyme essentiell. Die meisten Enzyme sind Proteine, es gibt allerdings auch Nukleinsäuren wie Ribozyme, die katalytisch aktiv sind.

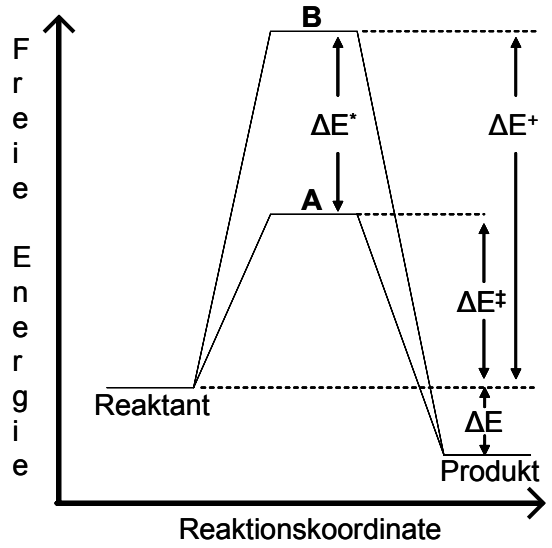


Abbildung 2-5: Vereinfachtes Energiediagramm für das Reaktionsprofil einer typischen chemischen Reaktion. Dargestellt sind die Übergangszustände der Reaktion von Reaktant zu Produkt mit Katalysator (A) und ohne (B) Katalysator inklusive der dafür notwendigen Aktivierungsenergien $\Delta E^{\ddagger}$ (A) und ΔE^{+} (B). Der Betrag, um den der Katalysator die Aktivierungsenergie herabsetzt ist ΔE^{*}. ΔE ist die Freie Energie zwischen Reaktant und Produkt (nach Copeland, 2000).

Damit ein Enzym eine chemische Umwandlung von einem Molekül, dem Substrat, zu einem zweiten Molekül, dem Produkt, katalysieren kann, müssen Enzym und Substrat aufeinandertreffen und einen binären Komplex, den sogenannten Enzym-Substrat-Komplex, bilden. Die Bindung des Substrates an das Enzym erfolgt im sogenannten aktiven Zentrum des Enzyms (*active site*). Werden Enzym und Substrat im entsprechenden Reaktionspuffer miteinander gemischt und misst man zeitgleich die Abnahme des Substrats bzw. die Produktzunahme mit der Zeit, so erhält man eine Zeit-Umsatz-Kurve, wie sie in Abbildung

2-6 dargestellt ist. Im Bereich kurzer Inkubationszeiten ist die Produkt- bzw. Substratänderungsrate hoch wohingegen sie mit zunehmender Zeit abnimmt und schließlich mit der Depletierung des Substrats gegen Null geht.

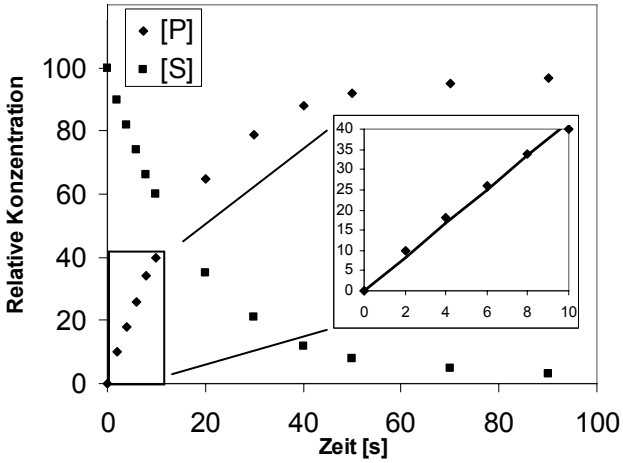


Abbildung 2-6. Beispiel für eine Zeit-Umsatz-Kurve für die Substratabnahme bzw. Produktzunahme während einer Enzym-katalysierten Reaktion.

Dieser zeitliche Verlauf kann mit einer Kinetik 1. Ordnung gemäß Gleichung 2-7 beschrieben werden, wobei [*S*] die Substratkonzentration zu einem gegebenen Zeitpunkt *t* und [S_0] die Anfangskonzentration des Substrats ist. Die Geschwindigkeitskonstante pseudo-1. Ordnung für diese Reaktion ist *k*.

$$[S] = [S_0] \cdot e^{-kt}$$

Gleichung 2-7

Hieraus ergibt sich folgende Geschwindigkeit für die Enzymreaktion:

$$v = -\frac{d[S]}{dt} = \frac{d[P]}{dt} = k \cdot [S_0] \cdot e^{-kt}$$

Gleichung 2-8

Betrachtet man die Produktbildungsrate im Anfangsbereich der Zeit-Umsatz-Kurve (Abbildung 2-6) so stellt man fest, dass die Produktbildung nahezu linear mit der Zeit verläuft. Für diesen zeitlich sehr stark begrenzten Bereich kann die Anfangsgeschwindigkeit v_0 der Enzymreaktion über die Steigung der Geraden angenähert werden.

$$v_0 = -\frac{\Delta[S]}{\Delta t} = \frac{\Delta[P]}{\Delta t}$$

Gleichung 2-9

Werden die Anfangsgeschwindigkeiten gegen die Substratkonzentrationen aufgetragen, so resultiert eine Kurve wie in Abbildung 2-7 dargestellt, die über die Henri-Michaelis-Menten-Gleichung (Gleichung 2-10) beschrieben werden kann.

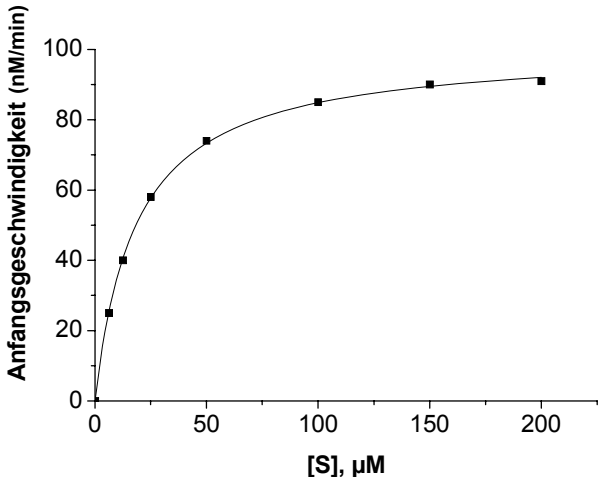


Abbildung 2-7. Michaelis-Menten Kurve. Aufgetragen sind die Anfangsgeschwindigkeiten der Enzymreaktion gegen die Substratkonzentrationen [S].

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

Gleichung 2-10. Henri-Michaelis-Menten-Gleichung der Enzymkinetik

Grundlage der Henri-Michaelis-Menten-Gleichung ist die Annahme, dass während einer Enzymreaktion ein sogenannter *steady state*-Zustand existiert, bei dem die Bildungsgeschwindigkeit des Enzym-Substrat-Komplexes gleich dessen Zerfall zum Produkt und freien Enzym ist. Dieser Zustand kann erreicht werden, wenn die Substratkonzentration in großem Überschuss im Vergleich zum freien Enzym vorliegt (Copeland, 2000). Allgemein betrachtet verläuft die Enzymreaktion nach folgendem Schema:

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_2} E + P$$

Gleichung 2-11

Das Substrat reagiert mit der Geschwindigkeitskonstante k_1 zum Enzym-Substrat-Komplex ES, und dissoziiert mit der Geschwindigkeitskonstante k_{-1} wieder vom Enzym ab. Der Umsatz zum Produkt P erfolgt mit der Geschwindigkeitskonstante k_2.

Die Michaelis-Menten Konstante K_M in Gleichung 2-10 gibt die Substratkonzentration bei halbmaximaler Geschwindigkeit wieder und setzt sich gemäß Gleichung 2-12 aus den Geschwindigkeitskonstanten k_1, k_{-1} und k_2 zusammen. Sie ist somit ein Maß für die Stabilität

des Enzym-Substrat-Komplexes oder anders ausgedrückt für die Affinität des Enzyms zum Substrat.

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

Gleichung 2-12

Die bei Substratsättigung maximal erreichbare Reaktionsgeschwindigkeit der Enzymreaktion ist V_{max}. Diese hängt jedoch direkt von der eingesetzten Enzymkonzentration ab. Um eine Enzym-spezifische Konstante für die maximale Umsetzung von Substrat pro Zeiteinheit zu erhalten, wurde die Wechselzahl k_{cat} eingeführt. k_{cat} erhält man gemäß Gleichung 2-13 durch die Normierung der Maximalgeschwindigkeit V_{max} auf die eingesetzte Enzymkonzentration $[E]$.

$$V_{\max} = k_{cat}[E]$$

Gleichung 2-13

Die Wechselzahl k_{cat} ist eine Geschwindigkeitskonstante und umfasst praktisch die Geschwindigkeitskonstanten aller Einzelreaktionen, die für die Umwandlung des Enzym-Substrat-Komplexes zum Produkt und freien Enzym notwendig sind. Für komplexe Reaktionen gilt somit folgendes Schema (Gleichung 2-14):

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_{cat}} E + P$$

Gleichung 2-14

3 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Katalysemechanismus der *para*-Aminobenzoesäure-Biosynthese von *B. subtilis* im Vergleich zu *E. coli* zu untersuchen. Die ADC-Synthase von *B. subtilis* enthält, wie die einer Reihe anderer Mikroorganismen, im aktiven Zentrum anstelle eines Lysins ein Alanin. Da Alanin nicht die funktionelle Aufgabe des Lysins, einen nukleophilen Angriff auf C2 von Chorismat auszuüben, erfüllen kann, wurde die Hypothese aufgestellt, dass der Katalysemechanismus grundsätzlich anders ablaufen muss. Diese Hypothese sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit überprüft werden.

Hierfür mussten zunächst die an der der *para*-Aminobenzoesäure-Biosynthese beteiligten Enzyme PabA, PabB und PabC aus dem Gesamtgenom von *B. subtilis* und *E. coli* kloniert, Mutanten erzeugt, die Proteine überexprimiert und eine Reinigungsstrategie etabliert werden. Basierend auf quantitativer und qualitativer Massenspektrometrie wurde die Enzymreaktion untersucht und charakterisiert. Dabei kamen sowohl massenspektrometrische Techniken für kleine Moleküle (*Small Molecules*) als auch Protein-Massenspektrometrie zum Einsatz. Zur Verfolgung der Enzymreaktion musste ein geeignetes Assay-System entwickelt werden, das eine Quantifizierung der Reaktionsprodukte der ADC-Synthase-Reaktion ermöglichte.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Geräte

Äkta Purifier 10 UPC Chromatographiesystem

GE Healthcare, Uppsala, Schweden

AVANCE 400 NMR Spektrometer

Bruker, Karlsruhe

Agarosegelkammern

BIO-RAD Mini-Sub Cell GT, München

Photometer

AMERSHAM BIOSCIENCES Ultrospec 2100 pro, Uppsala, Schweden

PCR

PEQLAB Primus 96 advanced, Erlangen

Zentrifugen

HERMLE Z 383 K, Gosheim
HERMLE Z 233 MK-2, Gosheim

Heizblock

EPPENDORF 1,5ml Thermomixer comfort, Hamburg

SDS-PAGE

BIO-RAD Mini-PROTEAN 3 Electrophoresis, München

Western Blot

BIO-RAD Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell, München

Brutschrank

BINDER, Tuttlingen

Schüttelinkubator

INFORS Multitron II, Bottmingen, Schweiz

French Press

SIM-AMINCO, SLM Instruments, Inc. Rochester, NY, USA

HPLC und Massenspektrometer

HPLC analytisch: Agilent 1100 HPLC, Agilent Technologies, Waldbronn

Capillary HPLC: Agilent 1100 HPLC, Agilent Technologies, Waldbronn

Q-TOF2 Waters/Micromass Micromass/Waters, Milford, USA

QTrap2000, Applied Biosystems / MDS Sciex, Darmstadt

4.1.2 Chemikalien

Agar Kobe I pulv., Roti®-Quant	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg
Ampicillin	Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg
BCA Protein Assay Kit	PIERCE Biotechnology Inc., Rockford, IL, USA
Bromphenolblau	Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg
^{15}N-ω-markiertes Glutamin	Eurisotop, Saint-Aubin Cedex, Frankreich
Dialysemembran	Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg
Dithiothreitol (DTT)	Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg
Ethidiumbromid	Sigma Chemie, München
E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit I	PEQLAB Biotechnology GmbH, Erlangen
GeneRuler 1kb DANN Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Diagnostic Chemicals Limited Charlottetown Bio-Tech Trade & Service GmbH
Ammoniumsulfat	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
$H_2O_{dest.}$	Interne Wasserentsalzungsanlage
H_2O_{dd}	Millipore Corporation, Billerica, MA, USA
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg
NucleoSpin Extract Kit	MACHEREY-NAGEL GmbH, Düren
Nutrient Broth	BD Becton Dickinson GmbH, Sparks, MD, USA
Primer	Biomers.net GmbH, Ulm
Prestained Proteinladder, 10-180 kDa	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Proteinladder, 10-200 kDa	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma Aldrich, Steinheim
Pyridoxalphosphat	Sigma Aldrich, Steinheim
Chorismat	Sigma Aldrich, Steinheim
Qiaex II Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, La Jolla, California, USA
Plasmid Midiprep Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Roti®-Quant Reagenz	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Rotiphorese Gel A (30 %)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Rotiphorese Gel B (2 %)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Serva Blau 250	Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg
TriDye 100 bp DNA Ladder	New England Biolabs, Schwalbach

TriDye 2-log DNA Ladder	New England Biolabs, Schwalbach
Trizma® base (Tris)	Sigma Chemie, München

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien waren analysenreine Reagenzien der Firma Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe.

4.1.3 Enzyme

Antarctic Phosphatase	New England Biolabs, Schwalbach
DNA Polymerase I Klenow Fragment	New England Biolabs, Schwalbach
Lysozym	Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg
Proteinase K	Roche, Basel
Pwo DNA-Polymerase und Puffer	Roche, Basel
Quickligase	New England Biolabs, Schwalbach
Prescission Protease	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Restriktionsendonucleasen und –puffer	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
	New England Biolabs, Schwalbach
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs, Schwalbach
T4-Polynucleotidkinase	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

4.1.4 Medien

LB-Medium	Trypton	10 g
	Yeast Extract	5 g
	NaCl	10 g
	H_2O dest.	ad 1 L
TY-Medium	Trypton	8 g
	Yeast Extract	5 g
	NaCl	5 g
	H_2O dest.	ad 1 L

4.1.5 Medienzusätze

Agar	Agar Kobe I für Platten	7,5 g für 500 ml LB
Antibiotika	Ampicillin (stock 25 mg/ml) in H_2O	50 µg/ml
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktosid, (*stock* 100 mM) in H_2O	1 mM

4.1.6 Lösungen

4.1.6.1 Lösungen zur DNA-Isolierung

TE-Puffer	10 mM Tris/HCl	121,1 mg
	1 mM EDTA	37 mg
	H_2O dest.	ad 100 ml
		pH 8,0
Lysozym-Lösung	100 mg/ml Lysozym in TE-Puffer	
Proteinase K-Lösung	20 mg/ml Proteinase K in TE-Puffer	
RNase A-Lösung	10 mg/ml RNase A in TE-Puffer	

4.1.6.2 Lösungen für Agarosegele

Auftragspuffer 5 x	Saccharose	25 %
	SDS	0,1 %
	Bromphenolblau	0,05 %
	Tris	50 mM
TAE-Puffer 10 x	Tris	48,4 g
	Essigsäure (96 %)	11,4 g
	EDTA	7,2 g
	H_2O dest.	ad 1 l
		pH 7,9
Ethidiumbromid-Färbebad		5 µg/ml in 500 ml H_2O_d

4.1.6.3 Lösungen für SDS-PAGE und Westernblot

Auftragspuffer	1 M Tris/HCl pH 6,8	3,75 ml
	SDS	1,2 g
	Glycerin	6 ml
	Bromphenolblau	6 mg
	H_2O dest.	ad 13,5 ml
Zugabe vor Verwendung:	1 M DTT	1,5 ml
Elektrophoresepuffer 10 x	Tris	31 g
	Glycin	144 g
	SDS	10 g
	H_2O dest.	ad 1 l
		pH 8,3
Sammelgelpuffer	Tris/HCl, pH 6,8	0,25 M

Trenngelpuffer	Tris/HCl, pH 8,8	1,5 M
Sammelgel	Rotiphorese Gel A (30 % Acrylamid)	1,25 ml
	Rotiphorese Gel B (2 % Bisacrylamid)	0,5 ml
	Sammelgelpuffer	6,3 ml
	H_2O dest.	4,0 ml
	SDS (10 %)	120 µl
	APS (100 mg/ml)	80 µl
	TEMED	30 µl
Trenngel (12 %)	Rotiphorese Gel A (30 % Acrylamid)	8 ml
	Rotiphorese Gel B (2 % Bisacrylamid)	2,4 ml
	Trenngelpuffer	5,0 ml
	H_2O dest.	7,5 ml
	SDS (10 %)	400 µl
	APS (100 mg/ml)	100 µl
	TEMED	50 µl
Färbelösung	Serva Blau R250	0,85 g
	Ethanol	250 ml
	Eisessig	50 ml
	H_2O dest.	ad 500 ml
Entfärbelösung	Ethanol	100 ml
	Eisessig	100 ml
	H_2O dest.	ad 1 l
Westernblot Puffer	Tris/HCl	0,25 M
	Glycin	190 mM
	MeOH	20 %
TNT Puffer	Tris/HCl pH 7,5	0,25 M
	NaCl	500 mM
	Tween 20	0,05 %

AP-Puffer	Tris/HCl pH 9,5	100 mM
	NaCl	100 mM
	$MgCl_2$	5 mM
	EDTA	1 mM
4-Nitroblautetrazolium-Lösung	50 mg/ml in 70 % DMF	
5-Brom-4-Chlorindolyl-phosphat-Lösung	10 mg/ml in 100 % DMF	
Westernblot Färbelösung	4-Nitroblautetrazolium-Lösung	135 µl
	5-Brom-4-Chlorindolyl-phosphat-Lösung	300 µl
	AP-Puffer	15 ml

4.1.6.4 Lösungen zur Proteinreinigung von PabA

Puffer A	8 M Harnstoff	48,05 g
	100 mM NaH_2PO_4	1,38 g
	10 mM Tris/HCl	121 mg
	H_2O dest.	ad 100 ml
		pH 8,0
Zugabe vor Gebrauch:	1 M DTT (5 mM)	0,5 ml
Puffer B	50 mM Tris/HCl	6,06 g
	Glycerin 8 %	93 ml
	H_2O dest.	ad 1 l
		pH 8,0
Zugabe vor Gebrauch:	1 M DTT	1 ml
Puffer B mit NaCl	50 mM Tris/HCl	6,06 g
	Glycerin 8 %	93 ml
	1M NaCl	58 g
	H_2O dest.	ad 1 l
		pH 8,0
	1 M DTT	1 ml

Puffer C	50 mM Tris/HCl	6,06 g
	Glycerin 8 %	93 ml
	100 mM NaCl	5,8 g
	H_2O dest.	ad 1 l
		pH 8,0
Zugabe vor Gebrauch:	1 M DTT	1 ml

4.1.6.5 Lösungen zur Proteinreinigung von PabB

Lysis-Puffer:	50 mM NaH_2PO_4	780 mg
	300 mM NaCl	1,75 g
	20 mM Imidazol	136 mg
		ad 100 ml H_2O_{dd}
		pH 8,0
Wasch-Puffer:	50 mM NaH_2PO_4	780 mg
	300 mM NaCl	1,75 g
	40 mM Imidazol	272 mg
		ad 100 ml H_2O_{dd}
		pH 8,0
Elutions-Puffer:	50 mM NaH_2PO_4	780 mg
	300 mM NaCl	1,75 g
	250 mM Imidazol	1,7 g
		ad 100 ml H_2O_{dd}
		pH 8,0
Dialysepuffer	50 mM Tris/HCl	6,06 g
	Glycerol	50 %
	H_2O_{dd}	ad 1 l
		pH 8,0
Zugabe vor Gebrauch:	1 M DTT	1 ml

Gelfiltrationspuffer	50 mM Tris/HCl	6,06 g
	Glycerin 8 %	93 ml
	150 mM NaCl	8,7 g
	H_2O_d	ad 1 l
		pH 8,0
Zugabe vor Gebrauch:	1 M DTT	1 ml

4.1.6.6 Lösungen zur Proteinbestimmung

Reagenzlösung BCA	BCA Protein Assay Reagent A	50 Teile (v/v)
	BCA Protein Assay Reagent B	1 Teil (v/v)
Reagenzlösung Bradford	Bradford Reagenz	2 Teile (v/v)
	H_2O_{dd}	5,5 Teile (v/v)

4.1.6.7 Puffer für die Kinetik

Ammoniumsulfat-Puffer 2 x	100 mM Tris/HCl	1,21 g
	200 mM $(NH_3)_2SO_4$	2,64 g
	10 mM $MgCl_2$	203 mg
	10 % Glycerol	10 ml
	H_2O_{dd}	ad 100 ml
		pH 8,5
Glutamin-Puffer 2 x	100 mM Tris/HCl	1,21 g
	200 mM Glutamin	2,92 g
	10 mM $MgCl_2$	203 mg
	10 % Glycerol	10 ml
	H_2O_{dd}	ad 100 ml
		pH 8,5

Assay-Puffer	Ammoniumsulfat- oder Glutaminpuffer	50 µl
	1 M DTT (1 mM f.c.)	0,2 µl
	Chorismat	10 µl
	H_2O_{dd}	39,8 µl
		pH 8,5

4.1.6.8 Laufmittel für die LC-ESI-MS-Kopplung

Laufmittel für Enzymkinetik (Quantifizierung der ungekoppelten Reaktion)

Laufmittel A	H_2O_{LCMS}	
	5 mM Ammoniumformiat	313,15 mg/l
	0,1 % HCOOH	1 ml
Laufmittel B	$Methanol_{LCMS}$	
	5 mM Ammoniumformiat	313,15 mg/l
	0,1 % HCOOH	1 ml

Laufmittel für alle weiteren Systeme

Laufmittel A	H_2O_{LCMS}	
	0,1 % HCOOH	1 ml
Laufmittel B	$Acetonitril_{LCMS}$	
	0,1 % HCOOH	1 ml

Alle Bestandteile der Laufmittel stammten von der Firma Carl Roth GmbH.

4.1.7 Bakterienstämme

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Bakterienstämme verwendet:

Tabelle 4-1. Bakterienstämme, die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt wurden.

Spezies	Bezeichnung	Merkmale	Referenz
Bacillus subtilis	DSM 10	sensitiv auf Abyssomicin	DSMZ, Braunschweig
Escherichia coli	DH5α	*supE44* Δ*lacU169* (Φ80 *lac*ZΔM15) *hsdR17 recA1 endA1 gyrA thi-1 relA1*	Hanahan, 1983
Escherichia coli	BL21(DE3)	*hsdS* ($r_B^- m_B^-$) *gal dcm ompT*λ(DE3), T7-RNA-Polymerasegen unter Kontrolle des *lac*UV5-Promotors	Studier und Moffat, 1986

4.1.8 Vektoren

Für diese Arbeit wurden die in Abbildung 4-1 dargestellten Plasmide PrSet_6His_PP und pT7-7 verwendet, die freundlicherweise von Prof. Michael Groll (TU München) und von Prof. Volkmar Braun (Mikrobiologie-Membranphysiologie, Universität Tübingen) zur Verfügung gestellt wurden.

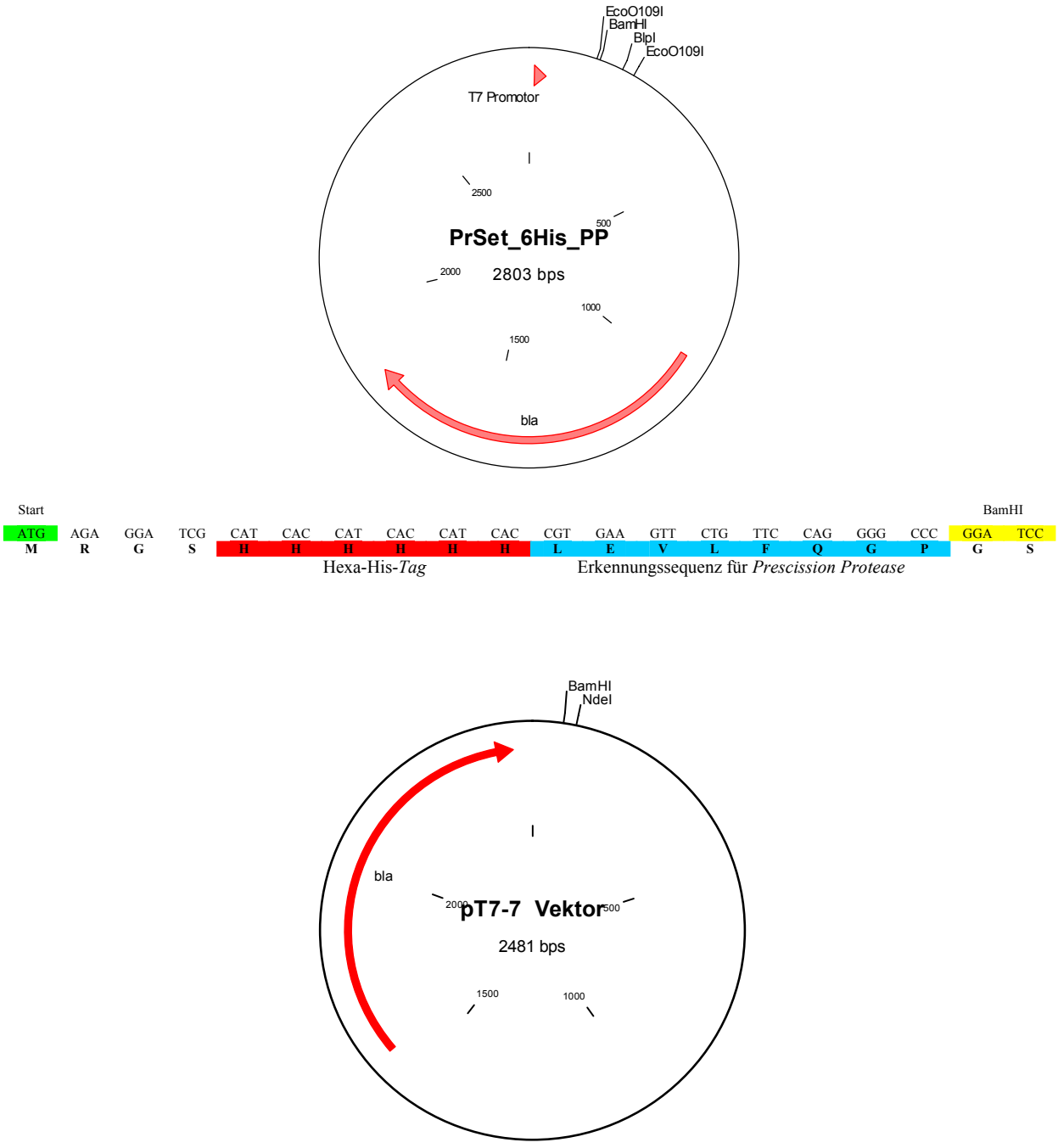
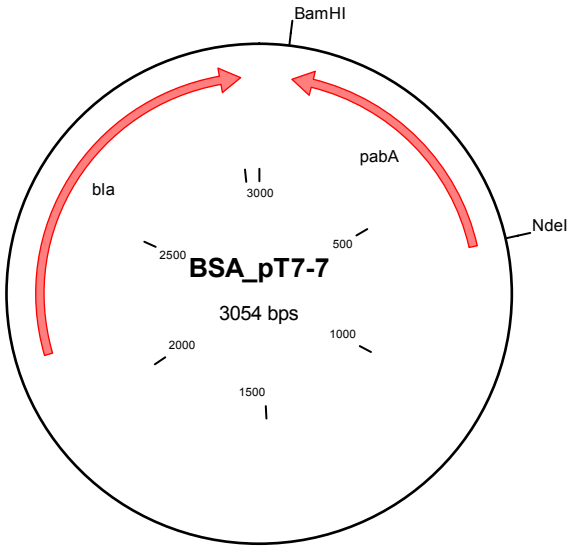


Abbildung 4-1. Schematische Darstellung der Plasmide PrSet_6His_PP und pT7-7. Eingezeichnet sind neben den Restriktionsschnittstellen der Hexa-His-*Tag* und die Erkennungssequenz der *Prescission Protease* für den Vektor PrSet-6His_PP, sowie für beide Vektoren die Promotorregion Φ10 und das für die Ampicillinresistenz verantwortliche β-Lactamasegen *bla*.

4.1.9 Konstrukte

Konstrukte zur Überexpression von PabA und PabB aus *B. subtilis* wurden von Dr. Simone Schadt zur Verfügung gestellt. PabA wird ohne *Tag* im Plasmid pT7-7 (Konstrukt BSA_pT7-7) vom Wirtsstamm *E. coli* BL21 (DE3) über ein T7-Expressionssystem überexprimiert (Abbildung 4-2).

PabB wird mit einem Hexa-His-*Tag* im Plasmid PrSet_6His_PP (Konstrukt BSB_pRSET_6His_PP) vom Wirtsstamm *E. coli* BL21 (DE3) über ein T7-Expressionssystem überexprimiert (Abbildung 4-3).



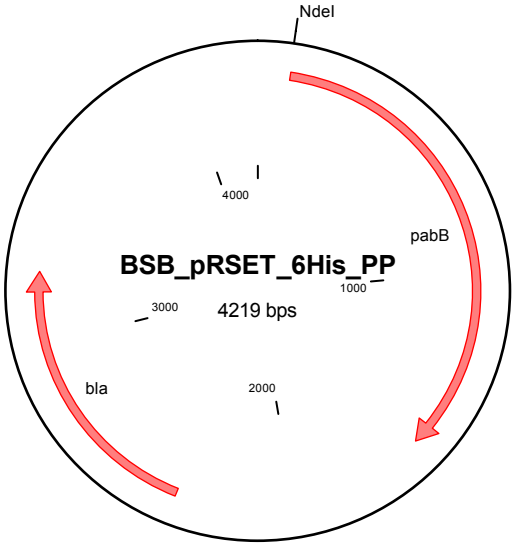
Nucleotidsequenz:

```
ATGATTTTAA TGATTGATAA CTACGATTCA TTCACGTACA ACTTGGTACA GTATTTGGGC
GAGCTTGGGG AAGAGCTGGT TGTGAAACGC AATGACAGCA TCACAATCGA TGAAATTGAA
GAACTGTCTC CGGACTTTCT GATGATATCT CCCGGACCGT GCAGCCCTGA TGAGGCGGGA
ATCAGCCTCG AAGCAATTAA ACATTTCGCA GGGAAAATTC CTATTTTCGG TGTATGTCTC
GGACATCAGT CCATCGCACA AGTGTTCGGT GGTGATGTTG TTAGGGCAGA ACGGCTTATG
CACGGGAAAA CCTCGGATAT CGAGCATGAC GGCAAAACCA TTTTTGAAGG GTTGAAAAAT
CCCCTTGTTG CGACGCGATA CCACTCGCTG ATCGTAAAAC CTGAGACGCT GCCAAGCTGT
TTTACAGTAA CAGCACAAAC GAAAGAAGGA GAAATCATGG CTATTCGCCA CAATGACCTC
CCGATAGAGG GTGTGCAATT TCACCCAGAG TCTATTATGA CCTCCTTTGG GAAAGAAATG
CTCAGAAATT TTATTGAGAC ATATCGCAAG GAAGTTATTG CGTGA
```

Aminosäuresequenz:

```
MILMIDNYDS FTYNLVQYLG ELGEELVVKR NDSITIDEIE ELSPDFLMIS PGPCSPDEAG
ISLEAIKHFA GKIPIFGVCL GHQSIAQVFG GDVVRAERLM HGKTSDIEHD GKTIFEGLKN
PLVATRYHSL IVKPETLPSC FTVTAQTKEG EIMAIRHNDL PIEGVQFHPE SIMTSFGKEM
LRNFIETYRK EVIA
```

Abbildung 4-2: Konstrukt BSA_pT7-7 mit *pabA* aus *B. subtilis* im Plasmid pT7-7. Darunter die Nucleotid- und die Proteinsequenzen.



Nucleotidsequenz:

```
ATGAGAGGAT CGCATCACCA TCACCATCAC CTGGAAGTTC TGTTCCAGGG GCCCGGATCC
GCACAACGCA GACCGGCAGG CAAAAAAATA CCTTTTCAAA AAGACTCATT CTTACAACAA
TTTGAGAAAC TTGCGCAATC CCGGAAACAT CATGTACTTC TCGAAAGTGC AAGAGGCGGC
AGATATAGTA TAGCCGGTCT TGATCCAATT GCGACTGTGA AAGGAAAAGA CGGAATAACT
ACAATTAAGC ATGGTGATGA GATGCTGTTT AAAGAAGGTG ATCCATTACG GGCCTTCCAC
AGCTGGTTTA AAACACTGGA AACAGAAACG AATCATGAGT TCCCTGACTT TCAAGGCGGG
GCAATCGGGT TTCTCAGCTA TGATTACGCA CGGTACATTG AAAATTTTAA AATGCTCTCA
TTAGATGATT TAGAAACACC AGATATTTAT TTTCTTGTTT TTGATGATAT AGCAGTTTAT
GACCATCAAG AAGAGTCTCT ATGGCTGATT ACTCATGTTA ATGGTTCTGA TCAGGAAACA
GCGGATGTGA AGCTATCTGA GTTAGAGCAG ATGTGGTTGA CTGAGCTTCC CGCTGTCACT
TCGCGAGAGA TGAAGCCTGA AACAGCTGGT TCTTTCGCGG CGCCATTTAC CGAGGATGGG
TTCTCACAAG CTGTAGAGAA AATCAAACAA TACATTGCCA GCGGAGATGT GTTTCAAGTC
AATCTATCAA TAAGGCAGTC ACAGTCACTG TCTGTCCACC CATATCAAAT TTACAAAACC
TTGAGAGAAG TAAATCCTTC TCCTTATATG GCGTATTTAG AAACACCTGA TTTCCAAATC
ATTTGCGGAT CGCCTGAACT GCTTGTCAGC AAAAAGGGCA AGCTATTAGA GACGAGACCG
ATTGCGGGCA CCCGTTCCAG AGGGAAAACA AATGAAGAAG ACGAGGCGCT TGCAAACGAA
TTGATACACA ATGAAAAAGA ACGCGCGGAA CATGTCATGC TGGTTGATCT TGAGCGAAAT
GATCTGGGAA GAGTATCACG TTACGGGTCT GTGCGCGTAA ATGAATTCAT GGCAATTGAA
AAATACTCGC ATGTGATGCA CATTGTGTCT AATGTCCAAG GTGAACTGCA GGATGGGTAT
GATGCTGTAG ATATTATTCA TGCTGTGTTT CCCGGAGGAA CCATTACTGG TGCACCGAAA
GTAAGAACGA TGGAAATTAT AGAAGAACTT GAGCCGACAC GCCGAGGGCT TTATACTGGA
TCTATAGGAT GGTTTGGATA TAATCACGAT CTGCAGTTTA ATATCGTCAT TCGAACCATT
TATGCAACCG GAGGGCAGGC ATTTATGCAG TCCGGTGCAG GAGTTGTGAT TGATTCTGTT
CCGAAGCACG AATACAAGGA ATCATTCAAA AAAGCTTTTG CGATGCAAAG AGCATTAGAG
CTGAGCGAAG AAGAGACAAA AATTAGATGA
```

Aminosäuresequenz:

```
MRGSHHHHHH LEVLFQGPGS AQRRPAGKKI PFQKDSFLQQ FEKLAQSRKH HVLLESARGG
RYSIAGLDPI ATVKGKDGIT TIKHGDEMLF KEGDPLRAFH SWFKTLETET NHEFPDFQGG
AIGFLSYDYA RYIENFKMLS LDDLETPDIY FLVFDDIAVY DHQEESLWLI THVNGSDQET
ADVKLSELEQ MWLTELPAVT SREMKPETAG SFAAPFTEDG FSQAVEKIKQ YIASGDVFQV
NLSIRQSQSL SVHPYQIYKT LREVNPSPYM AYLETPDFQI ICGSPELLVS KKGKLLETRP
IAGTRSRGKT NEEDEALANE LIHNEKERAE HVMLVDLERN DLGRVSRYGS VRVNEFMAIE
KYSHVMHIVS NVQGELQDGY DAVDIIHAVF PGGTITGAPK VRTMEIIEEL EPTRRGLYTG
SIGWFGYNHD LQFNIVIRTI YATGGQAFMQ SGAGVVIDSV PKHEYKESFK KAFAMQRALE
LSEEETKIR
```

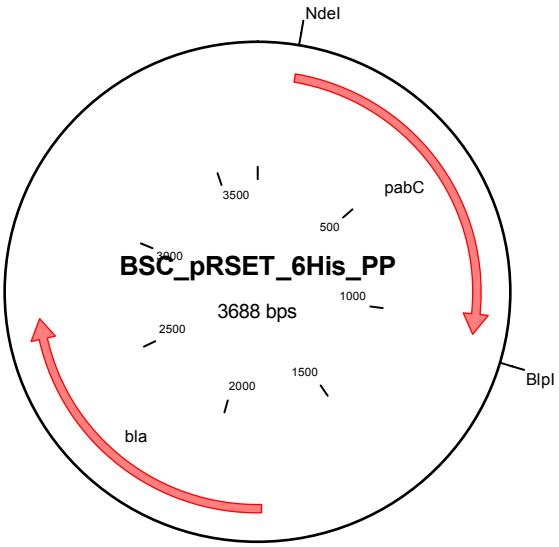
Abbildung 4-3: Konstrukt BSB_pRSET_6His_PP mit *pabB* aus *B. subtilis* im Plasmid PrSet_6His_PP. Darunter die Nucleotid- und die Proteinsequenz.

Die Gene für *pab*A, *pab*B, *pab*C und *trp*E wurden über PCR aus genomischer DNA von *B. subtilis* oder *E. coli* mit den in Tabelle 4-2 aufgelisteten Oligonukleotidprimern amplifiziert. Die genomische DNA wurde freundlicherweise von Dr. Simone Schadt zur Verfügung gestellt. Die Primer für *E. coli pabB* und *B. subtilis trpE* beinhalteten Restriktionsschnittstellen für *BamHI* im Falle des *forward* Primers und *BlpI* im Falle des *reverse* Primers. Alle weiteren Primer für die Amplifizierung der Gene *pab*B und *pab*C enthielten Restriktionsschnittstellen für *BamHI* sowohl im *forward* als auch im *reverse* Primer.

Das *pab*A-Gen von *E. coli* wurde phosphoryliert und *blunt end* in den Vektor pT7-7 kloniert. Tabelle 4-2 gibt eine Übersicht über die verwendeten Konstrukte.

Tabelle 4-2. Übersicht über die verwendeten Konstrukte mit Konstruktname und NCBI-Zugangsnummer für die entsprechenden Sequenzen.

Gene	Name des Konstruktes	NCBI-Zugangsnummer
B. subtilis pabA	BSA_pT7-7	Z99104 REGION: 84287..84871
B. subtilis pabB	BSB_pRSET_6His_PP	Z99104 REGION: 82861..84273
B. subtilis pabC	BSC_pRSET_6His_PP	Z99104 REGION: 84871..85752
E. coli pabA	ECA_pT7-7	M32354
E. coli pabB	ECB_pRSET_6His_PP	K02673
E. coli pabC	ECC_pRSET_6His_PP	M93135
B. subtilis trpE	BST_pRSET_6His_PP	NP_390149



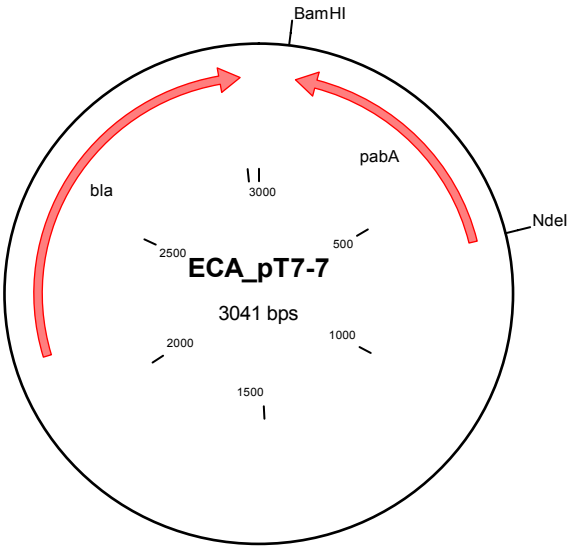
Nucleotidsequenz:

```
ATGAGAGGAT CGCATCACCA TCACCATCAC CTGGAAGTTC TGTTCCAGGG GCCCGGATCC
ATATATGTGA ACGGCCGGTA TATGGAGGAG AAAGATGCAG TTCTTTCTCC TTTTGACCAT
GGGTTTTTAT ATGGGATCGG TGTTTTCGAA ACCTTCAGGC TCTACGAAGG CTGCCCGTTT
TTGCTTGATT GGCATATAGA GAGGCTTGAA CGCGCGCTTA AGGATCTGCA AATCGAATAT
ACTGTTTCAA AGCATGAGAT CCTTGAGATG CTGGACAAGC TGCTTAAGCT AAATGATATC
AAGGATGGCA ATGCCCGCGT CAGACTGAAC ATATCAGCGG GAATCAGCGA TAAAGGCTTT
GTCGCCCAGA CGTACGATAA GCCCACCGTT TTATGCTTTG TGAATCAGCT GAAACCAGAA
AGTCTTCCTT TGCAAAAAGA AGGAAAGGTT TTATCGATAC GGAGAAACAC TCCAGAGGGA
TCGTTCCGGT TAAAATCTCA TCATTATCTA AATAATATGT ATGCGAAACG GGAAATTGGA
AATGATCCGC GTGTCGAGGG AATTTTCTTA ACGGAGGATG GAGCTGTTGC AGAGGGTATC
ATATCTAATG TCTTCTGGAG AAAAGGTCGC TGTATCTATA CGCCATCGCT TGATACCGGT
ATTCTGGACG GCGTCACGAG ACGTTTTATC ATAGAAAATG CAAAGGATAT CGGCCTGGAG
CTCAAAACGG GCCGATATGA GCTAGAAGCT CTCTTGACAG CTGACGAAGC GTGGATGACG
AACTCGGTTC TTGAAATCAT CCCGTTTACT AAAATAGAAG AAGTAAACTA TGGAAGCCAA
AGCGGAGAAG CAACCTCCGC TCTTCAATTG TTATACAAAA AAGAAATAAA GAACATGATT
CATGAAAAGG GAGGAAGAGC ATGGCGCAGC ACACAATAG
```

Aminosäuresequenz:

```
MRGSHHHHHH LEVLFQGPGS IYVNGRYMEE KDAVLSPFDH GFLYGIGVFE TFRLYEGCPF
LLDWHIERLE RALKDLQIEY TVSKHEILEM LDKLLKLNDI KDGNARVRLN ISAGISDKGF
VAQTYDKPTV LCFVNQLKPE SLPLQKEGKV LSIRRNTPEG SFRLKSHHYL NNMYAKREIG
NDPRVEGIFL TEDGAVAEGI ISNVFWRKGR CIYTPSLDTG ILDGVTRRFI IENAKDIGLE
LKTGRYELEA LLTADEAWMT NSVLEIIPFT KIEEVNYGSQ SGEATSALQL LYKKEIKNMI
HEKGGRAWRS TQ
```

Abbildung 4-4. Konstrukt BSC_pRSET_6His_PP mit *pabC* aus *B. subtilis* im Plasmid PrSet_6His_PP. Darunter die Nucleotid- und die Proteinsequenz.



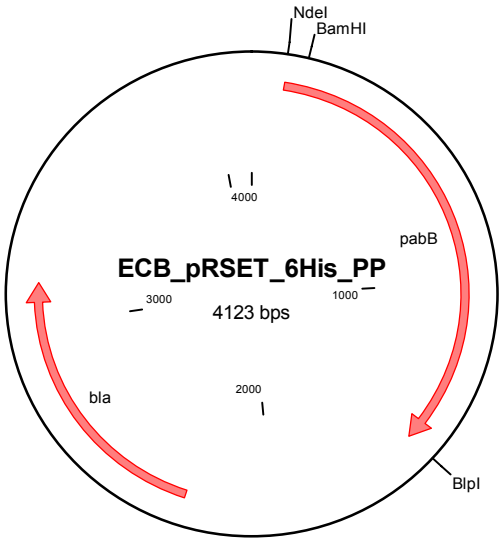
Nucleotidsequenz:

```
ATGATCCTGC TTATAGATAA CTACGATTCT TTTACCTGGA ACCTCTACCA GTACTTTTGT
GAACTGGGGG CGGATGTGCT GGTTAAGCGC AACGATGCGT TGACGCTGGC GGATATCGAC
GCCCTTAAAC CACAAAAAAT TGTCATCTCA CCTGGCCCCT GTACGCCAGA TGAAGCCGGG
ATCTCCCTTG ACGTTATTCG CCACTATGCC GGGCGCTTGC CGATTCTTGG CGTCTGCCTC
GGTCATCAGG CAATGGCGCA GGCATTTGGC GGTAAAGTTG TGCGCGCCGC AAAGGTCATG
CACGGCAAAA CCTCGCCGAT TACACATAAC GGTGAGGGCG TATTTCGGGG GCTGGCAAAT
CCACTTACCG TGACACGCTA CCATTCGCTG GTGGTGGAAC CTGACTCATT ACCAGCGTGC
TTTGACGTGA CGGCCTGGAG CGAAACCCGA GAGATTATGG GGATTCGCCA TCGCCAGTGG
GATCTGGAAG GTGTGCAGTT CCATCCAGAA AGTATTCTTA GCGAACAAGG ACATCAACTG
CTGGCTAATT TCCTGCATCG CTGA
```

Aminosäuresequenz:

```
MILLIDNYDS FTWNLYQYFC ELGADVLVKR NDALTLADID ALKPQKIVIS PGPCTPDEAG
ISLDVIRHYA GRLPILGVCL GHQAMAQAFG GKVVRAAKVM HGKTSPITHN GEGVFRGLAN
PLTVTRYHSL VVEPDSLPAC FDVTAWSETR EIMGIRHRQW DLEGVQFHPE SILSEQGHQL
LANFLHR
```

Abbildung 4-5. Konstrukt ECA_pT7-7 mit *pabA* aus *E. coli* im Plasmid pT7-7. Darunter die Nucleotid- und die Proteinsequenz.



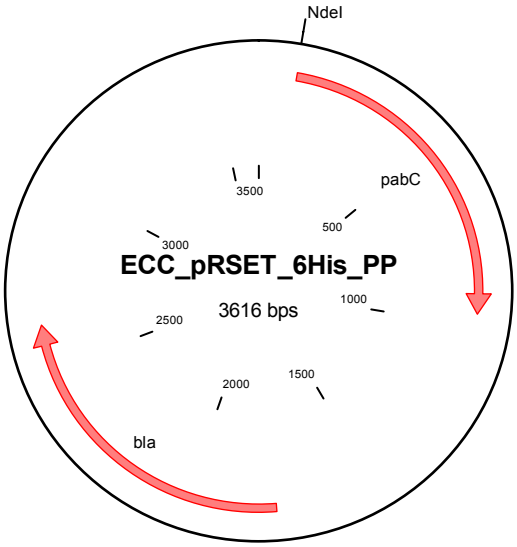
Nucleotidsequenz:

```
ATGAGAGGAT CGCATCACCA TCACCATCAC CTGGAAGTTC TGTTCCAGGG GCCCGGATCC
AAGACGTTAT CTCCCGCTGT GATTACTTTA CCCTGGCGTC AGGACGCCGC TGAATTTTAT
TTCTCCCGCT TAAGCCACCT GCCGTGGGCG ATGCTTTTAC ACTCCGGCTA TGCCGATCAT
CCGTATAGCC GCTTTGATAT TGTGGTCGCC GAGCCGATTT GCACTTTAAC CACTTTCGGT
AAAGAAACCG TTGTTAGTGA AAGCGAAAAA CGCACAACGA CCACTGATGA CCCGCTACAG
GTGCTCCAGC AGGTGCTGGA TCGCGCAGAC ATTCGCCCAA CGCATAACGA AGATTTGCCA
TTTCAGGGCG GCGCACTGGG GTTGTTTGGC TACGATCTGG GCCGCCGTTT TGAGTCACTG
CCAGAAATTG CGGAACAAGA TATCGTTCTG CCGGATATGG CAGTGGGTAT CTACGATTGG
GCGCTCATTG TCGACCACCA GCGTCATACA GTTTCTTTGC TGAGTCATAA TGATGTCAAT
GCCCGTCGGG CCTGGCTGGA AAGCCAGCAA TTCTCGCCGC AGGAAGATTT CACGCTCACT
TCCGACTGGC AATCCAATAT GACCCGCGAG CAGTACGGCG AAAAATTTCG CCAGGTACAG
GAATATCTGC ACAGCGGTGA TTGCTATCAG GTGAATCTCG CCCAACGTTT TCATGCGACC
TATTCTGGCG ATGAATGGCA GGCATTCCTT CAGCTTAATC AGGCCAACCG CGCGCCATTT
AGCGCTTTTT TACGTCTTGA ACAGGGTGCA ATTTTAAGCC TTTCGCCAGA GCGGTTTATT
CTTTGTGATA ATAGTGAAAT CCAGACCCGC CCGATTAAAG GCACGCTACC ACGCCTGCCC
GATCCTCAGG AAGATAGCAA ACAAGCAGTA AAACTGGCGA ACTCAGCGAA AGATCGTGCC
GAAAATCTGA TGATTGTCGA TTTAATGCGT AATGATATCG GTCGTGTTGC CGTAGCAGGT
TCGGTAAAAG TACCAGAGCT GTTCGTGGTG GAACCCTTCC CTGCCGTGCA TCATCTGGTC
AGCACCATAA CGGCGCAACT ACCAGAACAG TTACACGCCA GCGATCTGCT GCGCGCAGCT
TTTCCTGGTG GCTCAATAAC CGGGGCTCCG AAAGTACGGG CTATGGAAAT TATCGACGAA
CTGGAACCGC AGCGACGCAA TGCCTGGTGC GGCAGCATTG GCTATTTGAG CTTTTGCGGC
AACATGGATA CCAGTATTAC TATCCGCACG CTGACTGCCA TTAACGGACA AATTTTCTGC
TCTGCGGGCG GTGGAATTGT CGCCGATAGC CAGGAAGAAG CGGAATATCA GGAAACTTTT
GATAAAGTTA ATCGTATCCT GAAGCAACTG GAGAAGTAA
```

Aminosäuresequenz:

```
MRGSHHHHHH LEVLFQGPGS KTLSPAVITL PWRQDAAEFY FSRLSHLPWA MLLHSGYADH
PYSRFDIVVA EPICTLTTFG KETVVSESEK RTTTTDDPLQ VLQQVLDRAD IRPTHNEDLP
FQGGALGLFG YDLGRRFESL PEIAEQDIVL PDMAVGIYDW ALIVDHQRHT VSLLSHNDVN
ARRAWLESQQ FSPQEDFTLT SDWQSNMTRE QYGEKFRQVQ EYLHSGDCYQ VNLAQRFHAT
YSGDEWQAFL QLNQANRAPF SAFLRLEQGA ILSLSPERFI LCDNSEIQTR PIKGTLPRLP
DPQEDSKQAV KLANSAKDRA ENLMIVDLMR NDIGRVAVAG SVKVPELFVV EPFPAVHHLV
STITAQLPEQ LHASDLLRAA FPGGSITGAP KVRAMEIIDE LEPQRRNAWC GSIGYLSFCG
NMDTSITIRT LTAINGQIFC SAGGGIVADS QEEAEYQETF DKVNRILKQL EK
```

Abbildung 4-6. Konstrukt ECB_pRSET_6His_PP mit *pabB* aus *E. coli* im Plasmid PrSet_6His_PP. Darunter die Nucleotid- und die Proteinsequenz.



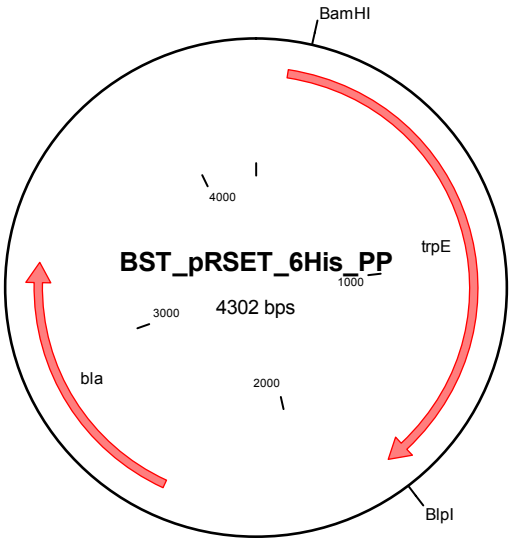
Nucleotidsequenz:

```
ATGAGAGGAT CGCATCACCA TCACCATCAC CTGGAAGTTC TGTTCCAGGG GCCCGGATCC
TTCTTAATTA ACGGTCATAA GCAGGAATCG CTGGCAGTAA GCGATCGGGC AACGCAGTTT
GGTGATGGTT GTTTTACCAC CGCCAGAGTT ATCGACGGTA AAGTCAGTTT GTTATCGGCG
CATATCCAGC GACTACAGGA TGCTTGTCAG CGGTTGATGA TTTCCTGTGA CTTCTGGCCT
CAGCTTGAAC AAGAGATGAA AACGCTGGCA GCAGAACAGC AAAATGGTGT GCTGAAAGTC
GTGATCAGTC GCGGTAGTGG CGGGCGAGGG TACAGCACAT TGAACAGCGG ACCGGCAACG
CGGATTCTCT CCGTTACGGC TTATCCTGCA CATTACGACC GTTTGCGTAA CGAGGGGATT
ACGTTGGCGC TAAGCCCGGT GCGGCTGGGG CGCAATCCTC ATCTTGCAGG TATTAAACAT
CTCAATCGTC TTGAGCAAGT ATTGATTCGC TCTCATCTTG AGCAGACAAA CGCTGATGAG
GCGCTGGTCC TTGACAGCGA AGGGTGGGTT ACGGAATGCT GTGCGGCTAA TTTGTTCTGG
CGGAAGGGCA ACGTAGTTTA TACGCCGCGA CTGGATCAGG CAGGTGTTAA CGGCATTATG
CGACAATTCT GTATCCGTTT GCTGGCACAA TCCTCTTATC AGCTTGTCGA AGTGCAAGCC
TCTCTGGAAG AGTCGTTGCA GGCAGATGAG ATGGTTATTT GTAATGCGTT AATGCCAGTG
ATGCCCGTAT GTGCCTGTGG CGATGTCTCC TTTTCGTCAG CAACGTTATA TGAATATTTA
GCCCCACTTT GTGAGCGCCC GAATTAG
```

Aminosäuresequenz:

```
MRGSHHHHHH LEVLFQGPGS FLINGHKQES LAVSDRATQF GDGCFTTARV IDGKVSLLSA
HIQRLQDACQ RLMISCDFWP QLEQEMKTLA AEQQNGVLKV VISRGSGGRG YSTLNSGPAT
RILSVTAYPA HYDRLRNEGI TLALSPVRLG RNPHLAGIKH LNRLEQVLIR SHLEQTNADE
ALVLDSEGWV TECCAANLFW RKGNVVYTPR LDQAGVNGIM RQFCIRLLAQ SSYQLVEVQA
SLEESLQADE MVICNALMPV MPVCACGDVS FSSATLYEYL APLCERPN
```

Abbildung 4-7. Konstrukt ECC_pRSET_6His_PP mit *pabC* aus *E. coli* im Plasmid PrSet_6His_PP. Darunter die Nucleotid- und die Proteinsequenz.



Nucleotidsequenz:

```
ATGAGAGGAT CGCATCACCA TCACCATCAC CTGGAAGTTC TGTTCCAGGG GCCCGGATCC
AATTTCCAAT CAAACATTTC CGCATTTTTA GAGGACAGCT TGTCCCACCA CACGATACCG
ATTGTGGAGA CCTTCACAGT CGATACACTG ACACCCATTC AAATGATAGA GAAGCTTGAC
AGGGAGATTA CGTATCTTCT TGAAAGCAAG GACGATACAT CCACTTGGTC CAGATATTCG
TTTATCGGCC TGAATCCATT TCTCACAATT AAAGAAGAGC AGGGCCGTTT TTCGGCCGCT
GATCAGGACA GCAAATCTCT TTACACAGGA AATGAACTAA AAGAAGTGCT GAACTGGATG
AATACCACAT ACAAAATCAA AACACCTGAG CTTGGCATTC CTTTTGTCGG CGGAGCTGTC
GGGTACTTAA GCTATGATAT GATCCCGCTG ATTGAGCCTT CTGTTCCTTC GCATACCAAA
GAAACAGACA TGGAAAAGTG TATGCTGTTT GTTTGCCGGA CATTAATTGC GTATGATCAT
GAAACCAAAA ACGTCCACTT TATCCAATAT GCAAGGCTCA CTGGAGAGGA AACAAAAAAC
GAAAAAATGG ATGTATTCCA TCAAAATCAT CTGGAGCTTC AAAATCTCAT TGAAAAAATG
ATGGACCAAA AAAACATAAA AGAGCTGTTT CTTTCTGCTG ATTCATACAA GACACCCAGC
TTTGAGACAG TATCTTCTAA TTATGAAAAA TCGGCTTTTA TGGCTGATGT AGAAAAAATC
AAAAGCTATA TAAAAGCAGG CGATATCTTC CAGGGTGTTT TATCACAAAA ATTTGAGGTG
CCGATAAAAG CAGATGCTTT TGAGTTATAC CGAGTGCTTA GGATCGTCAA TCCTTCGCCG
TATATGTATT ATATGAAACT GCTAGACAGA GAAATAGTCG GCAGCTCTCC GGAACGGTTA
ATACACGTTC AAGACGGGCA CTTAGAAATC CATCCGATTG CCGGTACGAG AAAACGCGGT
GCAGACAAAG CTGAAGATGA GAGACTGAAG GTTGAGCTCA TGAAGGATGA AAAAGAAAAA
GCGGAGCATT ACATGCTCGT TGATCTTGCC CGAAACGATA TCGGCAGAGT AGCAGAGTAT
GGTTCTGTTT CTGTGCCGGA GTTCACAAAA ATTGTTTCCT TTTCACATGT CATGCACATT
ATCTCGGTGG TTACAGGCCG ATTGAAAAAA GGGGTTCATC CTGTCGATGC ACTGATGTCT
GCTTTCCCGG CGGGGACTTT AACAGGCGCA CCCAAAATCC GTGCCATGCA GCTTTTGCAA
GAACTCGAGC CAACACCGAG AGAGACATAC GGAGGGTGTA TTGCCTACAT TGGGTTTGAC
GGGAATATCG ACTCTTGTAT TACGATTCGC ACGATGAGTG TAAAGAACGG TGTTGCATCG
ATACAGGCAG GTGCTGGCAT TGTTGCTGAT TCTGTTCCGG AAGCCGAATA CGAAGAAAGC
TGTAATAAAG CCGGTGCGCT GCTGAAAACG ATTCATATTG CAGAAGACAT GTTTCATAGC
AAGGAGGATA AAGCTGATGA ACAGATTTCT ACAATTGTGC GTTGA
```

Aminosäuresequenz:

```
MRGSHHHHHH LEVLFQGPGS NFQSNISAFL EDSLSHHTIP IVETFTVDTL TPIQMIEKLD
REITYLLESK DDTSTWSRYS FIGLNPFLTI KEEQGRFSAA DQDSKSLYTG NELKEVLNWM
NTTYKIKTPE LGIPFVGGAV GYLSYDMIPL IEPSVPSHTK ETDMEKCMLF VCRTLIAYDH
ETKNVHFIQY ARLTGEETKN EKMDVFHQNH LELQNLIEKM MDQKNIKELF LSADSYKTPS
FETVSSNYEK SAFMADVEKI KSYIKAGDIF QGVLSQKFEV PIKADAFELY RVLRIVNPSP
YMYYMKLLDR EIVGSSPERL IHVQDGHLEI HPIAGTRKRG ADKAEDERLK VELMKDEKEK
AEHYMLVDLA RNDIGRVAEY GSVSVPEFTK IVSFSHVMHI ISVVTGRLKK GVHPVDALMS
AFPAGTLTGA PKIRAMQLLQ ELEPTPRETY GGCIAYIGFD GNIDSCITIR TMSVKNGVAS
IQAGAGIVAD SVPEAEYEES CNKAGALLKT IHIAEDMFHS KEDKADEQIS TIVR
```

Abbildung 4-8. Konstrukt BST_pRSET_6His_PP mit *trpE* aus *B. subtilis* im Plasmid PrSet_6His_PP. Darunter die Nucleotid- und die Proteinsequenz.

4.1.10 Primer

Folgende Oligonukleotidprimer wurden für die Herstellung der Expressionskonstrukte verwendet.

Tabelle 4-3. Oligonukleotidprimer für die Herstellung der Expressionskonstrukte.

Primer für die *B. subtilis* Konstrukte:	
PabA *forward*	5'-TGATTTTAATGATTGATAACTACG-3'
PabA *reverse*	5'-TCACGCAATAACTTGCTTGCGA-3'
PabB BamHI *forward*	5'-TGTGTTGGATCCGCACAACGCAGACC-3'
PabB BamHI *reverse*	5'- ATAGGATCCTCATCTAATTTTTGTCTCTTCTTCGCTCAGCTC -3'
PabC BamHI *forward*	5'-GTTTGGATCCATATATGTGAACGGCCGGTA-3'
PabC BamHI *reverse*	5'-GTTTGGATCCCTATTGTGTGCTGCGCCATG-3'
TrpE BamHI *forward*	5'-CCCACCGGATCCAATTTCCAATCAAACATTTCCGC-3'
TrpE BlpI *reverse*	5'-CCCAAAGCTCAGCTCAACGCACAATTGTAGAAATCTG-3'
Primer für die *E. coli* Konstrukte:	
PabA *forward*	5'-TGATCCTGCTTATAGATAACTAC-3'
PabA *reverse*	5'-TCAGCGATGCAGGAAATTAGCC-3'
PabB BamHI *forward*	5'-TGTGTTGGATCCAAGACGTTATCTCCCGCTG-3'
PabB BlpI *reverse*	5'-AGGAGTGCTGAGCTTACTTCTCCAGTTGCTTCAGG-3'
PabC BamHI *forward*	5'-GTTTGGATCCTTCTTAATTAACGGTCATAAGCAGGAATCG-3'
PabC BamHI *reverse*	5'-GTTTGGATCCCTAATTCGGGCGCTCACAAAGT-3'

4.1.11 Primer für die Mutagenese

Folgende Oligonukleotidprimer wurden für die Mutageneseexperimente verwendet.

Tabelle 4-4. Oligonukleotidprimer für *Site-Directed Mutagenesis*.

Primer für *B. subtilis pabB*-Mutanten:		Name des Konstruktes:
BSB_A283K *forward*	5'-GAGACCGATTAAGGGCACCCGTT-3'	BSB_A283K_pRSET_6His_PP
BSB_A283K *reverse*	5'- AACGGGTGCCCTTAATCGGTCTC-3'	
BSB_A283V *forward*	5'-GAGACCGATTGTGGGCACCCGTT-3'	BSB_A283V_pRSET_6His_PP
BSB_A283V *reverse*	5'-AACGGGTGCCCACAATCGGTCTC-3'	
BSB_A283I *forward*	5'-GAGACCGATTATAGGCACCCGTT-3'	BSB_A283I_pRSET_6His_PP
BSB_A283I *reverse*	5'-AACGGGTGCCTATAATCGGTCTC-3'	
BSB_C263S *forward*	5'-CCAAATCATTTCCGGATCGCCTG-3'	BSB_C263S_pRSET_6His_PP
BSB_C263S *reverse*	5'-CAGGCGATCCGGAAATGATTTGG-3'	
BSB_C263K *forward*	5'-CCAAATCATTAAGGGATCGCCTG-3'	BSB_C263K_pRSET_6His_PP
BSB_C263K *reverse*	5'-CAGGCGATCCCTTAATGATTTGG-3'	
BSB_C263A *forward*	5'-CCAAATCATTGCCGGATCGCCTG-3'	BSB_C263A_pRSET_6His_PP
BSB_C263A *reverse*	5'-CAGGCGATCCGGCAATGATTTGG-3'	

Primer für *E. coli pabB*-Mutanten:		Name des Konstruktes:
ECB_K274A *forward*	5'- CCGCCCGATTGCAGGCACGCTAC-3'	ECB_K274A_pRSET_6His_PP
ECB_K274A *reverse*	5'-GTAGCGTGCCTGCAATCGGGCGG-3'	

4.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten im Agarosegel erfolgte in der Flachbett-Elektrophoreseapparatur *BIO-RAD Mini-Sub Cell GT* (Bio-Rad, München) für 30 min bei einer Spannung von 80 V. Die hierzu verwendeten Gele enthielten 0,9 % Agarose in TAE-Puffer. Durch Inkubation im Ethidiumbromid-Färbebad wurden die DNA-Banden nach der Elektrophorese durch langwelliges UV-Licht sichtbar gemacht.

4.2.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die auf Saiki *et al.* (1988) zurückgehende Polymerasekettenreaktion dient der zyklischen Amplifizierung von DNA-Abschnitten unter Verwendung einer thermostabilen Polymerase.

Hierzu sind zwei Oligonucleotid-Primer notwendig, die jeweils an einem Ende des zu amplifizierenden DNA-Stückes hybridisieren können.

Pro Ansatz wurde in ein PCR-*Tube* pipettiert, wobei die Zusammensetzung des Ansatzes gegebenenfalls angepasst wurde:

5 µl 10 x Reaktionspuffer
0,3 µl genomische DNA
1,6 µl dNTP (10 mM)
je 2,5 µl Primer (10 pmol/µl)
0,25 µl Pwo DNA-Polymerase (Roche)
H_2O_{dd} ad 50 µl

Für die PCR wurden jeweils optimierte Programme eingesetzt, beispielhaft sei hier eines davon dargestellt:

	Reaktion	Temperatur	Zeit
1.	Denaturierung	94 °C	3 min
30 Zyklen:			
2.	Denaturierung	94 °C	45 s
3.	*Annealing*	60 °C	50 s
4.	Polymerisation	72 °C	1 min 20 s
5.	Polymerisation	72 °C	10 min
6.	Ende	6 °C	∞

4.2.3 Restriktionsverdau, Phosphatase-Reaktionen und Ligationen

Restriktionsverdau, Dephosphorylierung und Ligation wurde jeweils nach Empfehlung des Herstellers im mitgelieferten Puffer durchgeführt. Bei Bedarf wurden die Ansätze auf ein Agarosegel aufgetragen und mittels *QIAEX II-DNA*-Extraktionskit (Qiagen, Hilden) aufgereinigt.

4.2.4 Reinigung von DNA-Fragmenten

PCR-Produkte, Restriktionsfragmente und Dephosphorylierungsprodukte wurden mit Hilfe des *QIAEX II-DNA*-Extraktionskit (Qiagen, Hilden) aus dem Agarosegel entsprechend der Anleitung aufgereinigt. Die Menge des PCR-Produkts wurde anhand von Agarosegelen abgeschätzt.

4.2.5 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Die Herstellung kompetenter Zellen erfolgte nach der von Dagert und Ehrlich (1979) beschriebenen $CaCl_2$-Methode, die logarithmisch wachsenden *E. coli*-Zellen die Fähigkeit verleiht, freie DNA aus dem umgebenden Medium aufzunehmen.
Hierzu wurden 40 ml LB- oder TY-Medium mit 0,4 ml einer Übernachtkultur des entsprechenden *E. coli*-Stammes angeimpft und bei 37°C unter Schütteln etwa 2 h bis zu einer OD_{578} von 0,5 inkubiert. Die Bakterien wurden in einem sterilen 50 ml *Falcon Tube* 10 min auf Eis gestellt und anschließend in einer auf 4°C gekühlten *Hermle Z383.K* Zentrifuge mit Ausschwingrotor *221.08 V01* für 10 min bei 3500 rpm zentrifugiert. Die Bakterien wurden in 20 ml eiskaltem 0,1 M $CaCl_2$ resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert und anschließend erneut bei 4°C 10 min bei 4300 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml eiskalter $CaCl_2$–Lösung aufgenommen und für 16 h auf Eis gestellt, anschließend sofort zur Transformation (s. Absatz 4.2.6) verwendet.

4.2.6 Transformation von kompetenten *E. coli*-Zellen mit Plasmid-DNA

Die Transformation wurde nach Sambrook und Russel (2001) durchgeführt. Hierzu wurden zwischen 50 und 100 µl kompetente Zellen mit 5 µl Ligationsansatz bzw. 1 µl Plasmid-DNA-Lösung versetzt und zunächst 30 min auf Eis gestellt. Anschließend erfolgte der Hitzeschock für 1,5 min bei 42°C, dann wurden die Zellen erneut auf Eis gestellt. Der gesamte Ansatz wurde auf ampicillinhaltigen LB- oder TY-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.2.7 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte unter Verwendung des *E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit I* (PEQLAB Biotechnology GmbH, Erlangen) entsprechend den Angaben des Herstellers.

Um größere Mengen Plasmid DNA in reiner Form zu erhalten, wurde das *Qiagen Plasmid MIDI Kit* verwendet.

4.2.8 Mutagenese

Die Mutagenese von Plasmid-Konstrukten erfolgte unter Verwendung des *QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kits* (Stratagene, La Jolla, California, USA) entsprechend den Angaben des Herstellers. Die für die Mutagenese verwendeten Primer mit den Namen der entsprechenden Konstrukten sind in Tabelle 4-4 aufgelistet. Für die Mutagenese *von B. subtilis pabB* (NCBI-Zugangsnummer: Z99104 REGION: 82861..84273) wurde das Konstrukt BSB_pRSET_6His_PP, und für die Mutagenese von *E. coli pabB* (NCBI-Zugangsnummer: K02673) das Konstrukt ECB_pRSET_6His_PP verwendet. Tabelle 4-5 gibt eine Übersicht über die durch *site-directed mutagenesis* generierten Konstrukte mit den substituierten Aminosäuren.

Tabelle 4-5. Übersicht über die generierten Mutanten mit Konstruktname und Hinweis auf die substituierten Aminosäuren. Die Zahlen bezeichnen die Positionen der substituierten Aminosäuren in den entsprechenden *Wildtyp*-Sequenzen beginnend vom Start-Methionin auf Basis der in der Datenbank von NCBI hinterlegten Sequenzen.

Gene	Name des Konstruktes	Substituierte Aminosäure
B. subtilis pabB	BSB_A283K_pRSET_6His_PP	Ala-283 zu Lys-283
B. subtilis pabB	BSB_A283V_pRSET_6His_PP	Ala-283 zu Val-283
B. subtilis pabB	BSB_A283I_pRSET_6His_PP	Ala-283 zu Ile-283
B. subtilis pabB	BSB_C263S_pRSET_6His_PP	Cys-263 zu Ser-263
B. subtilis pabB	BSB_C263K_pRSET_6His_PP	Cys-263 zu Lys-263
B. subtilis pabB	BSB_C263A_pRSET_6His_PP	Cys-263 zu Ala-263
E. coli pabB	ECB_K274A_pRSET_6His_PP	Lys-274 zu Ala-274

4.3 Proteinbiochemische Methoden

4.3.1 Proteinexpression und Reinigung

4.3.1.1 Reinigung von PabA

Zur Expression von PabA aus *E. coli* und *B. subtilis*, wurden *E. coli* BL21 (DE3) Zellen mit den entsprechenden Konstrukten ECA_pT7-7 und BSA_pT7-7 transformiert (Tabelle 4-2) und auf TY-Agarplatten mit 50 µg/ml Ampicillin selektioniert. Von den hierbei gewonnenen Klonen wurden Vorkulturen für 16 h in 20 ml TY Medium mit 50 µg/ml Ampicillin angezogen. 250 ml ampicillinhaltiges TY-Medium wurden mit 4 ml dieser Vorkultur inokuliert und unter Schütteln (150 rpm) bei 37°C zu einer OD_{578} von 0,5 wachsen gelassen. Isopropyl-β-D-thiogalactosid (IPTG) wurde zu einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben, und die Kulturen weitere 4 h geschüttelt. Dann wurden die Zellen bei 4°C durch Zentrifugation geerntet und in 50 mM NaH_2PO_4, 300 mM NaCl, pH 8,0 resuspendiert. Auf dieser Stufe können die Zellpellets gegebenenfalls bei -80°C gelagert werden. Alle Reinigungsschritte wurden bei 4°C durchgeführt und entgaste Puffer wurden benutzt. Die Zelle wurden mit der *French press* (Sim-Aminco, Rochester, USA) bei 10000 p.s.i aufgeschlossen. Der erste Schritt der PabA Reinigung war eine Zentrifugation für 15 min bei 600 g, wodurch Zelltrümmer abgetrennt werden können. Der Überstand wurde nochmals bei 7000 g für 15 min zentrifugiert. Da PabA in *Inclusion Bodies* überexprimiert wird, wurde das Pellet in Puffer A (8 mM Harnstoff, 100 mM NaH_2PO_4, 10 mM Tris/HCl, pH 8,0) resuspendiert und 5 min bei 60°C inkubiert. Diese Lösung wurde dann 10 min bei 4000 g zentrifugiert, und der Überstand zweimal gegen Puffer B (50 mM Tris/HCl, 8 % Glycerol, 1mM DTT, pH 8,0) dialysiert (Dialysemembran: MWCO 12-14 kDa). Das Dialysat wurde auf eine Resource Q Anionenaustauschsäule (6 ml, GE Healthcare, Uppsala, Sweden) aufgetragen und die Proteine mit einem 120 ml NaCl-Gradient von 0 – 0,5 M NaCl in Puffer B eluiert. PabA enthaltende Fraktionen wurden gepoolt und weiter durch Gelfiltration mit einer Superdex 75 Säule (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) aufgereinigt, die mit Puffer C (50 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 8 % Glycerol, 1mM DTT, pH 8,0) äquilibriert war. Die Elution erfolgte bei einer Flussrate von 1 ml/min und 1 ml Fraktionen wurden gesammelt. Alle chromatographischen Reinigungsschritte wurden an einem ÄktaPurifier 10 UPC System (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) durchgeführt.

4.3.1.2 Reinigung von PabB, PabB-Mutantenprotein, TrpE und PabC

Zur Expression von *B. subtilis* PabB, TrpE und *E. coli* PabB, mutiertem PabB und PabC, wurden *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen mit den entsprechenden Plasmiden BSB_pRSET_6His_PP, BSB_A283K_pRSET_6His_PP, BSB_A283V_pRSET_6His_PP, BSB_A283I_pRSET_6His_PP, BST_pRSET_6His_PP, BSB_C263S_pRSET_6His_PP, BSB_C263K_pRSET_6His_PP, BSB_C263A_pRSET_6His_PP, BSC_pRSET_6His_PP, ECB_pRSET_6His_PP, ECB_K274A_pRSET_6His_PP und ECC_pRSET_6His_PP transformiert (Tabelle 4-2 und Tabelle 4-5) und auf TY-Agarplatten mit 50 µg/ml Ampicillin selektioniert. Von den hierbei gewonnenen Klonen wurden Vorkulturen für 16 h in 20 ml TY Medium mit 50 µg/ml Ampicillin angezogen. 250 ml ampicillinhaltiges TY-Medium wurde mit 4 ml dieser Vorkultur inokuliert und unter Schütteln (150 rpm) bei 17°C zu einer OD_{578} von 0,5 wachsen gelassen. Isopropyl-β-D-thiogalactosid (IPTG) wurde zu einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben, und die Kulturen weitere 16 h geschüttelt. Dann wurden die Zellen bei 4°C durch Zentrifugtion geerntet und in 50 mM NaH_2PO_4, 300 mM NaCl und 20 mM Imidazol resuspendiert. Auf dieser Stufe können die Zellpellets gegebenenfalls bei -80°C gelagert werden. Alle Reinigungsschritte wurden bei 4°C durchgeführt und entgaste Puffer wurden benutzt. Die Zelle wurden mit der *French press* (Sim-Aminco, Rochester, USA) bei 20000 p.s.i aufgeschlossen. Der erste Reinigungsschritt war eine Zentrifugation für 20 min bei 10000 g, wodurch Zelltrümmer abgetrennt werden können. Der Überstand wurde über eine Nickelaffinitäts *HisTrap FF Crude* 1 ml Säule (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) unter Verwendung eines ÄktaPurifier 10 UPC Systems (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) gereinigt. Der Waschpuffer bestand aus 50 mM NaH_2PO_4, 300 mM NaCl, 40 mM Imidazol, pH 8,0, die Elution des sauberen Proteins erfolgte bei 50 mM NaH_2PO_4, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8,0. Das Eluat wurde gegen 50 mM Tris/HCl, 50 % Glycerol, 1 mM DTT, pH 8,0 dialysiert (Dialysemembran: MWCO 12-14 kDa). Im Fall von *E. coli* and *B. subtilis* PabC wurde der Hexa-His-*Tag* durch Verdau mit der *Prescission protease* (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) entsprechend der Herstellerangaben entfernt. Im Fall von PabB wurde auf eine routinemäßige Abspaltung des Hexa-His-*Tag*s verzichtet, da keine Aktivitätssteigerung daraus resultierte.

4.3.2 Proteinbestimmung

4.3.2.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung nach Bradford (1976) beruht auf einer Farbänderung des Farbstoffs Coomassie von braun nach blau nach Bindung in saurem Medium an Proteine. Die anionische Form des Farbstoffs wird sowohl durch hydrophobe als auch durch ionische Wechselwirkungen stabilisiert. Die Verschiebung des Absorptionsmaximums von λ = 465 nm nach λ =595 nm lässt sich photometrisch verfolgen.
Die Proteinbestimmung nach Bradford erfolgte unter Verwendung des *Roti®-Quant Reagenz* (Carl Roth GmbH + Co., Karlsruhe). Die Standard-Verdünnungsreihe wurde entsprechend der Vorschrift aus einer BSA-Stammlösung (400 µg/ml) hergestellt und umfasste einen Konzentrationsbereich von 20 µg/ml bis 100 µg/ml. Von den zu bestimmenden Proteinkonzentrationen wurden verschiedene Verdünnungen hergestellt, wobei meist eine Verdünnung von 1:20 bis 1:40 ausreichend war. In Mikrotiterplatten wurden je 50 µl Standard bzw. Probe vorgelegt und mit 200 µl Bradfordreagenz versetzt. Nach 5 min Inkubation wurde die Absorption bei λ = 595 nm gemessen.

4.3.2.2 Proteinbestimmung durch UV-Absorption

Bei Kenntnis des Extinktionskoeffizienten lässt sich anhand des Lambert-Beerschen Gesetzes die Konzentration eines Proteins aus seiner Absorption bei λ = 280 nm errechnen:

$$E_{280} = -\log\frac{I}{I_0} = c \cdot \varepsilon_{280} \cdot l$$

Gleichung 4-1

mit I (Intensität des transmittierten Lichtes), I_0 (Intensität des einfallenden Lichtes), c (Konzentration der absorbierenden Substanz), ε_{280} (molarer Extinktionskoeffizient bei λ = 280 nm) und l (Weglänge des Lichtes in cm). Der Extinktionskoeffizient der Proteine wurde auf der Webpage http://www.scripps.edu/~cdputnam/protcalc.html mit dem PROTEIN CALCULATOR v3.3 berechnet.

4.3.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der Proteine wurde nach der auf Lugtenberg *et al.* (1975) zurückgehenden Methode in einer *Mini-PROTEAN 3 Electrophoresis* Gelelektrophoresekammer von BIO-RAD im 12 %igen Trenngel für 30 min bei 15 mA/Gel und 45 min bei 20 mA/Gel durchgeführt. Hierzu wurden jeweils 20 µl gelöstes Protein aufgetragen, das zuvor in Auftragspuffer aufgenommen und für 3 min bei 95°C erhitzt wurde. Zur Identifizierung einzelner Proteinbanden wurden diverse Proteinstandards der Fermentas GmbH (St. Leon-Rot) eingesetzt. Die Gele wurden mit Färbelösung gefärbt und mit Entfärbelösung entfärbt.

4.3.4 Western Blot

Alternativ zur Anfärbung des Gels kann dieses auch geblottet werden. Hierzu wird das Gel 20 min in Westernblot-Puffer inkubiert und anschließend bei 15 V und maximal 360 mA für 35 min im *Trans-blot SD* von BIORAD auf eine PVDF-Membran (Whatman GmbH, Dassel) geblottet. Anschließend wird die Membran 1 h in *Blocking*-Lösung inkubiert. Über Nacht erfolgt die Bindung des Primärantikörpers (Penta-His-Antikörper, Mouse IgG, Sigma), dann wird dreimal für 15 min mit 1 % BSA in TNT-Puffer gewaschen, und anschließend mit dem Sekundärantikörper (Anti-Mouse-Alkalische-Phosphatase Konjugat, Goat IgG, Sigma) inkubiert, und dreimal für 15 min mit TNT-Puffer gewaschen. Die Membran wird dann mit der Westernblot-Färbelösung gefärbt.

4.3.5 Vorbereitung und Messung von Proteinen über ESI-MS

Für alle Protein-massenspektrometrischen Experimente wurde frisch gereinigtes Protein unmittelbar vor der Messung gegen 10 mM Tris/HCl pH 7,5 dialysiert (Dialysemembran: MWCO 12-14 kDa). Zur Detektion kovalenter Chorismataddukte wurde zu 3 µM *E. coli* oder *B. subtilis* ADC-Synthase 300 µM Chorismat zugegeben und für 15 min bei 37°C inkubiert. Die Abspaltung von ADC aus dem kovalenten Chorismat-Enzyme Komplex erfolgte durch Zugabe von 20 mM Ammoniumsulfat.

Die Protein-massenspektrometrischen Experimente wurden auf einem Q-TOF2 *Hybrid quadrupol time of flight* ESI-Massenspektrometer (Micromass/Waters, Milford, USA), das an ein Agilent 1100 HPLC System (Agilent, Waldbronn, Deutschland) gekoppelt war, durchgeführt. Hierfür wurden 40 µl Probe über die HPLC injiziert, mit einer Flussrate von 0,4 ml/min über eine MassPREP *On-Line Desalting Cartridge* 2.1 x 10 mm (Waters, Milford,

USA) *online* entsalzt und anschließend direkt massenspektrometrisch analysiert. Über ein Schaltventil wurden die in der Probe enthaltenen früh eluierenden Salzbestandteile abgesplittet. Die Spektren wurden über die *Software* MassLynx (Micromass/Waters, Milford, USA) ausgewertet.

4.3.6 Analyse der Reaktionsprodukte über ESI-MS

Qualitative massenspektrometrische Analysen der Reaktionsprodukte der Enzyme der *p*ABA Biosynthese erfolgten auf einem Q-TOF2 *hybrid Quadrupol Time Of Flight* ESI-Massenspektrometer (Micromass/Waters, Milford, USA), das an ein Agilent 1100 HPLC System (Agilent, Waldbronn, Deutschland) gekoppelt war.

Die Reaktionsansätze bestanden aus:

50 mM	Tris/HCl
100 mM	$(NH_4)_2SO_4$ oder 200 mM Gln / [N^{15}]Gln
5 mM	$MgCl_2$
10 %	Glycerol
2 mM	DTT
2,5 mM	Chorismat bzw. ADIC
2 µM	ADCS (*B. subtilis* oder *E. coli* oder entsprechende PabB-Mutantenproteine)
Fakultativ:	
16 µM	ADCL (*B. subtilis* oder *E. coli*)
pH 8,5	

Die Reaktionsansätze wurden für 2 h bei 37°C inkubiert. 50 µl des Reaktionsansatzes wurden auf eine YMC-ODS-AQ RP-C18, 5µ, 120 A, 150 x 4,0 mm, (YMC, Kyoto, Japan) Säule injiziert, und über einen linearen Gradienten von 5 min 5 % Acetonitril (0,1 % HCOOH) auf 55 % Acetonitril (0,1 % HCOOH) in 13 min bei einer Flussrate von 800 µl/min chromatographisch aufgetrennt.
Semi-quantitative massenspektrometrische Analysen zur relativen Quantifizierung der Reaktionsprodukte der ADCS-Reaktion erfolgten auf einem QTrap2000-Massenspektrometer (Applied Biosystems/MDS Sciex, Darmstadt, Deutschland), das an ein Agilent 1100 *Capillary* HPLC System (Agilent, Waldbronn, Deutschland) gekoppelt war.

Die Reaktionsansätze für die ungekoppelte Reaktion enthielten:

50 mM	Tris/HCl
100 mM	$(NH_4)_2SO_4$ oder 200 mM Gln
5 mM	$MgCl_2$
10 %	Glycerol
2 mM	DTT
0,039 µM bis 2,5 mM	Chorismat
0,4 µM	ADCS (*E. coli* oder *B. subtilis*)
pH 8,5	

Die Reaktionsansätze wurden bei 37°C inkubiert und direkt analysiert. Hierzu wurde 1 µl des Reaktionsansatzes auf eine Jupiter Säule (5µ, 300 A, 50 x 1 mm, Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland) aufgetragen und über einen linearen Gradient von 5 % Methanol auf 50 % in 3 min bei einer Flussrate von 60 µl/min unter sauren, gepufferten Bedingungen (0,1% HCOOH, 5 mM NH_4Formiat) aufgetrennt. Die Reaktionsprodukte wurden mit der Analyst *Software* auf der Basis des MRM-Übergangs *m/z* 226 zu *m/z* 191 relativ quantifiziert. Eine absolute Quantifizierung über Standards ist nicht möglich, da die Reaktionsprodukte nicht in analysenreiner Form in ausreichender Menge und Stabilität zugänglich waren.

4.3.7 *Steady State*-Kinetik der ADC-Synthase-Reaktion

Quantitative massenspektrometrische Analysen zur Bestimmung der *Steady State*-Konstanten erfolgten auf einem QTrap2000-Massenspektrometer (Applied Biosystems/MDS Sciex, Darmstadt, Deutschland), das an ein Agilent 1100 *Capillary* HPLC System (Agilent, Waldbronn, Deutschland) gekoppelt war.

Die Reaktionsansätze für die Bestimmung der Konstanten sind im Folgenden beschrieben, wobei die erforderliche Menge an ADCL in einem Vorversuch titriert worden war, da die Grundvoraussetzung für gekoppelt Enzymassays ist, dass das Kopplungsenzym auf keinen Fall geschwindigkeitsbestimmend sein darf:

50 mM	Tris/HCl
100 mM	$(NH_4)_2SO_4$ oder 200 mM Gln
5 mM	$MgCl_2$
10 %	Glycerol
2 mM	DTT
0,039 µM bis 2,5 mM	Chorismat
0,4 µM	ADCS (*E. coli* oder *B. subtilis*)
16 µM	ADCL (*E. coli* oder *B. subtilis*)
pH 8,5	

Die Reaktionsansätze wurden bei 37°C inkubiert, die Reaktion zu verschiedenen Zeitpunkten durch Zugabe von EDTA gestoppt und bis zur Analyse auf Eis gehalten. 1 µl des Reaktionsansatzes wurde dann auf eine Jupiter-Säule (5µ, 300 A, 50 x 1 mm, Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland) aufgetragen und über einen linearen Gradient von 5 % Acetonitrile für 1 min auf 50 % in 2 min bei einer Flussrate von 60 µl/min unter sauren Bedingungen (0,1% HCOOH) aufgetrennt. *p*ABA wurde mit der Analyst *Software* auf der Basis der MRM-Übergänge *m/z* 138 zu *m/z* 94 (*quantifier*) und *m/z* 138 zu *m/z* 120 (*qualifier*) quantifiziert. Die Bestimmung der absoluten *p*ABA-Konzentration erfolgte anhand einer validierten Kalibrierkurve von 0,1 µM bis 100 µM. Es wurde nach dem *Batch*-Konzept quantifiziert und die *Batch*-Validität durch Qualitätskontrollen (QC 1 = 0,2 µM, QC 2 = 2 µM, QC 3 = 20 µM) sichergestellt.

Für die Berechnung der *Steady State*-Konstanten wurden die Anfangsgeschwindigkeiten der Reaktion als Funktion der eingesetzten Chorismatkonzentration aufgetragen. Die erhaltene hyperbole Kurve wurde mittels Origin *Software* (Massachusetts, USA) nichtlinear an die Henri-Michaelis-Menten Gleichung-angepasst:

$$v = \frac{V_{\max}[S]}{K_M + [S]}$$

Gleichung 4-2. Henri-Michaelis-Menten Gleichung

$$\text{mit } V_{\max} = [E] \cdot k_{cat}$$

Gleichung 4-3

4.4 Synthese, Reinigung und NMR-Analyse des Zwischenprodukts der ADC-Synthasereaktion

Die Biosynthese des neuartigen Zwischenprodukts der ADC-Synthase erfolgte nach folgendem Protokoll:

50 mM Tris/HCl
100 mM $(NH_4)_2SO_4$
5 mM $MgCl_2$
10 % Glycerol
2 mM DTT
2,5 mM Chorismat
2 µM *B. subtilis* ADCS
pH 8,5

Die Reaktion wurde 2 h bei 37°C inkubiert, dann mit TFA angesäuert und dreimal mit eiskaltem Chloroform und dreimal mit eiskaltem Ethylacetat extrahiert um Chorismat abzutrennen (Anderson, 1991). Die wässrige Phase wurde anschließend über eine MCX Kationaustausch SPE Kartusche (Waters, Milford, USA) entsprechend den Herstellerangaben weitergereinigt. Der letzte Reinigungsschritt war eine semi-präparative reversed phase HPLC, die auf einem Agilent 1100 HPLC System (Agilent, Waldbronn, Deutschland) mit einer Luna Säule (RP-C18, 5 µm *particle size*, 100 x 4,6 mm, Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland) durchgeführt wurde. Hierzu wurde ein linearer Gradient von 5 % – 100 % Acetonitril in 15 min bei einer Flussrate von 1,5 ml/min verwendet, entsprechende Fraktionen gesammelt und lyophilisiert.

NMR-Experimente wurden auf einem AVANCE 400 NMR Spektrometer (Bruker, Karlsruhe, Deutschland) mit dualem Probenkopf gemessen. Die Spektren wurden in $[D_4]$Methanol aufgenommen und darauf referenziert ($\delta(^1H)$ 3.30 ppm; $\delta(^{13}C)$ 49.0 ppm). 2D *COSY*-Experimente wurden mit den Standard Bruker Parametern (XWinNMR 3.2) gemessen.

5 Ergebnisse

5.1 Phylogenetische Analyse der ADC-Synthasen verschiedener Mikroorganismen

Wie aus dem Sequenzvergleich in Kapitel 1.6.2 (**Abbildung 1-18**) hervorgeht, ist die katalytisch aktive Aminosäure Lys-274 der PabB-Untereinheit der *E. coli* ADC-Synthase bei *B. subtilis* durch Ala ersetzt. Ein Vergleich von Sequenzen verschiedener Mikroorganismen, die in der Datenbank von NCBI als ADC-Synthasen annotiert sind (Tabelle 5-1), zeigt, dass es zwei Gruppen von ADC-Synthasen gibt: Die erste Gruppe, die im hoch konservierten Motiv PI***X***GT in der Position ***X*** wie *E. coli* ein Lysin (Lys-274) und die zweite Gruppe, die wie die *B. subtilis* ADC-Synthase ein Alanin (Ala-283) besitzen (Abbildung 5-1).

Tabelle 5-1. Als ADC-Synthasen annotierte Sequenzen verschiedener Mikroorganismen entnommen aus der Datenbank von NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Stamm	Annotiertes Protein	NCBI Zugang
Cyanothece sp. PCC 8801	ADC-Synthase PabB	ZP_02942422
Stenotrophomonas maltophilia R551-3	ADC-Synthase PabB	YP_002027263
Xylella fastidiosa M23	ADC-Synthase PabB	YP_001830267
Bacillus subtilis subsp. subtilis (B.s._PabB)	ADC-Synthase PabB	NP_387955
Bacillus amyloliquefaciens FZB42	ADC-Synthase PabB	YP_001419754
Bacillus halodurans C-125	ADC-Synthase PabB	NP_240956
Streptomyces venezuelae	ADC-Synthase PabB	BAD21140
Corynebacterium glutamicum ATCC 13032	ADC-Synthase PabAB	NP_600222
Mycobacterium tuberculosis	ADC-Synthase PabB	NP_335470
Escherichia coli	ADC-Synthase PabB	YP_001724797

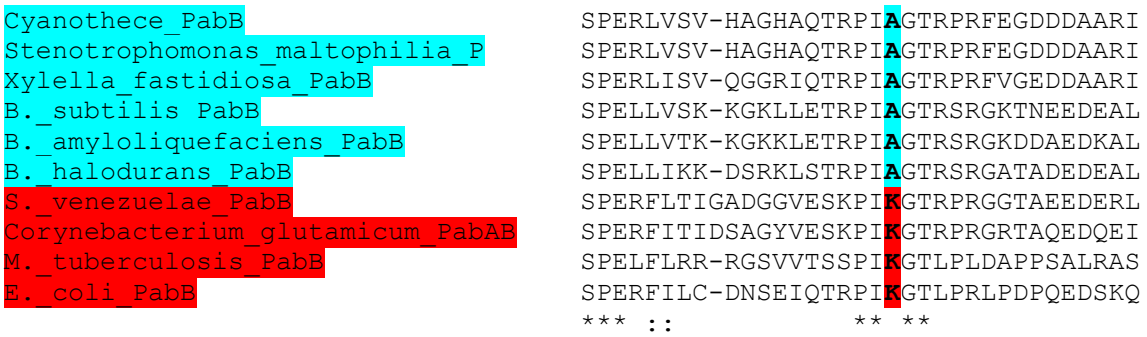


Abbildung 5-1. Sequenzvergleich von ADC-Synthasen verschiedener Mikroorganismen aus Tabelle 5-1 im Bereich von Ala-283 bei *B. subtilis* bzw. Lys-274 bei *E. coli*.

Die Sequenzen der ADC-Synthasen der entsprechenden Mikroorganismen wurden mit der *Software Phylogeny.fr* (http://www.phylogeny.fr/) einer phylogenetischen Analyse unterzogen. Interessanterweise wurden einerseits die ADC-Synthasen, die an Position ***X*** Ala besitzen, in eine phylogenetisch verwandte Gruppe eingruppiert, während die ADC-Synthase, die an dieser Position Lys aufweisen, einer zweiten Gruppe zugeordnet wurden (Abbildung 5-2). Die phylogenetische Verwandtschaft der alaninhaltigen ADC-Synthasen des *B. subtilis*-Typs und die Tatsache, dass Ala an Position ***X*** nicht die Funktion des katalytisch aktiven Nukleophils übernehmen kann, lässt für diese Gruppe einen gemeinsamen, von *E. coli* (Kozlowski *et al.*, 1995; He *et al.*, 2004) grundlegend abweichenden Katalysemechanismus vermuten.

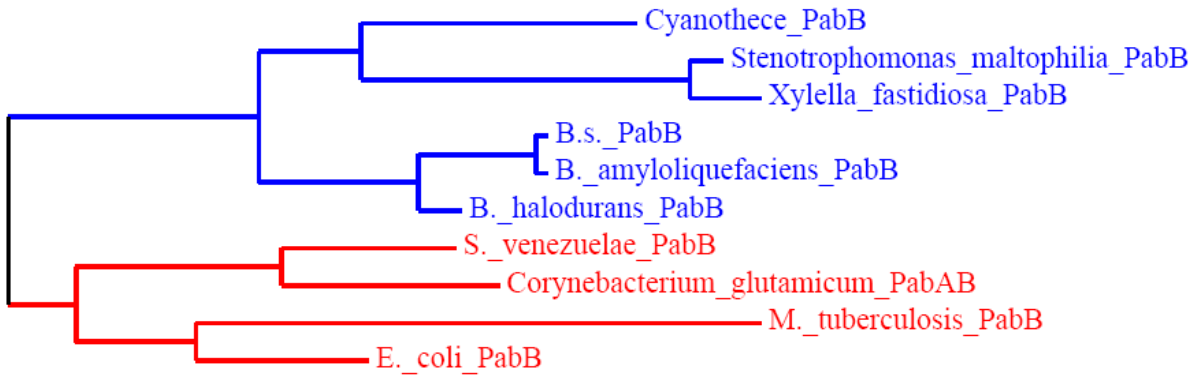


Abbildung 5-2. Phylogenetische Analyse von ADC-Synthasen verschiedener Mikroorganismen aus Tabelle 5-1. Die Anzahl der Verzweigungspunkte gibt den phylogenetischen Verwandschaftsgrad wieder.

5.2 TOF-Messungen des Proteins

Der von He *et al*. (2004) publizierte Reaktionsmechanismus für die ADC-Synthase von *E. coli* sieht vor, dass die ε-Amino Gruppe von Lys-274 der PabB Untereinheit nukleophil an C2 von Chorismat angreift, wodurch ein kovalent gebundenes Substrat-Enzym-Intermediat ausgebildet wird. Dieses an Lys-274 kovalent gebundene Chorismat-ADC-Synthase-Intermediat konnte 2005 von Bulloch *et al*. und 2006 von He *et al*. durch ESI-MS-Analyse des intakten Proteins direkt nachgewiesen werden. Die Vermessung des *Wildtyp*-Proteins der *E. coli* ADC-Synthase nach Inkubation mit Chorismat lieferte sowohl bei He als auch bei Bulloch ein zweites Signal mit einer Massendifferenz von +208 Da relativ zum nativen Protein, welches bei der analogen Umsetzung mit einer PabB Lys274Ala Mutante nicht vorhanden war. Aufgrund dieser Experimente konnte eindeutig gezeigt werden, dass Chorismat kovalent von Lys-274 gebunden wird.

Um zu untersuchen, ob die PabB-Untereinheit der ADC-Synthase von *B. subtilis* ebenfalls ein für die Katalyse essentielles kovalent gebundenes Substrat-Enzym-Intermediat ausbildet, wurde diese vor und nach der Umsetzung mit Chorismat über ESI-MS am QTOF-2-Massenspektrometer vermessen. Die für diese Analytik notwendige vorherige Entsalzung des Proteins erfolgte über eine eigens hierfür eingesetzte *Online-Desalting*-Kartusche mittels analytischer HPLC, welche an die ESI-Quelle des Massenspektrometers gekoppelt wurde. Die Messung von Proteinen im ESI-MS erfolgt immer über Ladungs*cluster*, welche anschließend zur Masse des Proteins dekonvuliert werden. Das Ladungs*cluster* eines Proteins besteht aus den Signalen der mehrfach geladenen Molekülionen, wobei sich die Ladung z und somit die Masse M des Proteins aus den gemessenen *m/z*-Verhältnissen zweier beliebiger aber aufeinanderfolgender Molekülionen ($[m/z]_1$ und $[m/z]_2$ mit $[m/z]_2 > [m/z]_1$) berechnen lassen. Für den Fall, dass Protonen die Ladungsträger sind, gilt:

$$[m/z]_1 = \frac{M+z}{z} \qquad [m/z]_2 = \frac{M+(z-1)}{z-1}$$

Gleichung 5-1

Wodurch die Ladung z des entsprechenden Molekülions und anschließend die exakte Masse M des Proteins berechnet werden kann:

$$z = \frac{[m/z]_2 - 1}{[m/z]_2 - [m/z]_1} \qquad M = z \cdot ([m/z]_1 - 1)$$

Gleichung 5-2

Die Dekonvulierung des Ladungs*clusters* erfolgte in diesem Fall *Software* gestützt über die Funktion *Maximum Entropy1* (*MaxEnt1*) von MassLynx (Micromass/Waters). Da die Anzahl der Atome bei Proteinen im Vergleich zu kleinen Molekülen um ein Vielfaches höher ist, berechnet sich die exakte Molekülmasse des Proteins aus der wahrscheinlichsten Isotopenzusammensetzung und entspricht nicht der monoisotopischen Masse, wie dies bei kleinen Molekülen der Fall ist. Die Bestimmung der exakten Masse und der Isotopenverteilung der zu untersuchenden Proteine erfolgte auf Basis der entsprechenden Aminosäuresequenz über die Software *Isotopident* auf der Internetseite www.expasy.org/tools.
Abbildung 5-3 zeigt das Massenspektrum mit dem Ladungs*cluster* für *B. subtilis* PabB vor Dekonvulierung, exemplarisch für die Messung aller weiteren Proteine.

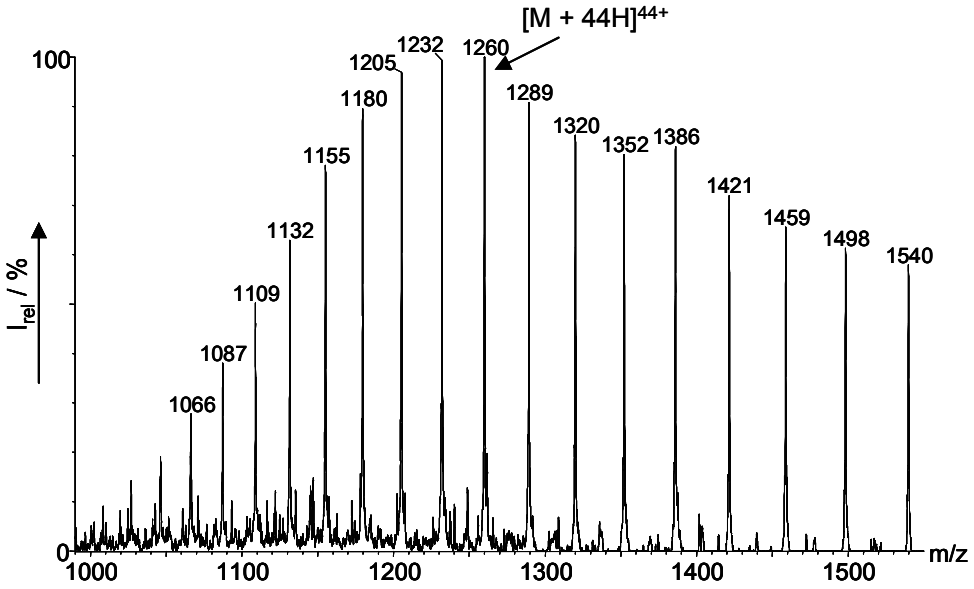


Abbildung 5-3. Massenspektrum von *B. subtilis*-PabB vor der Dekonvulierung. Zu sehen ist das Ladungs*cluster* mit den Signalen für die mehrfach geladenen Molekülionen.

Durch Vergleich der dekonvulierten Massenspektren von *B. subtilis* PabB vor und nach Inkubation mit Chorismat sollte geklärt werden, ob Chorismat kovalent an die PabB-Unterheinheit der *B. subtilis* ADC-Synthase bindet und somit ein zur *E. coli*-Reaktion analoger Mechanismus vorliegt. Der Vergleich der Aminosäuresequenz von *E. coli* und *B. subtilis* PabB (Abbildung 1-18) zeigt, dass Lys-274 von *E. coli*-PabB bei *B. subtilis* durch ein Alanin substituiert ist, welches folglich nicht die Funktion des Nukleophils im Reaktionsmechanismus übernehmen kann. Sollte bei *B. subtilis* ein zur *E. coli* ADC-Synthase analoger Mechanismus vorliegen, so müsste die Funktion des Nukleophils von einer anderen nukleophilen Aminosäure (beispielsweise Lys, Cys oder Ser) übernommen

werden, was sich im dekonvulierten Massenspektrum durch ein zweites Signal mit deiner Massendifferenz von +208 Da relativ zum nativen Protein zeigen würde.
Für die Etablierung des Assays mussten zunächst die für die *E. coli* ADC-Synthase bereits publizierten Ergebnisse reproduziert werden, bevor die entsprechenden Experimente für *B. subtilis* durchgeführt werden konnten.

Folgende Reaktionsansätze wurden zur Aufklärung des *B. subtilis* ADC-Synthase-Reaktionsmechanismus über ESI-Q-TOF2-MS analysiert:

1.1) *E. coli* PabB (*Wildtyp*) ohne Inkubation mit Chorismat (Abbildung 5-4)
1.2) *E. coli* PabB (*Wildtyp*) nach Inkubation mit Chorismat (Abbildung 5-5)
1.3) *E. coli* PabB (*Wildtyp*) inkubiert mit Chorismat und nachfolgender Zugabe von NH_4^+ (Abbildung 5-6)

2.1) *E. coli* PabB_K274A-Mutante ohne Inkubation mit Chorismat (Abbildung 5-7)
2.2) *E. coli* PabB_K274A-Mutante nach Inkubation mit Chorismat (Abbildung 5-8)

3.1) *B. subtilis* PabB (*Wildtyp*) ohne Inkubation mit Chorismat (Abbildung 5-9)
3.2) *B. subtilis* PabB (*Wildtyp*) nach Inkubation mit Chorismat (Abbildung 5-10)

In allen Fällen wurden 50 µl einer 3 µM Proteinlösung über HPLC injiziert. Abbildung 5-4 zeigt das Ladungs-dekonvulierte Massenspektrum der PabB Untereinheit der *E. coli* ADC-Synthase vor Inkubation mit Chorismat. Die gemessene Masse beträgt 53105 Da, die basierend auf der Aminosäuresequenz über Isotopident (www.expasy.org/tools) zuvor berechnete exakte Masse ist 53102 Da.
Nach Zugabe von 300 µM Chorismat bildet sich unter Abspaltung der C4- Hydroxygruppe ein kovalent gebundenes Substrat-PabB-Intermediat aus. Im Massenspektrum zeigt sich dieses Substrat-Enzym-Intermediat durch ein zweites Signal mit einer Massendifferenz von +208 Da relativ zum unmodifizierten Protein (Abbildung 5-5). Gibt man bei pH 8,0 Ammonium-Ionen (40 mM) zum Chorismat-PabB-Reaktionsansatz hinzu und vermisst diesen anschließend über ESI-MS, so stellt man fest, dass die relative Signalintensität des zweiten Massenpeaks, welcher durch das gebildete Chorismat-Enzym-Intermediat zustande kommt, von ca. 65 % auf ca. 20 % abnimmt (Abbildung 5-6). Diese Beobachtung

lässt sich durch den Fortgang der Enzymreaktion erklären, wodurch in Anwesenheit von NH_3 das Reaktionsprodukt 4-Amino-4-desoxychorismat gebildet wird und freies, regeneriertes PabB entsteht. Durch diesen Assay konnte reproduziert werden, dass Chorismat im Zuge der enzymatischen Umwandlung ein kovalent gebundenes Intermediat mit der PabB-Untereinheit der ADC-Synthase von *E. coli* ausbildet.

Um zu untersuchen, ob tatsächlich Lys-274 der *E. coli* PabB-Untereinheit das Nukleophil darstellt, welches an C2 von Chorismat angreift, wurde eine Mutante generiert, bei der Lys-274 zu Ala mutiert wurde, und diese anschließend in analoger Weise über ESI-MS vermessen. Abbildung 5-7 zeigt das Ladungs-dekonvulierte Massenspektrum der *E. coli*-PabB-K274A-Mutante vor Inkubation mit Chorismat. Die gemessene Molekülmasse beträgt 53050 Da, die über *Isotopident* (www.expasy.org/tools) zuvor berechnete exakte Molekülmasse ist 53045 Da. Zugabe von 300 µM Chorismat und anschließende ESI-MS-Analytik zeigt eindeutig, dass kein kovalent gebundenes Chorismat-PabB-Intermediat gebildet wird (Abbildung 5-8). Im entsprechenden Massenspektrum ist kein weiteres Signal zu sehen. Chorismat kann von der PabB-K274A-Mutante nicht mehr kovalent gebunden werden. Dieses Experiment beweist somit, dass tatsächlich Lys-274 als Nukleophil im Katalysemechanismus der *E. coli* ADC-Synthase für die Bildung des kovalent gebundenen Substrat-Enzym-Intermediats verantwortlich ist.
Die von Bulloch *et al.*, 2005 und He *et al.*, 2006 publizierten Daten bezüglich des kovalent gebundenen Chorismat-Enzym-Intermediats bei der *E. coli* ADC-Synthase konnten durch diesen *Assay* hervorragend reproduziert werden, womit die Validität des Systems gegeben war.

Um herauszufinden, ob beim Katalysemechanismus der *B. subtilis* ADC-Synthase ebenfalls ein kovalent gebundenes Chorismat-Enzym-Intermediat ausgebildet wird, wurde die PabB-Untereinheit vor und nach Umsetzung mit 300 µM Chorismat über ESI-MS vermessen. Abbildung 5-9 zeigt das Ladungs-dekonvulierte Massenspektrum von *B. subtilis* PabB. Die gemessene Molekülmasse beträgt 55399 Da, die über *Isotopident* (www.expasy.org/tools) zuvor berechnete exakte Molekülmasse ist ebenfalls 55399 Da. Interessanterweise zeigt das Massenspektrum nach Zugabe von 300 µM Chorismat kein weiteres Signal mit einer Massendifferenz von +208 Da relativ zum nativen PabB-Peak (Abbildung 5-10). Offensichtlich wird bei *B. subtilis* durch Zugabe von Chorismat kein kovalent gebundenes Chorismat-PabB-Intermediat ausgebildet.

Diese ESI-QTOF-MS-Experimente beweisen, dass beim Katalysemechanismus der *B. subtilis* ADC-Synthase kein kovalent gebundenes Substrat-Enzym-Intermediat entsteht, wodurch sich dieser Reaktionsmechanismus grundlegend von dem für die *E. coli* ADC-Synthase publizierten Mechanismus (Kozlowski *et al.*, 1995; He *et al*., 2004; He *et al.*, 2006) unterscheiden muss.

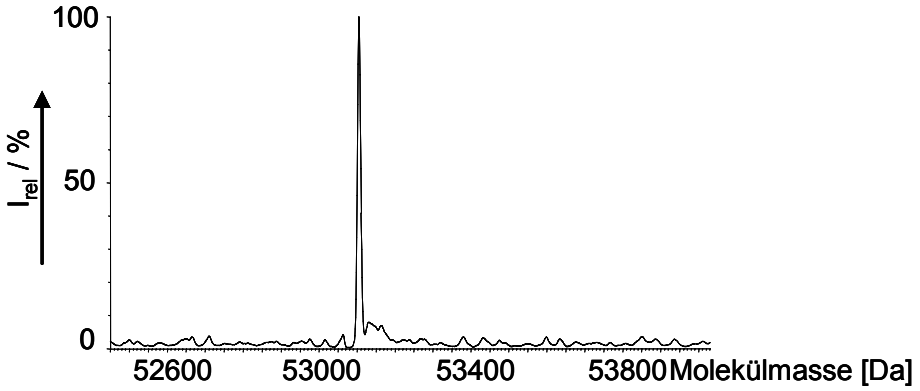


Abbildung 5-4. Ladungs-dekonvuliertes ESI-QTOF-Spektrum von *E. coli*-PabB vor Inkubation mit Chorismat. Die gemessene Molekülmasse ist 53105 Da, die berechnete exakte Molekülmasse beträgt 53102 Da.

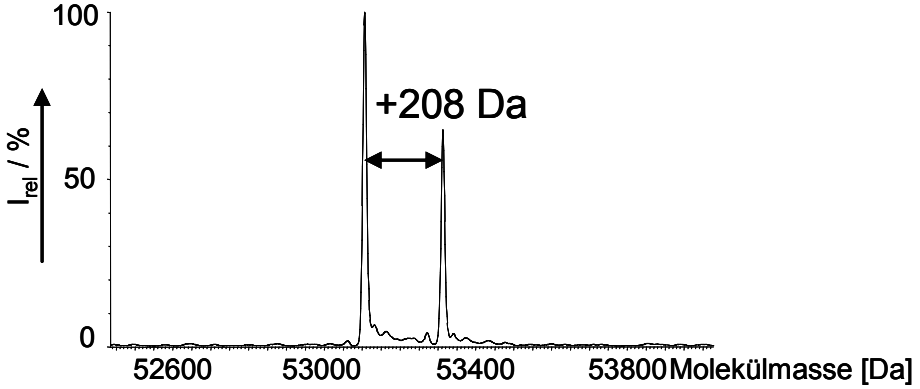


Abbildung 5-5. Ladungs-dekonvuliertes ESI-QTOF-Spektrum von *E. coli* PabB nach Inkubation mit Chorismat. Das zweite Signal mit einer Massendifferenz von +208 Da relativ zum nativen Protein mit der gemessenen Molekülmasse von 53105 Da kommt durch das kovalent gebundene Chorismat-Addukt zustande.

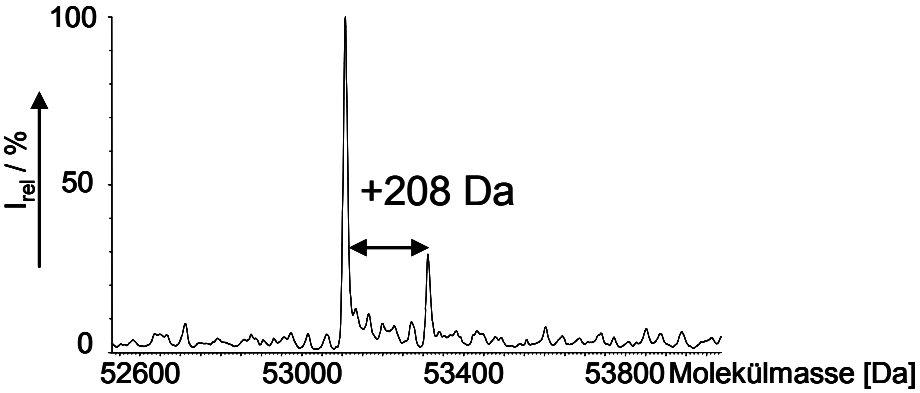


Abbildung 5-6. Ladungs-dekonvuliertes ESI-QTOF-Spektrum von *E. coli* PabB inkubiert mit Chorismat und nach Zugabe von NH_4^+-Ionen. Die Intensität des zweiten Signals mit einer Massendifferenz von +208 Da relativ zum nativen Protein nimmt ab, da sich das kovalent gebundene Chorismat-Enzym-Intermediat durch nukleophilen Angriff von NH_3 in freies 4-Amino-4-desoxychorismat und regeneriertes Enzym umwandelt.

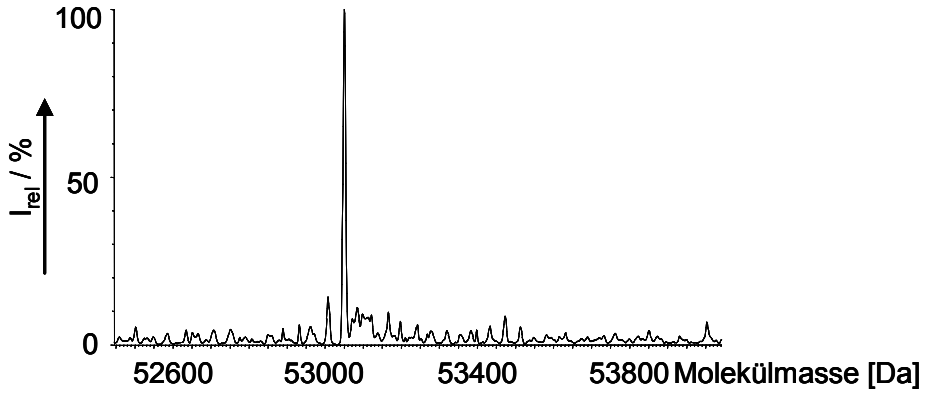


Abbildung 5-7. Ladungs-dekonvuliertes ESI-QTOF-Spektrum der *E. coli*-PabB-K274A-Mutante vor Inkubation mit Chorismat. Die gemessene Molekülmasse ist 53050 Da, die berechnete exakte Molekülmasse beträgt 53045 Da.

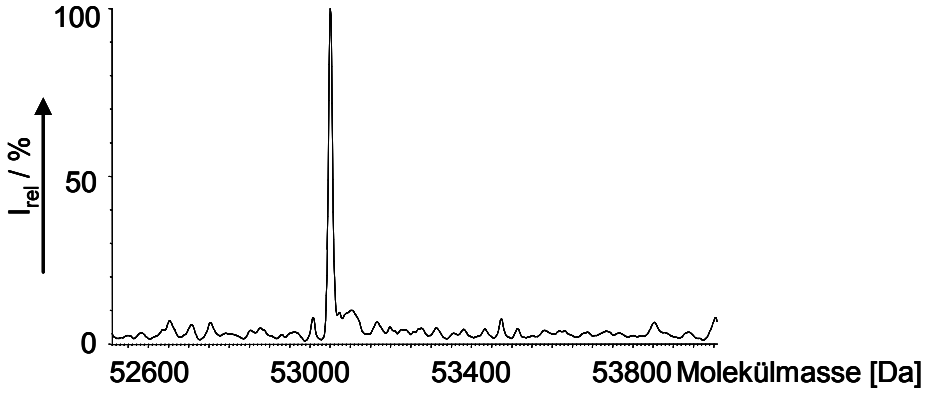


Abbildung 5-8. Ladungs-dekonvuliertes ESI-QTOF-Spektrum der *E. coli*-PabB-K274A-Mutante nach Inkubation mit Chorismat. Es entsteht kein zweites Signal mit einer Massendifferenz von +208 Da. Aufgrund der Substitution von Lys-274 zu Ala entsteht kein kovalent gebundenes Chorismat-PabB-Addukt.

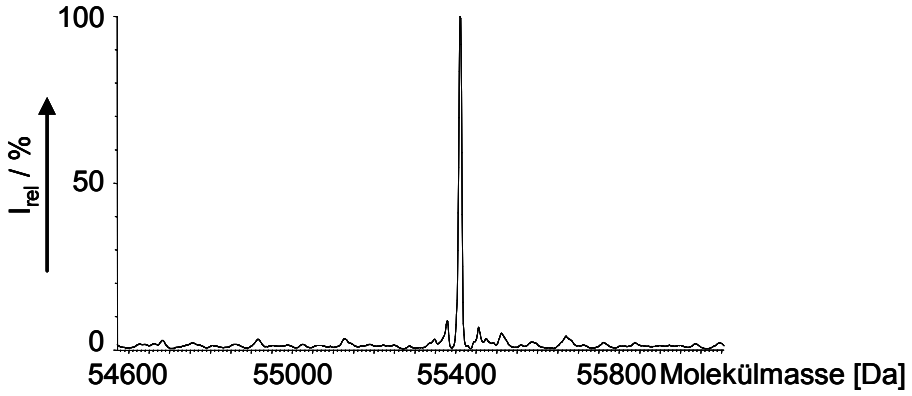


Abbildung 5-9. Ladungs-dekonvuliertes ESI-QTOF-Spektrum von *B. subtilis*-PabB vor Inkubation mit Chorismat. Die gemessene Molekülmasse ist 55399 Da, die berechnete exakte Molekülmasse beträgt 55399 Da.

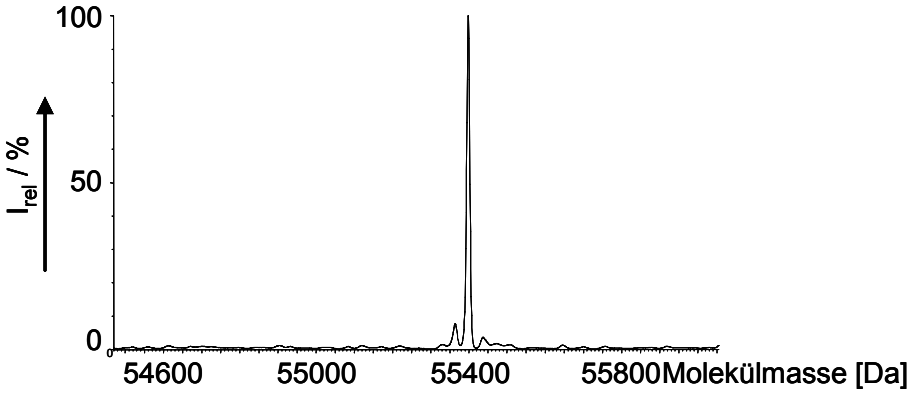


Abbildung 5-10. Ladungs-dekonvuliertes ESI-QTOF-Spektrum von *B. subtilis* PabB nach Inkubation mit Chorismat. Es entsteht kein zweites Signal mit einer Massendifferenz von +208 Da. *B. subtilis*-PabB bildet somit kein kovalent gebundenes Chorismat-Enzym-Intermediat aus.

5.3 Massenspektrometrische Analyse der Reaktionsprodukte

Die Reaktionen der *E. coli* ADC-Synthase und -Lyase, der *B. subtilis* ADC-Synthase und -Lyase, sowie einer *E. coli* ADC-Synthase K274A Mutante mit dem Substrat Chorismat und NH_4^+ bzw. Gln als Stickstoffquelle wurden per LC-MS untersucht und die Reaktionsprodukte charakterisiert.

Die Reaktion der *E. coli* ADC-Synthase mit Chorismat und Ammoniak führt zu ADC (*m/z* 226, R_t=3,3 min) als Reaktionsprodukt (Abbildung 5-11 A). Durch Zugabe von *E. coli* ADC-Lyase wird *p*ABA (*m/z* 138) gebildet (Abbildung 5-11 D). Im Gegensatz dazu führt die Reaktion der *B. subtilis* ADC-Synthase zu zwei Verbindungen mit *m/z* 226 zu den Retentionszeiten R_t = 3,3 min und 4,7 min (Abbildung 5-11 B). Bei dem Peak mit der Retentionszeit R_t = 3,3 min handelt es sich um ADC, das Hauptprodukt zur Retentionszeit R_t = 4,7 min jedoch konnte als Konstitutionsisomer von ADC, als 2-Amino-2-desoxychorismat (ADIC), identifiziert werden. Die Strukturaufklärung von ADIC ist in Abschnitt 5.4 beschrieben. Desweiteren wurde beobachtet, dass die Reaktion der ADC-Synthase von *B. subtilis* auch zur Bildung von Anthranilat (*o*ABA) führt: Durch Zugabe von *B. subtilis* ADC-Lyase wird, wie bei *E. coli*, *p*ABA (*m/z* 138) gebildet (Abbildung 5-11 E), es handelt sich also zweifelsohne um die Enzyme der *p*ABA-Biosynthese. Um die Reihenfolge der gebildeten Reaktionsprodukte zu untersuchen, wurde zuvor biosynthetisch hergestelltes und spektroskopisch charakterisiertes ADIC (Kapitel 4.4) mit *B. subtilis* ADC-Synthase und in einem separaten Experiment mit *B. subtilis* ADC-Lyase inkubiert. Die Inkubation mit ADC-Lyase führt nicht zur Synthese von *p*ABA, ADIC ist also kein Substrat der *B. subtilis* ADC-Lyase. Im Gegensatz dazu führt die Inkubation von ADIC mit der *B. subtilis* ADC-Synthase jedoch zur Bildung von ADC. Durch Zugabe von *B. subtilis* ADC-Lyase zu diesem Reaktionsansatz wird schließlich *p*ABA (*m/z* 138) gebildet (Abbildung 5-11 F). ADIC wird ebenfalls neben ADC von einer mutierten ADC-Synthase von *E. coli* mit der Mutation K274A gebildet (Abbildung 5-11 C, He *et al.*, 2004). Abgebildet sind jeweils die Reaktionsansätze mit NH_4^+ als Stickstoffquelle, wird statt dessen Glutamin verwendet, werden identische Ergebnisse erhalten. Auch Reaktionen „über Kreuz“ können erfolgreich durchgeführt werde. So kann Chorismat auch mit *E. coli* ADC-Synthase und *B. subtilis* ADC-Lyase zu *p*ABA umgesetzt werden, ebenso in einer Kombination von *B. subtilis* ADC-Synthase und *E. coli* ADC-Lyase.

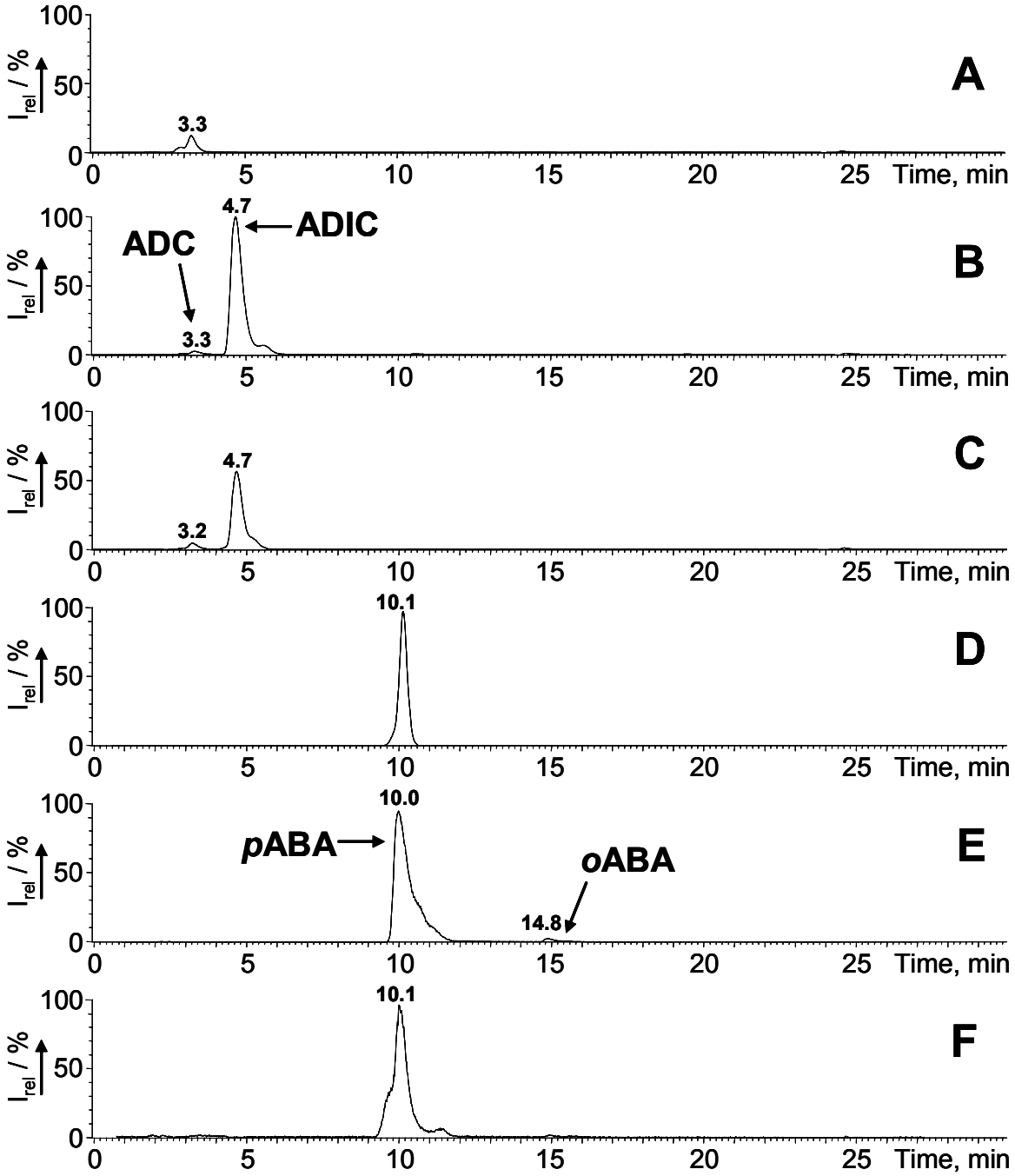


Abbildung 5-11. HPLC-MS-Chromatogramme (extrahierter Ionenstrom *m/z* 226) der Reaktionsansätze. (A) *E. coli* ADC-Synthase + Chorismat + NH_4^+; (B) *B. subtilis* ADC-Synthase + Chorismat + NH_4^+; (C) *E. coli* K274A ADC-Synthase + Chorismat + NH_4^+; HPLC-MS-Chromatogramme (extrahierter Ionenstrom *m/z* 138) der Reaktionsansätze. (D) *E. coli* ADC-Synthase + ADC-Lyase + Chorismat + NH_4^+; (E) *B. subtilis* ADC-Synthase + ADC-Lyase + Chorismat + NH_4^+; (F) *B. subtilis* ADC-Synthase + ADC-Lyase + ADIC + NH_4^++. *p*ABA und *o*ABA wurden anhand synthetischer Standards durch Retentionszeitvergleich und MS/MS-Spektren identifiziert.

5.4 Aufreinigung und Charakterisierung der Reaktionsprodukte

Bei der Umsetzung von Chorismat mit der ADC-Synthase von *B. subtilis* wurde festgestellt, dass neben ADC noch ein zweites Reaktionsprodukt mit *m/z* 226 entsteht. In Abbildung 5-12 dargestellt ist der extrahierte Ionenstrom von *m/z* 226. Es erscheinen zwei Peaks zu den Retentionszeiten R_t = 3,3 min und 4,7 min, die beide ein $[M+H]^+$-Signal bei *m/z* 226 zeigen. Die MS/MS-Spektren der beiden Substanzen, ebenfalls in Abbildung 5-12 dargestellt, sind identisch. Durch vergleichende Chromatographie mit Umsetzungen von Chorismat mit der ADC-Synthase von *E. coli* konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem ersten Peak zur Retentionszeit R_t = 3,3 min um ADC handelt. Ein Schema, das mögliche Fragmentierungswege aufzeigt, die zu den detektierten Fragment-Ionen führen können, ist in Abbildung 5-13 dargetellt.

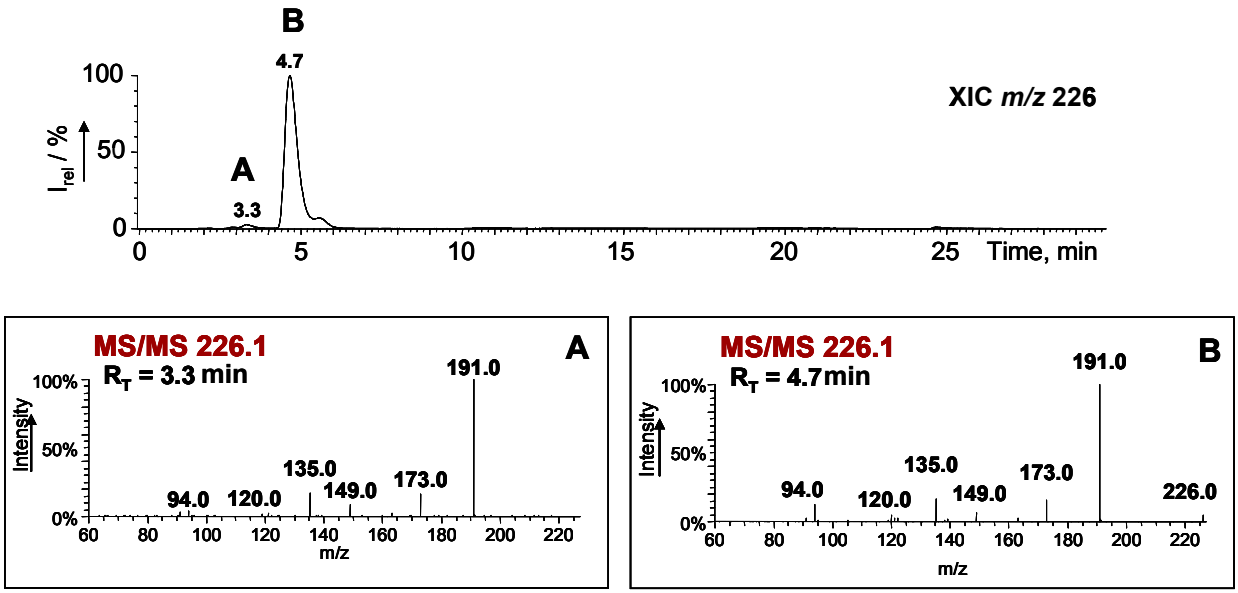


Abbildung 5-12: Extrahierter Ionenstrom (*m/z* 226) aus der ADC-Synthase-Reaktion von *B. subtilis* mit zwei Peaks (oben). MS/MS-Spektren der beiden Peaks bei R_t = 3,3 min (A, ADC) und R_t = 4,7 min (B, unbekannte Substanz).

Auf der Basis dieser Fragmentspektren konnte der Schluss gezogen werden, dass es sich bei den beiden Verbindungen um Isomere handelt, deren struktureller Unterschied anhand von massenspektrometrischen Untersuchungen jedoch nicht aufgeklärt werden kann. Die Strukturaufklärung erfolgte daher mittels NMR-Spektroskopie. Zur Aufnahme von NMR-Spektren ist es notwendig, dass die Substanz hochrein in verhältnismäßig großer Menge (*ca.* 1 mg) vorliegt. Zu diesem Zweck wurden 20 mg Chorismat in Ammoniumsulfatpuffer mit der ADC-Synthase von *B. subtilis* umgesetzt, und anhand eines eigens entwickelten Reinigungsprotokolls, das in Abschnitt 4.4 beschrieben ist, aufgereinigt. Der Erfolg der

Reinigungsschritte wurde mittels LC-MS kontrolliert. Die Schwierigkeit dieser Reinigung bestand darin, dass zum einen die strukturell ähnlichen Verbindungen ADC und Chorismat abgetrennt werden müssen, zum anderen die zu isolierende Verbindung verhältnismäßig instabil ist. Zur Abtrennung von Chorismat wurde ausgenutzt, dass dieses einen anderen pK-Wert als seine aminierten Analoga besitzt. Durch Ansäuern mit TFA werden die Substanzen so protoniert, dass Chorismat neutral ist, während seine aminierten Analoga eine positive Ladung tragen. Dadurch lässt sich Chorismat mit Chloroform bzw. Ethylacetat extrahieren, während die aminierte Form in der wässrigen Phase verbleibt. Auf demselben Prinzip basiert der Reinigungsschritt über Kationaustauschchromatographie. Die Trennung der beiden Aminierungsprodukte ist über semi-präparative *reversed phase* HPLC gut möglich, da sich die Retentionszeiten ausreichend unterscheiden. Um der Tatsache gerecht zu werden, dass die isolierte Substanz verhältnismäßig instabil ist, wurden, wo immer möglich, eiskalte Lösungsmittel verwendet, bzw. in der Kälte und rasch gearbeitet. Die entsprechenden Fraktionen der HPLC-Reinigung wurden lyophilisiert, in deuteriertem Methanol aufgenommen und am NMR-Spektrometer vermessen.

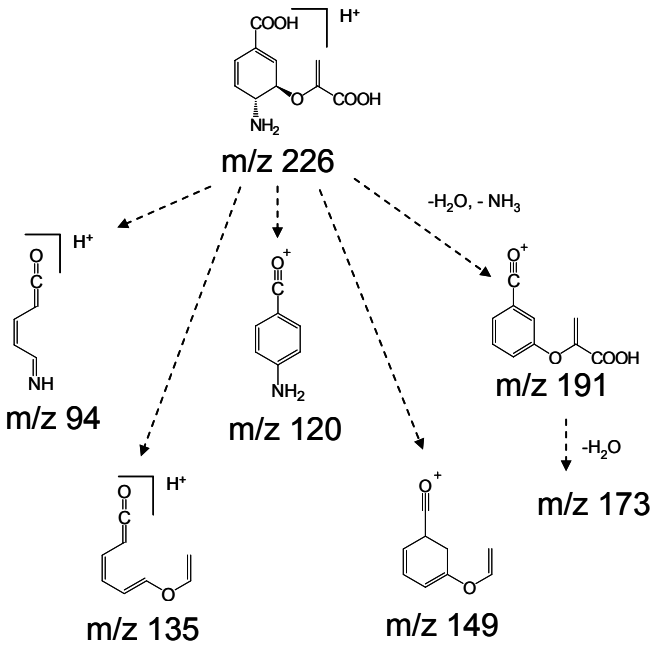


Abbildung 5-13: Fragmentierungswege von ADC (*m/z* 226) im ESI-MS.

Die Strukturaufklärung der so aufgereinigten Verbindung erfolgte anhand eines *COSY*-Experiments (*Correlated Spectroscopy*). Aus dem *COSY*-Experiment lässt sich die Kopplung benachbarter Protonen (^2J und ^3J) ermitteln. Auf den Frequenzachsen F1 und F2 (Abbildung 5-14) ist jeweils die ^{1}H-chemische Verschiebung aufgetragen. Das 1D-NMR-Spektrum ergibt sich als Projektion der Diagonalen, während die Kreuzsignale zeigen, welche Kerne miteinander koppeln. Das *COSY*-Spektrum der isolierten Verbindung aus

der ADC-Synthase-Reaktion von *B. subtilis* samt Interpretation ist in Abbildung 5-14 dargestellt.

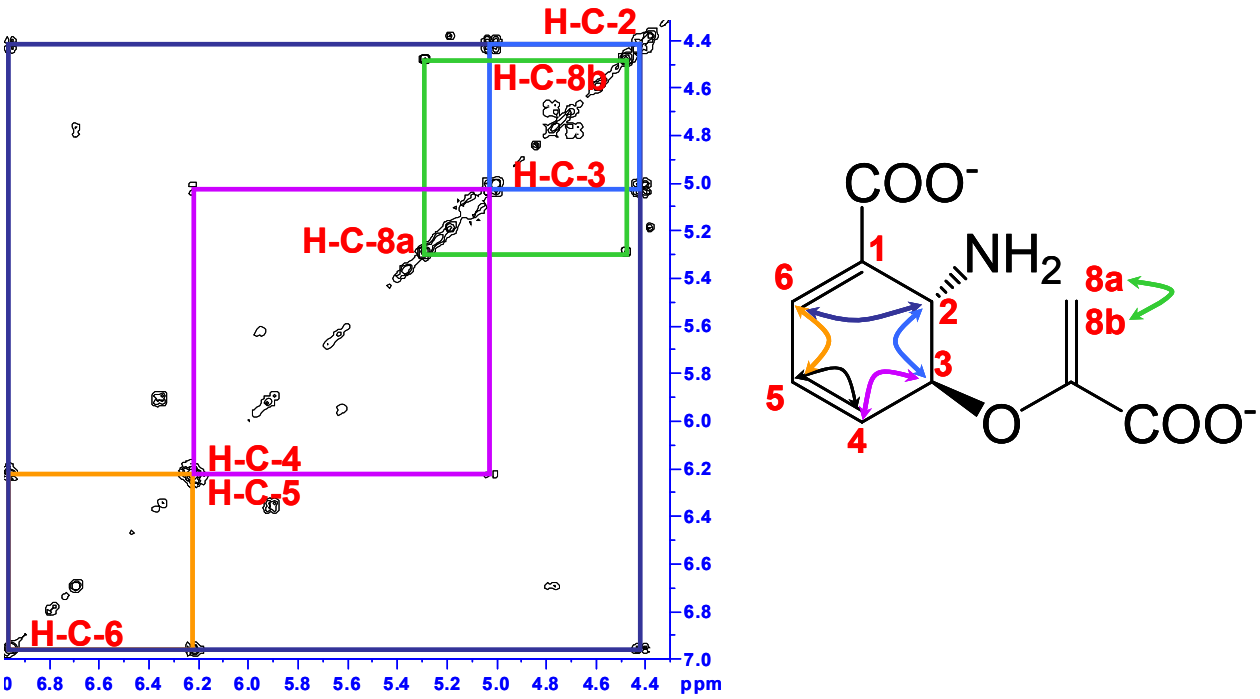


Abbildung 5-14: *COSY*-Spektrum des Hauptprodukts der ADC-Synthase-Reaktion von *B. subtilis* in MeOD mit eingezeichneten Kopplungen (farbige Linien).

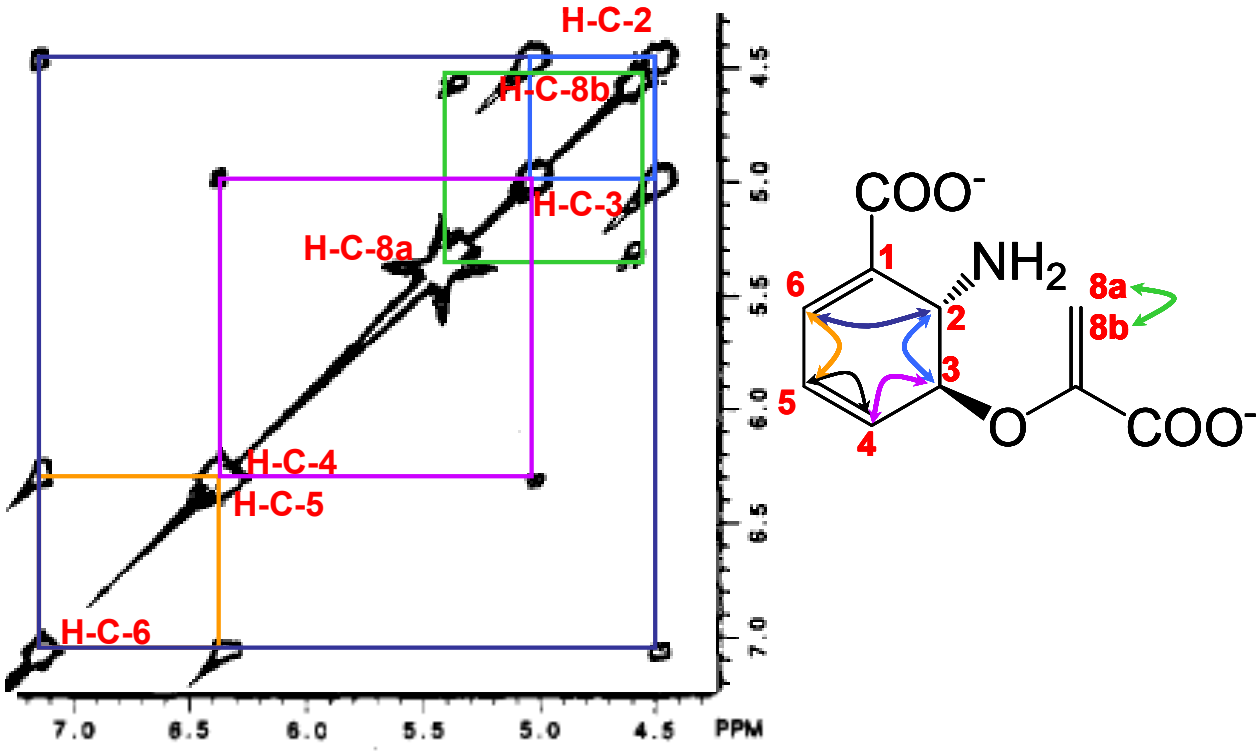


Abbildung 5-15: *COSY*-Spektrum von 2-Amino-2-desoxyisochorismat (ADIC) in MeOD mit eingezeichneten Kopplungen (Quelle: Morollo *et al.*, 1993).

Bei der isolierten Verbindung handelt es sich um 2-Amino-2-desoxyisochorismat, das strukturell erstmals von Morollo *et al.* 1993 beschrieben wurde. Das entsprechende *COSY*-Spektrum ist in Abbildung 5-15 dargestellt. Hier wurden die Kopplungen analog zum Spektrum der isolierten Substanz eingezeichnet, die Ähnlichkeit der beiden Spektren ist offensichtlich. Die chemischen Verschiebungen der isolierten und als ADIC identifizierten Verbindung sind wie folgt (^{1}H-NMR, Angaben in *ppm*): 6,6 (1H, H-2), 6,5 (1H, H-6), 6,0 (1H, H-5), 5,3 (1H, H-8a), 5,0 (1H, H-3), 4,6 (1H, H-8b), 4,2 (1H, H-4).

5.5 Markierungsexperimente

Bei der Biosynthese von ADC aus ADIC wandert formal eine Aminogruppe von C2 zu C4 (Abbildung 5-16). Um zu untersuchen, ob hierbei eine intramolekulare Umlagerung stattfindet, oder ob ein zweiter nukleophiler Angriff durch ein zweites Ammoniakmolekül stattfindet, wurden Markierungsexperimente durchgeführt.

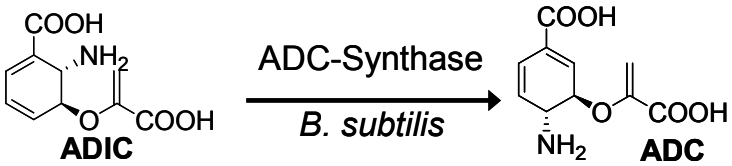


Abbildung 5-16. Enzymkatalysierte Umwandlung von ADIC zu ADC.

Wie in Abschnitt 5.3 beschrieben bildet sich zunächst ADC, wenn Chorismat oder isoliertes ADIC in Glutaminpuffer mit der ADC-Synthase umgesetzt wird, und schließlich durch Zugabe der ADC-Lyase von *B. subtilis p*ABA. Im Massenspektrometer wird hierbei *m/z* 138 (für *p*ABA) detektiert, entsprechend der Summenformel $C_7H_8NO_2$ (Abbildung 5-17 A). Um zu klären, ob bei der Umwandlung von ADIC zu ADC eine intramolekulare Umlagerung stattfindet, oder ob ein zweiter nukleophiler Angriff durch ein zweites Ammoniakmolekül stattfindet, wurde isoliertes ADIC mit der ADC-Synthase und der ADC-Lyase von *B. subtilis* in [$^{15}N_\omega$]Glutaminpuffer umgesetzt und das Reaktionsprodukt mit LC-MS analysiert. Im ersten Falle, wenn also eine intramolekulare Umlagerung stattfindet, und dieselbe Aminogruppe im Molekül verbleibt, so ist kein Massenshift zu erwarten, und es müsste erneut *m/z* 138 detektiert werden. Im zweiten Fall, wenn ein weiterer nukleophiler Angriff durch ein zweites Ammoniakmolekül stattfindet, das in diesem Fall nur aus dem markierten [^{15}N]Gln stammen kann, müsste ein Massenshift von 1 auftreten und somit *m/z* 139, entsprechend der Summenformel $C_7H_8{}^{15}NO_2$, detektiert werden. In Abbildung 5-17 B ist die LC-MS-Analyse der Umsetzung von ADIC mit ADC-

Synthase und ADC-Lyase von *B. subtilis* in [^{15}N]Glutaminpuffer dargestellt. Zu sehen ist ein Signal bei *m/z* 139, es wurde also der markierte Stickstoff eingebaut. Somit konnte gezeigt werden, dass keine intramolekulare Umlagerung stattfindet, sondern zwei nukleophile Angriffe durch zwei Moleküle Ammoniak, die *in vivo* durch die kleine Untereinheit der ADC-Synthase, die Glutamin-Amidotransferase PabA, aus Glutamin gebildet werden.

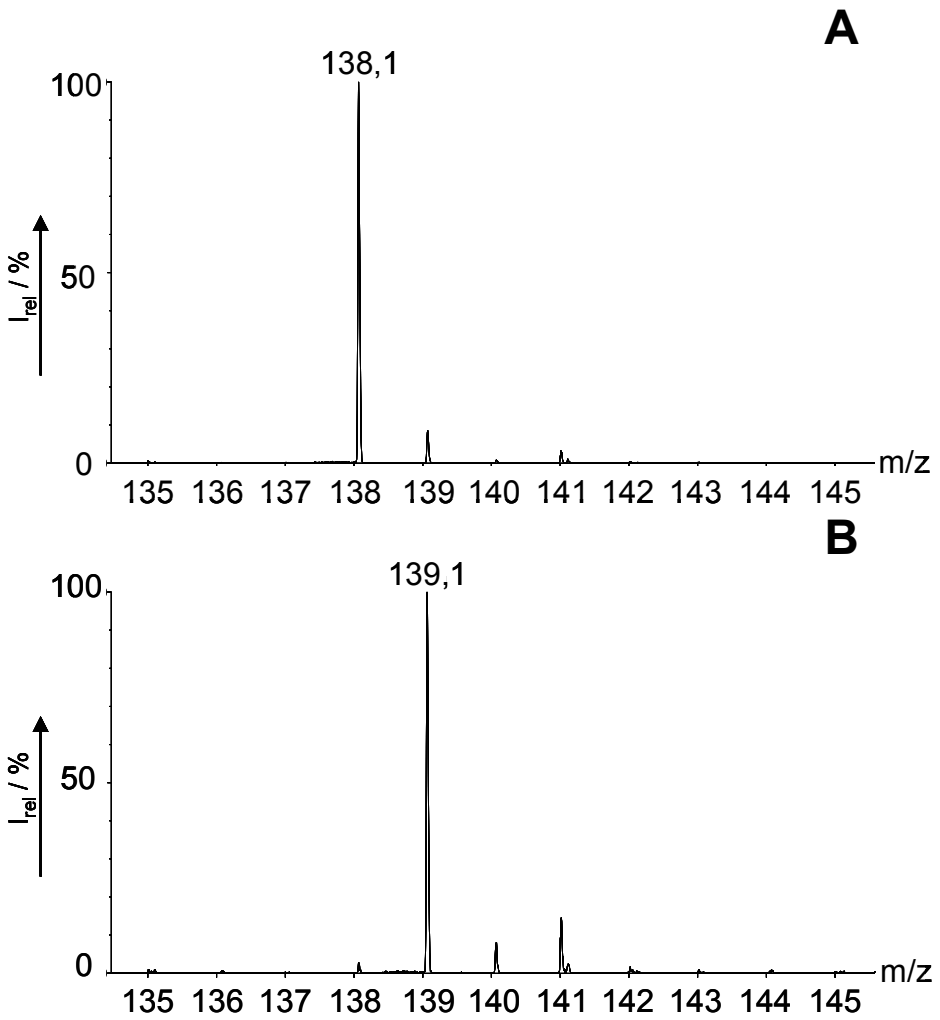


Abbildung 5-17. MS-Spektren von *p*ABA aus Umsetzungen mit *B. subtilis* ADC-Synthase und ADC-Lyase. A) Umsetzung von Chorismat in [^{14}N]Glutaminpuffer. B) Umsetzung von ADIC in [^{15}N]Glutaminpuffer.

5.6 Untersuchung von mutierten ADC-Synthasen

Zur genaueren Charakterisierung der ADC-Synthase aus *B. subtilis* wurden verschiedene Mutanten des Enzyms erzeugt. Zunächst wurde versucht, die *B. subtilis* ADC-Synthase in eine *E. coli* ADC-Synthase umzuwandeln, indem mittels *site-directed mutagenesis* die Aminosäure Ala-283, die dem Lys-274 bei *E. coli* entspricht, zu einem Lysin mutiert wurde. Es sollte dann untersucht werden, ob die Umsetzung von Chorismat mit der A283K *B. subtilis* ADC-Synthase analog der *E. coli* ADC-Synthase direkt ADC liefert. Dies war jedoch nicht der Fall; statt dessen war die A283K *B. subtilis* ADC-Synthase weder bezüglich ADIC noch bezüglich ADC aktiv. Da sterische Gründe hierfür vermutet wurden, wurden weitere Mutanten der *B. subtilis* ADC-Synthase erzeugt, bei denen Ala-283 gegen Val und Ile ausgetauscht wurde. Genau wie die A283K-ADC-Synthase war die A283I-ADC-Synthase nicht aktiv, bei der A283V Mutante hingegen war noch eine marginale Restaktivität bezüglich ADIC detektierbar.

Desweiteren wurde die Aminosäure Cys-263 der *B. subtilis* ADC-Synthase durch Mutagenese ausgetauscht, da dieses Cys die Zielstruktur des Antibiotikums Abyssomicin C darstellt (Keller *et al*., 2007). Die Bindung von Abyssomicin C / atrop-Abyssomicin C an Cys-263 der ADC-Synthase von *B. subtilis* führt nämlich zu einem deutlichen Verlust der Enzymaktivität. Cys-263 wurde gegen Ser und Ala ausgetauscht. Die Aktivität der C263A- und der C263S-Mutanten wurden im Vergleich zum *Wildtyp*-Enzym anhand einer Zeit-Umsatz-Kurve bestimmt. Beide Mutanten sind bezüglich ADIC noch aktiv, wenngleich mit deutlich reduzierter Kapazität. Die C263A-Mutante weist noch ca 1 % Rest-Aktivität auf, während die C263S-Mutante noch ca 15 % Rest-Aktivität im Vergleich zum *Wildtyp*-Enzym zeigt (Abbildung 5-18).

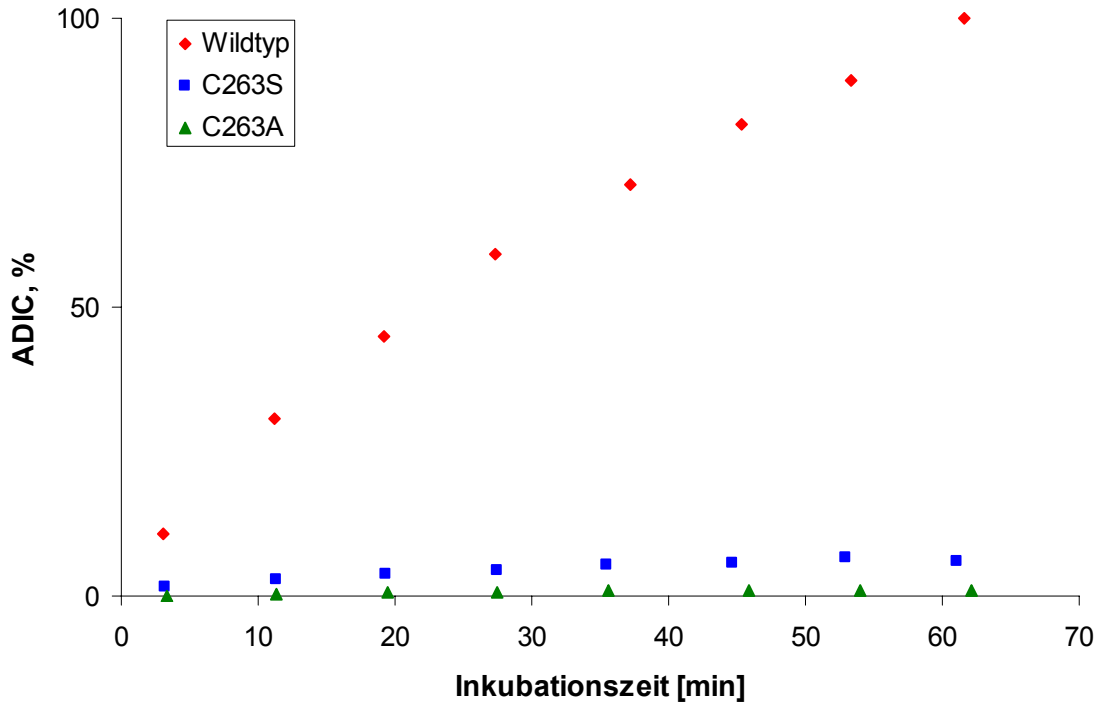


Abbildung 5-18. Vergleich der Aktivitäten verschiedener *B. subtilis* ADC-Synthasen (*Wildtyp*, C263S, C263A) anhand von Zeit-Umsatz-Kurven bei folgenden Bedingungen: 100 mM $(NH_4)_2SO_4$; 5 mM Chorismat, 500 nM ADC-Synthase, 37 °C, pH 8,5 (Detektion mit HPLC-MS).

5.7 Untersuchungen zur *B. subtilis* ADC-Synthase und Anthranilat-Synthase

5.7.1 Vergleich *B. subtilis* ADC-Synthase und Anthranilat-Synthase

Vergleicht man die Aminosäuresequenzen der PabB-Untereinheit der ADC-Synthase mit der TrpE-Untereinheit der Anthranilat-Synthase von *B. subtilis*, so stellt man fest, dass beide Sequenzen einen hohen Grad an Homologie aufweisen (Abbildung 5-19). Interessanterweise ist Ala-283 von PabB bei der TrpE-Untereinheit der Anthranilat-Synthase ebenfalls konserviert.

Das Reaktionsprodukt der *B. subtilis* Anthranilat-Synthase ist *ortho*-Aminobenzoesäure (Anthranilat; *o*ABA), welches als Baustein für die Biosynthese der aromatischen Aminosäure Tryptophan benötigt wird. Der für die *E. coli* Anthranilat-Synthase publizierte Mechanismus sieht vor, dass Chorismat über ADIC zu Anthranilat umgewandelt wird. Das Zwischenprodukt ADIC wird dabei nicht freigesetzt, sondern aromatisiert sofort weiter zur Anthranilsäure (Morollo *et al.*, 1993).

```
TrpE   33   IQMIEKL--DREITYLLESKDDTSTWSRYSFIGLNPFLTIKEEQGRFSAADQDSKSLYTG  90
            +Q  EKL   R+   LLES    +   RYS  GL+P  T+K + G  +    D      G
PabB   19   LQQFEKLAQSRKHHVLLES----ARGGRYSIAGLDPIATVKGKDGITTIKHGDEMLFKEG  74

TrpE   91   NELKEVLNWMNTTYKIKTPELGIPFVGGAVGYLSYDMIPLIEPSVPSHTKETDMEKCMLF  150
            + L+   +W  T  + +T      F GGA+G+LSYD    IE        + +
PabB   75   DPLRAFHSWFKTL-ETETNHEFPDFQGGAIGFLSYDYARYIENFKMLSLDDLETPDIYFL  133

TrpE   151  VCRTLIAYDHETKNVHFIQYARLTGEETKNEKMDVFHQNHL-ELQNLIEKMMDQKNIKEL  209
            V   +  YDH+ +++  I +   + +ET + K+    Q  L EL  +  + M  +
PabB   134  VFDDIAVYDHQEESLWLITHVNGSDQETADVKLSELEQMWLTELPAVTSREMKPE-----  188

TrpE   210  FLSADSYKTPSFETVSSNYEKSAFMADVEKIKSYIKAGDIFQGVLSQKFEVPIKADAFEL  269
              +A S+  P        + +  F   VEKIK YI +GD+FQ  LS +    +    +++
PabB   189  --TAGSFAAP--------FTEDGFSQAVEKIKQYIASGDVFQVNLSIRQSQSLSVHPYQI  238

TrpE   270  YRVLRIVNPSPYMYYMKLLDREIVGSSPERLIHVQDGHLEIHPIAGTRKRGADKAEDERL  329
            Y+ LR VNPSPYM Y++  D +I+  SPE L+  +   LE  PIAGTR RG    EDE L
PabB   239  YKTLREVNPSPYMAYLETPDFQIICGSPELLVSKKGKLLETRPIAGTRSRGKTNEEDEAL  298

TrpE   330  KVELMKDEKEKAEHYMLVDLARNDIGRVAEYGSVSVPEFTKIVSFSHVMHIISVVTGRLK  389
              EL+ +EKE+AEH MLVDL RND+GRV+ YGSV V EF  I  +SHVMHI+S V G L+
PabB   299  ANELIHNEKERAEHVMLVDLERNDLGRVSRYGSVRVNEFMAIEKYSHVMHIVSNVQGELQ  358

TrpE   390  KGVHPVDALMSAFPAGTLTGAPKIRAMQLLQELEPTPRETYGGCIAYIGFDGNIDSCITI  449
             G   VD + + FP GT+TGAPK+R M++++ELEPT R  Y G I + G++ ++   I I
PabB   359  DGYDAVDIIHAVFPGGTITGAPKVRTMEIIEELEPTRRGLYTGSIGWFGYNHDLQFNIVI  418

TrpE   450  RTMSVKNGVASIQAGAGIVADSVPEAEYEESCNKAGALLKTIHIAED  496
            RT+    G A +Q+GAG+V DSVP+ EY+ES  KA A+ + + ++E+
PabB   419  RTIYATGGQAFMQSGAGVVIDSVPKHEYKESFKKAFAMQRALELSEE  465
```

Abbildung 5-19. Sequenzvergleich der Anthranilat-Synthase TrpE und der ADC-Synthase PabB von *B. subtilis.* Farblich markiert sind: die konservierten Aminosäuren der *active site* auf der Basis des *E. coli*-Enzyms, die komplett identisch sind zwischen TrpE und PabB (grün) und der wichtigste Rest der *active site* des *E. coli*-Enzyms, das sowohl bei TrpE als auch bei PabB Ala anstelle von Lys ist (rosa).

Wie bereits in Kapitel 5.3 beschrieben, entstehen Spuren von Anthranilat als Nebenprodukt der *B. subtilis* ADC-Synthase-Reaktion. Unklar ist jedoch, ob Anthranilat durch spontane Aromatisierung aus ADIC entsteht, oder ob diese Reaktion ebenfalls Enzym-katalysiert stattfindet. Um abzuschätzen, in welchem Verhältnis das von der ADC-Synthase gebildete Anthranilat zu dem von der Anthranilat-Synthase gebildeten Anthranilat steht, wurden sowohl die *B. subtilis* Anthranilat-Synthase als auch die *B. subtilis* ADC-Synthase in Anwesenheit von Ammoniumionen als Stickstoffquelle mit 5 mM Chorismat umgesetzt. Abbildung 5-20 zeigt die resultierende Zeit-Umsatz-Kurve. Bei der Inkubation beider Reaktionsansätze im gleichen Zeitraum unter gleichen Bedingungen (ca. 30 min bei 37°C) beträgt die Anthranilatmenge im Ansatz der ADC-Synthase-Reaktion etwa 5 % der Menge, die von der Anthranilat-Synthase gebildet wird.

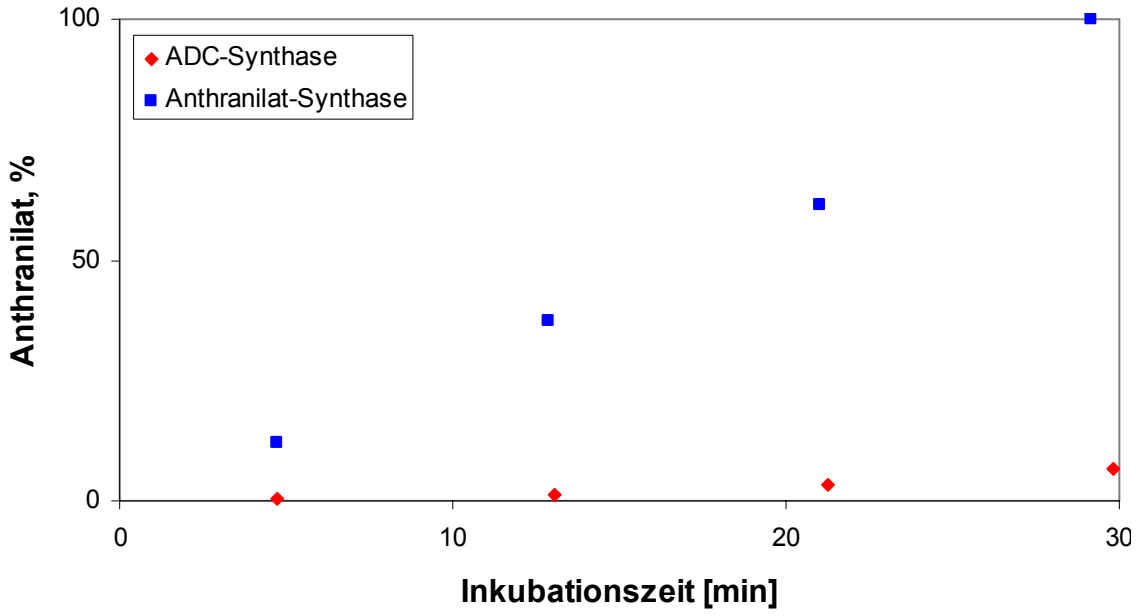


Abbildung 5-20. Vergleich der Zeit-Umsatz-Kurven der ADC-Synthase-Reaktion und der Anthranilat-Synthase-Reaktion bezogen auf die gebildete Menge an Anthranilat.

Interessanterweise werden bei der *B. subtilis* Anthranilat-Synthase-Reaktion, entgegen der für das *E. coli*-Enzym publizierten Aussage von Morollo *et al.* (1993), Spuren von ADIC gebildet, die freigesetzt werden und über LC-MS-MRM detektierbar sind. Hier wiederum beträgt die freigesetzte Menge an ADIC etwa 5% der Menge, die im gleichen Zeitraum und unter gleichen Bedingungen von der ADC-Synthase gebildet wird (Abbildung 5-21).

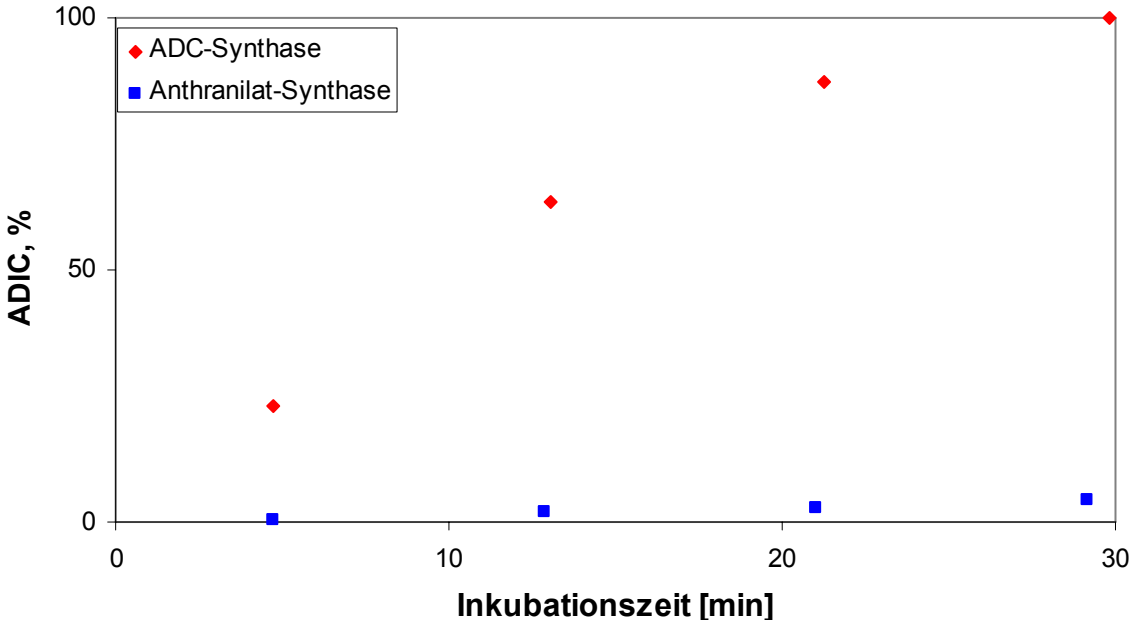


Abbildung 5-21. Vergleich der Zeit-Umsatz-Kurven der ADC-Synthase-Reaktion und der Anthranilat-Synthase-Reaktion bezogen auf die gebildete Menge an ADIC.

5.7.2 Untersuchungen zur Tryptophan-Abhängigkeit der *B. subtilis* ADC-Synthase

Für die *B. subtilis* Anthranilat-Synthase wurde eine Tryptophan-abhängige Regulation auf Proteinebene beschrieben (Nester *et al.*, 1966, Henner *et al.*, 1993, Gollnick *et al.*, 2005). Interessanterweise weist die Kristallstruktur von *E. coli* PabB ebenfalls ein Molekül Tryptophan auf, welches mit dem Protein co-kristallisierte (Parsons *et al.*, 2002). Allerdings konnte für die *E. coli* ADC-Synthase bisher keine Tryptophan-abhängige Regulation festgestellt werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob bei der *B. subtilis* ADC-Synthase eine Tryptophan-abhängige Regulation vorliegt. Denkbar wäre entweder eine Funktion von Tryptophan als allosterischer Aktivator, oder, infolge der Sequenzhomologie, eine Inhibition auch der ADC-Synthase. Zu diesem Zweck wurde eine Zeit-Umsatz-Kurve der ADC-Synthase-Reaktion in Anwesenheit von 200 mM Ammoniumionen und 5 mM Chorismat aufgenommen. Abbildung 5-22 zeigt sehr deutlich, dass bei Anwesenheit von 10 mM Tryptophan im Vergleich zur Kontrolle keine signifikante Änderung der Enzym-katalysierten ADIC-Bildung auftritt.

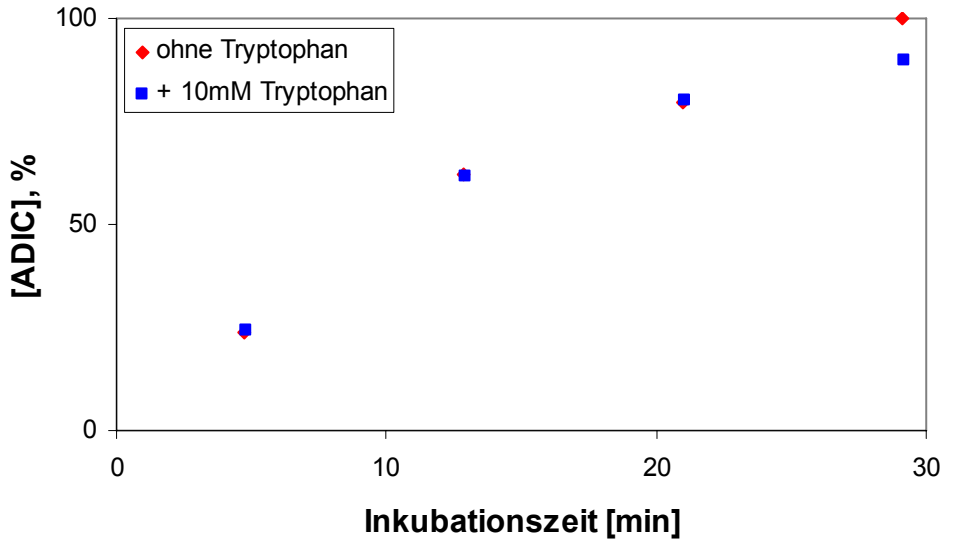


Abbildung 5-22. Abhängigkeit der *B. subtilis* ADC-Synthase-Reaktion von Tryptophan.

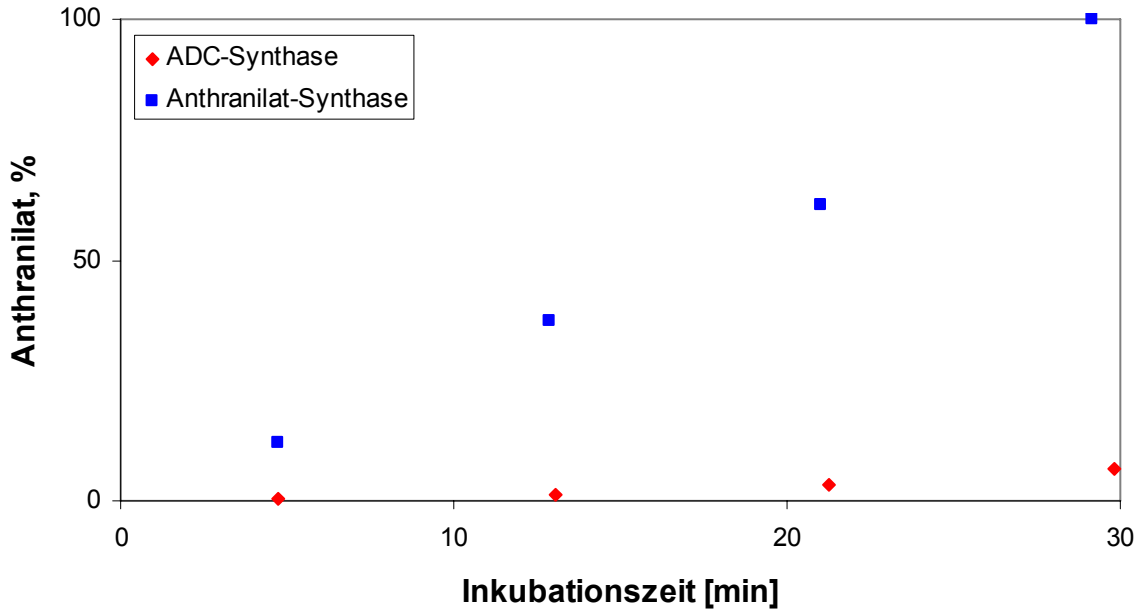


Abbildung 5-20. Vergleich der Zeit-Umsatz-Kurven der ADC-Synthase-Reaktion und der Anthranilat-Synthase-Reaktion bezogen auf die gebildete Menge an Anthranilat.

Interessanterweise werden bei der *B. subtilis* Anthranilat-Synthase-Reaktion, entgegen der für das *E. coli*-Enzym publizierten Aussage von Morollo *et al.* (1993), Spuren von ADIC gebildet, die freigesetzt werden und über LC-MS-MRM detektierbar sind. Hier wiederum beträgt die freigesetzte Menge an ADIC etwa 5% der Menge, die im gleichen Zeitraum und unter gleichen Bedingungen von der ADC-Synthase gebildet wird (Abbildung 5-21).

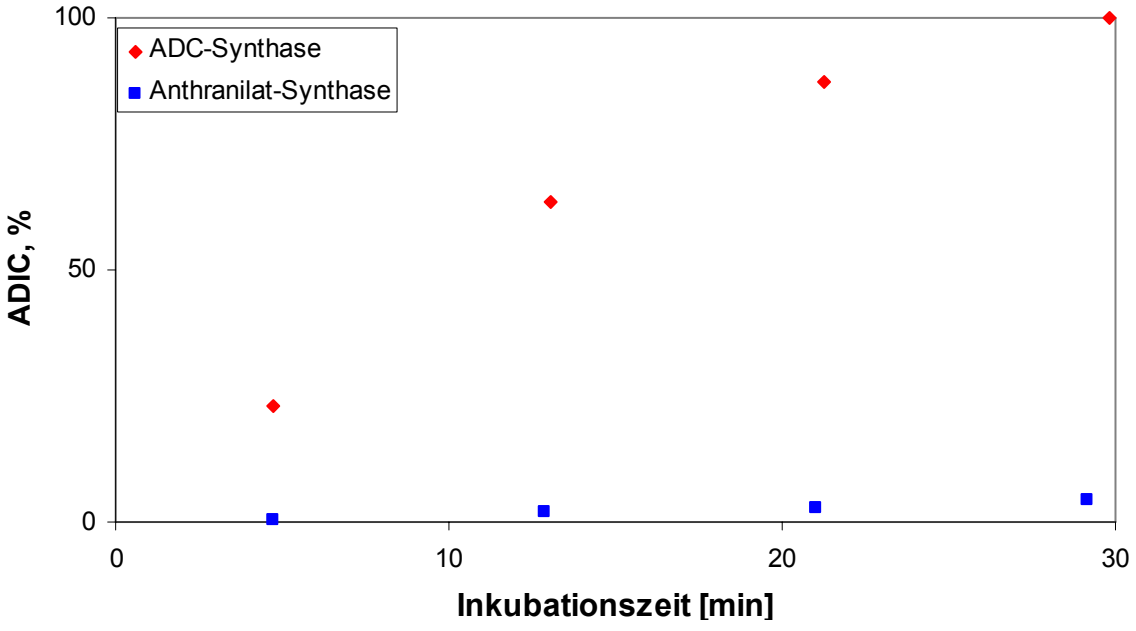


Abbildung 5-21. Vergleich der Zeit-Umsatz-Kurven der ADC-Synthase-Reaktion und der Anthranilat-Synthase-Reaktion bezogen auf die gebildete Menge an ADIC.

Die erhaltenen Peaks wurden mit der Analyst *Software* über den Algorithmus Analyst Classic quantifiziert. Die Bestimmung der absoluten *p*ABA-Konzentration erfolgte anhand einer Kalibriergerade von 0,1 µM bis 100 µM. Ein Beispiel für eine solche Kalibriergerade, die automatisch im Programm Analyst erstellt wurde, ist in Tabelle 5-2 bzw. Abbildung 5-24 dargestellt. An die Messwerte wurde die Gleichung $y = ax + b$ linear angepasst mit der Gewichtung $1/x^2$. Im abgebildeten Beispiel ergibt sich ein Bestimmtheitsmaß von 0,9989, die Voraussetzung der Linearität ist über den ganzen Messbereich gegeben. Die *Batch*validität wurde jeweils über Qualitätskontrollen sichergestellt. Als Akzeptanzkriterien wurde festgelegt, dass die *Inaccuracy* sowie die *Imprecision* bei 15 % oder weniger liegen müssen. Ein Beispiel für einen Satz Qualitätskontrollen ist in Tabelle 5-3 dargestellt.

Tabelle 5-2. Kalibriergerade von 0,1 µM bis 100 µM *p*ABA.

Sample Name	Sample Type	Analyte Peak Area (counts)	Analyte Peak Height (cps)	Analyte Concentration (µM)	Calculated Concentration (µM)	Accuracy (%)
C01	Standard	6.44E+05	4.56E+04	100	101	101
C02	Standard	3.24E+05	2.38E+04	50	51.0	102
C03	Standard	1.60E+05	1.21E+04	25	25.2	101
C04	Standard	6.77E+04	4.56E+03	10	10.6	106
C05	Standard	3.11E+04	2.31E+03	5	4.88	97.6
C06	Standard	1.52E+04	1.24E+03	2.5	2.38	95.4
C07	Standard	6.32E+03	5.34E+02	1	0.979	97.9
C08	Standard	3.40E+03	2.57E+02	0.5	0.520	104
C09	Standard	1.56E+03	1.27E+02	0.25	0.230	92
C10	Standard	7.50E+02	7.34E+01	0.1	0.103	103

Englische Begriffe wurden direkt aus dem Computerprogramm übernommen.

Tabelle 5-3. Qualitätskontrollen von 0,2 µM bis 20 µM *p*ABA

Sample Name	Sample Type	Analyte Peak Area (counts)	Analyte Peak Height (cps)	Analyte Concentration (µM)	Calculated Concentration (µM)	Accuracy (%)
QC01	Quality Control	1.37E+03	1.08E+02	0.2	0.2	100
QC02	Quality Control	1.30E+04	1.07E+03	2	2.04	102
QC03	Quality Control	1.29E+05	1.01E+04	20	20.3	102

Englische Begriffe wurden direkt aus dem Computerprogramm übernommen.

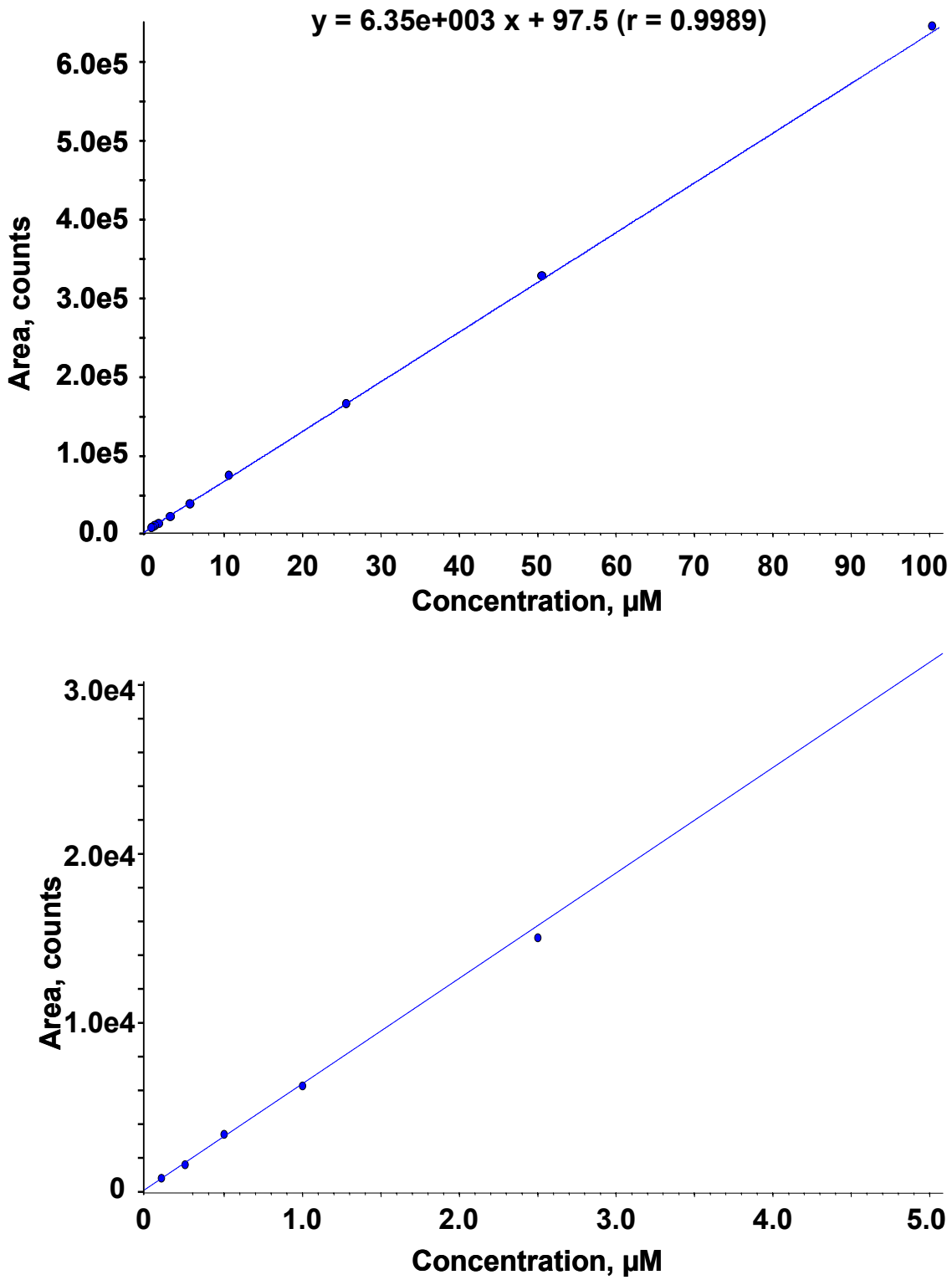


Abbildung 5-24. Kalibriergerade für *p*ABA von 0,1 µM bis 100 µM, im Programm *Analyst* erstellt durch *Linear Fit* an die Gleichung y = ax + b mit Gewichtung $1/x^2$. Der Messbereich von 0.1 µM bis 5 µM ist im unteren Teil der Abbildung herausvergrößert.

5.8.2 *E. coli* ADC-Synthase

Die Reaktionsprodukte der *E. coli* ADC-Synthase in Ammoniumsulfatpuffer wurden mit dem unter Abschnitt 5.8.1 beschriebenen *Assay*system quantifiziert. Die Ergebnisse der Quantifizierung der ADC-Synthase-Reaktion von *E. coli* sind in Tabelle 5-4 dargestellt.

Tabelle 5-4. Quantifizierung der *E. coli* ADC-Synthase-Reaktion.

Sample Name	Sample Type	Analyte Peak Area (counts)	Analyte Peak Height (cps)	Calculated Concentration (µM)
AS_2.5mM_t1	Unknown	2.28E+04	1.23E+03	19.0
AS_2.5mM_t2	Unknown	4.46E+04	2.53E+03	36.9
AS_2.5mM_t3	Unknown	6.64E+04	3.35E+03	54.9
AS_2.5mM_t4	Unknown	8.85E+04	5.21E+03	73.2
AS_1.25mM_t1	Unknown	2.20E+04	1.36E+03	18.3
AS_1.25mM_t2	Unknown	4.01E+04	2.49E+03	33.3
AS_1.25mM_t3	Unknown	6.74E+04	3.52E+03	55.8
AS_1.25mM_t4	Unknown	8.90E+04	4.91E+03	73.7
AS_0.625mM_t1	Unknown	2.08E+04	1.27E+03	17.3
AS_0.625mM_t2	Unknown	4.06E+04	2.23E+03	33.7
AS_0.625mM_t3	Unknown	5.94E+04	3.15E+03	49.2
AS_0.625mM_t4	Unknown	8.23E+04	3.94E+03	68.1
AS_0.3125mM_t1	Unknown	2.09E+04	1.15E+03	17.4
AS_0.3125mM_t2	Unknown	4.05E+04	2.45E+03	33.5
AS_0.3125mM_t3	Unknown	6.63E+04	3.62E+03	54.9
AS_0.3125mM_t4	Unknown	8.91E+04	5.21E+03	73.7
AS_0.15625mM_t1	Unknown	1.92E+04	1.01E+03	16.0
AS_0.15625mM_t2	Unknown	3.93E+04	2.14E+03	32.6
AS_0.15625mM_t3	Unknown	5.26E+04	2.78E+03	43.6
AS_0.15625mM_t4	Unknown	7.11E+04	3.49E+03	58.8
AS_0.078125mM_t1	Unknown	1.84E+04	8.28E+02	15.3
AS_0.078125mM_t2	Unknown	2.71E+04	1.23E+03	22.5
AS_0.078125mM_t3	Unknown	3.53E+04	1.95E+03	29.3
AS_0.078125mM_t4	Unknown	3.43E+04	1.85E+03	28.5
AS_0.0390625mM_t1	Unknown	1.11E+04	7.17E+02	9.3
AS_0.0390625mM_t2	Unknown	1.62E+04	9.08E+02	13.5
AS_0.0390625mM_t3	Unknown	1.58E+04	9.61E+02	13.2
AS_0.0390625mM_t4	Unknown	1.49E+04	8.72E+02	12.4

Englische Begriffe wurden direkt aus dem Computerprogramm übernommen.

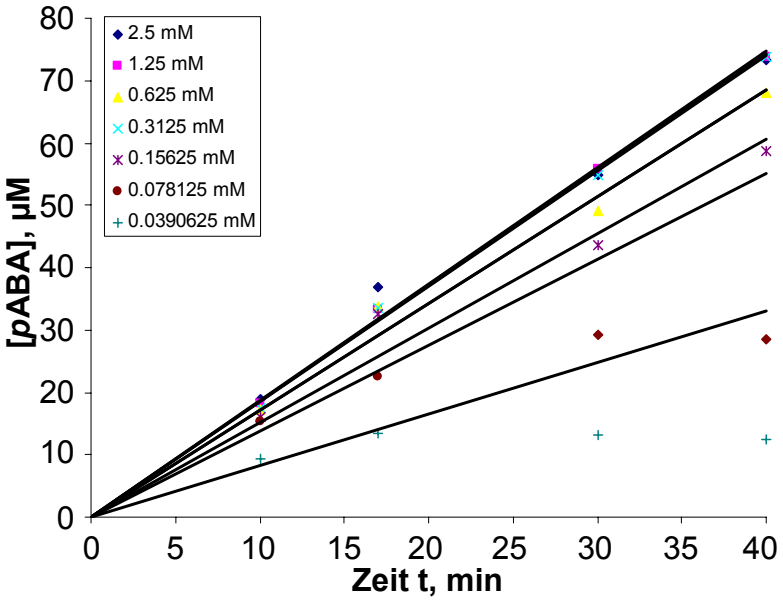


Abbildung 5-25. Zeit-Umsatz-Kurven der ADC-Synthase von *E. coli* bei verschiedenen Substratkonzentrationen mit linearer Kurvenanpassung zur Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeiten.

Für die Berechnung der *Steady State*-Konstanten müssen zunächt die Anfangsgeschwindigkeiten der Reaktion bei unterschiedlichen Chorismatkonzentrationen ermittelt werden (Abbildung 5-25). Zur Berechnung können nur die Bereiche linearer Anfangsgeschwindigkeiten berücksichtigt werden. Bei den niedrigen Substratkonzentrationen ist diese Voraussetzung nur für die ersten beiden Zeitpunkte erfüllt, wie in Abbildung 5-25 zu sehen ist.

Werden die Anfangsgeschwindigkeiten gegen die Substratkonzentration aufgetragen, so resultiert daraus eine hyperbole Kurve. Diese hyperbole Kurve wurde mittels *Origin Software* (Massachusetts, USA) nichtlinear an die Henri-Michaelis-Menten-Gleichung (Gleichung 5-3) angepasst (Abbildung 5-26):

$$v = \frac{V_{\max}[S]}{K_M + [S]}$$

Gleichung 5-3. Henri-Michaelis-Menten-Gleichung

$$\text{mit } V_{\max} = [E] \cdot k_{cat}$$

Gleichung 5-4

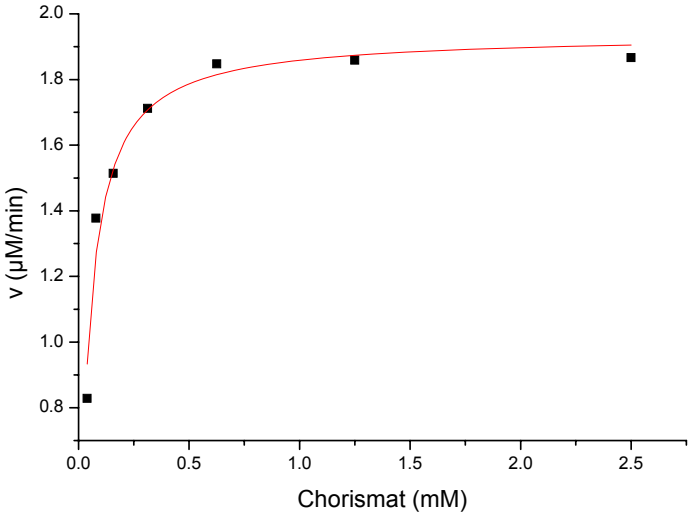


Abbildung 5-26. Henri-Michaelis-Menten-Kurve der ADC-Synthase von *E. coli* zur Bestimmung der *Steady-State*-Parameter K_M und k_{cat}.

Daraus errechnen sich folgende Ergebnisse für die *Steady State*-Konstanten:

$K_M = 42 \pm 5.56$ µM

$V_{max} = 1.93677 \pm 0.0463$ µM/min

$k_{cat} = 0.08$ sec^{-1}

5.8.3 *B. subtilis* ADC-Synthase

Die Reaktion der *B. subtilis* ADC-Synthase wurde sowohl in Ammoniumsulfatpuffer als auch in Glutaminpuffer durchgeführt. Bei der Reaktion mit NH_4^+ als Stickstoffquelle wird nur die Reaktion der großen Untereinheit PabB betrachtet, während die Reaktion mit Glutamin als Stickstoffquelle der Reaktion *in vivo* näher kommt, da hier auch die Reaktion der Glutamin-Amidotransferase PabA, die zunächst Glutamin in Glutamat und Ammoniak spaltet, berücksichtigt wird. Wie im Falle des *E. coli*-Enzyms wurde auch hier die Reaktion mit der ADC-Lyase gekoppelt, so dass *p*ABA entstand, das über MRM-Massenspektrometrie quantifiziert werden kann. Die Ergebnisse der Quantifizierung der ADC-Synthase-Reaktion von *B. subtilis* sind in Tabelle 5-5 und Tabelle 5-6 dargestellt.

Tabelle 5-5. Quantifizierung der *B. subtilis* ADC-Synthase-Reaktion in Ammoniumsulfat-puffer.

Sample Name	Sample Type	Analyte Peak Area (counts)	Analyte Peak Height (cps)	Calculated Concentration (µM)
AS_2.5mM_t1	Unknown	5.10E+03	3.51E+02	0.623
AS_2.5mM_t2	Unknown	7.95E+03	3.63E+02	0.956
AS_2.5mM_t3	Unknown	1.89E+04	1.10E+03	2.23
AS_2.5mM_t4	Unknown	2.74E+04	1.90E+03	3.22
AS_1.25mM_t1	Unknown	4.56E+03	2.37E+02	0.561
AS_1.25mM_t2	Unknown	8.04E+03	4.29E+02	0.966
AS_1.25mM_t3	Unknown	2.01E+04	1.32E+03	2.37
AS_1.25mM_t4	Unknown	2.46E+04	1.44E+03	2.89
AS_0.625mM_t1	Unknown	3.74E+03	2.07E+02	0.466
AS_0.625mM_t2	Unknown	6.92E+03	4.18E+02	0.836
AS_0.625mM_t3	Unknown	1.60E+04	8.86E+02	1.89
AS_0.625mM_t4	Unknown	2.10E+04	1.29E+03	2.48
AS_0.3125mM_t1	Unknown	3.24E+03	1.89E+02	0.407
AS_0.3125mM_t2	Unknown	5.77E+03	3.58E+02	0.702
AS_0.3125mM_t3	Unknown	1.11E+04	7.08E+02	1.33
AS_0.3125mM_t4	Unknown	1.33E+04	7.66E+02	1.58
AS_0.15625mM_t1	Unknown	1.62E+03	1.01E+02	0.218
AS_0.15625mM_t2	Unknown	3.22E+03	2.03E+02	0.405
AS_0.15625mM_t3	Unknown	4.97E+03	2.95E+02	0.608
AS_0.15625mM_t4	Unknown	4.76E+03	2.74E+02	0.584
AS_0.078125mM_t1	Unknown	1.01E+03	4.80E+01	0.148
AS_0.078125mM_t2	Unknown	1.80E+03	1.10E+02	0.239
AS_0.078125mM_t3	Unknown	3.55E+03	1.92E+02	0.443
AS_0.078125mM_t4	Unknown	5.62E+03	3.69E+02	0.685
AS_0.0390625mM_t1	Unknown	3.45E+02	2.22E+01	0.0695
AS_0.0390625mM_t2	Unknown	1.02E+03	6.08E+01	0.148
AS_0.0390625mM_t3	Unknown	2.09E+03	1.30E+02	0.272
AS_0.0390625mM_t4	Unknown	2.77E+03	1.74E+02	0.352

Englische Begriffe wurden direkt aus dem Computerprogramm übernommen.

Tabelle 5-6. Quantifizierung der *B. subtilis* ADC-Synthase-Reaktion in Glutaminpuffer.

Sample Name	Sample Type	Analyte Peak Area (counts)	Analyte Peak Height (cps)	Calculated Concentration (µM)
QT_2.5mM_t1	Unknown	5.81E+03	4.22E+02	0.709
QT_2.5mM_t2	Unknown	1.28E+04	6.98E+02	1.54
QT_2.5mM_t3	Unknown	2.71E+04	1.54E+03	3.25
QT_2.5mM_t4	Unknown	3.48E+04	2.28E+03	4.16
QT_1.25mM_t1	Unknown	6.64E+03	4.04E+02	0.663
QT_1.25mM_t2	Unknown	1.25E+04	7.17E+02	1.28
QT_1.25mM_t3	Unknown	2.47E+04	1.52E+03	2.47
QT_1.25mM_t4	Unknown	3.26E+04	1.93E+03	4.52
QT_0.625mM_t1	Unknown	5.00E+03	3.06E+02	0.613
QT_0.625mM_t2	Unknown	9.37E+03	6.75E+02	1.13
QT_0.625mM_t3	Unknown	1.93E+04	1.18E+03	2.31
QT_0.625mM_t4	Unknown	2.71E+04	1.60E+03	3.24
QT_0.3125mM_t1	Unknown	3.36E+03	1.98E+02	0.418
QT_0.3125mM_t2	Unknown	6.57E+03	4.15E+02	0.799
QT_0.3125mM_t3	Unknown	1.11E+04	8.48E+02	1.34
QT_0.3125mM_t4	Unknown	1.61E+04	1.20E+03	1.94
QT_0.15625mM_t1	Unknown	7.96E+02	9.86E+01	0.112
QT_0.15625mM_t2	Unknown	2.14E+03	2.43E+02	0.273
QT_0.15625mM_t3	Unknown	8.88E+03	6.14E+02	1.07
QT_0.15625mM_t4	Unknown	1.42E+04	7.84E+02	1.71
QT_0.078125mM_t1	Unknown	7.81E+02	6.00E+01	0.11
QT_0.078125mM_t2	Unknown	1.45E+03	1.18E+02	0.189
QT_0.078125mM_t3	Unknown	4.52E+03	3.48E+02	0.556
QT_0.078125mM_t4	Unknown	6.57E+03	4.60E+02	0.800
QT_0.0390625mM_t1	Unknown	2.87E+02	2.15E+01	0.0515
QT_0.0390625mM_t2	Unknown	9.74E+02	7.01E+01	0.133
QT_0.0390625mM_t3	Unknown	1.98E+03	1.57E+02	0.253
QT_0.0390625mM_t4	Unknown	3.21E+03	2.12E+02	0.400

Englische Begriffe wurden direkt aus dem Computerprogramm übernommen.

Für die Berechnung der *Steady State*-Konstanten wurden wie bereits oben aufgeführt die Anfangsgeschwindigkeiten der Reaktion ermittelt, wobei nur der lineare Bereich berücksichtigt wurde. Anschließend wurden die so ermittelten Anfangsgeschwindigkeiten gegen die Substratkonzentration aufgetragen. Die erhaltenen hyperbolen Kurven wurden mittels *Origin Software* (Massachusetts, USA) nichtlinear an die Henri-Michaelis-Menten-Gleichung angepasst (Abbildung 5-27 und Abbildung 5-28). Daraus errechnen sich folgende Ergebnisse für die *Steady State* Konstanten in Ammoniumsulfatpuffer und in Glutaminpuffer:

Ammoniumsulfatpuffer:

K_M = 379.20 ± 58.21 µM

V_{max} = 0.09092 ± 0.00468µM/min

k_{cat} = 0.004 sec^{-1}

Glutaminpuffer:

K_M = 419.56 ± 57.14 µM

V_{max} = 0.12397 ± 0.00582 µM/min

k_{cat} = 0.005 sec^{-1}

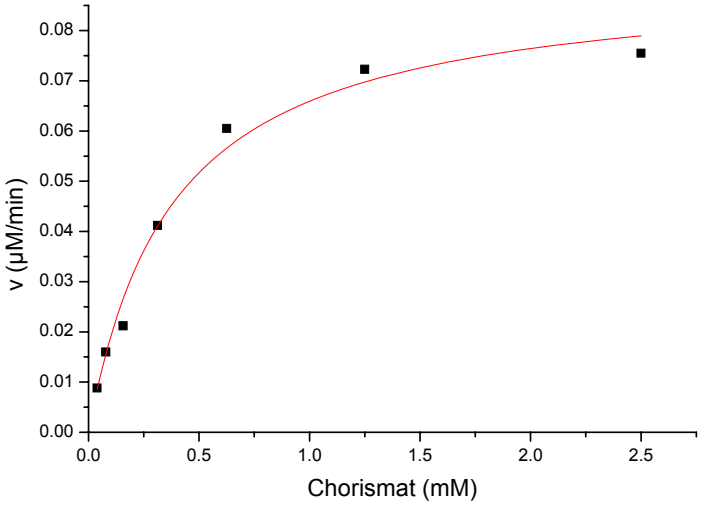


Abbildung 5-27. Henri-Michaelis-Menten-Kurve der ADC-Synthase-Reaktion von *B. subtilis* in Ammoniumsulfatpuffer zur Bestimmung der *Steady-State*-Parameter K_M und k_{cat}.

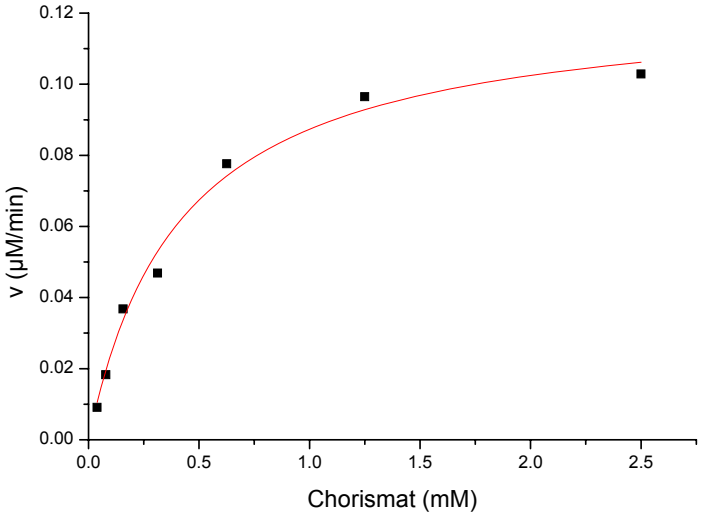


Abbildung 5-28. Henri-Michaelis-Menten-Kurve der ADC-Synthase-Reaktion von *B. subtilis* in Glutaminpuffer zur Bestimmung der *Steady-State*-Parameter K_M und k_{cat}.

6 Diskussion

6.1 Katalysemechanismus der *B. subtilis* ADC-Synthase

Die Biosynthese der *para*-Aminobenzoesäure (*p*ABA) erfolgt bei Mikroorganismen und Pflanzen ausgehend von Chorismat in zwei Schritten (Abbildung 6-1): In einem ersten Schritt wird Chorismat durch die Aminodesoxychorismat-Synthase (ADC-Synthase), die sich als Heterodimer aus den beiden Untereinheiten PabA und PabB zusammensetzt, zu 4-Amino-4-desoxychorismat (ADC) umgewandelt. PabA ist eine Glutamin-Amidotransferase und liefert die Stickstoffquelle für die Aminierung des Chorismats, indem sie die Umwandlung von Glutamin zu Glutamat katalysiert, wodurch der Stickstoff aus der funktionellen Amid-Gruppe des Glutamins freigesetzt wird. Die Untereinheit PabB überträgt diesen Stickstoff auf Chorismat wodurch 4-Amino-4-desoxychorismat entsteht. Anstelle von Glutamin kann *in vitro* auch Ammoniak als Stickstoffquelle für die Reaktion benutzt werden.
In einem zweiten Schritt wird 4-Amino-4-desoxychorismat unter Abspaltung von Pyruvat zur *para*-Aminobenzoesäure aromatisiert. Diese Reaktion wird durch die Aminodesoxychorismat-Lyase (ADC-Lyase) oder auch PabC genannt, katalysiert und benötigt als Cofaktor Pyridoxal-5'-phosphat.

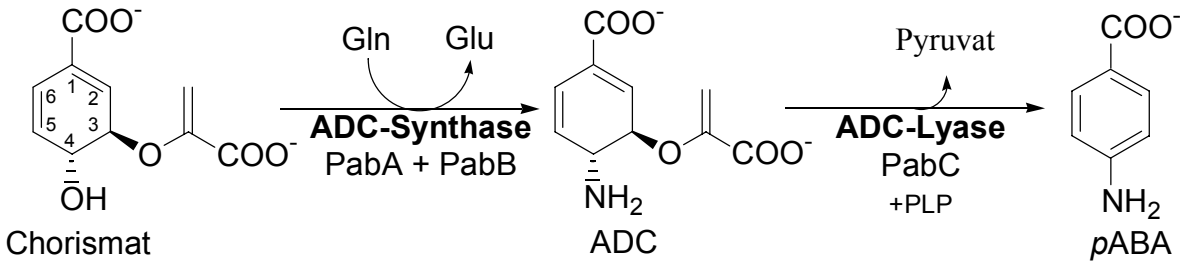


Abbildung 6-1. Schematische Darstellung der *p*ABA-Biosynthese.

6.1.1 Der Katalysemechanismus der ADC-Synthase bei *E. coli* nach Bartlett

Einen der ersten Hinweise zu einem möglichen Katalysemechanismus der ADC-Synthase von *E. coli* lieferten die Arbeiten der Gruppe um P. Bartlett 1995 (Kozlowski *et al*., 1995). Basis der Arbeit waren drei synthetische Inhibitoren (Abbildung 6-2), anhand derer Inhibitionsstudien mit den *E. coli*-Enzymen Isochorismat-Synthase (IS), Anthranilat-Synthase und ADC-Synthase durchgeführt wurden. Aufgrund der hohen Sequenzhomologie dieser drei Enzyme nimmt man an, dass diese aus einem gemeinsamen Vorläufer entstanden und evolutionär verwandt sind.

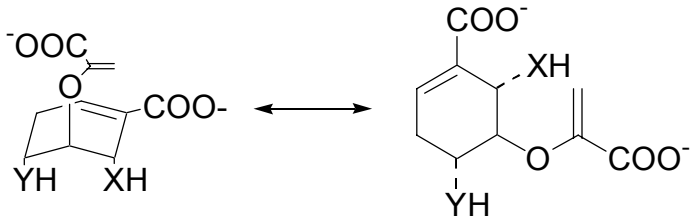


Abbildung 6-2. Synthetische Inhibitoren der *E. coli*-Enzyme IS, AS und ADC-Synthase der Gruppe von Bartlett (Kozlowski *et al*., 1995).1: X=Y=O; 2: X= NH_2^+ , Y=O; 3: X=O, Y= NH_2^+ .

Alle drei Verbindungen inhibieren die Isochorismat-Synthase und die Anthranilat-Synthase, wobei die beiden isomeren Aminoalkohol-Inhibitoren (**2**) und (**3**) ein deutlich höheres Inhibitionspotential als Inhibitor (**1**) zeigen. Das Reaktionsprodukt der Isochorismat-Synthase, Isochorismat, ist bis auf die Substitution der Hydroxygruppe durch eine Aminogruppe komplett identisch mit dem Zwischenprodukt der Anthranilat-Synthase, 2-Amino-2-desoxyisochorismat (ADIC), welches jedoch nicht freigesetzt, sondern sofort weiter zu Anthranilat aromatisiert wird (Morollo *et al*. 1993) (Abbildung 6-3). Interessanterweise waren die drei getesteten Substratanaloga jedoch nur schlechte Inhibitoren für die ADC-Synthase.

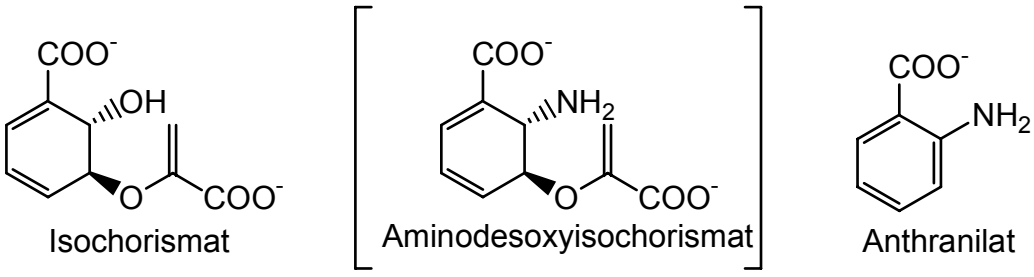


Abbildung 6-3. Strukturen von Isochorismat, Aminodesoxyisochorismat und Anthranilat.

Tabelle 6-1. Inhibitionskonstanten der synthetischen Inhibitoren (1), (2), (3) (Kozlowski *et al*., 1995).

	Ligand		
	(**1**), K_i	(**2**), K_i	(**3**), K_i
Isochorismat-Synthase	0,36 µM	0,053 µM	0,45 µM
Anthranilat-Synthase	195 µM	0,62 µM	6,3 µM
ADC-Synthase	124 µM	635 µM	38 µM

Eine Vielzahl von möglichen Mechanismen wurde bis zum heutigen Zeitpunkt für die Reaktionen der Anthranilat-Synthase, Isochorismat-Synthase und ADC-Synthase in Betracht gezogen (Abbildung 6-4 und Abbildung 6-5) (Kozlowski *et al*., 1995, Walsh *et al*., 1990, He *et al*, 2004). Möglichkeit A (Abbildung 6-4) sieht eine direkte Substitution der C4-

Hydroxygruppe des Chorismats durch den einzuführenden Substituenten an Position C2 vor, wobei der Reaktant durch ein Magnesiumion koordiniert wird. Dieser Vorgang kann entweder konzertiert über eine Abspaltung der C4-Hydroxygruppe bei gleichzeitiger Bildung der C2-Bindung zum Substituenten erfolgen, oder aber schrittweise durch Abspaltung der Bindung zur C4-Hydroxygruppe und anschließender Bindungsbildung zum C2-Substituenten bzw. *vice versa*.

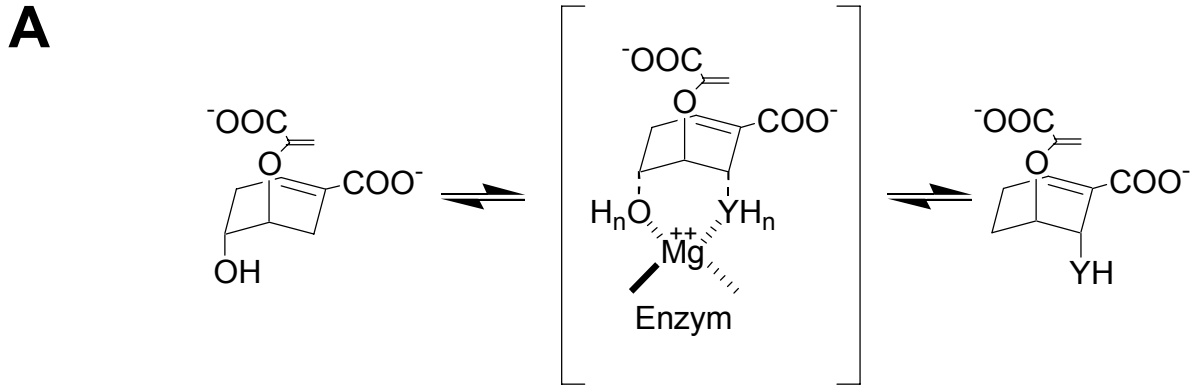


Abbildung 6-4. Von den Gruppen P. Bartlett und C. Walsh diskutierten möglicher Mechanismus für die Reaktionen der Anthranilat-Synthase, Isochorismat-Synthase und ADC-Synthase (Kozlowski *et al*., 1995, Walsh *et al*., 1990). Möglichkeit A sieht eine Substitution der C4-Hydroxygruppe des Chorismats durch den C2-Substituenten vor, wobei dieser Vorgang entweder konzertiert ablaufen kann, d.h. Bildung der Bindung zum Substituenten an C2 bei gleichzeitiger Abspaltung der C4-Hydroxygruppe, oder aber schrittweise, über einen Übergangszustand mit kationischem Charakter des Ringsystems (zuerst Abspaltung der C4-Hydroxygruppe mit anschließender Bildung der Bindung zum C2-Substituenten) bzw. anionischem Charakter (zuerst Bildung der C2-Bindung zum Substituenten, Delokalisierung der Ladung in die Carboxylgruppe, und anschließender Abspaltung der C4-Hydroxygruppe). In allen Fällen wird der Reaktant über Magnesium koordiniert.

Möglichkeit B (Abbildung 6-5) geht von einem sequentiellen Mechanismus über einen transienten nukleophilen Angriff auf das C6-Kohlenstoffatom von Chorismat aus, wobei das Nukleophil eine gebundene prosthetische Gruppe oder Seitenkette des Enzyms, die Carboxylatgruppe der Enolpyruvyl-Seitenkette von Chorismat selbst, oder Wasser sein könnte. In einem zweiten Schritt erfolgt erneut ein nukleophiler Angriff des einzuführenden Substituenten an Position 2 (ADIC oder Isochorismat) oder Position 4 (ADC).

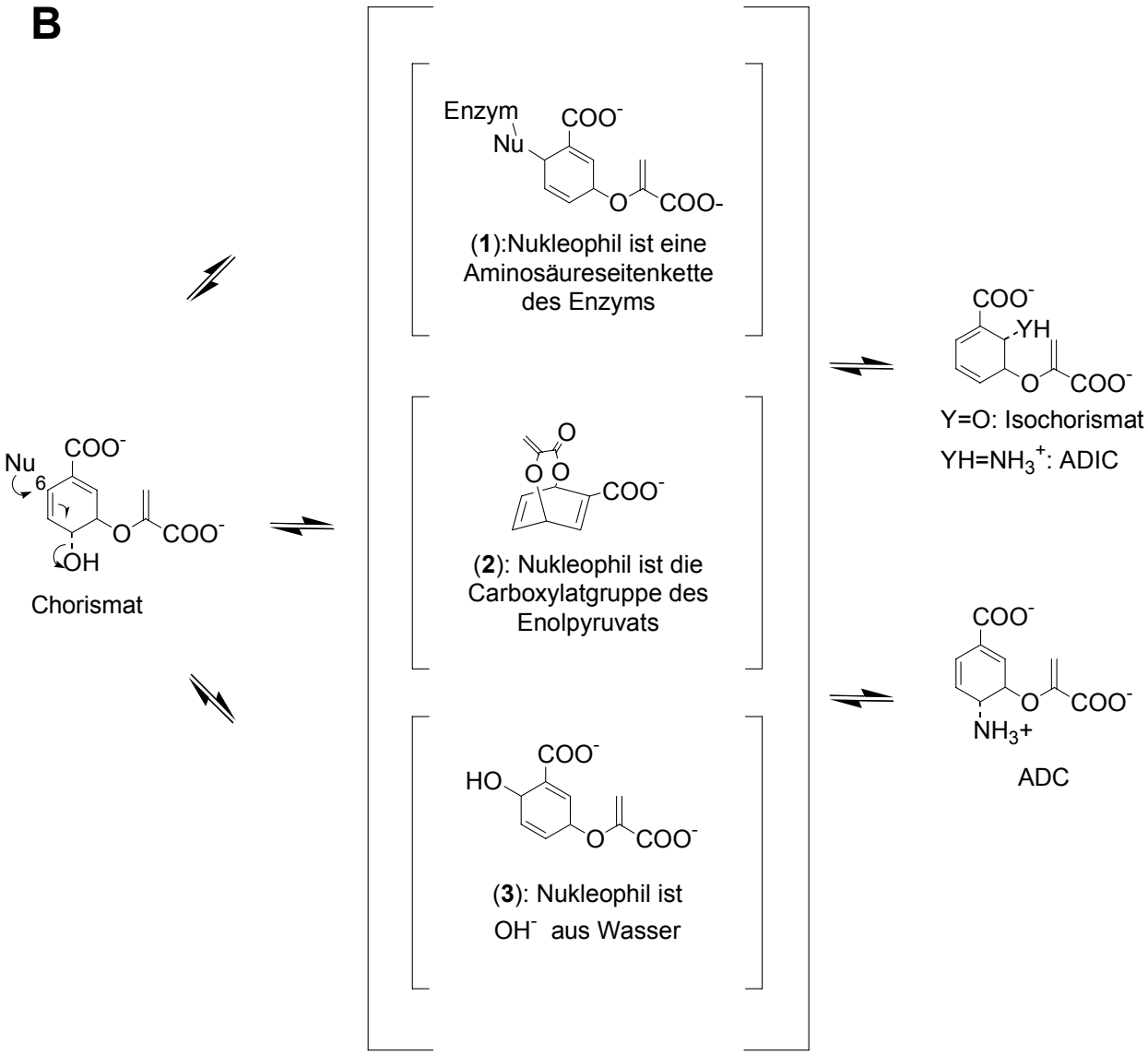


Abbildung 6-5. Möglicher sequentielle Mechanismus für die Reaktionen der Anthranilat-Synthase, Isochorismat-Synthase und ADC-Synthase, wie er von den Gruppen P. Bartlett und C. Walsh diskutiert wurde (Kozlowski *et al.*, 1995, Walsh *et al.*, 1990). Hierbei wird Chorismat zunächst nukleophil an C6-Position angegriffen, wobei als Nukleophil das Enzym selbst über eine nukleophile Seitenkette in Frage kommen könnte (1), die Carboxylatgruppe der Enolpyruvyl-Seitenkette von Chorismat (2) oder aber OH^- aus Wasser (3). In einem zweiten Schritt erfolgt erneut ein nukleophiler Angriff von NH_3 an C4- (ADC) bzw. C2- Position (ADIC) oder aber von OH^- an Position C2, wodurch Isochorismat entsteht.

Aufgrund des vergleichbaren Inhibitionspotentials der isomeren Aminoalkohol-Inhibitoren (**2**) und (**3**) (Abbildung 6-2) und deren hohe Affinität zur Anthranilat-Synthase und Isochorismat-Synthase vermuteten Kozlowski *et al*. (1995), dass diese Substratanaloga als Mimetikum eines symmetrischen oder quasi-symmetrischen Übergangszustandes fungieren, wie er entsprechend Abbildung 6-4 auftreten würde. Aus diesem Grunde erschien den Autoren Vorschlag A als der wahrscheinlichere für den Katalysemechanismus der

Anthranilat-Synthase und der Isochorismat-Synthase. Die Magnesiumabhängigkeit der Reaktion konnte dadurch außerdem erklärt werden.

Von allen drei Inhibitoren (Abbildung 6-2), die nur eine moderate Hemmwirkung auf die ADC-Synthase besaßen, zeigte das 4-Amino-Isomer (**3**) ein etwas höheres Inhibitionspotential. Durch die nur moderate Aktivität dieser an Position 2 und 4 substituierten Inhibitoren wurde ein Mechanismus für die ADC-Synthase auf Basis von Möglichkeit A (Abbildung 6-4) als unwahrscheinlich angesehen. Die Beobachtungen sprachen vielmehr für einen sequentiellen Mechanismus wie er in Abbildung 6-5 vorgeschlagen wurde. Grundlage hierfür wäre der Angriff eines Nukleophils an Position 6 von Chorismat, was die nur moderate Hemmwirkung der an Position 2 und 4 substituierten Inhibitoren erklären könnte. In einem zweiten Schritt würde ein weiterer nukleophiler Angriff auf C4 des entsprechenden Chorismat-Intermediats erfolgen. Die größere Ähnlichkeit von Inhibitor (**3**) zu ADC sowie dessen höhere Affinität zur ADC-Synthase würde ebenfalls für einen solchen Mechanismus sprechen.

6.1.2 Der Katalysemechanismus der ADC-Synthase bei *E. coli* nach Toney und Abell

Weitere Studien zum Reaktionsmechanismus der *E. coli* ADC-Synthase mit synthetischen Inhibitoren folgten 2004 von den Arbeitsgruppen um M.D. Toney und P. Bartlett (He *et al*., 2004). Um den von Kozlowski *et al*. (1995) für die ADC-Synthase favorisierten Katalysemechanismus (Abbildung 6-4 B), welcher von einem nukleophilen Angriff auf Position 6 des Chorismats ausgeht, genauer zu untersuchen, setzte die Gruppe synthetische Chorismat- und Aminodesoxychorismat-Analoga ein, die zusätzlich an Position 6 durch eine Hydroxygruppe substituiert waren (Abbildung 6-6).

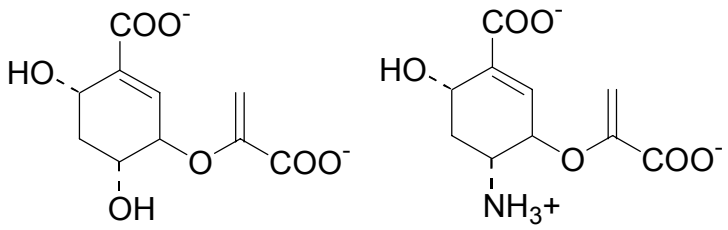


Abbildung 6-6. Weitere synthetische Inhbitioren, die zusätzlich an Position 6 durch eine Hydroxygruppe substituiert sind (Quelle: He *et al.*, 2004).

Überraschenderweise zeigten diese Inhibitoren nur eine geringe kompetitive Hemmwirkung auf die ADC-Synthase mit K_i-Werten im millimolaren Bereich (K_i >1000 µM bzw. K_i>500 µM) (He *et al*., 2004). Der von der Bartlett-Gruppe eingesetzte Inhibitor (**3**), welcher von den Autoren nur als moderater Hemmstoff bezeichnet wurde, hatte dagegen eine Inhibitionskonstante K_i im unteren mikromolaren Bereich (K_i=38 µM nach Kozlowski *et al*., 1995 bzw. K_i=5,6 µM nach He *et al*., 2004) und zeigte somit tatsächlich ein höheres Hemmpotential als die an C6 substituierten Inhibitoren.

Durch *Modelling* von Chorismat in die überlagerten Kristallstrukturen der *E. coli* ADC-Synthase und Anthranilat-Synthase und basierend auf Mutagenesestudien wurde von He *et al*. 2004 ein für die ADC-Synthase, Anthranilat-Synthase und Isochorismat-Synthase einheitliches Reaktionprinzip abgeleitet. Dabei wird bei allen drei Enzymen die Reaktion durch Addition von Stickstoff- oder Sauerstoff-Nukleophilen an C2 von Chorismat initiiert (Abbildung 6-7). Bei der Anthranilat-Synthase fungiert Ammoniak als Nukleophil, bei der Isochorismat-Synthase Wasser. Bei der *E. coli* ADC-Synthase befindet sich im aktiven Zentrum des Enzyms dagegen ein Lysin, Lys-274, dessen ε-Aminogruppe nukleophil an C2 des Chorismats addiert wird. Anschließend divergieren die Reaktionen und es entstehen die für jedes Enzym spezifischen Endprodukte: bei der Anthranilat-Synthase durch Eliminierung von Pyruvat Anthranilat, die Isochorismat-Synthase setzt das gebildete Produkt Isochorismat

frei und die ADC-Synthase katalysiert eine zweite S_N2-Reaktion, wodurch Aminodesoxychorismat gebildet wird (Abbildung 6-7).

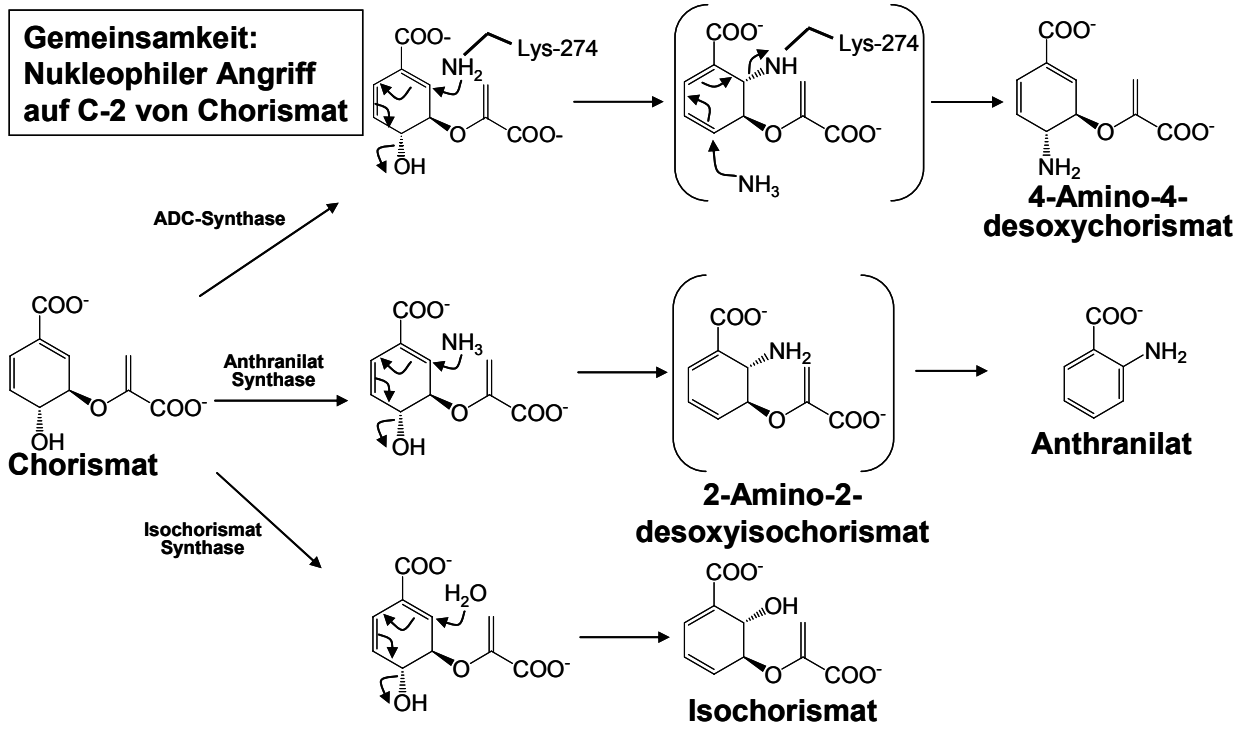


Abbildung 6-7. Einheitliche Reaktionsprinzip der Anthranilat-Synthase, Isochorismat-Synthase und ADC-Synthase nach He *et al*., 2004. Bei allen drei Enzymen wird die Reaktion durch Addition von Stickstoff- oder Sauerstoff-Nukleophilen an C2 von Chorismat initiiert. Bei der Anthranilat-Synthase fungiert Ammoniak als Nukleophil, bei der Isochorismat-Synthase Wasser, bei der ADC-Synthase die ε-Aminogruppe von Lysin 274.

Durch den von He *et al*. 2004 vorgeschlagenen Reaktionsmechanismus für die *E. coli* ADC-Synthase war auch die von Anderson *et al*. 1991 publizierte Retention der Stereochemie bei der Substitution der C4-Hydroxygruppe des Chorismats durch die Aminogruppe erklärbar. Kurz darauf lieferte die Arbeitsgruppe von C. Abell (Bulloch *et al*., 2004) anhand von Inhibitionsstudien mit dem irreversiblen Inhibitor 2-Fluorochorismat weitere Belege für den von He *et al*. postulierten Reaktionsmechanismus. Dabei wird 2-Fluorochorismat als Chorismat-Mimetikum an C2-Position nukleophil von Lys-274 der ADC-Synthase angegriffen, wodurch die C4-Hydroxygruppe eliminiert wird und zunächst ein fluoriertes Addukt entsteht. Durch Eliminierung der guten Abgangsgruppe Fluor in Form von Fluorwasserstoff bildet sich ein aromatisches System, welches kovalent an Lys-274 gebunden bleibt und somit als irreversibler Inhibitor fungiert. Durch ESI-MS-Experimente konnte das kovalent gebundene aromatische Addukt über eine Massendifferenz von 206.1 Da im Vergleich zur nativen ADC-Synthase bestätigt werden (Abbildung 6-8).

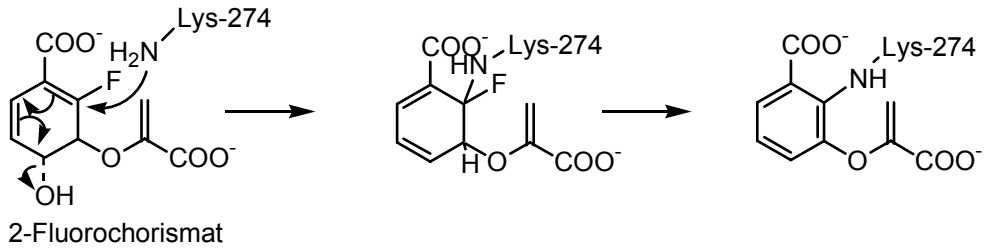


Abbildung 6-8. Bindung des Substratmimetikums 2-Fluorochorismat an Lys-274 der ADC-Synthase von *E. coli* durch nukleophilen Angriff der ε-Aminogruppe an C2 von Fluorochorismat. Während bei der Umsetzung von Chorismat die ε-Aminogruppe des Lysins als Abgangsgruppe fungiert, ist in diesem Fall Fluor bevorzugt, sodass sich ein aromatisches System bildet, welches kovalent an Lys-274 gebunden bleibt.

Den abschließenden Beweis für die Richtigkeit dieses Reaktionsmechanismus wurde schließlich erneut von den Gruppen um C. Abell (Bulloch *et al*., 2005) und M.D. Toney (He *et al*., 2006) erbracht. Beide generierten eine *E. coli* PabB-Mutante, bei der Lys-274 zu einem Ala mutiert wurde. Durch Analyse des intakten PabB*Wildtyp*-Proteins und der PabB K274A-Mutante über ESI-MS-Experimente vor und nach Inkubation mit Chorismat konnte eindeutig ein an Lys-274 kovalent gebundenes Chorismat-Enzym-Intermediat über eine Massendifferenz von 208 Da nachgewiesen werden (Abbildung 6-9). Diese Ergebnisse konnten im Zuge der vorliegenden Arbeit ebenfalls experimentell reproduziert werden. Für den Katalysemechanismus der *E. coli* ADC-Synthase ergibt sich folgendes Schema:

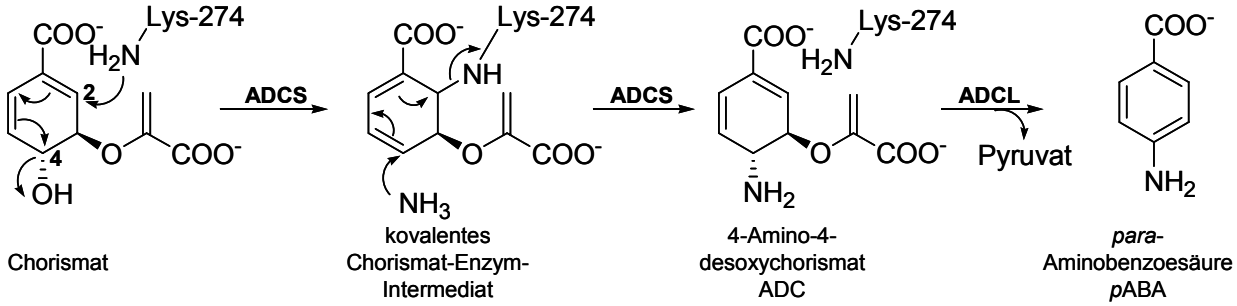


Abbildung 6-9. Katalysemechanismus der *E. coli* ADC-Synthase nach He *et al*., 2004, Bulloch *et al*., 2005 und He *et al*., 2006.

Das Aktive-Zentrum-Nukleophil Lys-274 greift an der C2-Position des Chorismats an, wodurch es zu einer Verschiebung der Doppelbindungen im Ringsystem kommt und die C4-Hydroxygruppe eliminiert wird. Dabei entsteht ein kovalent gebundenes Chorismat-Enzym-Intermediat. In einem zweiten Reaktionsschritt wird das kovalent gebundene Chorismat-Enzym-Intermediat durch Ammoniak an Position C4 angegriffen, wodurch es erneut zu einer Verschiebung der Doppelbindungen im Ringsystem kommt und Lys-274 abgespalten wird. Es entsteht das freie Reaktionsprodukt 4-Amino-4-desoxychorismat (ADC).

6.1.3 Der Katalysemechanismus der ADC-Synthase bei *B. subtilis*

Im Zuge dieser Arbeit wurde der Reaktionsmechanismus der *B. subtilis* ADC-Synthase untersucht. Wie aus dem Sequenzvergleich in **Abbildung 1-18** hervorgeht, enthält die PabB-Untereinheit von *B. subtilis* kein Lysin, sondern ein Alanin, Ala-283, an der zum *E. coli*-Enzym homologen Position des aktiven Zentrum Lys-274. Interessanterweise liegt diese Modifikation nicht nur bei der *B. subtilis* ADC-Synthase vor, sondern auch die ADC-Synthasen einer ganzen Reihe von weiteren Mikroorganismen weisen dieselbe Alanin-Substitution auf. Erstaunlicherweise sind diese ADC-Synthasen auch strukturell miteinander verwandt, wie eine phylogenetische Stammbaumanalyse zeigt (Abbildung 5-2). Aufgrund der Abwesenheit der katalytisch aktiven Aminosäure Lysin im entsprechenden konservierten Motif PI***X***GT lag die Vermutung nahe, dass der Reaktionsmechanismus der *B. subtilis* ADC-Synthase als Stellvertreter für die Alanin-Gruppe der ADC-Synthasen nach einem anderen Schema ablaufen muss. Diese anfängliche Vermutung, die aufgrund von Sequenzhomologievergleichen weiter gefestigt wurde, konnte in dieser Arbeit bestätigt und ein neuer Reaktionsmechanismus für die *B. subtilis* ADC-Synthase abgleitet werden. Wie die Ergebnisse in Kapitel 5.2 zeigen, bildet die PabB-Unterheinheit der *B. subtilis* ADC-Synthase kein kovalent gebundenes Substrat-Enzym-Intermediat nach Inkubation mit Chorismat aus. Dieser experimentelle Befund steht jedoch im unüberbrückbaren Gegensatz zu der für die *E. coli* ADC-Synthase publizierten und im Zuge dieser Arbeit reproduzierten Beobachtung. Der nukleophile Angriff von Lys-274 auf C2 von Chorismat stellt den essentiellen Schritt des Reaktionsmechanismus bei *E. coli* dar, wodurch das kovalent gebundene Intermediat entsteht. Offensichtlich übernimmt bei *B. subtilis* PabB keine andere Aminosäure die Funktion des Nukleophils, welches an der C2-Position des Chorismats angreift und somit die Reaktion initiiert. Da eine direkte Substitution der C4-Hydroxygruppe des Chorismats durch eine Aminogruppe, zumal unter Retention, mechanistisch aufgrund der in Abschnitt 6.1.1 aufgeführten Argumente eher unwahrscheinlich ist, stellte sich die Frage, auf welchem Wege bei *B. subtilis* 4-Amino-4-desoxychorismat gebildet wird, das durch die ADC-Lyase schließlich zu *p*ABA umgewandelt werden kann. Aufschluss hierüber ergab die Analyse der Reaktionsprodukte der *B. subtilis* ADC-Synthase über LC-MS und NMR-Spektroskopie. Wie in Kapitel 5.3 dargelegt, entstehen bei der *B. subtilis* ADC-Synthase-Reaktion zwei Reaktionsprodukte mit gleicher Molekülmasse (*m/z* 226) wie 4-Amino-4-desoxychorismat, aber unterschiedlichen Retentionszeiten. Durch MS/MS-Experimente konnte man keine Rückschlüsse auf die Unterschiede in den Strukturen ziehen. Ein Vergleich der

Reaktionsprodukte der *B. subtilis*-Reaktion mit der *E. coli*-Reaktion ergab, dass das Produkt der *B. subtilis* ADC-Synthase mit der Retentionszeit R_t = 3,3 min dem Produkt der *E. coli* ADC-Synthase entspricht, nämlich dem 4-Amino-4-desoxychorismat.

Das Hauptprodukt der *B. subtilis*-Reaktion, welches die gleiche Molekülmasse besitzt wie 4-Amino-4-desoxychorismat (*m/z* 226), jedoch erst nach 4,7 min von der RP-C18 Säule eluiert, konnte isoliert und ein *COSY*-NMR-Spektrum aufgenommen werden. Die Auswertung des *COSY*-Spektrums ergab eindeutig, dass es sich bei dieser Substanz um das Konstitutionsisomer 2-Amino-2-desoxyisochorismat (ADIC) handelt. ADIC wurde bereits 1993 von Morollo *et al.* als Zwischenprodukt einer H398M-Mutante der Anthranilat-Synthase TrpE von *Salmonella typhimurium* beschrieben, bei dem *Wildtyp*-Enzym wurde diese Verbindung dagegen bisher nicht freigesetzt.

ADIC wird neben ADC bei Anwesenheit von NH_4^+ als Stickstoffquelle ebenfalls von einer mutierten ADC-Synthase von *E. coli* mit der Mutation K274A gebildet (He *et al.*, 2004). Wurde die gleiche Reaktion im Glutaminpuffer durchgeführt, so konnte keine Enzymaktivität der Mutante festgestellt werden (He *et al*., 2004). Die Autoren diskutierten, dass NH_4^+ als „*Rescue*"-Reagenz bei der K274A-Mutante partiell die Funktion des Aktiven-Zentrum-Nukleophils Lys-274 übernehmen kann und nukleophil an der C2-Position des Chorismats angreift, wodurch ADIC gebildet wird. In einem zweiten Schritt erfolgt der Angriff eines weiteren Moleküls Ammoniak an C4 von ADIC, wodurch ADC entsteht. Dieses ADC konnte durch die *E. coli* ADC-Lyase zu *p*ABA aromatisiert werden.

Um zu untersuchen, ob bei *B. subtilis* ein ähnlicher Mechanismus wie bei der *E. coli* K274A Mutante vorliegt, wurde isoliertes ADIC als Substrat für die *B. subtilis* ADC-Synthase eingesetzt und die Reaktion an die ADC-Lyase gekoppelt. Sowohl im Glutaminpuffer, als auch im Ammoniumsulfatpuffer wurde *p*ABA gebildet. Wurde nur die ADC-Lyase mit ADIC inkubiert, so konnte kein *p*ABA nachgewiesen werden, wodurch gezeigt war, dass ADIC kein Substrat für die ADC-Lyase ist.

Das Hauptprodukt ADIC aus der *B. subtilis*-Reaktion wurde offensichtlich über die ADC-Synthase zu ADC umgewandelt, welches als Substrat für die ADC-Lyase zu *p*ABA aromatisiert werden konnte. Markierungsexperimente mit [$15N_\omega$]-Glutamin zeigten, dass ADIC durch die ADC-Synthase nicht durch eine intramolekulare Umlagerung der C2-Aminogruppe an Position 4 zu ADC umgewandelt wird, sondern dass ein zweiter nukleophiler Angriff von Ammoniak an C4 von ADIC erfolgt. Die Stickstoffquelle für die Aminogruppe an Position 4 von ADC wird somit durch ein zweites Molekül Glutamin

bereitgestellt, welches über die Glutamin-Amidotransferase-Reaktion der ADC-Synthase-Untereinheit PabA geliefert wird.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente lassen für die *p*ABA-Biosynthese bei *B. subtilis* somit folgende Schlussfolgerungen zu:

(1) Chorismat wird durch die ADC-Synthase mit den Untereinheiten PabA und PabB unter Abspaltung der C4-Hydroxygruppe zu 2-Amino-2-desoxyisochorismat (ADIC) katalysiert. Die Stickstoffquelle für die Aminierung an Position 2 des Chorismats stammt aus der ω-Amid-Funktion von Glutamin und wird durch die PabA-Reaktion bereitgestellt. Die Untereinheit PabB überträgt die Aminogruppe auf das Substrat.

(2) In einem zweiten Schritt wird Ammoniak nukleophil an Position 4 von 2-Amino-2-desoxyisochorismat (ADIC) addiert, wobei die C2-Aminogruppe abgespalten und 4-Amino-4-desoxychorismat gebildet wird. Die Stickstoffquelle für diese zweite Aminierung wird ebenfalls durch die PabA-Reaktion aus Glutamin bereitgestellt und von der PabB-Untereinheit auf ADIC übertragen.

(3) In einem letzten Schritt wird das zuvor gebildete 4-Amino-4-desoxychorismat katalysiert durch die ADC-Lyase, auch PabC genannt, zur *para*-Aminobenzoesäure aromatisiert. Dieser Schritt ist identisch mit der *E. coli* Reaktion, dadurch belegt, dass das Produkt der *E. coli* ADC-Synthase-Reaktion mit der *B. subtilis* ADC-Lyase zu *p*ABA umgesetzt werden kann und umgekehrt. Außerdem kann das *B. subtilis*-Enzym wie das *E. coli*-Enzym nur D-Alanin, nicht aber L-Alanin zu Pyruvat transaminieren (Jhee *et al*., 2000), woraus Rückschlüsse auf die Stereochemie der katalysierten Reaktion gezogen werden können. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass das Reaktionsprodukt der *E. coli* ADC-Synthase identisch ist mit dem durch die *B. subtilis* ADC-Synthase gebildete ADC.

Für die *B. subtilis* ADC-Synthase konnte im Zuge dieser Arbeit somit ein neuer Reaktionsmechanismus aufgeklärt werden, der schematisch in Abbildung 6-10 dargestellt ist. Aufgrund der hohen phylogenetischen Verwandtschaft kann postuliert werden, dass dieser Katalysemechanismus der *B. subtilis* ADC-Synthase stellvertretend für alle weiteren ADC-Synthasen der Alanin-Gruppe mit dem hochkonservierten Motif PL*X*GT im aktiven Zentrum Gültigkeit hat.

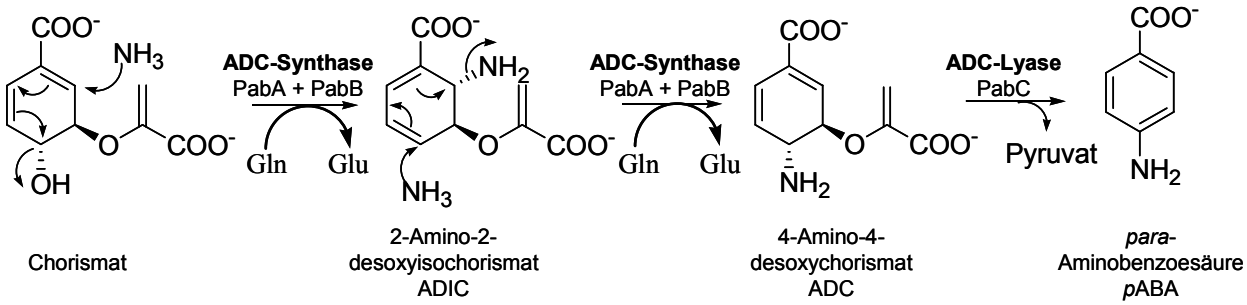


Abbildung 6-10. Reaktionsmechanismus der *B. subtilis* ADC-Synthase als Stellvertreter der alaninhaltigen ADC-Synthasen. Anstelle des Lys-274 bei *E. coli* greift hier Ammoniak, das von Gln stammt, nukleophil an C2 des Chorismats an. Dann folgt ein zweiter nukleophiler Angriff eines zweiten Moleküls Ammoniak auf C4 von ADIC. Beide Reaktionen werden durch die ADC-Synthase katalysiert. Der dritte Schritt der Reaktion, die Aromatisierung von ADC zu *p*ABA, der durch die ADC-Lyase katalysiert wird, ist wieder identisch mit dem Reaktionsmechanismus bei *E. coli*.

Die Abwesenheit des Nukleophils Lysin im hoch konservierten Motif PI*X*GT des aktiven Zentrum bei der *B. subtilis* ADC-Synthase, die dazu führt, das sich kein kovalent gebundenes Chorismat-Enzym-Intermediat ausbilden kann, wird somit durch die Bildung eines neuen Zwischenproduktes, 2-Amino-2-desoxyisochorismat, kompensiert. Die Kompensation geht jedoch auf Kosten eines weiteren Moleküls Glutamin, welches durch die PabA-Reaktion zu Glutamat hydrolysiert wird und im Anschluss durch die Glutaminsynthase-Reaktion unter ATP-Verbrauch regeneriert werden muss (Metzler, 2003).

Der wesentliche Unterschied der *p*ABA-Biosynthese bei *B. subtilis* im Vergleich zu *E. coli* besteht darin, dass anstelle des bei der *E. coli* ADC-Synthase kovalent gebundenen Chorismat-Enzym-Intermediats bei *B. subtilis* ein neues Zwischenprodukt, 2-Amino-2-desoxyisochorismat entsteht. Die *B. subtilis* ADC-Synthase ist nach unserer Kenntnis das erste in der Literatur beschriebene *Wildtyp*-Enzym des Primärmetabolismus, welches ADIC-Synthase-Aktivität zeigt. Auf diesen Aspekt der Arbeit wird in Kapitel 6.2 ausführlich eingegangen. Abbildung 6-11 zeigt schematisch die Unterschiede im Reaktionsmechanismus der ADC-Synthasen von *B. subtilis* und *E. coli*.

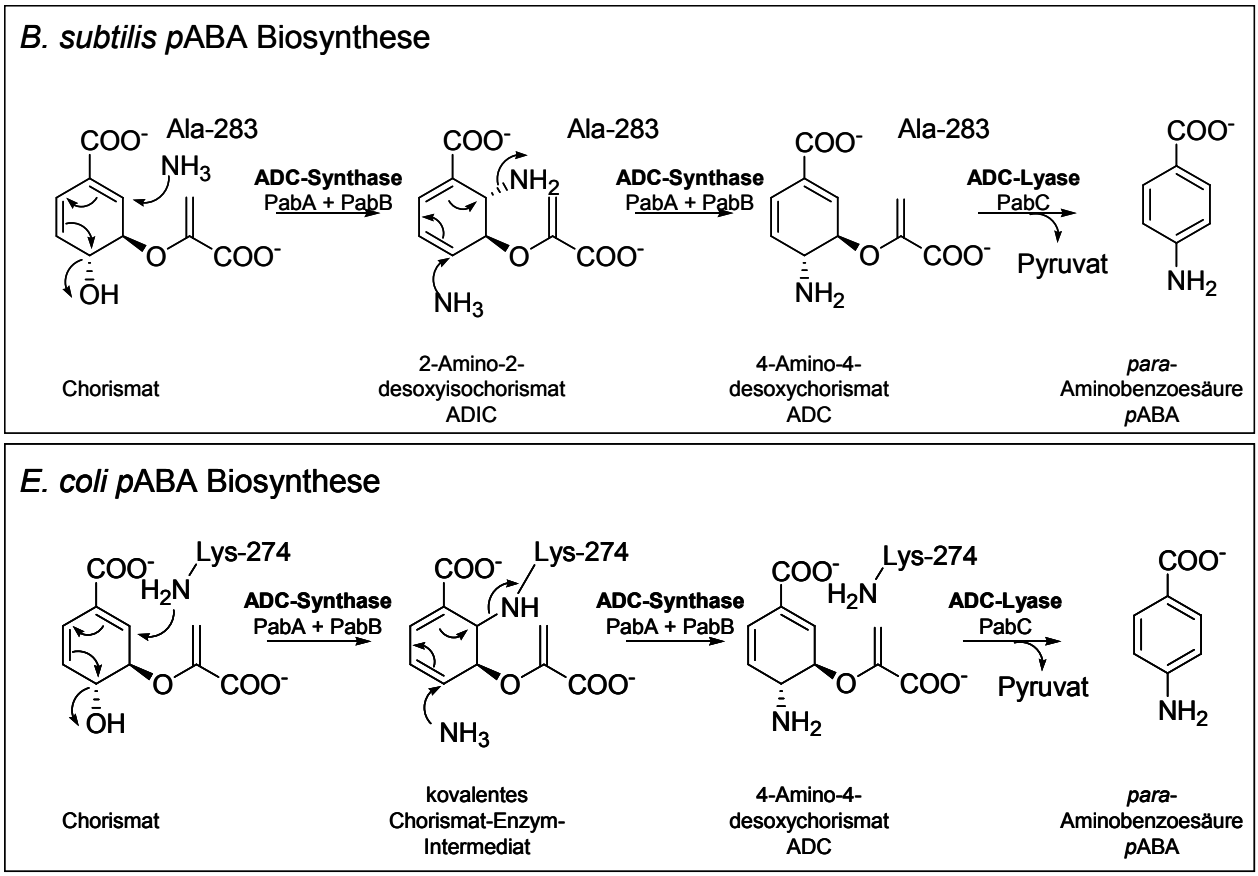


Abbildung 6-11. Katalysemechanismen der *B. subtilis* ADC-Synthase und der *E. coli* ADC-Synthase im Vergleich.

Trotz der Unterschiede im Katalysemechanismus der *B. subtilis* ADC-Synthase zum *E. coli*-Enzym lässt sich auch diese Reaktion in das von He *et al.* für die ADC-Synthase, Anthranilat-Synthase und Isochorismat-Synthase abgeleitete einheitliche Reaktionsprinzip einreihen. Bei der *B. subtilis* ADC-Synthase findet im ersten Reaktionsschritt analog zur Isochorismat-Synthase, Anthranilat-Synthase und *E. coli* ADC-Synthase die Initiation der Katalyse durch Addition eines Stickstoff- oder Sauerstoff-Nukleophils an C2 von Chorismat statt. Bei der *E. coli* ADC-Synthase stellt das Stickstoff-Nukleophil die ε-Aminogruppe von Lys-274 des aktiven Zentrums dar, wodurch ein kovalent gebundenes Substrat-Enzym-Intermediat entsteht. Bei der *B. subtilis* ADC-Synthase wird das Stickstoff-Nukleophil dagegen durch die PabA-Reaktion aus Glutamin bereitgestellt und ADIC als neues Zwischenprodukt gebildet. Abbildung 6-12 gibt einen Überblick über das einheitliche Reaktionsprinzip der Isochorismat-Synthase, Anthranilat-Synthase und ADC-Synthase, welcher nun durch die *B. subtilis* ADC-Synthase erweitert werden konnte.

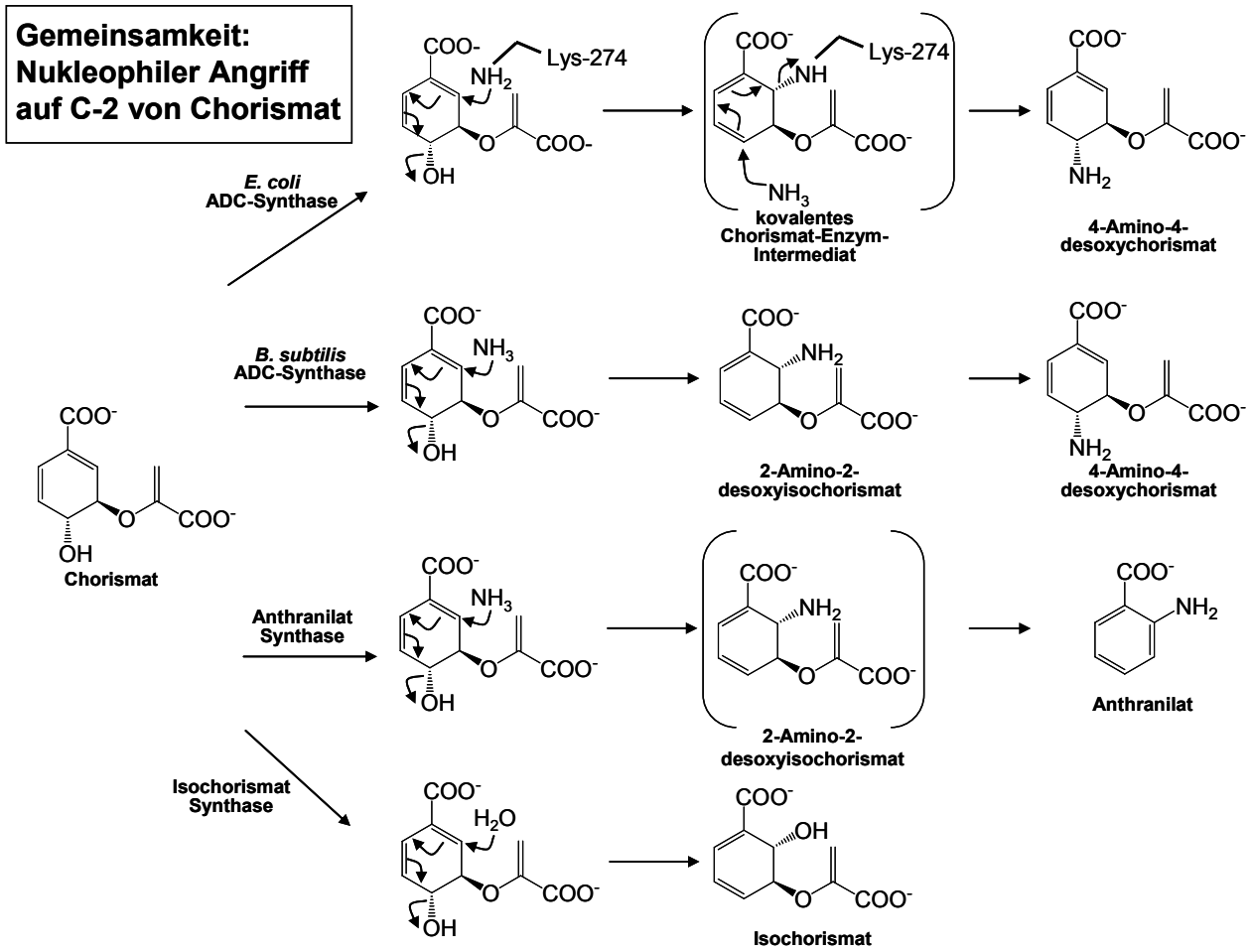


Abbildung 6-12. Von He *et al.* (2004) vorgeschlagener einheitliches Reaktionsprinzip der Anthranilat-Synthase, Isochorismat-Synthase und ADC-Synthase. Der neu entdeckte Reaktionsmechanismus der ADC-Synthase von *B. subtilis* fügt sich zwanglos in dieses Schema ein.

6.1.4 Kinetische Konstanten der ADC-Synthase bei *B. subtilis*

Für die kinetische Charakterisierung der *B. subtilis* ADC-Synthase mit ihrem neuen Katalysemechanismus wurden die enzymkinetischen Parameter K_M und k_{cat} bestimmt. Aufgrund der relativen Instabilität von ADC und dadurch, dass diese Substanz nicht käuflich erhältlich ist, wurde von einer direkten absoluten Quantifizierung von ADC abgesehen. Stattdessen wurde für die absolute Bestimmung dieser Konstanten die ADC-Synthase-Reaktion an die ADC-Lyase gekoppelt und anhand von Standards die absolute Konzentration des Endproduktes *p*ABA bestimmt (Abbildung 6-13). Aufgrund der 1:1-Stöchiometrie zwischen ADC und *p*ABA, die durch die Enzyme ADC-Synthase und ADC-Lyase innerhalb der *p*ABA-Biosynthese aus Chorismat gebildet werden, entspricht die Menge an gebildeten *p*ABA exakt der Menge des zuvor gebildeten ADC. Dieses Kopplungsprinz findet häufig

Anwendung in der Enzymkinetik. Voraussetzung hierfür ist, dass das Kopplungsenzym, in diesem Fall die ADC-Lyase nicht limitierend eingesetzt wird, was durch Titration der ADC-Lyase zum Reaktionsansatz in entsprechenden Vorversuchen ausgearbeitet wurde. Über einen validierten LC-MS-MRM-*Assay* wurde die absolut gebildete Menge an *p*ABA und somit die absolute Menge an ADC bestimmt und im Anschluss die enzymkinetischen Parameter für die *B. subtilis* und *E. coli* ADC-Synthasen berechnet.

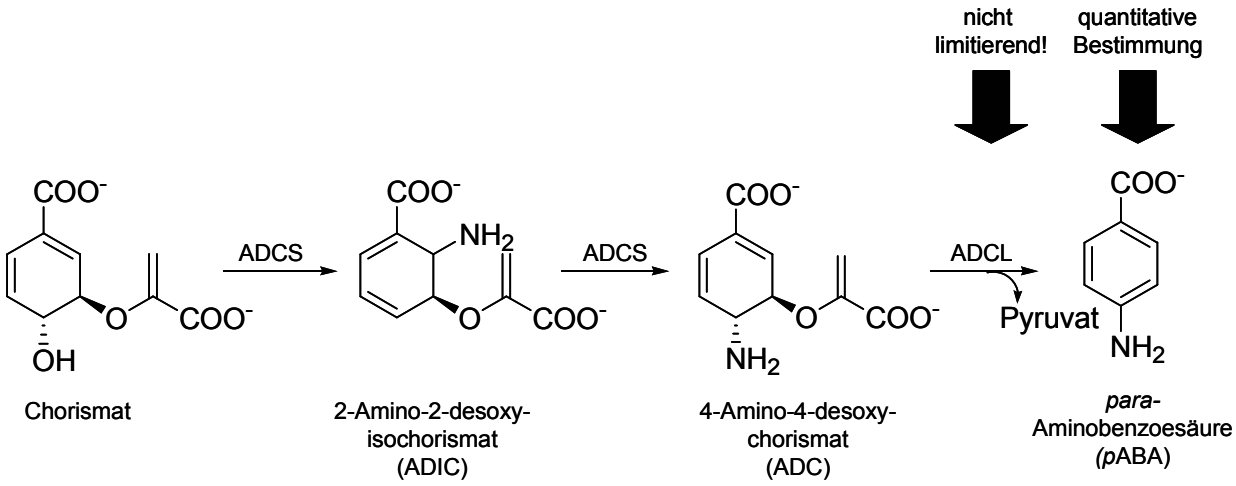


Abbildung 6-13. Kopplung der ADC-Synthase und der ADC-Lyase.

Der K_M-Wert eines Enzyms, auch Michaelis-Menten-Konstante genannt, gibt die Substratkonzentration bei halbmaximaler Reaktionsgeschwindigkeit wieder und ist praktisch betrachtet ein Maß für die Affinität des Enzyms zum Substrat. Der k_{cat}-Wert, auch Wechselzahl genannt, beschreibt die Anzahl der katalytischen Umwandlungen pro Zeiteinheit, die das entsprechende Enzym maximal katalysieren kann und ist somit ein Maß für die Katalysegeschwindigkeit. Folgende kinetischen Parameter für die ADC-Synthase von *B. subtilis* und *E. coli* konnten bestimmt werden (Tabelle 6-2):

Tabelle 6-2. Die im Zuge dieser Arbeit bestimmten kinetischen Parameter für die *B. subtilis* und *E. coli* ADC-Synthase.

Stamm	Enzym	Stickstoffquelle	K_M	k_{cat}
B. subtilis	ADC-Synthase	Ammonium	380 µM	0.004 s^{-1}
B. subtilis	ADC-Synthase	Glutamin	420 µM	0.005 s^{-1}
E. coli	ADC-Synthase	Ammonium	42 µM	0.08 s^{-1}

Tabelle 6-3. Übersicht über die bisher publizierten kinetischen Konstanten der *E. coli* ADC-Synthase sowie einiger Mutanten.

Stamm	Enzym	Stickstoffquelle	K_M	k_{cat}	Referenz
E. coli	ADC-Synthase	Ammonium	58 µM	0,032 s^{-1}	He *et al*., 2004
E. coli	ADC-Synthase	Glutamin	13 µM	0,53 s^{-1}	He *et al*., 2004
E. coli	ADC-Synthase	Ammonium	19 µM	n.d.	Viswanathan *et al*., 1995
E. coli	ADC-Synthase	Glutamin	4 µM	n.d.	Viswanathan *et al*., 1995
E. coli	ADC-Synthase	Glutamin	500 µM	n.d.	Dixon *et al*., 2006
E. coli	ADC-Synthase	Ammonium	67 µM	0,098 s^{-1}	Anderson *et al*., 1991
E. coli	K274A ADC-Synthase	Ammonium	97 µM	0,026 s^{-1}	He *et al*., 2004
E. coli	K274A ADC-Synthase	Glutamin	*n.d.*	0,002 s^{-1}	He *et al*., 2004
E. coli	K274R ADC-Synthase	Ammonium	*n.d.*	$9{,}8\cdot10^{-5}$ s^{-1}	He *et al*., 2004
E. coli	K274R ADC-Synthase	Glutamin	*n.d.*	$8{,}3\cdot10^{-4}$ s^{-1}	He *et al*., 2004
E. coli	E258A ADC-Synthase	Ammonium	*n.d.*	$6{,}9\cdot10^{-8}$ s^{-1}	He *et al*., 2006
E. coli	E258A ADC-Synthase	Glutamin	*n.d.*	$1{,}7\cdot10^{-7}$ s^{-1}	He *et al*., 2006
E. coli	E258D ADC-Synthase	Ammonium	*n.d.*	$1{,}2\cdot10^{-4}$ s^{-1}	He *et al*., 2006
E. coli	E258D ADC-Synthase	Glutamin	*n.d.*	$2{,}0\cdot10^{-5}$ s^{-1}	He *et al*., 2006

Mit den in dieser Arbeit bestimmten K_M- und k_{cat}-Werten für die *E. coli* ADC-Synthase (Tabelle 6-2) konnten die in der Literatur angegebenen Werte sehr gut reproduziert werden (Tabelle 6-3), was für die hohe Qualität des verwendeten Assay-Systems spricht.

Für die kinetischen Parameter der *B. subtilis* ADC-Synthase sind bisher keine Referenzwerte in der Literatur beschrieben worden. Die vorliegende Dissertation ist nach unserem Kenntnisstand die erste Arbeit, die sich mit der enzymkinetischen Charakterisierung der *B. subtilis* ADC-Synthase befasst. Die für die *B. subtilis* ADC-Synthase ermittelten K_M- und k_{cat}-Werte liegen unabhängig von der Stickstoffquelle im gleichen Bereich (Tabelle 6-2). Vergleicht man diese Beobachtung mit den für *E. coli* publizierten Daten, so stellt man fest, dass im Gegensatz zu *B. subtilis* bei der *E. coli* ADC-Synthase die Art der Stickstoffquelle einen nicht unwesentlichen Einfluss auf die Wechselzahl k_{cat} zeigt. Im Glutaminpuffer ($0.53\ s^{-1}$) erhöht sich die Wechselzahl um Faktor 17,5 im Vergleich zum Ammoniumsulfatpuffer ($0{,}032\ s^{-1}$) (Tabelle 6-3).

Vergleicht man die kinetischen Parameter der *B. subtilis* mit der *E. coli* ADC-Synthase, so zeigt sich, dass die Michaelis-Menten-Konstante bei *B. subtilis* (K_M = 380 µM im Ammoniumsulfatpuffer und K_M = 420 µM im Glutaminpuffer) etwa um einen Faktor zehn höher liegt als beim *E. coli*-Enzym (K_M = 42 µM im Ammoniumsulfatpuffer, in der Literatur wurden K_M –Werte zwischen 19 µM und 500 µM beschrieben, siehe Tabelle 6-3). Die *B. subtilis* ADC-Synthase scheint zumindest *in vitro* eine geringere Affinität zu Chorismat zu

zeigen als das *E. coli*-Enzym. Da sowohl *E. coli* als auch *B. subtilis* PabB bei diesen Experimenten über einen *N*-terminalen Hexa-His-*Tag* verfügten, kann der Hexa-His-*Tag* als Ursache für den höheren K_M bei *B. subtilis* ausgeschlossen werden. Vorversuche mit der *B. subtilis* ADC-Synthase, bei welcher PabB mit *N*-terminalen Hexa-His-*Tag* und nach His-*Tag*-Abspaltung eingesetzt wurde, zeigten, dass der *N*-terminale Hexa-His-*Tag* keinen signifikanten Einfluss auf die Aktivität der ADC-Synthase hatte.

Noch deutlicher werden die kinetischen Unterschiede der *E. coli* und *B. subtilis* ADC-Synthase, wenn man die Wechselzahlen dieser beiden Enzyme betrachtet. Bei gleichen Pufferbedingungen liegt der k_{cat} bei der *E. coli* ADC-Synthase (k_{cat} = 0.08 s^{-1} im Ammoniumsulfatpuffer) um einen Faktor 20 höher als bei der *B. subtilis* ADC-Sythase (k_{cat} = 0.004 s^{-1} im Ammoniumsulfatpuffer). Das bedeutet, dass bei der *B. subtilis* ADC-Synthase pro Zeiteinheit zwanzigmal weniger Chorismatmoleküle zu ADC umgewandelt werden im Vergleich zur *E. coli* ADC-Synthase. Die Katalysegeschwindigkeit scheint beim *B. subtilis* Enzym zumindest *in vitro* unter den gewählten Bedingungen deutlich langsamer abzulaufen.

Auf Grundlage der in dieser Arbeit experimentell bestimmten kinetischen Daten kann zusammenfassend gesagt werden, dass die *B. subtilis* ADC-Synthase, was die Katalyseeffizienz anbelangt, unter den verwendeten Reaktionsbedingungen deutlich schlechter arbeitet, als die *E. coli* ADC-Synthase. Diese Experimente spiegeln jedoch nur die Situation *in vitro* wieder. *In vivo*, also in der lebenden Zelle, ist eine Steigerung der Katalyseeffizienz der *B. subtilis* ADC-Synthase durchaus denkbar wenn nicht sogar sehr wahrscheinlich. Allosterische Aktivatoren, die bisher noch nicht gefunden wurden, könnten dabei eine Rolle spielen. Diese könnten Metabolite der Folsäurebiosynthese oder aber auch Methylgruppenakzeptoren der Tetrahydrofolsäure wie beispielsweise Purine sein. Interessanterweise besitzt, wie in Kapitel 6.4 noch ausführlicher erläutert wird, die *B. subtilis* ADC-Synthase die gleichen konservierten Aminosäuren, die bei der Anthranilat-Synthase für die Tryptophanbindung notwendig sind. Tryptophan fungiert bei der Anthranilat-Synthase als allosterischer Inhibitor des Enzyms. Denkbar wäre gewesen, dass Tryptophan orthogonal hierzu die ADC-Synthase allosterisch aktiviert. Experimentell konnte in dieser Arbeit jedoch gezeigt werden, dass Tryptophan bei der *B. subtilis* ADC-Synthase keinen Einfluss auf die Aktivität des Enzyms hat.

Eine weitere Möglichkeit, Substratflüsse und auch die Katalyseeffizienz zu erhöhen, ist die Bildung von Multi-Enzym-Komplexen *in vivo*. Multi-Enzym-Komplexe sind Proteinkomplexe, in denen verschiedene Proteine über spezifische Bindungsstellen miteinander assoziiert vorliegen. Dabei kann auch das Phänomen auftreten, dass

Proteinbindungsstellen erst nach vorheriger Bindung eines allosterischen Liganden durch Konformationsänderungen auf der Oberfläche des Proteins freigelegt werden. Multi-Enzym-Komplexe ermöglichen einen hocheffizienten Fluss von Substraten und Reaktionsprodukten direkt in die entsprechenden aktiven Zentren der assoziierten Enzyme, wobei sogenannten „*Channeling*“ –Effekten häufig eine zentrale Rolle zukommt. Für *E. coli* konnte gezeigt werden, dass bei der *p*ABA-Biosynthese kein Multienzymkomplex vorliegt (Dosselare und Vanderleyden, 2001). Im Gegensatz zu *E. coli* sind jedoch die Gene der Folsäurebiosynthese bei *B. subtilis* in einem Operon organisiert, so dass die Möglichkeit eines Multienzymkomplexes durchaus nicht abwegig erscheint. Die sehr große Ähnlichkeit zwischen der *B. subtilis* ADC-Synthase und der Anthranilat-Synthase auf Proteinebene, sowie das bei der ADC-Synthase und auch bei der Anthranilat-Synthase zumindest in Spuren gebildete Zwischenprodukt ADIC, deuten auf eine fein abgestimmte, konzertierte Regulation beider Enzyme hin. Dass die Tryptophanbiosynthese bei *B. subtilis* hochgradig reguliert ist, ist literaturbekannt (Yanofsky, 2007; Gollnick *et al.,* 2005). Möglicherweise bildet ADIC auch einen Substratpool, der je nach den Anforderungen der Zelle durch die Aktivität der entsprechenden Enzyme zu Anthranilat oder *p*ABA umgewandelt wird. Das bei der *B. subtilis* ADC-Synthase-Reaktion in Spuren als Nebenprodukt gebildete Anthranilat, könnte bei einem Ausfall der Anthranilatsynthase zudem ein „*Rescue*“-Mechanismus darstellen. In so einem Fall würde das gemeinsame Substrat Chorismat akkumulieren wodurch *in vivo* annähernd Substratsättigung für die ADC-Synthase vorliegen könnte, was nach der Henri-Michaelis-Menten-Gleichung (Kapitel 2.2) mit einer deutlich erhöhten Geschwindigkeit der Enzymreaktion einhergeht. Dies würde einerseits zu einer erhöhten *p*ABA-Bildung, andererseits jedoch auch zu einer gesteigerten Produktion des Nebenproduktes Anthranilat führen, wodurch dessen Mangel durch den Ausfall der Anthranilatsynthase kompensierbar würde.

Die genetischen Organisation der Anthranilat-Synthase und der Enzyme der *p*ABA Biosynthese bei *B. subtilis* in verschiedenen Operons, deren Genprodukte, wie in Kapitel 6.4 beschrieben, miteinander aufs Engste verflochten sind, stellt einen weiteren Hinweis für ein System komplexer Regulationsmechanismen sowohl auf DNA-Ebene als auch auf Proteinebene dar. Die hohe Sequenzhomologie sowie die Nutzung der identischen, amphibolen Glutamin-Amidotransferase PabA bzw. TrpG der *B. subtilis*-Enzyme ADC-Synthase und Anthranilat-Synthase, spiegeln in bemerkenswerter Weise deren gemeinsamen evolutionären Ursprung wieder und bestärken die Vermutung aufeinander abgestimmter regulatorischer Mechanismen.

6.2 Literaturbekannte ADIC-Synthasen

Eine ADIC-Synthase-Funktion wurde bis heute neben der Isochorismat-Synthase, die Ammoniak anstelle von Wasser als Substrat akzeptieren kann (Kozlowski *et al*., 1993), nur für zwei mutierte Enzyme und zwei Enzyme aus dem Sekundärstoffwechsel beschrieben (Abbildung 6-14). Bei den mutierten Enzymen aus dem Primärstoffwechsel handelt es sich zum einen um die auch im Rahmen dieser Arbeit verwendeten K274A-PabB-Mutante von *E. coli* (He *et al.,* 2004). Zum anderen ist dies eine H398M-Mutante der Anthranilat-Synthase TrpE von *Salmonella tyhimurium* (Morollo *et al.*, 1993). Im Gegensatz zu dieser Mutante wird bei den bislang beschriebenen *Wildtyp*-Anthranilat-Synthasen kein ADIC frei, dieses entsteht zwar, wird aber unmittelbar vom Enzym zu Anthranilat aromatisiert (Morollo *et al.*, 1993, He *et al.*, 2004). Desweiteren wurde ADIC als Zwischenstufe bei der Biosynthese von Phenazin vorgeschlagen (McDonald *et al.*, 2001). Als Enzym mit ADIC-Synthase-Funktion wurde PhzE aus *Pseudomonas fluorescens* vorgeschlagen, das aus 207 Aminosäuren besteht und Sequenzhomologie zu bakteriellen Anthranilat-Synthasen (McDonald *et al.*, 2001) aufweist. Es konnte jedoch kein Beweis erbracht werden, dass ADIC tatsächlich frei wird. Die indirekten Beweise für eine mögliche Rolle von ADIC in der Phenazinbiosynthese stützen sich darauf, dass zellfreie Extrakte von *E. coli*-Stämmen, die die sieben Phenazin ORFs enthalten, ADIC und nicht Anthranilat als Vorstufe für die Phenazinbiosynthese akzeptieren. Desweitern konnte rekombinantes PhzD, das die auf die PhzE-Reaktion folgende Reaktion katalysiert, als Isochorismatase identifiziert werden, die die Spaltung des Pyruvat-Vinylethers sowohl von Isochorismat als auch von ADIC katalysiert. Bei der Spaltung von ADIC entsteht *trans*-2,3-Dihydro-3-hydroxyanthranilat (DHHA) (Abbildung 6-14). Zwei Moleküle DHHA werden dann unter Abspaltung von CO_2 in einer PhzF katalysierten Reaktion zu Phenazin-1-carbonsäure addiert.

Eindeutige Beweise für das Entstehen und Freiwerden von ADIC als Biosynthesezwischenprodukt konnten Von Lanen *et al.* 2008 bezüglich der Biosynthese des Endiin Antitumor-Antibiotikum C-1027 durch den Stamm *Streptomyces globisporus* liefern. Das Enzym SgcD ist der Anthranilat-Synthase von *E. coli* homolog. Von Lanen *et al.* konnten das von SgcD produzierte ADIC isolieren und über Massenspektrometrie und NMR-Spektroskopie charakterisieren. ADIC ist in diesem Fall die Vorstufe von 3-*O*-Enolpyruvylanthranilat (OPA), dessen Biosynthese durch SgcG katalysiert wird (Von Lanen *et al.*, 2008).

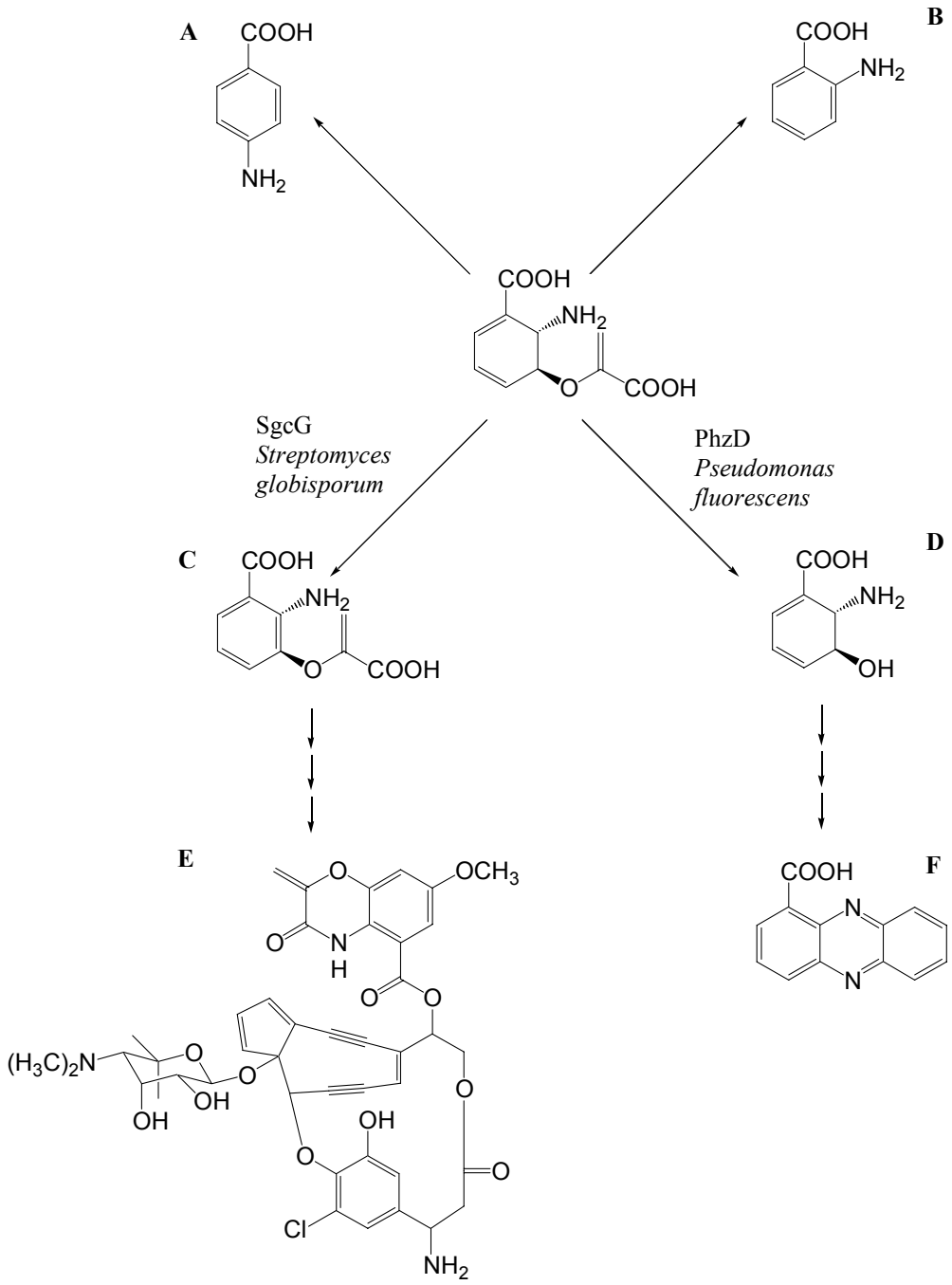


Abbildung 6-14. Biosynthesewege, die von ADIC ausgehen. A) Biosynthese von *p*ABA durch die K274A-PabB-Mutante von *E. coli*; B) Biosynthese von Anthranilat durch die H398M-TrpE-Mutante von *Salmonella tyhimurium*; C) Biosynthese von 3-*O*-Enolpyruvylanthranilat (OPA), durch SgcD von *Streptomyces globisporus* als Vorstufe des Endiin-Antitumor-Antibiotikums C-1027 (E); D) Biosynthese von *trans*-2,3-Dihydro-3-hydroxyanthranilat (DHHA) durch PhzE von *Pseudomonas fluorescens* als Vorstufe von Phenazin (F).

Ein Sequenzvergleich dieser vier Enzyme, bei denen mit Ausnahme von PhzE eine ADIC-Synthasefunktion nachgewiesen wurde, ist in Abbildung 6-15 dargestellt. Alle Enzyme sind homolog zueinander. Es fällt auf, dass Ala-283 von PabB (*B. subtilis*) bei allen Enzymen, für die ADIC definitiv nachgewiesen wurde, also bei TrpE (*S. typhimurium*), bei K274A PabB

(*E. coli*), und bei SgcD (*S. globisporus*), in der Sequenz PIAGT konserviert ist. Bei PhzE (*P. fluorescens*) hingegen steht anstelle von Ala ein Ser.

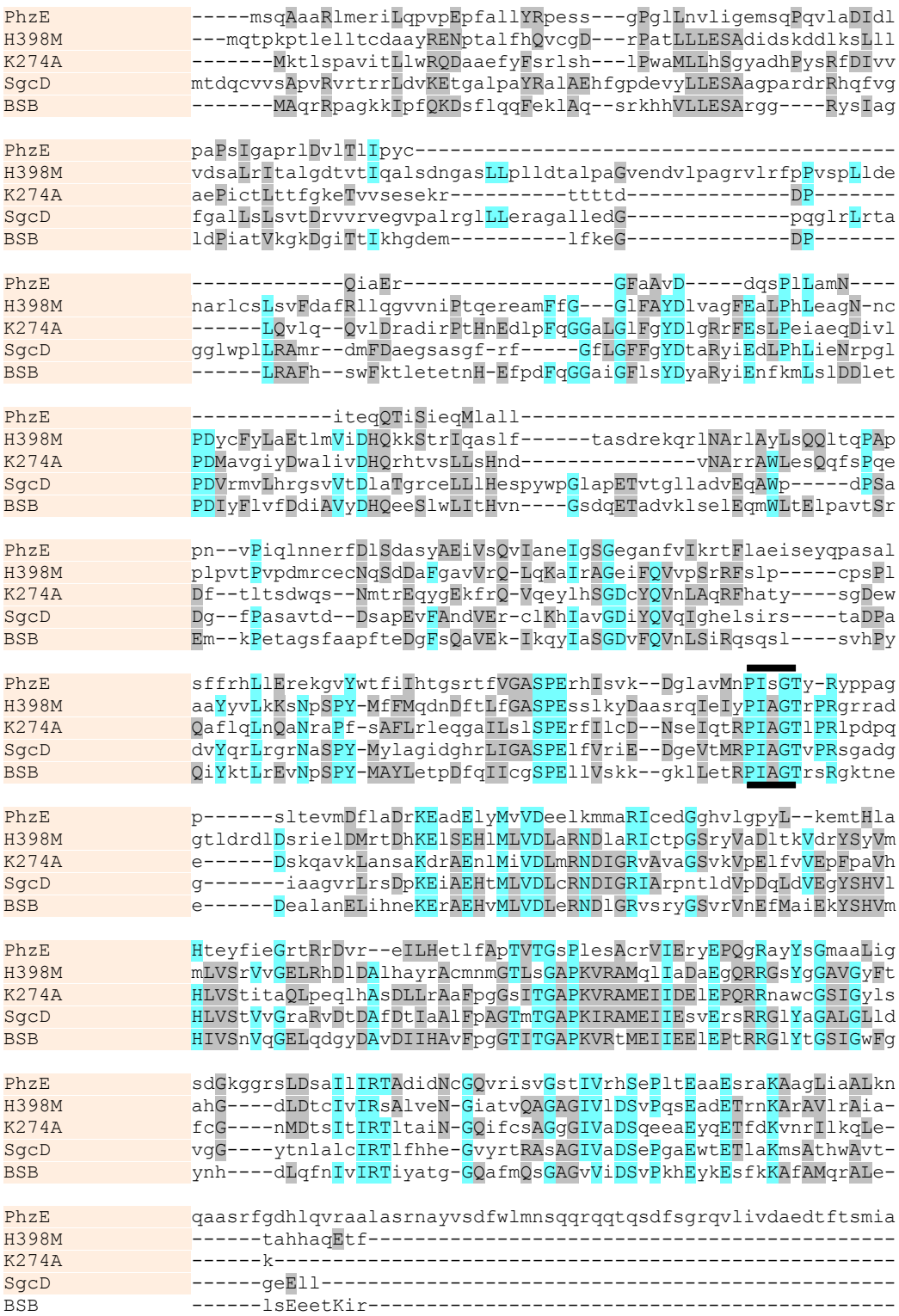


Abbildung 6-15. Sequenzvergleich von PabB (*B. subtilis*) mit K274A PabB (*E. coli*), H398M TrpE (*S. typhimurium*, NCBI Zugang 1I1Q_A), SgcD (*S. globisporus*, NCBI Zugang AAL06664) und PhzE (*P. fluorescens,* NCBI Zugang AAC18904; die 185 *C*-terminalen Aminosäuren sind hier nicht dargestellt, da sie keinerlei Homologie zu den anderen Enzymen aufweisen). Unterstrichen ist das konservierte Motiv PIAGT.

Weiterhin fällt auf, dass His-398 von TrpE (*S. typhimurium*) sowohl bei PabB (*B. subtilis*), bei K274A PabB (*E. coli*), als auch bei SgcD (*S. globisporus*) und PhzE (*P. fluorescens*) vorhanden ist, obwohl Morollo *et al*. (1993) diesem konservierten Histidin eine entscheidende Rolle bei der Aromatisierung von ADIC zu Anthranilat zugeschrieben haben. Damit zeigt die vorliegende Arbeit, dass die Schlüsselfrage nach den Faktoren, die darüber entscheiden, ob Pyruvat eliminiert wird oder erhalten bleibt, wieder neu gestellt werden muss.

6.3 Mutagenese bei der *B. subtilis* ADC-Synthase

Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, die ADC-Synthase aus *B. subtilis* in eine *E. coli* ADC-Synthase umzuwandeln, indem die Aminosäure Ala-283, die dem katalytisch aktiven Lys-274 bei *E. coli* entspricht, gegen Lysin ausgetauscht wurde. Diese Mutagenese war verbunden mit der Erwartung, dass die Umsetzung von Chorismat mit der A283K *B. subtilis* ADC-Synthase analog der *E. coli* ADC-Synthase direkt ADC liefert. Nachdem die A283K *B. subtilis* ADC-Synthase nicht aktiv war, wurden sterische Gründe als Ursache vermutet. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden weitere Mutanten der *B. subtilis* ADC-Synthase erzeugt, bei denen Ala-283 gegen Val und Ile ausgetauscht wurde, um sterische Hinderung unterschiedlichen Ausmaßes zu erzeugen. Diese Hypothese wurde durch die erzeugten Mutanten bestätigt. Die A283I ADC-Synthase, bei der ein sterisch anspruchsvolles Isoleucin anstelle von Ala vorhanden ist, war nicht aktiv, während die A283V-Mutante, die ein Val enthält, das vom sterischen Anspruch her zwischen Ala und Ile liegt, noch eine Restaktivität aufwies.

Weitere Mutationen, die in der ADC-Synthase erzeugt wurden, betrafen die Aminosäure Cys-263. Dieses Cystein wurde gewählt, da es als Zielstruktur des Antibiotikums Abyssomicin C fungiert, und dessen irreversible Bindung zu einem Verlust der Enzymaktivität führt. Daher lag die Vermutung nahe, dass auch Cys-263 bei der Katalyse, zumindest aber für die Enzymstruktur eine Bedeutung hat. Cys-263 wurde gegen Ser und Ala ausgetauscht, die beide eine ähnliche Größe besitzen, wodurch sterische Effekte minimiert werden sollten. Beide Mutanten waren noch aktiv, wenngleich mit reduzierter Aktivität, im Vergleich zum *Wildtyp* in folgender Abstufung: PabB > C263S > C263A (Rest-Aktivitäten der PabB-Mutanten: C263S: *ca.* 15 %; C263A: *ca.* 1 %). Naheliegend ist, dass die Thiolgruppe von Cys-263 eine stabilisierende Rolle ausübt, indem sie eine Wasserstoffbrücke ausbildet. Diese Funktion kann Ser besser gegenüber Ala erfüllen, was den experimentellen Beobachtungen entspricht. Denkbar ist einerseits, dass innerhalb des Proteins eine Wasserstoffbrücke durch Cys-263 ausgebildet wird, und diese Seitenkette somit eine strukturstabilisierende Aufgabe besitzt. Andererseits könnte sie ähnlich der Thiolgruppe Cys-75 der Chorismatmutase von *B. subtilis* eine Wasserstoffbrücke zu der Hydroxygruppe von Chorismat ausbilden (Abbildung 6-16), und damit dazu beitragen, dass Chorismat in der aktiven Tasche fixiert wird (Kienhöfer *et al*., 2003).

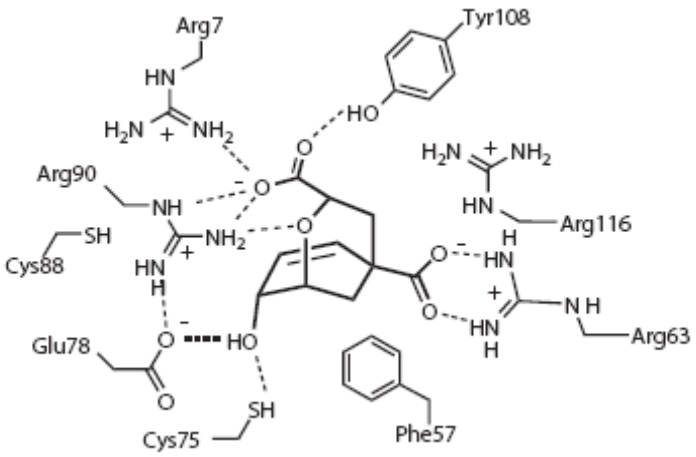


Abbildung 6-16. Schematische Darstellung der aktiven Tasche der Chorismat-Mutase von *B. subtilis* (Quelle: Kienhöfer *et al*., 2003).

Um eine solche Aufgabe zu erfüllen, müsste Cys-263 im aktiven Zentrum der ADC-Synthase von *B. subtilis* liegen. Da bislang keine Kristallstruktur von *B. subtilis* PabB zur Verfügung steht, wird hier auf Sekundärstrukturvorhersagen und Analogieschlüsse zur *E. coli* ADC-Synthase PabB zurückgegriffen. Abbildung 6-17 zeigt die Sekundärstrukturvorhersage für *B. subtilis* PabB und für *E. coli* PabB. Im unteren Teil der Abbildung ist die Kristallstruktur von *E. coli* PabB dargestellt. Alle zehn in der Kristallstruktur enthaltenen Helices werden sowohl für *E. coli* als auch für *B. subtilis* vorhergesagt, es kann davon ausgegangen werden, dass die Struktur des *B. subtilis*-Enzyms im Wesentlichen der des *E. coli*-Enzyms entspricht. Nach Auskunft von Prof. M. Groll (persönliche Mitteilung) ist es nicht wahrscheinlich, dass Cys-263 direkt im aktiven Zentrum liegt, sondern eher etwas abseits zwischen Helix α5 und dem aktiven Zentrum. Daher scheint die zweite Möglichkeit, dass Cys-263 innerhalb des Proteins eine Wasserstoffbrücke ausbildet und dadurch die Proteinstruktur stabilisiert, wahrscheinlicher. Im Zusammenhang mit der Kristallstruktur interessant ist die Tatsache, dass der *N*-terminale His-*Tag* weder bei *E. coli* PabB noch bei *B. subtilis* PabB einen Einfluss auf die Enzymkatalyse hat. Der *N*-Terminus befindet sich vor Helix α1 und damit, wie in Abbildung 6-17 zu sehen ist, weitab vom aktiven Zentrums. Der *N*-terminale His-*Tag* beeinflusst weder bei *E. coli* PabB noch bei *B. subtilis* PabB die Enzymfaltung derart entscheidend, dass eine Veränderung der Katalyseeffizienz eintritt.

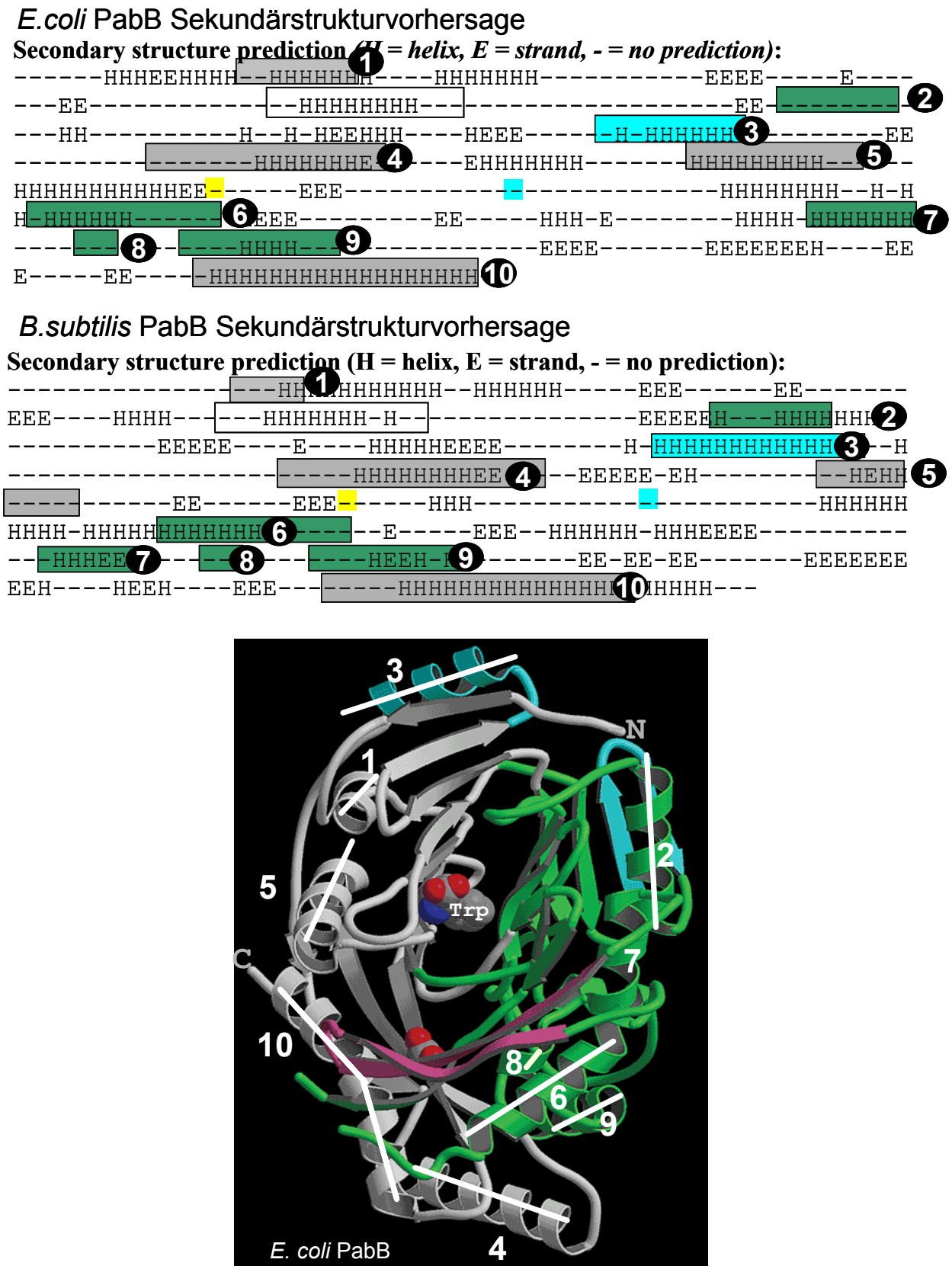


Abbildung 6-17. Im oberen Teil der Abbildung ist die Sekundärstrukturvorhersage für *E. coli* PabB, darunter für *B. subtilis* PabB dargestellt. Im unteren Teil der Abbildung ist die Kristallstruktur von *E. coli* PabB (Parsons *et al.*, 2002) abgebildet. Die zehn in der Kristallstruktur enthaltenen Helices werden sowohl für *E. coli* als auch für *B. subtilis* vorhergesagt. Das aktive Zentrum ist durch die eingezeichneten *Flaps* (rosa) verdeckt.

6.4 Folsäurebiosynthese und Tryptophanbiosynthese bei *B. subtilis*

6.4.1 Genetische Organisation

Bei *B. subtilis* sind die Gene der Folsäurebiosynthese und die Gene der Tryptophanbiosynthese außergewöhnlich eng miteinander verknüpft. Die Gene der Folsäurebiosynthese sind in einem Operon angeordnet (Slock *et al.*, 1990), beginnend mit den Genen der *p*-Aminobenzoesäure-Synthese *pabB, pabA* und *pabC* (Abbildung 6-18). Interessanterweise kodiert das Gen *pabA*, das auch als *trpG* bezeichnet wird, für eine amphibole GATase, die sowohl zur Synthese von Folsäure als auch von Tryptophan nötig ist (Kane *et al*., 1972). Tatsächlich fehlt im Tryptophanoperon das Gen *trpG,* und bei der Anthranilatsynthese wirken TrpE aus dem Tryptophanoperon mit TrpG aus dem Folsäureoperon zusammen. Sowohl die Translation des Tryptophanoperons als auch die von *pabA* aus dem Folsäureoperon sind durch den Regulator der Tryptophanbiosynthese TRAP (Tryptophan-RNA-Binding Attenuation Protein) reguliert. TRAP wird durch Bindung von L-Tryptophan aktiviert und bindet dann an das mRNA-Transkript des Tryptophanoperons (Yanofsky, 2007; Gollnick *et al.,* 2005) und von *pabA* (Yakhnin *et al*., 2007), und verhindert auf diese Art die Translation der RNA-Transkripte (Abbildung 6-19). Auch bezüglich des Gens für TRAP liegt eine sehr interessante Verflechtung mit der Folsäurebiosynthese vor: Das Gen für TRAP, *mtrB*, liegt zusammen mit dem Gen *mtrA*, das die den ersten Schritt der Folsäure katalysierende GTP-Cyclohydrolase kodiert, im *mtrAB*-Operon (Gollnick *et al.,* 2005).

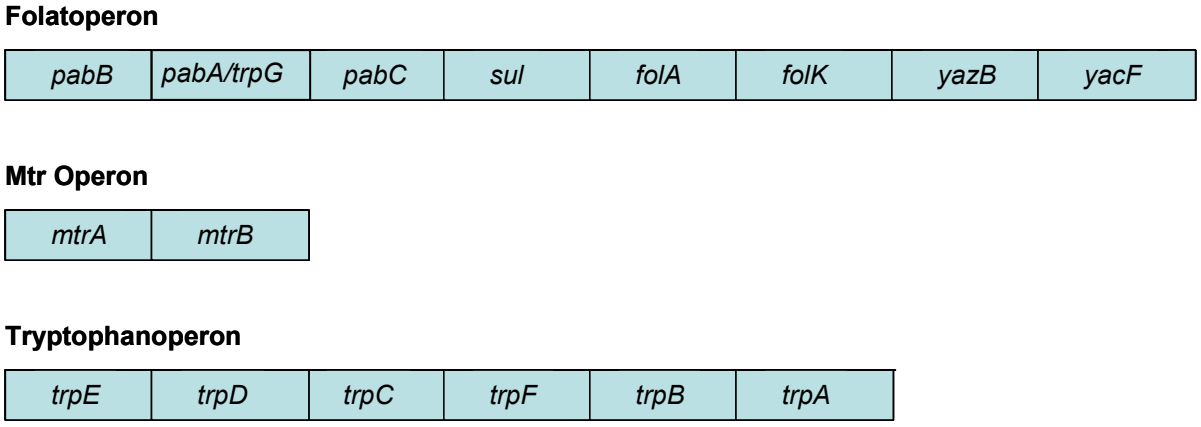


Abbildung 6-18. Genorganisation und genetischer Zusammenhang der Folsäure- und der Tryptophanbiosynthese von *B. subtilis*: Folatoperon, Mtr-Operon und Tryptophanoperon.

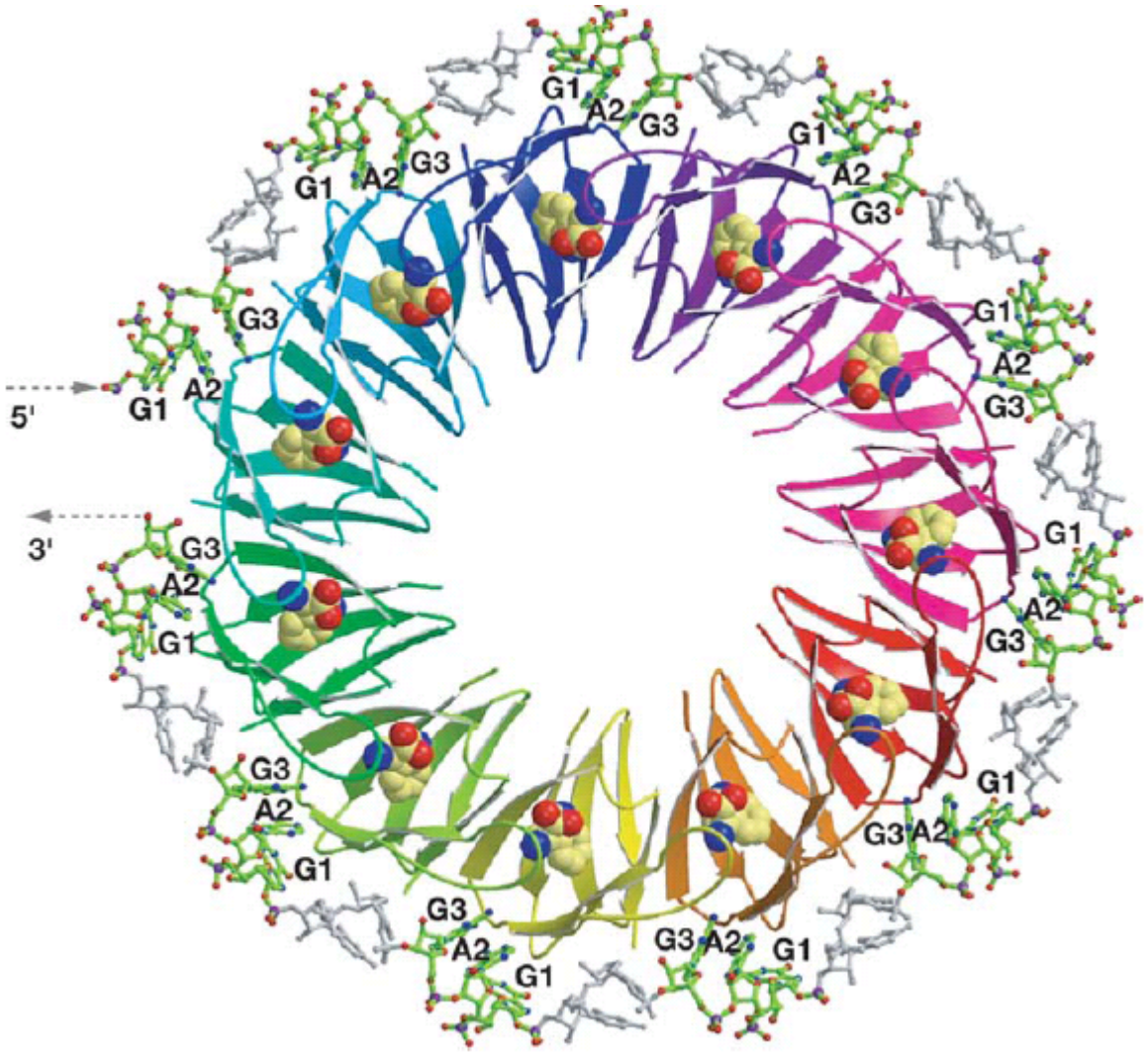


Abbildung 6-19. Struktur des TRAP-RNA-Komplexes. Elf identische Polypeptiduntereinheiten (hier jeweils in einer anderen Farbe dargestellt) binden infolge der Bindung von elf Tryptophanmolekülen an bestimmte RNA-Sequenzen des RNA-Transkripts des Tryptophanoperons und *pabA*, und verhindern so deren Translation (Quelle: Gollnick *et al*., 2005).

6.4.2 Proteinstruktur und Katalyse der Anthranilat-Synthase und ADC-Synthase von *B. subtilis*

Die enge Verknüpfung der beiden Enzyme Anthranilat-Synthase und ADC-Synthase von *B. subtilis* zeigt sich nicht nur auf genetischer Ebene, die in Abschnitt 6.4.1 dargestellt ist. Es wird angenommen, dass die Gene der Enzyme durch Duplikation und divergente Entwicklung aus einem gemeinsamen Vorläufer hervorgegangen sind (Dosselaere und Vanderleyden, 2001). Beide Enzyme bestehen aus zwei nicht identischen Untereinheiten α und β, die zu αβ-Dimeren assoziieren. Die kleinere β-Untereinheit ist eine Glutamin-Amidotransferase (GATase), die Glutamin in Glutamat und Ammoniak spaltet, welcher dann zur größeren α-Untereinheit transferiert und auf Chorismat übertragen wird. Bei *B. subtilis* (Kane *et al*.,

1972; Kane, 1977) existiert für beide Enzyme eine amphibolische GATase, d.h. es gibt nur eine GATase, die sowohl mit Anthranilat-Synthase als auch mit Aminodesoxychorismat-Synthase assoziieren kann. Wie in Abschnitt 6.4.1 beschrieben, liegt das für die GATase kodierende Gen im Folsäureoperon und wird als *pabA* oder *trpG* bezeichnet. Die große α-Untereinheit der Anthranilat-Synthase, TrpE, und der ADC-Synthase, PabB, zeichnen sich durch extrem hohe Sequenzhomologie aus (Abbildung 6-20).

```
TrpE    33   IQMIEKL--DREITYLLESKDDTSTWSRYSFIGLNPFLTIKEEQGRFSAADQDSKSLYTG  90
             +Q  EKL   R+   LLES    +   RYS  GL+P  T+K + G  +    D      G
PabB    19   LQQFEKLAQSRKHHVLLES----ARGGRYSIAGLDPIATVKGKDGITTIKHGDEMLFKEG  74

TrpE    91   NELKEVLNWMNTTYKIKTPELGIPFVGGAVGYLSYDMIPLIEPSVPSHTKETDMEKCMLF  150
             + L+   +W  T  + +T      F GGA+G+LSYD    IE        + +
PabB    75   DPLRAFHSWFKTL-ETETNHEFPDFQGGAIGFLSYDYARYIENFKMLSLDDLETPDIYFL  133


TrpE    151  VCRTLIAYDHETKNVHFIQYARLTGEETKNEKMDVFHQNHL-ELQNLIEKMMDQKNIKEL  209
             V   +  YDH+ +++  I +   + +ET + K+    Q  L EL  +  + M  +
PabB    134  VFDDIAVYDHQEESLWLITHVNGSDQETADVKLSELEQMWLTELPAVTSREMKPE-----  188

TrpE    210  FLSADSYKTPSFETVSSNYEKSAFMADVEKIKSYIKAGDIFQGVLSQKFEVPIKADAFEL  269
               +A S+  P        + +  F   VEKIK YI +GD+FQ  LS +    +    +++
PabB    189  --TAGSFAAP--------FTEDGFSQAVEKIKQYIASGDVFQVNLSIRQSQSLSVHPYQI  238

TrpE    270  YRVLRIVNPSPYMYYMKLLDREIVGSSPERLIHVQDGHLEIHPIAGTRKRGADKAEDERL  329
             Y+ LR VNPSPYM Y++  D +I+  SPE L+  +   LE  PIAGTR RG    EDE L
PabB    239  YKTLREVNPSPYMAYLETPDFQIICGSPELLVSKKGKLLETRPIAGTRSRGKTNEEDEAL  298

TrpE    330  KVELMKDEKEKAEHYMLVDLARNDIGRVAEYGSVSVPEFTKIVSFSHVMHIISVVTGRLK  389
               EL+ +EKE+AEH MLVDL RND+GRV+ YGSV V EF  I  +SHVMHI+S V G L+
PabB    299  ANELIHNEKERAEHVMLVDLERNDLGRVSRYGSVRVNEFMAIEKYSHVMHIVSNVQGELQ  358

TrpE    390  KGVHPVDALMSAFPAGTLTGAPKIRAMQLLQELEPTPRETYGGCIAYIGFDGNIDSCITI  449
              G   VD + + FP GT+TGAPK+R M++++ELEPT R  Y G I + G++ ++   I I
PabB    359  DGYDAVDIIHAVFPGGTITGAPKVRTMEIIEELEPTRRGLYTGSIGWFGYNHDLQFNIVI  418

TrpE    450  RTMSVKNGVASIQAGAGIVADSVPEAEYEESCNKAGALLKTIHIAED  496
             RT+    G A +Q+GAG+V DSVP+ EY+ES  KA A+ + + ++E+
PabB    419  RTIYATGGQAFMQSGAGVVIDSVPKHEYKESFKKAFAMQRALELSEE  465
```

Abbildung 6-20: Sequenzvergleich der Anthranilat-Synthase TrpE und der ADC-Synthase PabB von *B. subtilis*. Farblich markiert sind: Die Aminosäurecluster, LLESX_{10}S und NPSPYM, die für die allosterische Regulation durch Trp essentiell sind (gelb), die konservierten Aminosäuren der *active site* von PabB, abgeleitet vom *E. coli*-Enzym (grün), und die konservierten Aminosäuren der *active site* von TrpE (magenta).

Insbesondere die Aminosäuren der aktiven Zentren sind streng konserviert: die Anthranilat-Synthase enthält alle Aminosäuren des aktiven Zentrums der ADC-Synthase, und die ADC-Synthase enthält alle Aminosäuren des aktiven Zentrums der Anthranilat-Synthase. Äußerst bemerkenswert dabei ist, dass auch die zwei Aminosäurereste identisch sind, die in der Literatur bislang für die charakteristischen Reaktionen der beiden Enzyme verantwortlich gezeichnet wurden: Dies ist zum einen Ala-283 von PabB, dessen Pendant im *E. coli*-Enzym ein Lysin und die entscheidende katalytisch Aminosäure ist, was im Detail in Kapitel 6.1

erörtert wurde. Zum anderen ist auch His-379 von TrpE bei PabB vorhanden. Diesem konservierten Histidin wurde eine entscheidende Rolle bei der Aromatisierung von ADIC zu Anthranilat zugeordnet (Morollo *et al*., 1993, Spraggon *et al*., 2001). Die Frage, welche Aminosäuren dafür verantwortlich sind, dass Pyruvat eliminiert wird oder erhalten bleibt, wird somit von neuem aufgeworfen. Keine der nach aktuellem Stand der Literatur (Morollo *et al*., 1993, Spraggon *et al*., 2001, Parsons *et al*., 2002, Parsons *et al*., 2008) den aktiven Zentren zugeordneten Aminosäuren von Anthranilat-Synthase und ADC-Synthase unterscheidet sich. Dennoch synthetisiert die Anthranilat-Synthase hauptsächlich Anthranilat aus Chorismat, und ADIC als Nebenprodukt, während die ADC-Synthase Anthranilat nur als Nebenprodukt bildet und vorrangig ADIC und ADC synthetisiert.

Ebenfalls konserviert sind die beiden Aminosäuremotive, $LLESX_{10}S$ und NPSPYM, die für die allosterische Regulation durch Tryptophan essentiell sind (Dosselaere und Vanderleyden, 2001). Diese beiden *Cluster* sind durchgehend für Anthranilat-Synthasen hochkonserviert, wenngleich für *Thermococcus kodakaraensis* beschrieben wurde, dass das komplette $LLESX_{10}S$ fehlt und dennoch *feedback*-Inhibition vorliegt (Dosselaere und Vanderleyden, 2001). Durch die Faltung des Proteins gelangen beide Aminosäuremotive in räumliche Nähe und bilden eine Bindungsstelle für Tryptophan aus, die bei Anthranilat-Synthasen zur *feedback*-Inhibition führt. Während die *B. subtilis* ADC-Synthase erstaunlicherweise die beiden Aminosäurecluster $LLESX_{10}S$ und NPSPYM enthält, befinden sich bei der *E. coli* ADC-Synthase an der entsprechenden Stelle statt dessen die davon abweichenden Aminosäuren $LLHSX_{10}F$ und APFSAF, gleich sind also nur LLXS des ersten und P des zweiten *Motivs*. Dennoch bindet Tryptophan auch an *E. coli* PabB (Parsons *et al*., 2002), wenngleich keine *feedback*-Inhibition des Enzyms durch Tryptophan stattfindet. Für die *B. subtilis* ADC-Synthase, die die Aminosäuremotive vollständig enthält, die bei der Anthranilat-Synthase für die *feedback*-Inhibition verantwortlich gemacht werden, konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass *in vitro* keine *feedback*-Inhibition durch Zugabe von Tryptophan stattfindet.

Die hohe Sequenzhomologie der Anthranilat-Synthase und der ADC-Synthase von *B. subtilis* (Abbildung 6-20) und die Konservierung der Aminosäuren der aktiven Zentren führte zu der Frage, wie die Verwandtschaft der beiden Enzyme im Zusammenhang mit den Anthranilat-Synthasen und ADC-Synthasen weiterer Mikroorganismen einzuordnen ist. Wie aus Abbildung 6-21 hervorgeht, ist die *B. subtilis* PabB-Untereinheit der ADC-Synthase phylogenetisch näher mit den TrpE-Untereinheiten der Anthranilat-Synthasen verwandt, als

mit der PabB-Untereinheit der *E. coli* ADC-Synthase und weiteren ADC-Synthasen des PIKGT-Typs.

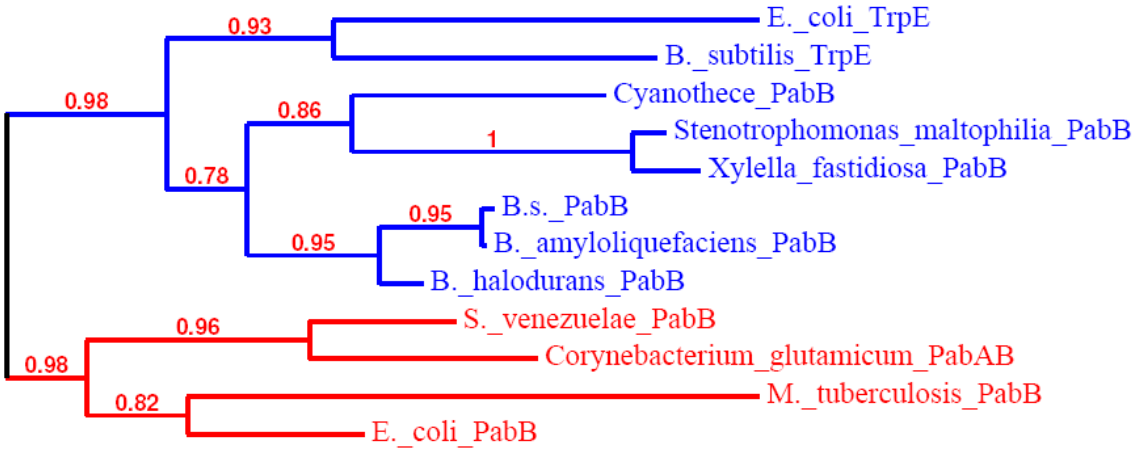


Abbildung 6-21. Phylogenetischer Baum und *Alignment* von Anthranilat-Synthasen und ADC-Synthasen ausgewählter Mikroorganismen. *B. subtilis* TrpE: NCBI Zugang NP_390149; *E. coli* TrpE: NCBI Zugang NP_415780.1; Alle weiteren ADC-Synthase siehe Tabelle 5-1.

Die Stoffwechselwege ausgehend von Chorismat können nun um die im Zuge dieser Arbeit diskutierten Modifikationen bei der *B. subtilis* ADC-Synthase ergänzt werden (Abbildung 6-22).

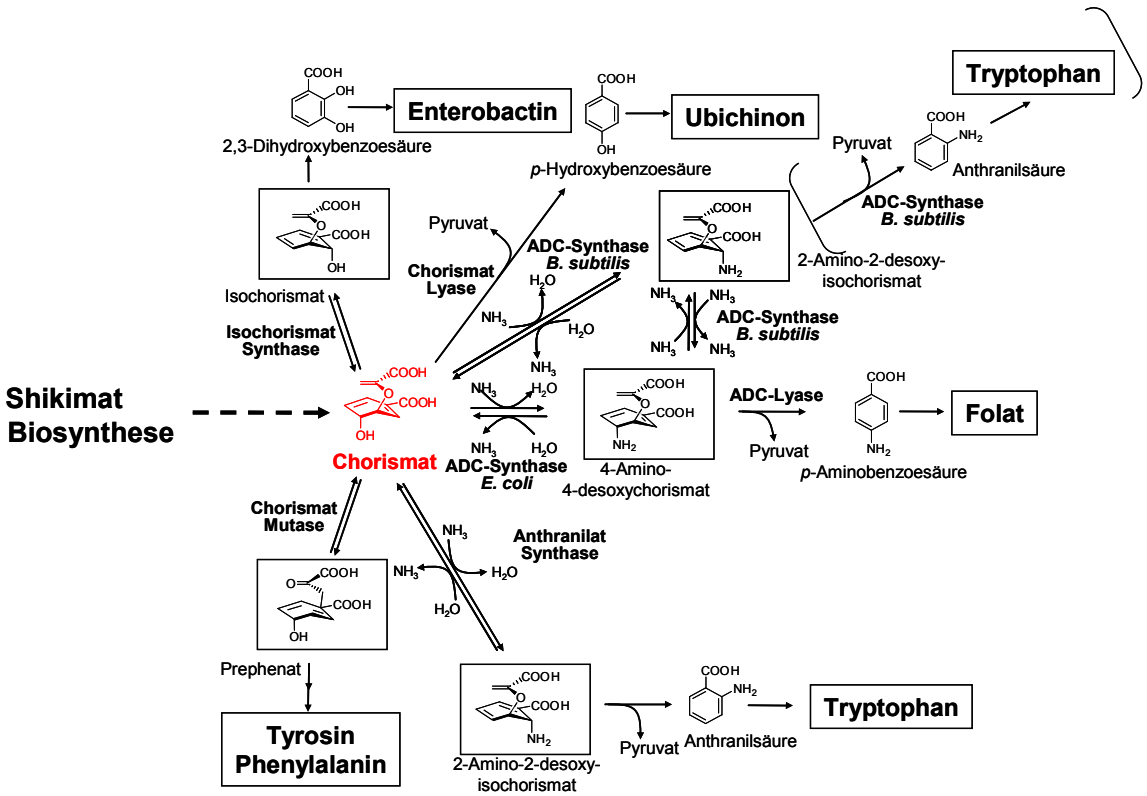


Abbildung 6-22. Biosynthesewege ausgewählter Stoffwechselprodukte, ausgehend von Chorismat und ergänzt um die in dieser Arbeit diskutierten Modifikationen bei der *B. subtilis* ADC-Synthase.

6.5 Die ADC-Lyase bei *E. coli* und *B. subtilis*

Im Gegensatz zur Anthranilat-Biosynthese, bei der das Zwischenprodukt 2-Amino-2-desoxyisochorismat unter Abspaltung von Pyruvat direkt zu *o*-Aminobenzoesäure (Anthranilat) aromatisiert (Morollo *et al*., 1993), ist zur Biosynthese von *p*-Aminobenzoesäure noch ein weiteres Enzym notwendig, die Aminodesoxychorismat-Lyase (Ye *et al*, 1990), die die Aromatisierung von 4-Amino-4-desoxychorismat zu *p*-Aminobenzoesäure unter Abspaltung von Pyruvat katalysiert.

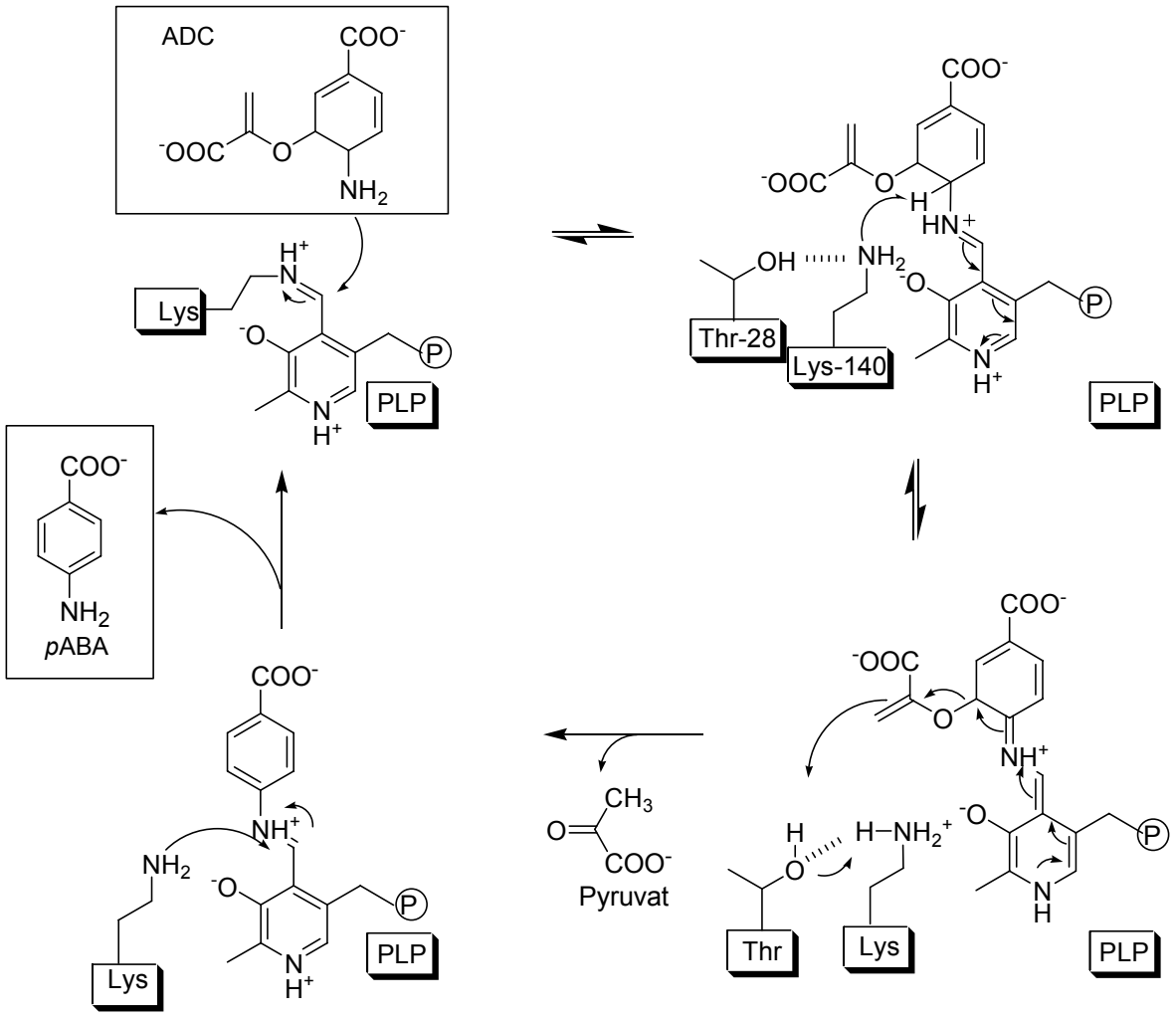


Abbildung 6-23. Mechanismus von PabC nach Nakai *et al.* (2000). Aminodesoxychorismat bildet eine Schiff-Base mit PLP, wodurch das katalytisch aktive Lys-140 frei wird, das eine Wasserstoffbrücke mit Thr-28 ausbildet. Die basische Aminogruppe des Lysins eliminiert dann ein Proton des ADC, wodurch ein chinoides PLP-Zwischenprodukt entsteht. Nun kann nach Rearomatisierung des Cofaktors Pyruvat abgespalten werden, wobei ein Proton von Thr auf den olefinischen Teil des 4-Amino-4-desoxychorismat-Intermediats übertragen wird.

Nach einem von Nakai *et al*. (2000) vorgeschlagenen Mechanismus bildet Aminodesoxychorismat zunächst eine Schiff-Base mit Pyridoxylphosphat (PLP), wodurch

das katalytisch aktive Lys-140 frei wird, das eine Wasserstoffbrücke zu Thr-28 ausbildet. Die basische Aminoseitenkette des Lysins eliminiert dann ein Proton von C4 des ADC, wodurch ein chinoides Zwischenprodukt entsteht. Aus diesem wird Pyruvat eliminiert, dabei wird ein Proton von Thr auf den olefinischen Teil des Intermediats übertragen (Abbildung 6-23). Sowohl Lys-140 als auch Thr-28 sind bei PabC von *B. subtilis* ebenfalls vorhanden (Abbildung 6-24). Auch die meisten anderen Aminosäureseitenketten, die die aktive Tasche auskleiden, sind identisch oder zumindest ähnlich.

```
B. subtilis MIYVNGRYMEEKDAVLSPFDHGFLYGIGVFETFRLYEGCPFLLDWHIERLERALKDLQIE 60
           M  +NG   E     L+  D     +G G F  T  R+ +G   LL  HI+RL+ A + L I
E. coli    MFLINGHKQES----LAVSDRATQFGDGCFTTARVIDGKVSLLSAHIQRLQDACQRLMIS 56

B. subtilis YTVSKHEILEMLDKLLKLNDIKDGNARVRLNISAGISDKGFVAQTYDKPTVLCFVNQLKP 120
                    EM             N  +++ IS G    +G+         T +  V
E. coli    CDFWPQLEQEMKTLAAEQQ-----NGVLKVVISRGSGGRGYSTLNSGPATRILSVTAYPA 111

B. subtilis ESLPLQKEGKVLS---IRRNTPEGSFRLKSHHYLNNMYAKREIGNDPRVEGIFLTEDGAV 177
               L+ EG  L+   +R         +K  + L  +  +  +      E + L  +G V
E. coli    HYDRLRNEGITLALSPVRLGRNPHLAGIKHLNRLEQVLIRSHLEQTNADEALVLDSEGWV 171

B. subtilis AEGISNVFWRKGRCIYTPSLDTGILDGVTRRFIIENAKDIGLELKTGRYELEALLTADE 237
             E   +N+FWRKG  +YTP LD   ++G+ R+F I        +L   +  LE  L ADE
E. coli    TECCAANLFWRKGNVVYTPRLDQAGVNGIMRQFCIRLLAQSSYQLVEVQASLEESLQADE 231

B. subtilis AWMTNSVLEIIPFTKIEEVNYGS 260
             + N++  ++P     +V++ S
E. coli    MVICNALMPVMPVCACGDVSFSS 254
```

Abbildung 6-24: Sequenzvergleich der ADC-Lyase PabC von *B. subtilis* und *E. coli*. Farblich markiert sind: Aminosäuren der Unterseite der *active site* von *E. coli*-PabC (rosa), die Aminosäuren der Seite/Wand der *active site* von *E. coli*-PabC (grün) sowie die entsprechenden Aminosäuren von *B. subtilis*, die zwar nicht identisch aber ähnlich sind (nach Nakai *et al*., 2000).

Es ist daher zu erwarten, dass die *B. subtilis* ADC-Lyase in gleicher Art wie die ADC-Lyase von *E. coli* die Aromatisierung von ADC zu *p*ABA katalysiert. Dies konnte im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden. Desweiteren sind Überkreuzreaktionen möglich: Das Reaktionsprodukt der ADC-Synthase von *E. coli* kann mit der ADC-Lyase von *B. subtilis* zu *p*ABA umgesetzt werden, und *vice versa*. Es ist naheliegend, dass die Reaktion der *B. subtilis* ADC-Lyase nach dem gleichen Mechanismus abläuft wie die der *E. coli* ADC-Lyase, auch was die Stereochemie der Reaktion betrifft. Genau wie das *E. coli*-Enzym kann das *B. subtilis*-Enzym nur D-Alanin, nicht aber L-Alanin zu Pyruvat transaminieren, was nach Jhee *et al*. (2000) Rückschlüsse auf die Substratspezifität zulässt.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte noch eine weitere wichtige Beobachtung gemacht werden: Im Gegensatz zu PabB von *E. coli* und *B. subtilis*, bei denen der *N*-terminale His-*Tag* keinen Einfluss auf die Katalyseeffizienz besitzt, führt der *N*-terminale His-*Tag* sowohl bei *E. coli* als auch bei *B. subtilis* PabC zu einer deutlichen Reduktion der Enzymaktivität, so dass eine

Abspaltung des *Tags* nötig war, um die beiden Enzyme effizient einsetzen zu können. Eine Erklärung für diese Beobachtung liefert die Kristallstruktur der *E. coli* ADC-Lyase (Nakai *et al*., 2000, Abbildung 6-25): Diese liegt als Homodimer vor, wobei jedes Monomer aus einer großen *C*-terminalen und einer kleinen *N*-terminalen Domäne besteht. Das erste β-Faltblatt der *N*-terminalen Domäne beginnt gleich mit Aminosäure 1. Die aktive Tasche liegt zwischen den beiden Untereinheiten. Der Cofaktor PLP, der an Lys-140 gebunden ist, gelangt durch die Proteinfaltung, wie in Abbildung 6-25 schön zu sehen ist, in räumlicher Nähe zum *N*-Terminus. Zusätzliche Aminosäuren am *N*-Terminus können bei suboptimaler Faltung den Zugang des Substrats zur aktiven Tasche versperren.

Abbildung 6-25. Bändermodell des *E. coli*-PabC-Homodimers mit dem Cofaktor PLP, der in räumlicher Nähe zum *N*-Terminus liegt. Eine der Untereinheiten ist in grau dargestellt (unten), die große und kleine Domäne der anderen Untereinheit sind in weiß bzw. schwarz abgebildet (oben) (Quelle: Nakai *et al*., 2000).

6.6 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit gelang es, wichtige Erkenntnisse zur *p*ABA-Biosynthese bei *B. subtilis* zu gewinnen und einen neuen Katalysemechanismus für die ADC-Synthase zu formulieren, der sich fundamental vom entsprechenden *E. coli*-Enzym unterscheidet. Im Gegensatz zur *E. coli* ADC-Synthase läuft diese Reaktion nicht über ein kovalentes Enzym-Chorismat-Intermediat ab, sondern über die Bildung von ADIC als Zwischenprodukt. Dieser alternative Biosyntheseweg gilt neben *B. subtilis* für alle weiteren ADC-Synthasen, die anstelle des hoch konservierten Motivs PI**K**GT (Bsp. *E. coli*) das Motiv PI**A**GT (Bsp. *B. subtilis*) besitzen. Diese Hypothese soll im Rahmen weiterer Arbeiten anhand der ADC-Synthasen verschiedener Mikroorganismen geprüft und bestätigt werden. Ein weiteres Ziel werden Untersuchungen zur enzymatischen Grundlage der Aromatisierung von ADIC durch die Anthranilat-Synthase im Gegensatz zu dessen Freisetzung durch die ADC-Synthase sein. Hierzu sollen sowohl die ADC-Synthase als auch die Anthranilat-Synthase kristallisiert werden. Desweiteren soll versucht werden, durch Mutagenesestudien und Synthese von chimären Proteinen aus der ADC-Synthase und der Anthranilat-Synthase von *B. subtilis* und ggf. weiteren Mikroorganismen herauszufinden, welche Proteinstrukturen und Aminosäuren für die Aromatisierung von ADIC zu Anthranilat verantwortlich sind.

7 Literatur

Anderson, K.S.; Kati, W.M.; Ye, Q.Z.; Liu, J.; Walsh, C.T.; Benesi, A.J.; Johnson, K.A. (1991)

Isolation and structure elucidation of the 4-amino-4-deoxychorismate intermediate in the pABA enzymatic pathway. *J. Am. Chem. Soc*., *113*: 3198-3200

Benkovic, S.J. (1984)

The transformylase enzymes in *de novo* purine biosynthesis. *Trends Biochem. Sci., 9*: 320-322.

Bister, B.; Bischoff, D.; Ströbele, M.; Riedlinger, J.; Reicke, A.; Wolter, F.; Bull, A.T.; Zähner, H.; Fiedler, H.P.; Süssmuth, R.D. (2004)

Abyssomicin C - A polycyclic antibiotic from a marine *Verrucosispora* strain as an inhibitor of the *p*-aminobenzoic acid/tetrahydrofolate biosynthesis pathway. *Angew. Chem. Int. Ed., 43*: 2574-2576.

Blattner, F.R.; Plunkett, G., III; Bloch, C.A.; Perna, N.T.; Burland, V.; Riley, M.; Collado-Vides, J.; Glasner, J.D.; Rode, C.K.; Mayhew, G.F.; Gregor, J.; Davis, N. W.; Kirkpatrick, H.A.; Goeden, M.A.; Rose, D.J.; Mau, B.; Shao, Y. (1997)

Complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science, 277*: 1453-1462.

Bracher, A.; Schramek, N.; Bacher, A. (2001)

Biosynthesis of pteridines. Stopped-flow kinetic analysis of GTP cyclohydrolase I. *Biochemistry, 40*: 7896-7902.

Bradford, M. (1976)
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*., *72***:** 248-254.

Brown, G.M. and Williamson, J.M. (1987)

Biosynthesis of folic acid, riboflavin, thiamine, and pantothenic acid. In *Escherichia coli and Salmonella typhimurium* (Neidhardt, F.C., Ingraham, J.L., Low, K.B., Magasanik, B., Schaechter, M. & Umbarger, H.E., Hrsg.), American Society for Microbiology, Washington, DC.; S. 521-538.

Budzikiewicz, H., Schäfer, M. (2005)

Massenspektrometrie. Eine Einführung. Wiley-VCH; Weinheim.

Bulloch, E.M.M.; Jones, M.A.; Parker, E.J.; Osborne, A.P.; Stephens, E., Davies, G.M.; Coggins, J.R.; Abell, C. (2004)

Identification of 4-amino-4-deoxychorismate synthase as the molecular target for the antimicrobial action of (6S)-6-fluoroshikimate. *J. Am. Chem. Soc., 126*: 9912-9913.

Bulloch, E.M.M.; Abell, C. (2005)

Detection of covalent intermediates formed in the reaction of 4-amino-4-deoxychorismate synthase. *ChemBioChem, 6*: 832-834.

Burchall, J. and Hitchings, G.H. (1965)

Inhibitor binding analysis of dihydrofolate reductases from various species. *Mol. Pharmacol., I*: 126-136.

Burg, A.W. and Brown, G. M. (1986)

The biosynthesis of folic acid. VIII. Purification and properties of the enzyme that catalyzes the production of formate from carbon atom 8 of guanosine triphosphate. *J. Biol. Chem., 243*: 2349-2358.

Buvinger, W.E.; Stone, L.C.; Heath, H.E. (1981)

Biochemical genetics of tryptophan synthesis in *Pseudomonas acidovorans*. *J. Bacteriol., 147*: 62-68.

Carreras, C.W. and Santi, D.V. (1995)

The catalytic mechanism and structure of thymidylate synthase. *Annu. Rev. Biochem.; 64*: 721-762.

Charlton, Peter A.; Young, Douglas W.; Birdsall, Berry; Feeney, James; Roberts, Gordon C. K. (1979)

Stereochemistry of reduction of folic acid using dihydrofolate reductase. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, *20*: 922-924.

Copeland, R.A. (2000)

Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism and Data Analysis. (Copeland, R.A., Hrsg.) Wiley-VCH; New York.

Copley, D. and Knowles, J.R. (1985)

The uncatalyzed claisen rearrangement of chorismate to prephenate prefers a transition state of chairlike geometry. *J. Am. Chem. Soc., 107*: 5306-5308.

Copley, D. and Knowles, J.R. (1987)

The conformational equilibrium of chorismate in solution: implications for the mechanism of the non-enzymatic and the enzyme-catalyzed rearrangement of chorismate to prephenate. *J. Am. Chem. Soc., 109*: 5008-5013.

Dagert, M. and Ehrlich, S.D. (1979)

Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene, 1*: 23-28.

Dixon, S.; Ziebart, K.T.; He, Z.; Jeddeloh, M.; Yoo, C.L.; Wang, X.; Lehman, A.; Lam, K.S.; Toney, M.D.; Kurth, M.J. (2006)

Aminodeoxychorismate synthase inhibitors from one-bead one-compound combinatorial libraries: "staged" inhibitor design. *J. Med. Chem., 49*: 7413-7426.

Domagk, G. (1935)

Chemotherapy of bacterial infections. *Dtsch. Med. Wochenschr., 61*: 250-253.

Dosselaere, F. and Vanderleyden, J. (2001)

A metabolic node in action: Chorismate-utilizing enzymes in microorganisms. *Crit. Rev. Microbiol., 27*: 75-131.

Eckerskorn, C. **(1998)**

Bioanalytik. (Lottspeich, F. und Zorbas, H.(Hrsg.)) Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg-Berlin 1989. S. 344.

Fuller, A.T. (1937)

Is *p*-aminobenzenesulfonamide the active agent in prontosil therapy? *Lancet, I*: 194-198.

Gollnick, P.; Babitzke, P.; Antson, A.; Yanofsky, C. (2005)

Complexity in reulation of tryptophan biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *Annu. Rev. Genet., 39*: 47-68.

Gosset, G.; Bonner, C.A.; Jensen, R.A. (2002)

Microbial origin of plant-type 2-keto-3-deoxy-D-arabinoheptulosonate 7-phosphate synthases, exemplified by the chorismate- and tryptophan-regulated enzyme from *Xanthomonas campestris*. *J. Bacteriol., 183*: 4061-4070.

Green, J.M. and Nichols, B.P. (1991)

p-aminobenzoate biosynthesis in *Escherichia coli*. purification of aminodeoxychorismate lyase and cloning of *pabC*. *J. Biol. Chem., 226*: 12971-12975.

Green, J.M.; Merkel, W. K.; Nichols, B.P. (1992)

Characterization and sequence of *Escherichia coli pabC*, the gene encoding aminodeoxy-chorismate lyase, a pyridoxal phosphate-containing enzyme. *J. Bacteriol., 174*: 5317-5323.

Green, J.M.; Nichols, B.P.; Matthews, R.G. (1996)

Folate biosynthesis, reduction and polyglutamylation. In *Escherichia coli and Salmonella typhimurium* (Neidhardt, F., Hrsg.) 2nd Ed., Vol. 1, S. 665-673.

Hanahan, D. (1983)

Studies on transformation of *E. coli* with plasmids. *J. Mol. Biol., 166*: 557-580.

He, Z., Stigers Lavoie, K.D., Bartlett, P.A., Toney, M.D. (2004)

Conservation of mechanism in three chorismate-utilizing enzymes. *J. Am. Chem. Soc*., *126*: 2378-2385.

He, Z., Toney, M.D. (2006)

Direct detection and kinetic analysis of covalent intermediate formation in the 4-amino-4-deoxychorismate synthase catalyzed reaction. *Biochemistry, 45*: 5019-5028.

Henner, D.; Yanofsky, C. (1993)

Biosynthesis of aromatic amino acids. In *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria: Biochemistry, physiology, and molecular genetics. (Sonenschein, A.; Hoch, J.A.; Losick, R.(Hrsg.)) *Am. Soc. Microbiol*. Washington D.C. S. 269-280.

http://www.bmz.de/de/themen/ernaehrung/hunger/zahlen_und_fakten/mangelernaehrung

http://www.expasy.org/tools

http://www.gehealthcare.com

http://www.ncbi.nlm.nih.gov

http://www.phylogeny.fr

http://www.scripps.edu/~cdputnam/protcalc.html

http://www.waters.com

Huang, M. and Gibson, F. (1970)

Biosynthesis of 4-aminobenzoate in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol., 102*: 767-773.

IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN) (1983)

Nomenclature and symbolism for amino acids and peptides. Recommendations [published erratum appears in Eur J Biochem 1993 Apr 1;213(1):2]. *Eur. J. Biochem., 138*: 9-37.

Jhee, K.H.; Yoshimura, T.; Miles, E.W.; Takeda, S.; Miyahara, I.; Hirotsu, K.; Soda, K. Kawata, Y.; Esaki, N. (2000)

Stereochemistry of the transamination reaction catalyzed by aminodeoxychorismate lyase from Escherichia coli: close relationship between fold type and stereochemistry. *J. Biochem., 128*: 679-686.

Kane, J.F.; Holmes, W.M.; Jensen, R.A. (1972)

Metabolic interlock. The dual function of a folate pathway gene as an extra-operonic gene of tryptophan biosynthesis. *J. Biol. Chem., 247*: 1587-1596.

Kane, J.F. (1977)

Regulation of a common amidotransferase subunit. *J. Bacteriol., 132*: 419-425

Kebarle, P. (2000)

A brief overview of the present status of the mechanism involved in electrospray mass spectrometry. *J. Mass Spectrom*., *35*: 804-817.

Keller, S.; Nicholson, G.; Drahl, C.; Sorensen, E.; Fiedler, H.P., Süssmuth, R.D. (2007a)

Abyssomicins G and H and atrop-abyssomicin C from the marine Verrucosispora strain AB-18-032. *J. Antibiot., 60*: 391-394.

Keller, S.; Schadt, H.S.; Ortel, I.; Süssmuth, R.D. (2007b)

Action of atrop-abyssomicin C as an inhibitor of 4-amino-4-deoxychorismate synthase PabB. *Angew. Chem. Int. Ed., 46*: 8284-8286.

Kienhöfer, A.; Kast, P.; Hilvert, D. (2003)

Selective stabilization of the chorismate mutase transition state by a positively charged hydrogen bond donor. *J. Am. Chem. Soc., 125*: 3206-3207.

Kozlowski, Marisa C.; Tom, Norma J.; Seto, Christopher T.; Sefler, Andrea M.; Bartlett, Paul A. (1995)

Chorismate-utilizing enzymes isochorismate synthase, anthranilate synthase, and p-amino-benzoate synthase: mechanistic insight through inhibitor design. *J. Am. Chem. Soc., 117*: 2128-2140.

Lugtenberg, B.; Meijers, J.; Peters, R.; van der Hoek, P.; van Alphen, L. (1975)

Electrophoretic resolution of the "major outer membrane protein" of *Escherichia coli* K12 into four bands. *FEBS Lett., 58*: 254-258.

Mathis J.B. and Brown, G.M. (1980)

Dihydroneopterin aldolase from *Escherichia coli*. *Methods Enzymol., 66*: 556-560.

McDonald, M.; Mavrodi, D.V.; Thomashow, L.S.; Floss, H.G. (2001)

Phenazine biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens*: Branchpoint from the primary shikimate biosynthetic pathway and role of phenazine-1,6-dicarboxylic acid. *J. Am. Chem. Soc*., *123*: 9459-9460.

Metzler, D. E. (2003)

Biochemistry. The chemical reactions of living cells. Volume 2 (Metzler, D.E.(Hrsg.)) Academic Press, Elsevier Science (USA), 2003. S. 1370.

Morollo, A.A.; Bauerle, R. (1993)

Characerization of composite aminodeoxyisochorismate synthase and aminodeoxy-isochorismate lyase acticities of anthranilate synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*., *90*: 9983-9987.

Mueller, D.R.; Eckersley, M.; Richter, W.J. (1988)

Hydrogen transfer reactions in the formation of "Y + 2" sequence ions from protonated peptides. *Org. Mass Spectrom., 23*: 217-222.

Mueller, W.T. and Benkovic, S.J. (1981)

On the purification and mechanism of 5-aminoimidazole-4-carboxyamide-ribonucleotide transformylase from chicken liver. *Biochemistry, 20*: 337-334.

Nakai, T.; Mizutani, H.; Miyahara, I.; Hirotsu, K.; Takeda, S.; Jhee, K.H.; Yoshimura, T.; Esaki, N. (2000)

Three-dimensional structure of 4-amino-4-deoxychorismate lyase from *Escherichia coli*. *J. Biochem., 128*: 29-38

Nester, E.W.; Jensen, R.A. (1966)

Control of aromatic acid biosynthesis in *Bacillus subtilis*: sequential feedback inhibition. *J. Bacteriol., 91*: 1594-1598.

Northey, E.H. (1940)

Structure and chemotherapeutic activities of sulfanilamide derivatives. *Chem. Rev., 27*: 85-197.

Nichol, C.A. and Welch, A.D. (1950)

Mechanism of action of aminopterin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*., *74*: 403-411.

Nichols, B.P.; Seibold, A.M.; Doktor, S.Z. (1989)

para-Aminobenzoate synthesis from chorismate occurs in two steps. *J. Biol. Chem., 25*: 8597-8601.

Nicolaou, K.C.; Harrison, S.T. (2006)

Total synthesis of abyssomicin C and atrop-abyssomicin C. *Angew. Chem. Int. Ed., 45*: 3265-3260.

Nicolaou, K.C.; Harrison, S.T. (2007)

Total synthesis of abyssomicin C, atrop-abyssomicin C, and abyssomicin D: implications for natural origins of atrop-abyssomicin C. *J. Am. Chem. Soc., 129,* 429-440.

Niessen, W.M.A. (1999)

State-of-the-art in liquid chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr., A 856,* 179-197.

Parsons, J.F.; Jensen, P.Y.; Pachikara, A.S.; Howard, A.J.; Eisenstein, E.; Ladner, J.E. (2002)

Structure of *Escherichia coli* aminodeoxychorismate synthase: architectural conservation and diversity in chorismate-utilizing enzymes. *Biochemistry, 19*: 2198-2208.

Parsons, J.F.; Shi, K.M.; Ladner, J.E. (2008)

Structure of isochorismate synthase in complex with magnesium. *Acta Cryst., D64*: 607-610.

Porat, I.; Sieprawska-Lupa, M.; Teng, Q.; Bohanon, F.J.; White, R.H.; Whitman, W.B. (2006)

Biochemical and genetic characterization of an early step in a novel pathway for the biosynthesis of aromatic amino acids and p-aminobenzoic acid in the archaeon *Methanococcus maripaludis*. *Mol. Microbiol., 62*: 1117-1131.

Qiagen (1997)

Plasmid purification handbook. Qiagen GmbH, Hilden.

Rader, J.I.; Huennekens, F.M. (1973)

Folate coenzyme-mediated transfer of one-carbon groups. *The Enzymes, Vol IX*: 197-223.

Riedlinger, J.; Reicke, A.; Zähner, H.; Krismer, B.; Bull, A.T.; Maldonado, L.A.; Ward, A.C.; Goodfellow, M.; Bister, B.; Bischoff, D.; Süssmuth, R.D.; Fiedler, H.-P. (2004)

Biosynthetic capacities of Actinomycetes: abyssomicins, inhibitors of the para-aminobenzoic acid pathway produced by the marine *Verrucosispora* strain AB-18-032. *J. Antibiot., 57*: 271-279.

Roepstorff, P. and Fohlman, J. (1984)

Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed. Mass Spectrom., 11*: 601.

Roux, B. and Walsh, C.T. (1992)

p-Aminobenzoate synthesis in *Escherichia coli*: kinetic and mechanistic characterization of the amidotransferase PabA. *Biochemistry, 31*: 6904-6910.

Saiki, R.K.; Gelfand, D.H.; Stoffel, S.; Scharf, S.J.; Higuchi, R.; Horn, G.T.; Mullis, K.B.; Erlich, H.A. (1988)

Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science, 239*: 487-491.

de Saizieu, A.; Vankan, P.; Vockler, C.; van Loon, A.P. (1997)

The trp RNA-binding attenuation protein (TRAP) regulates the steady-state levels of transcripts of the *Bacillus subtilis* folate operon. *Microbiology, 143*: 979-989.

Sambrook, J. and Russel, D.W. (2001)

Molecular cloning: a laboratory manual. (Sambrook, J. and Russel, D.W., Hrsg.) Cold Spring Habour Laboratory Press, Cold Spring Harbour. S. 1.110.

Sawula, R.V. and Crawford, I.P. (1972)

Mapping of the tryptophan genes of *Acinetobacter calcoaceticus* by transformation. *J. Bacteriol., 112*:797-805.

Sawula, R.V. and Crawford, I.P. (1973)

Anthranilate synthetase of *Acinetobacter calcoaceticus*. Separation and partial characterization of subunits. *J. Biol. Chem*., *248*: 3573-3581.

Sköld, O. (2001)

Resistance to trimethoprim and sulfonamids. *Vet. Res*., *32*: 261-273.

Slock, J.; Stahly, D.P.; Han, C.Y.; Six, E.W.; Crawford; I.P. (1990)

An apparent *Bacillus subtilis* folic acid biosynthetic operon containing *pab,* an amphibolic *trpG* gene, a third gene required for synthesis of *para*-aminobenzoic acid, and the dihydropteroate synthase gene. *J. Bacteriol*., *172*: 7211-7226.

Spraggon, G.; Kim, C.; Nguyen-Huu, X.; Yee, M.C.; Yanofsky, C. Mills, S.E. (2001)

The structures of anthranilate synthase of Serratia marcescens crystallized in the presence of (i) its substrates, chorismate and glutamine, and a product, glutamate, and (ii) its end-product inhibitor, L-tryptophan. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*., *98*: 6021-6026.

Storozhenko, S.; De Brouwer, V., Volckaert, M.; Navarrete1, O.; Blancquaert, D; Zhang, G.F.; Lambert, W.; Van Der Straeten, D. (2007)

Folate fortification of rice by metabolic engineering. *Nature Biotechnol*., *12*: 1277-1279.

Studier, F.W. and Moffatt, B.A. (1986)

Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol., 189*: 113-130.

Tabor, S.; Richardson, C.C. (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.

Tabor, S. (1996)

Expression using the T7 RNA polymerase/promoter system. In: *Current protocols in molecular biology*. (Ausubel, F.M.; Brent, R.; Kingston, R.E.; Moore, D.D.; Seidman, J.G.; Smith, J.A.; Struhl, K. (Hrsg.)) John Wiley & Sons, Inc. New York. Kap. 16.2.

Then, R.L. (1982)

Mechanisms of resistance to trimethoprim, the sulfonamides, and trimethoprim-sulfamethoxazole. *Rev*. *Infect*. *Dis*., *4*: 261-269.

Van Lanen, S.G.; Lin, S.; Shen, B. (2008)

Biosynthesis of the enediyne antitumor antibiotic C-1027 involves a new branching point in chorismate metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*.; *105*: 494-499.

Viswanathan, V.K.; Green, J.M.; Nichols, B.P. (1995)

Kinetic characterization of 4-amino-4-deoxychorismate synthase from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol., 177*: 5918-23.

Walsh, C.T.; Liu, J.; Rusnak, F.; Sakaitani, M. (1990)

Molecular studies on enzymes in chorismate metabolism and the enterobactin biosynthetic pathway. *Chem. Rev., 90*: 1105-1129.

Xie, G.; Keyhani, N.O.; Bonner, C.A.; Jensen, R.A. (2003)

Ancient origin of the tryptophan operon and the dynamics of evolutionary change. *Microbiol. Mol. Biol. Rev., 67*: 303-342.

Yanofsky, C. (2007)

RNA-based regulation of genes of tryptophan synthesis and degradation, in bacteria. *RNA, 13*: 1141-1154.

Yakhnin, H.; Yakhnin, A.V.; Babitzke, P. (2007)

Translation control of *trpG* from transcripts originating from the folate operon promoter of *Bacillus subtilis* is influenced by translation-mediated displacement of bound TRAP, while translation control of transcripts originating from a newly identified *trpG* promoter is not. *J. Bacteriol.;189*: 872-879.

Ye, Q.Z.; Liu, J.; Walsh, C.T. (1990)

p-Aminobenzoate synthesis in *Escherichia coli*: purification and characterization of PabB as aminodeoxychorismate synthase and enzyme X as aminodeoxychorismate lyase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.;87*: 9391-9395.

Zalkin, H. and Smith, J.L. (1998)

Enzymes utilizing glutamine as an amide donor. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol., 72*: 87-144.

Zapf, C.W.; Harrison, B.A.; Drahl, C. Sorensen, E.J (2005)

A Diels–Alder macrocyclization enables an efficient asymmetric synthesis of the antibacterial natural product abyssomicin C. *Angew. Chem. Int. Ed., 44*: 6533-6537.

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1. Struktur der Folsäure. 2
Abbildung 1-2. Struktur von Prontosil rubrum (A) und Sulfanilamid (B), dem antibiotisch wirksamen Metaboliten des Prontosils. 2
Abbildung 1-3. Struktur des Dihydrofolsäurereduktase-Inhibitors Trimethoprim. 4
Abbildung 1-4. Struktur des Folsäureantagonisten Methotrexat. 4
Abbildung 1-5. Strukturformeln der Abyssomicine C (1) B (2), D (3), G (5), H (6), and atrop-Abyssomicin C (4). 5
Abbildung 1-6: Enzyminaktivierung der ADC-Synthase durch atrop-Abyssomicin C in Abhängigkeit von der Präinkubationszeit und der Inhibitorkonzentration. 7
Abbildung 1-7: HPLC-MS-Chromatogramm der Peptide aus dem GluC-Verdau von PabB (oben) und PabB + atrop-Abyssomicin C (unten). Mit dem Pfeil markiert ist das zusätzlich auftretende Peptid von *m/z* 827 bei der Retentionszeit R_t = 31,1 min. 8
Abbildung 1-8: MS/MS-Spektrum des atrop-Abyssomicin C-Adduktpeptids *m/z* 827. 8
Abbildung 1-9. Einkohlenstoffübertragungsreaktionen der Tetrahydrofolsäure. Die Nummern beziehen sich auf folgende Enzyme: (1) 10-Formyltetrahydrofolat Synthetase, (2) 10-Formyltetrahydrofolat Deacylase, (3) 5,10-Methenyltetrahydrofolat Cyclohydrolase, (4) 5-Formyltetrahydrofolat Cyclodehydrase, (5) 5-Formiminotetrahydrofolat Cyclodeaminase, (6) Glycinamidribonucleotid Transformylase, (7) 5-Amino-4-imidazolcarboxamid-ribonucleotid Transformylase, (8) Formiminoglycin Formiminotransferase, (9) Formiminoglutamat Formiminotransferase, (10) *N*-Formylglutamat Transformylase, (11) Methionyl-tRNA Transformylase, (12) Deoxycytidylat-Hydroxymethyltransferase, (13) Deoxyuridylat-Hydroxymethyltransferase, (14) Thymidylat-Synthetase, (15) Serinhydroxymethyl-Transferase, (16) Glycin Decarboxylase-Synthetase System (P-Protein, H-Protein, T-Protein, Dihydrolipamid Dehydrogenase), (17) 5,10-Methylentetrahydrofolat Dehydrogenase, (18) 5,10-Methylentetrahydrofolat Reduktase, (19) 5-Methyltetrahydrofolat-Homocystein Transmethylase (Abbildung nach Rader und Huennekens, 1973). 9
Abbildung 1-10. Schritte der Purinbiosynthese, an denen THF beteiligt ist. GAR = Glycinamid-β-D-ribofuranosyl-5'-monophosphat; FGAR = Formylglycinamid-β-D-ribofuranosyl-5'-mono-phosphat; GAR TFase = Glycinamidribonucleotid Transformylase; AICAR = 5-Amino-4-imidazolcarboxamid-β-1-D-ribofuranosyl-5'-monophosphat; FAICAR = 1'-[(5-Formylamino)-4-(aminocarbonyl)-1-imidazolyl]-β-D-ribofuranosyl-5'-monophosphat; AICAR TFase = 5-Amino-4-imidazolcarboxamid-ribonucleotid Transformylase 10
Abbildung 1-11. Die Biosynthese von dTMP aus dUMP durch Thymidylat-Synthase. Alle drei Wasserstoffatome der Methylgruppe stammen von N^5,N^{10}-Methylentetrahydrofolat (rot). Deshalb muss das bei der dTMP-Biosynthese entstehende 7,8-Dihydrofolat durch Dihydrofolat-Reduktase wieder zu Tetrahydrofolat reduziert werden. Der mit Glutamat verknüpfte *p*-Aminobenzoesäure des Tetrahydrofolats ist in der Abbildung mit R bezeichnet. 11
Abbildung 1-12. Folsäurebiosynthese. Die Nummern beziehen sich auf folgende Enzyme: (1) GTP-Cyclohydrolase, (2) Dihydroneopterintriphosphat-Pyrophosphohydrolase, (3) Dihydroneopterin Aldolase (4) Pyrophosphokinase, (5) Aminodesoxychorismat-Synthase, (6) Aminodesoxychorismat-Lyase, (7) Dihydropteroat Synthase, (8) Dihydrofolat Synthase. 12

Abbildung 1-13. Genorganisation des Folat-Operons von *B. subtilis*. Nur die ersten sechs Gene, *pabB, pabA, pabC, sul, folA* und *folK* sind an der Folsäurebiosynthese beteiligt. Die Transkription erfolgt von links nach rechts. Die kodierenden Sequenzen sind durch Pfeile gezeigt, die Zahlen bezeichnen die Position der ersten Base des Startcodons ATG und der letzten Base des Stoppcodons. Oberhalb des Folat-Operons sind die vier möglichen Transkripte eingezeichnet. 13
Abbildung 1-14. Biosynthesewege ausgewählter Stoffwechselprodukte, die von Chorismat ausgehen. 15
Abbildung 1-15. Die katalytische Triade von Glutamin-Amidotransferasen. Der Cysteinrest greift nukleophil an der Seitenkette von Gln (Substrat) an, der Histidinrest wirkt als Protonendonor bei der Hydrolysereaktion, und der Glutamatrest stabilisiert das protonierte Histidin. 16
Abbildung 1-16. Bändermodell von PabB aus *E. coli*. Die Kristalle wurden in 2M Natriumformiat und 0,1 M Natriumacetat gezüchtet. Im Kalottenmodell dargestellt sind ein Molekül Ameisensäure und ein Molekül Tryptophan, das möglicherweise stabilisierende Funktion besitzt (Quelle: Parsons *et al.*, 2002). 17
Abbildung 1-17: Mechanismus der ADC-Synthese nach Kozlowski et al., 1995 und He et al., 2004. 18
Abbildung 1-18: Ausschnitt aus dem Alignment der PabB Sequenz von *B. subtilis* und *E. coli*. 18
Abbildung 1-19. Bändermodell des PabC-Homodimers mit dem Cofaktor PLP. Eine der Untereinheiten ist in grau dargestellt, die große und kleine Domäne der anderen Untereinheit sind in weiß bzw. schwarz abgebildet (Quelle: Nakai *et al*., 2000). 19
Abbildung 1-20. Mechanismus von PabC nach Nakai *et al.* (2000). Aminodesoxychorismat bildet eine Schiff-Base mit PLP, wodurch eine katalytisch aktive Lysinseitenkette frei wird, die eine Wasserstoffbrücke mit einer Threonseitenkette ausbildet. Die basische Aminogruppe des Lysins eliminiert ein Proton von ADC, wodurch ein chinoides PLP-Zwischenprodukt entsteht. Nun kann nach Rearomatisierung des Cofaktors Pyruvat abgespalten werden, wobei ein Proton von der Threoninseitenkette auf den olefinischen Teil des 4-Amino-4-desoxychorismat-Intermediats übertragen wird. 20
Abbildung 2-1. Äkta Purifier UPC Chromatographiesystem (Quelle: www.gehealthcare.com). 21
Abbildung 2-2: Schematische Darstellung des ESI-Prozesses (Quelle: Lottspeich, F. und Zorbas, H., 1998). 24
Abbildung 2-3: Schematische Abbildung der TurboIon-Quelle der QTrap 2000 (Quelle: W.M.A. Niessen, 1999). 27
Abbildung 2-4. Q-TOF2-Massenspektrometer von Waters/Micromass (Quelle: www.waters.com). 30
Abbildung 2-5: Vereinfachtes Energiediagramm für das Reaktionsprofil einer typischen chemischen Reaktion. Dargestellt sind die Übergangszustände der Reaktion von Reaktant zu Produkt mit Katalysator (A) und ohne (B) Katalysator inklusive der dafür notwendigen Aktivierungsenergien $\Delta E^{\ddagger}$ (A) und ΔE^{+} (B). Der Betrag, um den der Katalysator die Aktivierungsenergie herabsetzt ist ΔE^{*}. ΔE ist die Freie Energie zwischen Reaktant und Produkt (nach Copeland, 2000). 33
Abbildung 2-6. Beispiel für eine Zeit-Umsatz-Kurve für die Substratabnahme bzw. Produktzunahme während einer Enzym-katalysierten Reaktion. 34
Abbildung 2-7. Michaelis-Menten Kurve. Aufgetragen sind die Anfangsgeschwindigkeiten der Enzymreaktion gegen die Substratkonzentrationen [S]. 35

Abbildung 4-1. Schematische Darstellung der Plasmide PrSet_6His_PP und pT7-7. Eingezeichnet sind neben den Restriktionsschnittstellen der Hexa-His-*Tag* und die Erkennungssequenz der *Prescission Protease* für den Vektor PrSet-6His_PP, sowie für beide Vektoren die Promotorregion Φ10 und das für die Ampicillinresistenz verantwortliche β-Lactamasegen *bla*. 49
Abbildung 4-2: Konstrukt BSA_pT7-7 mit *pabA* aus *B. subtilis* im Plasmid pT7-7. Darunter die Nucleotid- und die Proteinsequenzen. 50
Abbildung 4-3: Konstrukt BSB_pRSET_6His_PP mit *pabB* aus *B. subtilis* im Plasmid PrSet_6His_PP. Darunter die Nucleotid- und die Proteinsequenz. 51
Abbildung 4-4. Konstrukt BSC_pRSET_6His_PP mit *pabC* aus *B. subtilis* im Plasmid PrSet_6His_PP. Darunter die Nucleotid- und die Proteinsequenz. 53
Abbildung 4-5. Konstrukt ECA_pT7-7 mit *pabA* aus *E. coli* im Plasmid pT7-7. Darunter die Nucleotid- und die Proteinsequenz. 54
Abbildung 4-6. Konstrukt ECB_pRSET_6His_PP mit *pabB* aus *E. coli* im Plasmid PrSet_6His_PP. Darunter die Nucleotid- und die Proteinsequenz. 55
Abbildung 4-7. Konstrukt ECC_pRSET_6His_PP mit *pabC* aus *E. coli* im Plasmid PrSet_6His_PP. Darunter die Nucleotid- und die Proteinsequenz. 56
Abbildung 4-8. Konstrukt BST_pRSET_6His_PP mit *trpE* aus *B. subtilis* im Plasmid PrSet_6His_PP. Darunter die Nucleotid- und die Proteinsequenz. 57
Abbildung 5-1. Sequenzvergleich von ADC-Synthasen verschiedener Mikroorganismen aus Tabelle 5-1 im Bereich von Ala-283 bei *B. subtilis* bzw. Lys-274 bei *E. coli*. 71
Abbildung 5-2. Phylogenetische Analyse von ADC-Synthasen verschiedener Mikroorganismen aus Tabelle 5-1. Die Anzahl der Verzweigungspunkte gibt den phylogenetischen Verwandschaftsgrad wieder. 72
Abbildung 5-3. Massenspektrum von *B. subtilis*-PabB vor der Dekonvulierung. Zu sehen ist das Ladungs*cluster* mit den Signalen für die mehrfach geladenen Molekülionen. 74
Abbildung 5-4. Ladungs-dekonvuliertes ESI-QTOF-Spektrum von *E. coli*-PabB vor Inkubation mit Chorismat. Die gemessene Molekülmasse ist 53105 Da, die berechnete exakte Molekülmasse beträgt 53102 Da. 78
Abbildung 5-5. Ladungs-dekonvuliertes ESI-QTOF-Spektrum von *E. coli* PabB nach Inkubation mit Chorismat. Das zweite Signal mit einer Massendifferenz von +208 Da relativ zum nativen Protein mit der gemessenen Molekülmasse von 53105 Da kommt durch das kovalent gebundene Chorismat-Addukt zustande. 78
Abbildung 5-6. Ladungs-dekonvuliertes ESI-QTOF-Spektrum von *E. coli* PabB inkubiert mit Chorismat und nach Zugabe von NH_4^+-Ionen. Die Intensität des zweiten Signals mit einer Massendifferenz von +208 Da relativ zum nativen Protein nimmt ab, da sich das kovalent gebundene Chorismat-Enzym-Intermediat durch nukleophilen Angriff von NH_3 in freies 4-Amino-4-desoxychorismat und regeneriertes Enzym umwandelt. 78
Abbildung 5-7. Ladungs-dekonvuliertes ESI-QTOF-Spektrum der *E. coli*-PabB-K274A-Mutante vor Inkubation mit Chorismat. Die gemessene Molekülmasse ist 53050 Da, die berechnete exakte Molekülmasse beträgt 53045 Da. 79
Abbildung 5-8. Ladungs-dekonvuliertes ESI-QTOF-Spektrum der *E. coli*-PabB-K274A-Mutante nach Inkubation mit Chorismat. Es entsteht kein zweites Signal mit einer Massendifferenz von +208 Da. Aufgrund der Substitution von Lys-274 zu Ala entsteht kein kovalent gebundenes Chorismat-PabB-Addukt. 79
Abbildung 5-9. Ladungs-dekonvuliertes ESI-QTOF-Spektrum von *B. subtilis*-PabB vor Inkubation mit Chorismat. Die gemessene Molekülmasse ist 55399 Da, die berechnete exakte Molekülmasse beträgt 55399 Da. 80

Abbildung 5-10. Ladungs-dekonvuliertes ESI-QTOF-Spektrum von *B. subtilis* PabB nach Inkubation mit Chorismat. Es entsteht kein zweites Signal mit einer Massendifferenz von +208 Da. *B. subtilis*-PabB bildet somit kein kovalent gebundenes Chorismat-Enzym-Intermediat aus. 80
Abbildung 5-11. HPLC-MS-Chromatogramme (extrahierter Ionenstrom *m/z* 226) der Reaktionsansätze. (A) *E. coli* ADC-Synthase + Chorismat + NH_4^+; (B) *B. subtilis* ADC-Synthase + Chorismat + NH_4^+; (C) *E. coli* K274A ADC-Synthase + Chorismat + NH_4^+; HPLC-MS-Chromatogramme (extrahierter Ionenstrom *m/z* 138) der Reaktionsansätze. (D) *E. coli* ADC-Synthase + ADC-Lyase + Chorismat + NH_4^+; (E) *B. subtilis* ADC-Synthase + ADC-Lyase + Chorismat + NH_4^+; (F) *B. subtilis* ADC-Synthase + ADC-Lyase + ADIC + NH_4^++. *p*ABA und *o*ABA wurden anhand synthetischer Standards durch Retentionszeitvergleich und MS/MS-Spektren identifiziert. 82
Abbildung 5-12: Extrahierter Ionenstrom (*m/z* 226) aus der ADC-Synthase-Reaktion von *B. subtilis* mit zwei Peaks (oben). MS/MS-Spektren der beiden Peaks bei R_t = 3,3 min (A, ADC) und R_t = 4,7 min (B, unbekannte Substanz). 83
Abbildung 5-13: Fragmentierungswege von ADC (*m/z* 226) im ESI-MS. 84
Abbildung 5-14: *COSY*-Spektrum des Hauptprodukts der ADC-Synthase-Reaktion von *B. subtilis* in MeOD mit eingezeichneten Kopplungen (farbige Linien). 85
Abbildung 5-15: *COSY*-Spektrum von 2-Amino-2-desoxyisochorismat (ADIC) in MeOD mit eingezeichneten Kopplungen (Quelle: Morollo *et al*., 1993). 85
Abbildung 5-16. Enzymkatalysierte Umwandlung von ADIC zu ADC. 86
Abbildung 5-17. MS-Spektren von *p*ABA aus Umsetzungen mit *B. subtilis* ADC-Synthase und ADC-Lyase. A) Umsetzung von Chorismat in [^{14}N]Glutaminpuffer. B) Umsetzung von ADIC in [^{15}N]Glutaminpuffer. 87
Abbildung 5-18. Vergleich der Aktivitäten verschiedener *B. subtilis* ADC-Synthasen (*Wildtyp*, C263S, C263A) anhand von Zeit-Umsatz-Kurven bei folgenden Bedingungen: 100 mM $(NH_4)_2SO_4$; 5 mM Chorismat, 500 nM ADC-Synthase, 37 °C, pH 8,5 (Detektion mit HPLC-MS). 89
Abbildung 5-19. Sequenzvergleich der Anthranilat-Synthase TrpE und der ADC-Synthase PabB von *B. subtilis.* Farblich markiert sind: die konservierten Aminosäuren der *active site* auf der Basis des *E. coli*-Enzyms, die komplett identisch sind zwischen TrpE und PabB (grün) und der wichtigste Rest der *active site* des *E. coli*-Enzyms, das sowohl bei TrpE als auch bei PabB Ala anstelle von Lys ist (rosa). 90
Abbildung 5-20. Vergleich der Zeit-Umsatz-Kurven der ADC-Synthase-Reaktion und der Anthranilat-Synthase-Reaktion bezogen auf die gebildete Menge an Anthranilat. 91
Abbildung 5-21. Vergleich der Zeit-Umsatz-Kurven der ADC-Synthase-Reaktion und der Anthranilat-Synthase-Reaktion bezogen auf die gebildete Menge an ADIC. 91
Abbildung 5-22. Abhängigkeit der *B. subtilis* ADC-Synthase-Reaktion von Tryptophan. 92
Abbildung 5-23. Optimierung der QTrap2000 Parameter für den MRM-Übergang *m/z* 138 → *m/z* 94. 93
Abbildung 5-24. Kalibriergerade für *p*ABA von 0,1 µM bis 100 µM, im Programm *Analyst* erstellt durch *Linear Fit* an die Gleichung y = ax + b mit Gewichtung $1/x^2$. Der Messbereich von 0.1 µM bis 5 µM ist im unteren Teil der Abbildung herausvergrößert. 95
Abbildung 5-25. Zeit-Umsatz-Kurven der ADC-Synthase von *E. coli* bei verschiedenen Substratkonzentrationen mit linearer Kurvenanpassung zur Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeiten. 97
Abbildung 5-26. Henri-Michaelis-Menten-Kurve der ADC-Synthase von *E. coli* zur Bestimmung der *Steady-State*-Parameter K_M und k_{cat}. 98
Abbildung 5-27. Henri-Michaelis-Menten-Kurve der ADC-Synthase-Reaktion von *B. subtilis* in Ammoniumsulfatpuffer zur Bestimmung der *Steady-State*-Parameter K_M und k_{cat}. .. 101

Abbildung 5-28. Henri-Michaelis-Menten-Kurve der ADC-Synthase-Reaktion von *B. subtilis* in Glutaminpuffer zur Bestimmung der *Steady-State*-Parameter K_M und k_{cat}. 101
Abbildung 6-1. Schematische Darstellung der *p*ABA-Biosynthese. 102
Abbildung 6-2. Synthetische Inhibitoren der *E. coli*-Enzyme IS, AS und ADC-Synthase der Gruppe von Bartlett (Kozlowski *et al*., 1995).1: X=Y=O; 2: X= NH_2^+ , Y=O; 3: X=O, Y= NH_2^+ 103
Abbildung 6-3. Strukturen von Isochorismat, Aminodesoxyisochorismat und Anthranilat.. 103
Abbildung 6-4. Von den Gruppen P. Bartlett und C. Walsh diskutierten möglicher Mechanismus für die Reaktionen der Anthranilat-Synthase, Isochorismat-Synthase und ADC-Synthase (Kozlowski *et al*., 1995, Walsh *et al*., 1990). Möglichkeit A sieht eine Substitution der C4-Hydroxygruppe des Chorismats durch den C2-Substituenten vor, wobei dieser Vorgang entweder konzertiert ablaufen kann, d.h. Bildung der Bindung zum Substituenten an C2 bei gleichzeitiger Abspaltung der C4-Hydroxygruppe, oder aber schrittweise, über einen Übergangszustand mit kationischem Charakter des Ringsystems (zuerst Abspaltung der C4-Hydroxygruppe mit anschließender Bildung der Bindung zum C2-Substituenten) bzw. anionischem Charakter (zuerst Bildung der C2-Bindung zum Substituenten, Delokalisierung der Ladung in die Carboxylgruppe, und anschließender Abspaltung der C4-Hydroxygruppe). In allen Fällen wird der Reaktant über Magnesium koordiniert. 104
Abbildung 8-1. Möglicher sequentielle Mechanismus für die Reaktionen der Anthranilat-Synthase, Isochorismat-Synthase und ADC-Synthase, wie er von den Gruppen P. Bartlett und C. Walsh diskutiert wurde (Kozlowski et al., 1995, Walsh et al., 1990). Hierbei wird Chorismat zunächst nukleophil an C6-Position angegriffen, wobei als Nukleophil das Enzym selbst über eine nukleophile Seitenkette in Frage kommen könnte (1), die Carboxylatgruppe der Enolpyruvyl-Seitenkette von Chorismat (2) oder aber OH- aus Wasser (3). In einem zweiten Schritt erfolgt erneut ein nukleophiler Angriff von NH3 an C4- (ADC) bzw. C2- Position (ADIC) oder aber von OH- an Position C2, wodurch Isochorismat entsteht. ……105
Abbildung 6-6. Weitere synthetische Inhbitioren, die zusätzlich an Position 6 durch eine Hydroxygruppe substituiert sind (Quelle: He *et al.*, 2004). 107
Abbildung 6-7. Einheitliche Reaktionsprinzip der Anthranilat-Synthase, Isochorismat-Synthase und ADC-Synthase nach He *et al*., 2004. Bei allen drei Enzymen wird die Reaktion durch Addition von Stickstoff- oder Sauerstoff-Nukleophilen an C2 von Chorismat initiiert. Bei der Anthranilat-Synthase fungiert Ammoniak als Nukleophil, bei der Isochorismat-Synthase Wasser, bei der ADC-Synthase die ε-Aminogruppe von Lysin 274. 108
Abbildung 6-8. Bindung des Substratmimetikums 2-Fluorochorismat an Lys-274 der ADC-Synthase von *E. coli* durch nukleophilen Angriff der ε-Aminogruppe an C2 von Fluorochorismat. Während bei der Umsetzung von Chorismat die ε-Aminogruppe des Lysins als Abgangsgruppe fungiert, ist in diesem Fall Fluor bevorzugt, sodass sich ein aromatisches System bildet, welches kovalent an Lys-274 gebunden bleibt. 109
Abbildung 6-9. Katalysemechanismus der *E. coli* ADC-Synthase nach He *et al*., 2004, Bulloch *et al*., 2005 und He *et al*., 2006. 109
Abbildung 6-10. Reaktionsmechanismus der *B. subtilis* ADC-Synthase als Stellvertreter der alaninhaltigen ADC-Synthasen. Anstelle des Lys-274 bei *E. coli* greift hier Ammoniak, das von Gln stammt, nukleophil an C2 des Chorismats an. Dann folgt ein zweiter nukleophiler Angriff eines zweiten Moleküls Ammoniak auf C4 von ADIC. Beide Reaktionen werden durch die ADC-Synthase katalysiert. Der dritte Schritt der Reaktion, die Aromatisierung von ADC zu *p*ABA, der durch die ADC-Lyase katalysiert wird, ist wieder identisch mit dem Reaktionsmechanismus bei *E. coli*. 113

Abbildung 6-11. Katalysemechanismen der *B. subtilis* ADC-Synthase und der *E. coli* ADC-Synthase im Vergleich. 114
Abbildung 6-12. Von He *et al*. (2004) vorgeschlagener einheitliches Reaktionsprinzip der Anthranilat-Synthase, Isochorismat-Synthase und ADC-Synthase. Der neu entdeckte Reaktionsmechanismus der ADC-Synthase von *B. subtilis* fügt sich zwanglos in dieses Schema ein. 115
Abbildung 6-13. Kopplung der ADC-Synthase und der ADC-Lyase. 116
Abbildung 6-14. Biosynthesewege, die von ADIC ausgehen. A) Biosynthese von *p*ABA durch die K274A-PabB-Mutante von *E. coli*; B) Biosynthese von Anthranilat durch die H398M-TrpE-Mutante von *Salmonella tyhimurium*; C) Biosynthese von 3-*O*-Enolpyruvylanthranilat (OPA), durch SgcD von *Streptomyces globisporus* als Vorstufe des Endiin-Antitumor-Antibiotikums C-1027 (E); D) Biosynthese von *trans*-2,3-Dihydro-3-hydroxyanthranilat (DHHA) durch PhzE von *Pseudomonas fluorescens* als Vorstufe von Phenazin (F). 121
Abbildung 6-15. Sequenzvergleich von PabB (*B. subtilis*) mit K274A PabB (*E. coli*), H398M TrpE (*S. typhimurium*, NCBI Zugang 1I1Q_A), SgcD (*S. globisporus*, NCBI Zugang AAL06664) und PhzE (*P. fluorescens,* NCBI Zugang AAC18904; die 185 *C*-terminalen Aminosäuren sind hier nicht dargestellt, da sie keinerlei Homologie zu den anderen Enzymen aufweisen). Unterstrichen ist das konservierte Motiv PIAGT. 122
Abbildung 6-16. Schematische Darstellung der aktiven Tasche der Chorismat-Mutase von *B. subtilis* (Quelle: Kienhöfer *et al*., 2003). 125
Abbildung 6-17. Im oberen Teil der Abbildung ist die Sekundärstrukturvorhersage für *E. coli* PabB, darunter für *B. subtilis* PabB dargestellt. Im unteren Teil der Abbildung ist die Kristallstruktur von *E. coli* PabB (Parsons *et al*., 2002) abgebildet. Die zehn in der Kristallstruktur enthaltenen Helices werden sowohl für *E. coli* als auch für *B. subtilis* vorhergesagt. Das aktive Zentrum ist durch die eingezeichneten *Flaps* (rosa) verdeckt. 126
Abbildung 6-18. Genorganisation und genetischer Zusammenhang der Folsäure- und der Tryptophanbiosynthese von *B. subtilis*: Folatoperon, Mtr-Operon und Tryptophanoperon. 127
Abbildung 6-19. Struktur des TRAP-RNA-Komplexes. Elf identische Polypeptiduntereinheiten (hier jeweils in einer anderen Farbe dargestellt) binden infolge der Bindung von elf Tryptophanmolekülen an bestimmte RNA-Sequenzen des RNA-Transkripts des Tryptophanoperons und *pabA*, und verhindern so deren Translation (Quelle: Gollnick *et al*., 2005). 128
Abbildung 6-20: Sequenzvergleich der Anthranilat-Synthase TrpE und der ADC-Synthase PabB von *B. subtilis*. Farblich markiert sind: Die Aminosäurecluster, $LLESX_{10}S$ und NPSPYM, die für die allosterische Regulation durch Trp essentiell sind (gelb), die konservierten Aminosäuren der *active site* von PabB, abgeleitet vom *E. coli*-Enzym (grün), und die konservierten Aminosäuren der *active site* von TrpE (magenta). 129
Abbildung 6-21. Phylogenetischer Baum und *Alignment* von Anthranilat-Synthasen und ADC-Synthasen ausgewählter Mikroorganismen. *B. subtilis* TrpE: NCBI Zugang NP_390149; *E. coli* TrpE: NCBI Zugang NP_415780.1; Alle weiteren ADC-Synthase siehe Tabelle 5-1. 131
Abbildung 6-22. Biosynthesewege ausgewählter Stoffwechselprodukte, ausgehend von Chorismat und ergänzt um die in dieser Arbeit diskutierten Modifikationen bei der *B. subtilis* ADC-Synthase. 131

Abbildung 6-23. Mechanismus von PabC nach Nakai *et al.* (2000). Aminodesoxychorismat bildet eine Schiff-Base mit PLP, wodurch das katalytisch aktive Lys-140 frei wird, das eine Wasserstoffbrücke mit Thr-28 ausbildet. Die basische Aminogruppe des Lysins eliminiert dann ein Proton des ADC, wodurch ein chinoides PLP-Zwischenprodukt entsteht. Nun kann nach Rearomatisierung des Cofaktors Pyruvat abgespalten werden, wobei ein Proton von Thr auf den olefinischen Teil des 4-Amino-4-desoxychorismat-Intermediats übertragen wird. 132
Abbildung 6-24: Sequenzvergleich der ADC-Lyase PabC von *B. subtilis* und *E. coli.* Farblich markiert sind: Aminosäuren der Unterseite der *active site* von *E. coli*-PabC (rosa), die Aminosäuren der Seite/Wand der *active site* von *E. coli*-PabC (grün) sowie die entsprechenden Aminosäuren von *B. subtilis*, die zwar nicht identisch aber ähnlich sind (nach Nakai *et al*., 2000). 133
Abbildung 6-25. Bändermodell des *E. coli*-PabC-Homodimers mit dem Cofaktor PLP, der in räumlicher Nähe zum *N*-Terminus liegt. Eine der Untereinheiten ist in grau dargestellt (unten), die große und kleine Domäne der anderen Untereinheit sind in weiß bzw. schwarz abgebildet (oben) (Quelle: Nakai *et al*., 2000)..... 134

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1. Antibakterielles Spektrum von Abyssomicin C. Angegeben sind die Hemmhöfe des Plattendiffusionstests [mm] bei Verwendung von Komplexmedium (Riedlinger *et al.*, 2004). 6
Tabelle 4-1. Bakterienstämme, die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt wurden. 48
Tabelle 4-2. Übersicht über die verwendeten Konstrukte mit Konstruktname und NCBI-Zugangsnummer für die entsprechenden Sequenzen. 52
Tabelle 4-3. Oligonukleotidprimer für die Herstellung der Expressionskonstrukte. 58
Tabelle 4-4. Oligonukleotidprimer für *Site-Directed Mutagenesis*. 59
Tabelle 4-5. Übersicht über die generierten Mutanten mit Konstruktname und Hinweis auf die substituierten Aminosäuren. Die Zahlen bezeichnen die Positionen der substituierten Aminosäuren in den entsprechenden *Wildtyp*-Sequenzen beginnend vom Start-Methionin auf Basis der in der Datenbank von NCBI hinterlegten Sequenzen. 62
Tabelle 5-1. Als ADC-Synthasen annotierte Sequenzen verschiedener Mikroorganismen entnommen aus der Datenbank von NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). 71
Tabelle 5-2. Kalibriergerade von 0,1 µM bis 100 µM *p*ABA. 94
Tabelle 5-3. Qualitätskontrollen von 0,2 µM bis 20 µM *p*ABA 94
Tabelle 5-4. Quantifizierung der *E. coli* ADC-Synthase-Reaktion. 96
Tabelle 5-5. Quantifizierung der *B. subtilis* ADC-Synthase-Reaktion in Ammoniumsulfat-puffer. 99
Tabelle 5-6. Quantifizierung der *B. subtilis* ADC-Synthase-Reaktion in Glutaminpuffer. 100
Tabelle 6-1. Inhibitionskonstanten der synthetischen Inhibitoren (1), (2), (3) (Kozlowski *et al.*, 1995). 103
Tabelle 6-2. Die im Zuge dieser Arbeit bestimmten kinetischen Parameter für die *B. subtilis* und *E. coli* ADC-Synthase. 116
Tabelle 6-3. Übersicht über die bisher publizierten kinetischen Konstanten der *E. coli* ADC-Synthase sowie einiger Mutanten. 117

Teile der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht:

Keller, S.; Schadt, H.S.; Ortel, I.; Süssmuth, R.D. (2007)
Action of atrop-abyssomicin C as an inhibitor of 4-amino-4-deoxychorismate synthase PabB. *Angew. Chem. Int. Ed., 46*: 8284-8286

Schadt, H.S.; Schadt, S., Oldach, F.; Süssmuth, R.D. (2009)
2-Amino-2-deoxyisochorismate is a key intermediate in *Bacillus subtilis para*-aminobenzoic acid biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc., accepted for publication*.

Danksagung

Prof. Dr. Roderich Süßmuth danke ich für die hervorragenden Arbeitsbedingungen, insbesondere für den phantastischen Gerätepark, für die Freiheit der eigenständigen Themenwahl und –bearbeitung, für seine Unterstützung, für sein Vertrauen und seinen Glauben an mich.

PD Dr. Ullrich Keller danke ich für interessante und anregende Diskussionen sowie für die Bereitschaft, die vorliegende Arbeit zu begutachten.

Der DFG danke ich für ihre finanzielle Unterstützung.

Den Kolleginnen und Kollegen aus dem Arbeitkreis Süßmuth danke ich für die kollegiale Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre. Den „Massenspektrometrikern“ der Gruppe, insbesondere Dr. Diane Butz, Jonny Nachtigall, Eva Mösker, Dr. Simone Schadt, Dr. Timo Schmiederer und Dr. Kathrin Schneider, danke ich für die gute Zusammenarbeit an den Massenspektrometern. Wolfgang Müller danke ich für die hervorragende Zusammenarbeit beim Aufbau und Betrieb des Proteinbiochemielabors, insbesondere was die Äkta betrifft. Elvira Gottardi, Eva Mösker und Hanna von Suchodoletz, mit denen ich das Büro geteilt habe, danke ich für die gute Atmosphäre

Anne Hänchen danke ich für das Messen der NMR-Proben, und Dr. Simone Schadt danke ich für die Unterstützung bei der Auswertung dieser Proben.

Meinem Diplomanden Florian Oldach danke ich für die fruchtbare Zusammenarbeit auf dem Gebiet der *p*ABA-Biosynthese und meiner Doktorandin Diana Matthes danke ich für die exzellente Zusammenarbeit auf dem spannenden Gebiet der synthetischen Gene von Cyclodepsipeptiden. Beiden wünsche ich viel Erfolg für ihre weiteren Arbeiten.

Meiner Frau Simone danke ich für hilfreiche fachliche Diskussionen, für das Korrekturlesen dieser Arbeit, vor allem aber für ihre grenzenlose Unterstützung und ihr Verständnis.

Nicht zuletzt möchte ich meinen lieben Eltern und meinen Geschwistern danken für ihr Vertrauen und für die bedingungslose Unterstützung.

Meine akademischen Lehrer waren

K. Albert, C. Bardele, E. Bayer, H. Bisswanger, K. Bock, P. Bohley, U. Breyer-Pfaff, A. Buchmann, P. Burcham, R. Dringen, M. Duszenko, H. Echner, H. Eckstein, K. Eisele, K. Fröhlich, G. Gauglitz, M. Groll, H. Günzl, G. Häfelinger, B. Hamprecht, R. Irvine, W. Jäger, H. Kallbacher, G. Jung, E. Lindner, G. Luippold, P. MacKenzie, F. Madeo, J. Maier, D. Mecke, J. Miners, P. Münzel, I. Musgrave, H. Ninnemann, H. Oberhammer, H. Oßwald, U. Quast, H. Pommer, H. Probst, K. Reutter, A. Salem, H. Schott, S. Schumacher, M. Schwarz, A. Somogyl, R. Süssmuth, J. Strähle, W. Voelter, G. Wagner, J. Werringloer, U. Weser, W. Wohlleben, K.-P. Zeller.