Die Entner-Doudoroff-Dehydratase

Vom Fachbereich Chemie der Rheinland-Pfälzischen
Technischen Universität Kaiserlautern-Landau
zur Verleihung des akademischen Grades
"Doktor der Naturwissenschaften"
genehmigte

Dissertation

vorgelegt von
Dipl. Chem. Monika Kerstin Reeh (geb. Schneider)

DE - 386

Betreuer: Prof. Dr. A. J. Pierik

Rheinland-Pfälzische Technische Universität
Kaiserslautern-Landau

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von Januar 2017 bis Juni 2021 im Arbeitskreis von Prof. Dr. A. J. Pierik an der Technischen Universität Kaiserslautern, Fachbereich Chemie, Fachrichtung Biochemie.

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 14. Juli 2021

Promotionskommission

Vorsitzender:	Prof. Dr. Jörg Fahrer
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Antonio J. Pierik
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Volker Schünemann

Zusammenfassung

Erstmals beschrieben im Bakterium *Pseudomonas saccharophila* ist der Entner-Doudoroff-Weg (ED-Weg), einer der drei weit verbreitetsten Abbauwege von Glucose und anderen Energielieferanten, neben dem Embden-Meyerhof-Parnas-Weg (Glycolyse) und dem Pentosephosphatweg. Er ist für *Zymomonas mobilis*, der „Hefe des Tequilas“ der einzige Weg zur Energiegewinnung sowie zur Synthese von Ethanol und weit verbreitet in Krankheitserregern. Hohe Durchsatzgeschwindigkeiten machen ihn für biotechnologische Anwendungen interessant. Umso erstaunlicher ist es, dass er bis jetzt sehr wenig untersucht wurde. Der Hauptgrund dürfte hierbei die Instabilität des Schlüsselenzyms, der Entner-Doudoroff-Dehydratase (6-Phosphogluconat-Dehydratase, EDD), sein, wodurch die Erforschung der EDD der Dreh- und Angelpunkt für ein Verständnis des gesamten ED-Weges ist.

In dieser Arbeit wurde unter anderem auf bioinformatischer Basis die Verbreitung der EDD in Bakterien untersucht. Zahlreiche Vertreter der EDD wurden in Gammaproteobakterien, Actinobacterien, Alphaproteobakterien und Betaproteobakterien gefunden. Ein Alignment von über 200 Sequenzen ermöglicht die eindeutige Abtrennung der EDD innherhalb der IlvD(2,3-Dihydroxy-3-methyl/Isovalerat-Dehydratase)/EDD-Familie und zeigt zwei hochkonservierte Bereiche, welche in der EDD aus *Thermomonospora curvata* bei ^{165}CDKxxP^{170} und ^{521}DxRxSG^{526} liegen.

Charakterisierungen des heterolog exprimierten und affinitätschromatographisch aufgereinigten Enzyms wurden für die EDD aus *E. coli*, *Z. mobilis* und *T. curvata* vorgenommen. Wobei für letztere die Thermostabilität und der Erhalt der Aktivität über Wochen im Anaeroben nachgewiesen werden konnte, was die EDD aus *T. curvata* für zahlreiche Anwendungen interessant macht. Für alle 3 Enzyme wurde gezeigt, dass diese nicht einen [2Fe-2S]-Cluster, sondern vielmehr einen [4Fe-4S]-Cluster koordinieren. Kinetische Daten wurden bestimmt, was durch die Etablierung eines gekoppelten Aktivitätsassays möglich war.

Mutagenese mit anschließender Charakterisierung der Mutanten zeigt, dass der [4Fe-4S]-Cluster in dem Enzym aus *T. curvata* durch C123, C165 und C232 koordiniert ist. Eine „Ecke“ des Clusters bleibt, wie bei der Aconitase, für die Substratbindung frei. Dieses Eisenion konnte selektiv durch ^{57}Fe ersetzt werden und so spezifische Mößbauermessungen durchgeführt werden.

Erstmalig an einer EDD durchgeführte spektroskopische Untersuchungen wie die Mößbauerspektroskopie oder die Resonanz-Raman Spektroskopie zusammen mit ESR-Spektroskopie geben Informationen über das aktive Zentrum. Eine erfolgreiche Etablierung der Synthese des Substrats 6-Phosphogluconat aus Glucose ermöglicht die Untersuchung der Substratbindung auch durch die Synthese von ^{13}C-gelabeltem Substrat. Die Bestimmung des Mechanismus wurde durch NMR-Messungen sowohl zeitabhängig (^{1}H) als auch 2-dimensional (COSY, NOESY) unterstützt. Die durch Meloche und Wood (131) gemachte Annahme, dass die Ketonisierung des Enol-Produkts nicht durch die EDD katalysiert wird, wurde widerlegt. Sowohl in der Hin- als auch in der Rückreaktion wurde selektiv die pro-S Position an C-3 aus Deuteriumoxid deuteriert.

Summary

First described in the bacterium *Pseudomonas saccharophila* the Entner-Doudoroff-pathway (ED-pathway) is one of the three most widespread metabolic pathways for glucose and other energy sources. The other two pathways are the Embden-Mayerhof-Parnas-pathway (Glycolysis) and the Pentosephosphate-pathway. For *Zymomonas mobilis* (also known as the „yeast of tequila“) the ED-pathway is the only way to generate energy while synthesizing ethanol as a byproduct. Additionally, the ED-pathway is used by many pathogens, making it a potential target for antibiotics. Its high flux rate makes it interesting for biotechnological applications. Still there is not much known about the ED-pathway to this day. The main reason for this is probably the instability of its key enzyme: the Entner-Doudoroff dehydratase (6-phosphogluconate dehydratase, EDD). This makes the research on EDD the fulcrum of understanding the whole ED-pathway.

In this work bioinformatic analyses on the distribution of EDD in bacteria show that mostly gammaproteobacteria, actinobacteria, alphaproteobacteria and betaproteobacteria have an EDD. An alignment of more than 200 sequences made it possible to distinguish EDD from other members of the IlvD(2,3-Dihydroxy-3-methyl/Isovalerate dehydratase)/EDD-family. It also shows two highly conserved regions. For the EDD from *Thermomonospora curvata* those are ^{165}CDKxxP^{170} and ^{521}DxRxSG^{526}.

Characterization of the heterologously expressed and affinity-tagged isolated EDDs of *E. coli*, *Z. mobilis* and *T. curvata* was carried out. For the latter thermostability and stability of the activity over 7 weeks in an anaerobic environment was demonstrated, properties which are for many applications of key interest. All three have a [4Fe-4S]-cluster in the active center, not a [2Fe-2S]-Cluster. Kinetic data has been determined by development of a coupled activity assay.

Mutagenesis followed by characterization of the mutants shows the coordination of the [4Fe-4S]-cluster of the enzyme from *T. curvata* by C123, C165 and C232, leaving one „corner“ of the cluster for the coordination of the substrate, as described for aconitase. This iron-ion could be substituted selectively by ^{57}Fe to carry out site-specific Mößbauer spectroscopy.

For the first time Mößbauer spectroscopy and Resonance Raman spectroscopy have been carried out for an EDD. Together with EPR spectroscopy information on the active center was obtained. A successful synthesis of the substrate 6-phosphogluconate from glucose gave the opportunity to look into the coordination of the substrate. Furthermore, it enabled the synthesis of ^{13}C labeled substrate. The determination of the mechanism was supported by NMR measurements, both time dependent (^{1}H) and 2-dimensional (COSY, NOESY). The hypothesis by Meloche and Wood (131) that the ketonisation is not catalysed by the EDD was disproven. Both in the forward and the reverse reaction the pro-S position at C-3 was selectively deuterated by deuteriumoxid.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung I

Summary III

Abbildungsverzeichnis IX

Tabellenverzeichnis XII

Abkürzungsverzeichnis XV

1 Einleitung 1

1.1 Die Dihydroxysäure-Dehydratasen . . . 1
1.1.1 Verbreitung der Dihydroxysäure-Dehydratasen . . . 1
1.1.2 Die 2,3-Dihydroxy-3-methyl/Isovalerat-Dehydratase . . . 3
1.1.3 Die D-Xylonat-Dehydratase . . . 4
1.1.4 Die L-Arabinonat-Dehydratase . . . 5
1.1.5 Die D-Gluconat-Dehydratase . . . 5
1.1.6 Die 6-Deoxy-6-sulfogluconat-Dehydratase . . . 6
1.2 Eisen-Schwefel-Cluster . . . 6
1.2.1 Verbreitung und Arten von Eisen-Schwefel-Clustern . . . 6
1.2.2 Aufgaben der Eisen-Schwefel-Cluster . . . 7
1.3 Der Entner-Doudoroff-Weg . . . 9
1.3.1 Verbreitung des ED-Weges . . . 11
1.3.2 Anwendung des ED-Weges und verwandter Enzyme . . . 12
1.4 Die Enzyme des Entner-Doudoroff-Wegs . . . 14
1.4.1 Die Entner-Doudoroff-Dehydratase . . . 14
1.4.2 Die Entner-Doudoroff-Aldolase . . . 15
1.5 Zielsetzung . . . 17

2 Methodenteil 19

2.1 Bioinformatik . . . 19
2.2 Vorbereitung von Materialien . . . 20
2.2.1 Gießen von Agarose-Gelen . . . 20
2.2.2 Gießen von SDS-PAGE-Gelen . . . 20
2.2.3 Gießen von Platten . . . 20
2.2.4 Herstellung kompetenter Zellen . . . 21
2.2.5 Antibiotika . . . 21
2.3 Vom Gen zum Enzym . . . 21
2.3.1 Polymerase-Kettenreaktion . . . 21
2.3.2 Qualitatives Agarose-Gel . . . 22
2.3.3 Präparatives Agarose-Gel . . . 23
2.3.4 Verdau und Ligation . . . 23
2.3.5 Minipräparation und Sequenzierung . . . 24
2.3.6 Probeverdau . . . 25
2.3.7 Kolonie-PCR . . . 25
2.3.8 Transformation von *E. coli* Zellen . . . 26

2.3.9 Zellzucht und Ernte . . . 26
2.3.10 Zellaufzucht in Minimalmedium . . . 27
2.3.11 Aufschluss mit Sonicator im anaeroben Zelt . . . 28
2.3.12 Aufreinigung über Strep-*Tag* . . . 28
2.3.13 Aufschluss mit French-Press . . . 29
2.3.14 Aufreinigung über His-*Tag* . . . 29
2.4 Charakterisierung der Proteine . . . 30
2.4.1 UV-Vis Spektroskopie . . . 30
2.4.2 Quantitative Proteinbestimmung mit Micro-Biuret . . . 30
2.4.3 Quantitative Bestimmung der Eisenkonzentration im Protein . . . 31
2.4.4 Quantitative Bestimmung des säurelabilen Schwefels im Protein . . . 32
2.4.5 Charakterisierung der Aufreinigung über SDS-PAGE . . . 32
2.5 Der gekoppelte Enzymassay zur Aktivitätsmessung von EDD . . . 34
2.5.1 Variationen des gekoppelten Enzymassays . . . 35
2.5.2 Michaelis-Menten-Experimente . . . 35
2.5.3 Der abgestoppte Enzymassay . . . 36
2.6 Mutagenese . . . 37
2.6.1 Durchführung der Mutagenese . . . 37
2.6.2 Zellextraktaktivitätsmessung . . . 38
2.7 Synthese von 6-Phosphogluconat . . . 39
2.7.1 Synthese von D-Glucose-6-phosphat Bariumsalz . . . 40
2.7.2 Synthese von 6-Phosphogluconat Bariumsalz . . . 40
2.7.3 Synthese von 6-Phosphogluconat Trinatriumsalz . . . 41
2.7.4 Charakterisierung der Produkte durch NMR-Spektroskopie . . . 41
2.7.5 Bestimmung der Reinheit des 6-Phosphogluconats über den gekoppelten Enzymassay . . . 41
2.8 Mößbauerspektroskopie . . . 42
2.8.1 Herstellung einer ^{57}Fe-Ammoniumeisencitratlösung . . . 42
2.8.2 Herstellung von Mößbauerproben . . . 43
2.8.3 Aufnahme von Mößbauerspektren . . . 43
2.8.4 Selektives Entfernen eines Fe-Ions des [4Fe-4S]-Clusters . . . 43
2.8.5 Selektiver Einbau eines Fe-Ions in einen [3Fe-4S]-Cluster . . . 44
2.9 Kristallisieren . . . 44
2.9.1 Aufreinigung durch Größenausschlusschromatographie . . . 44
2.9.2 Nicht reduzierende SDS-PAGE . . . 46
2.9.3 Entfernung des Strep-*Tag* mit der TEV-Protease . . . 46
2.9.4 Aufreinigung ohne *Tag*: Heparin-Säule . . . 46
2.9.5 Kristallisieren der EDD . . . 47
2.10 ESR-Spektroskopie . . . 47
2.11 Resonanz-Raman-Spektroskopie . . . 48
2.12 NMR-Spektroskopie . . . 49
2.12.1 NMR-Spektroskopie zur Aktivitätsverfolgung von EDD . . . 49
2.12.2 NMR-Spektroskopie zur Aufklärung der Stereoselektivität . . . 49
2.13 Redoxtitration . . . 50

3 Ergebnisse **51**
3.1 Bioinformatische Einordnung . . . 51
3.1.1 Abgrenzung der EDD zu anderen Dihydroxysäure-Dehydratasen . 51
3.1.2 Verbreitung der EDD . . . 52
3.1.3 Auswahl einer EDD für die Proteinexpression . . . 57
3.2 Optimierung der Proteinexpression . . . 58
3.2.1 Wachstumstemperatur und -zeit . . . 58
3.2.2 Zelldichte bei Induktion . . . 59
3.2.3 IPTG-Konzentration bei Induktion . . . 59
3.2.4 Weitere Optimierung . . . 60
3.3 Vergleich von EDD aus verschiedenen Organismen . . . 60
3.3.1 Clustergehalt . . . 61
3.3.2 UV-Vis Spektren . . . 62
3.3.3 SDS-PAGE . . . 64
3.3.4 Michaelis-Menten-Kinetik . . . 65
3.3.5 Stabilität . . . 67
3.3.6 ESR-Spektroskopie . . . 69
3.3.7 Mößbauer-Spektroskopie . . . 70
3.4 Charakterisierung der EDD aus *Thermomonospora curvata* . . . 73
3.4.1 Stabilität der EDD aus *Thermomonospora curvata* . . . 73
3.4.2 Temperatur- und pH-Wert-Optimum der EDD aus *Thermomonospora curvata* . . . 74
3.4.3 Relevanz von Mg^{2+}-Ionen für die Aktivität der EDD aus *T. curvata* 77
3.5 Kristallisation von EDD . . . 77
3.5.1 Aufreinigung mit anschließendem Verdau durch TEV-Protease . . 78
3.5.2 Aufreinigung mit Heparin-Säule . . . 79
3.5.3 Aufreinigung durch Größenausschlusschromatographie . . . 80
3.5.4 Optimierung der Größenausschlusschromatographie . . . 80
3.5.5 Kristallisationsexperimente . . . 83
3.6 Detektion der Cluster-Liganden . . . 83
3.6.1 Aktivitätsmessungen . . . 84
3.6.2 Charakterisierung der Cluster-Ligand-Mutanten . . . 84
3.7 Detektion der katalytischen Base . . . 88
3.7.1 Bioinformatische Grundlagen für die Auswahl der infrage kommenden Aminosäuren . . . 88
3.7.2 Zellextraktaktivitätsmessung der Mutanten . . . 89
3.7.3 Charakterisierung der Mutanten . . . 91
3.8 Analysen des aktiven Zentrums . . . 94
3.8.1 Optimierung des selektiven Eiseneinbaus . . . 94
3.8.2 Mößbauerspektren des selektiven Eiseneinbaus . . . 96
3.8.3 Mößbauerspektren der mit Dithionit reduzierten Probe . . . 99
3.8.4 Mößbauerspektren nach Inkubation mit Substrat . . . 99
3.8.5 Resonanz-Raman-Experimente . . . 101
3.8.6 Redoxpotential des [4Fe-4S]-Clusters . . . 103
3.9 Synthese des Substrats 6-Phosphogluconat . . . 104
3.9.1 Bestimmung der Reinheit des synthetisierten 6-Phosphogluconats mittels NMR . . . 104

3.9.2 Vergleich der Reinheit der Syntheseprodukte . . . 105
3.10 Katalytischer Reaktionsverlauf . . . 107
3.10.1 Zuordnung der Signale der Produkt und Edukt NMR-Spektren . . 107
3.10.2 Einordnung der Produktkonformere anhand von NMR-Spektren . 110
3.10.3 Untersuchung der Keto-Enol-Tautomerie von 2-Keto-3-deoxy-6-Phosphogluconat durch NMR-Spektroskopie . . . 113
3.10.4 Stereochemische Untersuchung der von EDD katalysierten Reaktion durch NMR-Spektroskopie . . . 115

4 Diskussion **117**
4.1 Analyse der Verbreitung der EDD . . . 117
4.2 Vergleich der EDD aus verschiedenen Organismen . . . 118
4.3 Charakterisierung und Einordnung der EDD aus *T. curvata* . . . 119
4.4 Räumliche Aufklärung der EDD . . . 120
4.4.1 Räumliche Aufklärung durch Mutation . . . 121
4.4.2 Räumliche Aufklärung durch Spektroskopie . . . 122
4.4.3 Kristallisationsexperimente . . . 124
4.5 Stereochemische Aspekte der von EDD katalysierten Reaktion . . . 125
4.5.1 Stereochemie am 2-Keto-3-deoxy-6-phosphogluconat . . . 125
4.5.2 Mechanismus der durch die EDD katalysierten Reaktion . . . 127

5 Ausblick **131**

6 Anhang **133**

7 Materialien **145**
7.1 Geräte . . . 145
7.2 Verbrauchsmaterialien . . . 147
7.3 Chemikalien . . . 148
7.4 Vorgefertigte Lösungen und Reagenzien . . . 151
7.5 Puffer und Lösungen . . . 151
7.6 Zellstämme und Plasmide . . . 156
7.7 Oligonukleotide . . . 160
7.8 DNA und Aminosäuresequenzen der Proteine . . . 163
7.9 Säulen und Säulenmaterialien . . . 168
7.10 Größenstandards . . . 168
7.11 Proteine und Enzyme . . . 170
7.12 Software . . . 170
7.13 Sonstige Materialien . . . 171

Danksagung **191**

Lebenslauf **193**

Eidesstattliche Erklärung **194**

Abbildungsverzeichnis

1 Reaktionen, welche durch die Enzyme der IlvD/EDD-Superfamilie katalysiert werden . . . 2
2 Die Biosynthese von L-Valin, L-Leucin und L-Isoleucin . . . 4
3 Der Sulfo-ED-Weg . . . 6
4 Typische Eisen-Schwefel-Cluster . . . 7
5 Die am weitesten verbreiteten Stoffwechselwege zur Energiegewinnung . . 10
6 Die Reaktionen des gekoppelten Enzymassays . . . 34
7 Der Reaktionsweg für die Synthese des Substrats 6-Phosphogluconat . . . 40
8 Der Gen-Cluster der *edd* aus den hier verwendeten Organismen, sowie aus *Neisseria gonorrhoeae* . . . 51
9 Phylogenetischer Baum ausgewählter DHADs . . . 53
10 Phylogenetischer Baum zur Verbreitung der *edds* . . . 54
11 Vergleich der EDD aus verschiedenen Organismen . . . 61
12 Visueller Vergleich der in *E. coli* produzierten EDD aus verschiedenen Organismen . . . 62
13 UV/Vis-Spektren der EDD aus verschiedenen Organismen . . . 62
14 UV/Vis-Spektren der reduzierten EDD aus verschiedenen Organismen . . 63
15 SDS-PAGE der Aufreinigung von EDD aus *Thermomonospora curvata* . . 64
16 SDS-PAGE der EDD aus verschiedenen Organismen . . . 65
17 Michaelis-Menten-Plot der EDD aus *T. curvata* . . . 66
18 Aktivität der EDD aus verschiedenen Organismen und der Mutante CC53_63AA aus *T. curvata* über 24 h im Anaeroben bei ca. 24 °C . . . 68
19 Aktivität in aerober Umgebung der EDD aus verschiedenen Organismen bei ca. 24 °C . . . 69
20 ESR-Spektrum der EDD . . . 70
21 Mößbauerspektrum der EDD aus *E. coli* . . . 71
22 Mößbauerspektrum der EDD aus *T. curvata* . . . 72
23 Aktivität der EDD aus *T. curvata* bei Inkubation über mehrere Wochen . 73
24 pH-Optimum der EDD aus *T. curvata* bei ca. 24 °C . . . 74
25 Stabilität der EDD aus *T. curvata* bei Inkubation bei pH 6 und 9,5 bei ca. 24°C . . . 75
26 Temperaturoptimum der EDD aus *T. curvata* . . . 76
27 Stabilität der EDD aus *T. curvata* bei Inkubation bei 60 °C . . . 76
28 Aktivität der EDD aus *T. curvata* in Abhängigkeit der Mg^{2+}-Ionen-Konzentration im Reaktionspuffer. . . . 77
29 SDS-PAGE nach Inkubation der EDD aus *T. curvata* mit TEV-Protease . 78
30 SDS-PAGE zur Aufreinigung der EDD aus *T. curvata* ohne *Tag* mit Heparin-Säule . . . 79
31 Elutionsprofil der Größenausschlusschromatographie der EDD aus *T. curvata* . . . 80
32 SDS-PAGE Variationen (reduziert/nicht reduziert mit DTT/DT und ohne/mit Hitzeschock) . . . 82
33 Erste Kristalle der EDD CC53_63AA aus *T. curvata* . . . 83
34 Aktivität der Mutanten im Zellextrakt zur Clusterligandenbestimmung . . 84
35 SDS-PAGE der CxxxA-Mutanten von EDD aus *T. curvata* . . . 85

36 UV/Vis-Spektren der CxxxA-Mutanten von EDD aus *T. curvata* 86
37 UV/Vis-Spektren der reduzierten CxxxA-Mutanten von EDD aus *T. curvata* 87
38 ESR-Spektrum der CxxxA-Mutanten von EDD aus *T. curvata* bei 10 K gemessen 87
39 ESR-Spektrum der CxxxA-Mutanten von EDD aus *T. curvata* bei 77 K gemessen 88
40 Aminosäuresequenz der EDD aus *T. curvata* mit Annotation der mutierten Aminosäuren 89
41 Aktivität der Zellextrakte verschiedener SxxxA-Mutanten der EDD aus *T. curvata* 90
42 Aktivität der Zellextrakte weiterer Mutanten der EDD aus *T. curvata* . . 91
43 Visuelle Darstellung der Mutanten der möglichen katalytischen Basen . . 92
44 UV/Vis-Spektren der Mutanten zur Suche der katalytischen Base 93
45 ESR-Spektren der reduzierten Mutanten der möglichen katalytischen Basen bei 10 K 94
46 ESR-Spektren zur Überprüfung des selektiven Eisenausbaus 95
47 Mößbauerspektren in Abhängigkeit der Eisenkonzentration beim selektiven Eiseneinbau 98
48 Aktivität der Mößbauerproben in Abhängigkeit der Ammoniumeisencitratkonzentration bei selektivem Eiseneinbau 99
49 Mößbauerspektrum mit selektiven Eiseneinbau nach Inkubation mit Substrat 100
50 Resonanz-Raman-Experimente 101
51 Resonanz-Raman-Experimente nach Substratzugabe 102
52 Experimente zur Bestimmung des Redoxpotentials der EDD aus *T. curvata* 103
53 ^{1}H-NMR-Spektrum des Syntheseproduktes bei 400 MHz in D_2O 104
54 ^{1}H-NMR-Spektrum des 2-^{13}C-gelabelten Syntheseproduktes 105
55 ^{13}C-NMR-Spektrum der Syntheseprodukte 106
56 ^{1}H-NMR Spektrum des Eduktes 6-Phosphogluconat bei 600 MHz 107
57 COSY des Eduktes 6-Phosphogluconat 108
58 ^{1}H-NMR-Spektrum von 2-Keto-3-deoxy-6-phosphogluconat 109
59 COSY des Produktes 2-Keto-3-deoxy-6-phosphogluconat 110
60 NOESY des Produktes 2-Keto-3-deoxy-6-phosphogluconat 111
61 Konformere des 2-Keto-3-deoxy-6-phosphogluconats 112
62 Keto-Enol-Tautomerie des 2-Keto-3-deoxy-6-phosphogluconats 112
63 Anomere des 2-Keto-3-deoxy-6-phosphogluconats 112
64 ^{1}H-NMR-Spektren von 2-Keto-3-deoxy-6-phosphogluconat in Abhängigkeit von der Zeit 114
65 Abhängigkeit der Deuterierung von 2-Keto-3-deoxy-6-phosphogluconat von der Konzentration von EDD 115
66 Umsetzung von 6-Phosphogluconat zu 2-Keto-3-deoxy-6-phosphogluconat durch EDD 116
67 Reaktionsmechanismus der EDD 128
68 SDS-PAGE der Aufreinigung von EDD aus *Z. mobilis* und *E. coli* 140
69 ESR Spektren der EDD aus *Z. mobilis* und *T. curvata* 141
70 Mößbauerspektren im externen Magnetfeld der EDD S525A aus *T. curvata* 142

71 Mößbauerspektren der EDD aus *T. curvata* nach Inkubation mit 6-Phosphogluconat . . . 143
72 Vektorkarte von pET Duet-1 . . . 157
73 Vektorkarte IBA 101 . . . 158
74 Vektorkarte pET28aTSTS . . . 158
75 DNA- und Aminosäuresequenz von phoN-Sf, welches zur Synthese verwendet wurde . . . 164
76 DNA- und Aminosäuresequenz des synthetischen Gens der EDD aus *T. curvata* codonoptimiert für *E. coli* . . . 165
77 DNA- und Aminosäuresequenz von EDD aus *E. coli* . . . 166
78 DNA- und Aminosäuresequenz des synthetischen Gens der EDD aus *Z. mobilis* codonoptimiert für *E. coli* . . . 167
79 DNA- und Aminosäuresequenz EDA aus *E. coli* . . . 168
80 Der 2-log DNA ladder Marker . . . 169
81 Der Proteinmarker für SDS-PAGE . . . 169

Tabellenverzeichnis

1 Antibiotika und ihre Konzentrationen . . . 21
2 Die Bedingungen einer PCR zur DNA-Amplifikation . . . 22
3 Durchgeführte Klonierungen . . . 23
4 Kolonie-PCR . . . 26
5 Pipettierschema für die Proteinkonzentrationsbestimmg durch Micro-Biuret 31
6 Pipettierschema für die Bestimmung der Eisenkonzentration im Protein . 32
7 Pippetierschema für die Bestimmung von säurelabilem Schwefel . . . 33
8 Verwendete Good-Puffer zur Variation des pH-Werts . . . 35
9 Der Ablauf des abgestoppten gekoppelten Enzymassays . . . 36
10 Ablauf der PCR des 1. Schrittes der Mutagenese . . . 37
11 Ablauf der PCR des 2. Schrittes der Mutagenese . . . 38
12 Proteine und ihre Größe für das Eichen der Säule der Größenausschluss-chromatographie . . . 45
13 Ablauf der Größenausschlusschromatographie . . . 45
14 Puffervarianten für die Größenausschlusschromatographie . . . 45
15 TEV-Protease Ansätze . . . 46
16 Aufreinigung mit Heparin-Säule . . . 47
17 Proteinproben für die Resonanz-Raman-Spektroskopie . . . 48
18 Parameter der NMR-Spektren . . . 50
19 Ablauf der Redoxtitration . . . 50
20 Hits des Blasts in NCBI mit dem Gen für EDD aus *E. coli* in allen in Tabelle 6 aufgeführten Bakterienklassen . . . 55
21 EDD-Ausbeute und Fe-Gehalt bei Variation der Wachstumstemperatur und -zeit . . . 58
22 EDD-Ausbeute und Fe-Gehalt in Abhängigkeit der Zelldichte bei Induktion 59
23 EDD-Ausbeute und Fe-Gehalt in Abhängigkeit der IPTG-Konzentration bei Induktion . . . 60
24 Vergleich der Absorptionen bei 410 und 280 nm der EDD aus drei Organismen . . . 63
25 Michaelis-Menten-Konstanten und maximale Geschwindigkeit . . . 67
26 Halbwertszeit der EDD aus verschiedenen Organismen, aerob und anaerob bei ca. 24 °C . . . 69
27 Parameter der Anpassung der Mößbauerspektren . . . 72
28 Optimierung der Bedingungen für die Größenausschlusschromatographie . 81
29 Isolierte Proteinmenge und Eisengehalt der CxxxA-Mutanten . . . 85
30 Vergleich der Mutanten zur Suche der katalytischen Base . . . 92
31 Experimente zum Vergleich des selektiven Eiseneinbaus . . . 96
32 Mößbauerparameter der Anpassung der Mößbauerspektren in Abhängigkeit von der Eisenionenkonzentration bei selektivem Eiseneinbau . . . 97
33 Mößbauerparameter der Anpassung des Mößbauerspektrums der reduzierten EDD . . . 99
34 Mößbauerparameter der Anpassung des Mößbauerspektrums der selektiv gelabelten Probe nach Inkubation mit Substrat 6-Phosphogluconat . . . 100
35 Bestimmung des 6-Phosphogluconatgehalts der Syntheseprodukte mittels Aktivitätsmessung . . . 106

36 Auswertung des NOESYs . . . 111
37 Abstände der Protonen in KDPG . . . 111
38 Vergleich der NMR-Spektren von 2-Keto-3-deoxy-6-phosphogluconat mit Literaturwerten . . . 113
39 Überblick über die Deuterierung verschiedener Protonen des 2-Keto-3-deoxy-6-phosphogluconats . . . 116
40 Bakterienstämme, deren Genome auf *edd* untersucht wurden . . . 133
41 Liste der auf *edd* untersuchten Bakterienklassen in NCBI . . . 139
42 Parameter der Anpassung der Mößbauerspektren im externen Magnetfeld 141
43 Zellstämme . . . 156
44 Allgemeine Plasmide . . . 156
45 Spezifische Plasmide . . . 159
46 Primer für Klonierung . . . 160
47 Primer für Mutagenese . . . 160
48 Primer für Sequenzierung . . . 163
49 DNA und Aminosäuresequenzen der Proteine, ein Überblick . . . 163
50 Säulenmaterial . . . 168
51 Größenstandards . . . 168
52 Aufreinigungskits . . . 171
53 Firmen und Collaborationen . . . 171
54 Kristallisationsscreens . . . 171

Abkürzungsverzeichnis

6-PG	6-Phosphogluconat
Amp	Ampicillin
AraD	L-Arabinonat-Dehydratase
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
AU	Absorption
bp	Basenpaare
C. crescentus	*Caulobacter crescentus*
CIA	Cytosolic iron sulfur protein assembly
COSY	Correlated Spectroscopy
δ	Isomerieverschiebung
$\Delta \mathbf{E}_Q$	Quadrupolaufspaltung
DHAD	Dihydroxysäure-Dehydratase
DF/FT	Durchfluss
E. coli	*Escherichia coli*
EDA	Entner-Doudoroff-Aldolase
EDD	Entner-Doudoroff-Dehydratase
EMP	Embden-Meyerhof-Parnas
eq.	Äquivalent
ESR/EPR	Elektronenspinresonanz
G6PD	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase
GAD	Gluconat-Dehydratase
gk	Glucokinase
HDO	deuteriertes Wasser
IlvD	2,3-Dihydroxy-3-methyl/Isovalerat-Dehydratase
ISC	Iron sulfur cluster
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen

$\mathbf{k}_{cat}$	Wechselzahl
kDa	Kilodalton
KDPG	2-Keto-3-desoxy-6-phosphogluconat
$\mathbf{K}_M$	Michaelis-Menten-Konstante
LDH	Lactat-Dehydrogenase
LB	Lineweaver-Burk-Plot
MM	Michaelis-Menten-Plot
NADH/H$^+$	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH/H$^+$	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NI/AI	nach Induktion
NIF	Nitrogen fixation
NMR	Kernspinresonanz
nn	nicht nachweisbar
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PEG	Polyethylenglycol
Pel	Pellet
pgi	Glucose-6-phosphat-Isomerase
pgl	Phosphogluconolactonase
PP	Pentosephosphat
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SUF	Mobilisation of sulfur
Sulfo-EDD	6-Deoxy-6-sulfogluconat-Dehydratase
T. curvata	*Thermomonospora curvata*
Tet	Tetracyclin
Üb/Sup	Überstand
UV	ultraviolett

VI/BI	vor Induktion
Vis	visible
W	Waschschritt
WT	Wildtyp
Z. mobilis	*Zymomonas mobilis*
XylD	D-Xylonat-Dehydratase
zwf	Zwischenferment; Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase

1 Einleitung

1.1 Die Dihydroxysäure-Dehydratasen

1.1.1 Verbreitung der Dihydroxysäure-Dehydratasen

Die Enzymklasse der Dihydroxysäure-Dehydratasen (EC 4.2.1), eine Untergruppe der Lyasen, wird in drei Superfamilien eingeteilt. Davon ist die am wohl besten untersuchteste die Enolase-Superfamilie (21) (148). Zu ihr zählen beispielsweise die D-Glucarat-Dehydratase aus *Escherichia coli* (80) und *Pseudomonas putida* (142) sowie die L-Fuconat-Dehydratase aus *Xanthomonas campestris* (198), die L-Rhamnonat-Dehydratase aus *Escherichia coli* und *Salmonella typhimurium* (153) und die D-Mannoat-Dehydratase aus verschiedenen Organismen (200) (154). Die Enzyme dieser Superfamilie enthalten ein Mg^{2+}-Ion im aktiven Zentrum.

Die zweite der drei Superfamilien ist wesentlich schlechter untersucht und nur wenige Vertreter wurden charakterisiert. Zu ihr zählen die D-Glucarat-Dehydratase aus *Escherichia coli* (86) und die D-Altronat-Dehydratase aus *Escherichia coli* (54). Diese Gruppe benötigt ein Reduktionsmittel, sowie ein divalentes Ion wie z. B. Eisen oder Mangan, für ihre Aktivität. Seit Kurzem ist die Kristallstruktur eines weiteren Vertreters der Galactarat-Dehydratase aus *E. coli* bekannt. Sie setzt sich aus drei Domänen zusammen, darunter ein β-Clip und eine Rossmann Domäne. Es wurde ein konservierter Cystein-Rest gefunden, der Ca^{2+} koordiniert, welches möglicherweise im nativen Zustand ein Fe^{2+}-Ion ist (159).

Die dritte Superfamilie, auf welche in dieser Arbeit genauer eingegangen wird, wird auch als IlvD/EDD-Superfamilie bezeichnet und wird durch einen Eisen-Schwefel-Cluster (siehe auch Kapitel 1.2) in ihrem aktiven Zentrum charakterisiert. Zu dieser Familie gehören die 2,3-Dihydroxy-3-methyl/Isovalerat-Dehydratase (IlvD auch DHAD), die D-Xylonat-Dehydratase (XylD), die L-Arabinonat-Dehydratase (AraD), die D-Gluconat-Dehydratase (GAD) sowie die 6-Phosphogluconat-Dehydratase (EDD; Entner-Douroroff-Dehydratase). Das neuste Mitglied dieser Familie ist die vor einigen Jahren entdeckte Sulfo-EDD (6-Deoxy-6-sulfogluconat-Dehydratase) (62). Ein Überblick aller bekannten, durch diese Enzymklasse katalysierten Reaktionen ist in Abbildung 1 dargestellt. Jede Enzymklasse wird in den folgenden Kapiteln kurz vorgestellt und entprechend des aktuellen Wissensstands charakterisiert. Auf die EDD wird im Kapitel 1.4.1 eingegangen.

Allen Reaktionen gemein ist die Abspaltung von Wasser aus einer 2,3-Dihydroxycarbonsäure unter Bildung einer 2-Ketogruppe. Für fast alle Reaktionen sind Enzyme der IlvD/EDD-Superfamilie, aber auch der Enolasesuperfamilie bekannt. Aus diesem Grund ist es wichtig, die entsprechenden Enzyme eines jeden Organismus durch den Nachweis und die Charakterisierung der Art des Eisen-Schwefel-Clusters eindeutig zuordnen zu können. Einen ersten Anhaltspunkt geben bioinformatische Untersuchungen. So konnte beispielsweise durch das Alignment von insgesamt 869 Proteinsequenzen von EDD, IlvD, XylD und AraD verschiedener Organismen zwei konservierte Cysteine bestimmt werden, welche auf eine Clusterkoordination hindeuten. Diese liegen für die XylD aus *Caulobacter crescentus* an Position 128 und 201. Ein weiteres Cystein ist für jede Enzymfamilie konserviert und variiert vor allem in Abhängigkeit der Clusterart (17) (siehe auch Kapitel 1.2).

Insgesamt sind die Enzyme der IlvD/EDD-Superfamilie sehr weit verbreitet (104). Die meisten Vertreter wurden aus Bakterien untersucht. Besonders für die IlvD sind aber

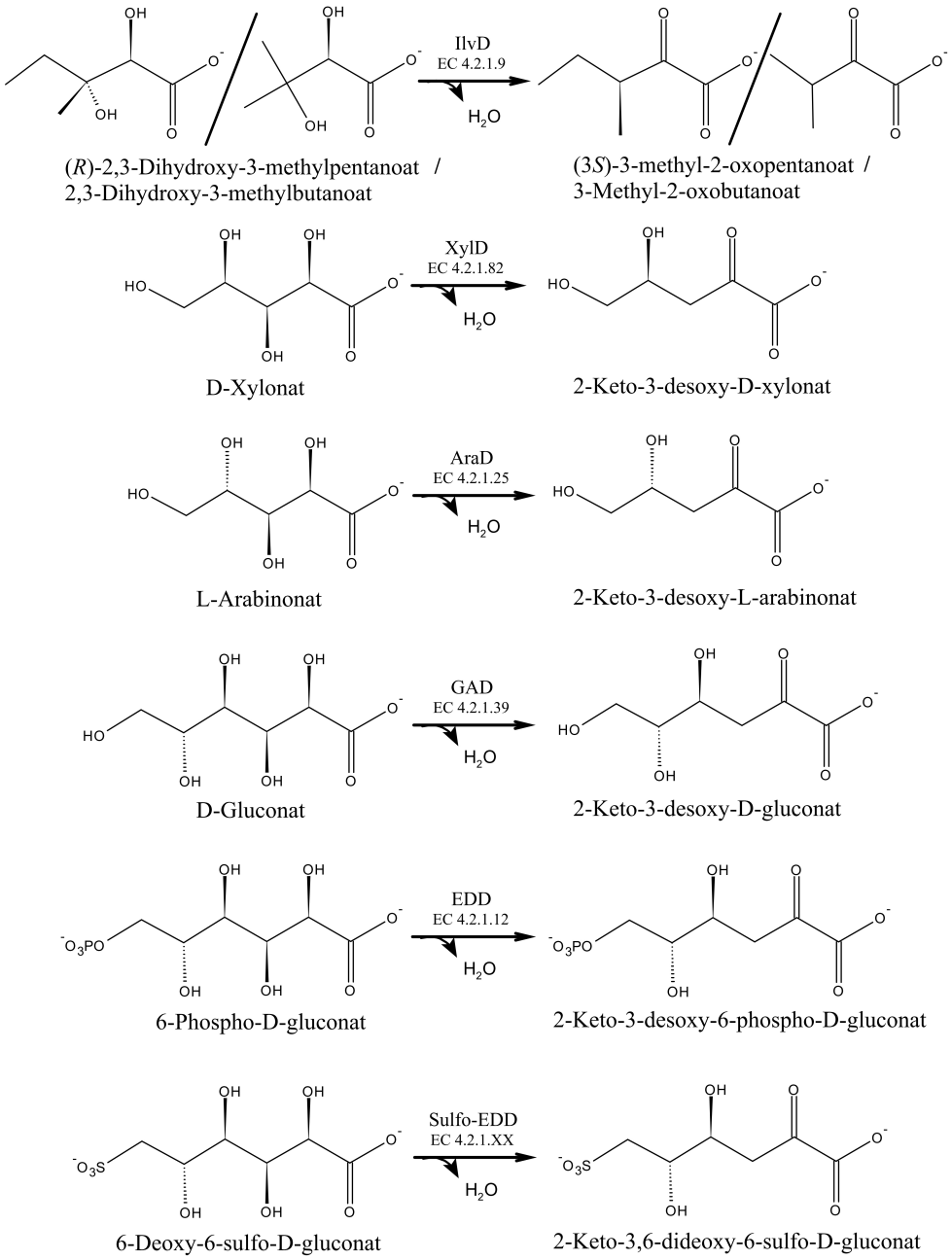


Abbildung 1: Reaktionen welche durch die Enzyme der IlvD/EDD-Superfamilie katalysiert werden. Allen Reaktionen ist die Abspaltung von Wasser aus einer 2,3-Dihydroxycarbonsäure unter Bildung einer 2-Ketogruppe gemein. Abkürzungen: IlvD: 2,3-Dihydroxy-3-methyl/Isovalerat-Dehydratase; XylD: D-Xylonat-Dehydratase; AraD: L-Arabinonat-Dehydratase; GAD: D-Gluconat-Dehydratase; EDD: Entner-Doudoroff-Dehydratase, 6-Phosphogluconat-Dehydratase; Sulfo-EDD: 6-Deoxy-6-sulfogluconat-Dehydratase.

auch Enzyme aus anderen Organismen wie dem Spinat (*Spinacea oleracea*) bekannt (67).

Kristallstrukturen und damit eine komplette strukturelle Aufklärung aus dieser Enzymklasse sind kaum vorhanden. Für die EDD liegt ein unvollständiger Datensatz des Apoenzyms aus *Shewanella oneidensis* vor (136). Weitere Kristallstrukturdaten konnten bis jetzt nur von den [2Fe-2S]-Cluster Holoenzymen L-Arabinonat-Dehydratase aus *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (152), der D-Xylonat-Dehydratase aus *Caulobacter crescentus* (151) und der 2,3-Dihydroxy-3-methyl/Isovalerat-Dehydratase aus *Mycobacterium tuberculosis* (24) erhalten werden.

Als weitere Gemeinsamkeit der Enzyme dieser Superfamilie wird ein Magnesiumion, welches in einigen Vertretern nachgewiesen wurde, diskutiert (151). Auch eine Carbamylierung eines Lysins, in der IlvD aus *Mycobacterium tuberculosis* K139 (24), konnte für verschiedene Vertreter detektiert werden. Hierbei fungiert die Carbamyl-Gruppe als Mg^{2+}-Ligand (152).

Insgesamt wurde die Vielfalt der IlvD/EDD-Superfamilie kaum untersucht. Für jede einzelne Enzymfamilie, abgesehen von den 2,3-Dihydroxy-3-methyl/Isovalerat-Dehydratasen, gibt es nur wenige, teilweise kaum charakterisierte, Vertreter. Dabei sind Enzyme mit einem [2Fe-2S]-Cluster im aktiven Zentrum deutlich besser und zahlreicher untersucht als solche mit einem [4Fe-4S]-Cluster. Die Folgenden Kapitel sollen einen Überblick über den aktuellen Stand der Forschung an den jeweiligen Enzymfamilien geben. Auf die EDD, welche Gegenstand der hier präsentierten Forschung ist, wird in Kapitel 1.4.1 genauer eingegangen.

1.1.2 Die 2,3-Dihydroxy-3-methyl/Isovalerat-Dehydratase

Die 2,3-Dihydroxy-3-methyl/Isovalerat-Dehydratase (IlvD, EC 4.2.1.9) katalysiert die Reaktion von 2,3-Dihydroxy-3-methylbutanoat (2,3-Dihydroxyisovalerat) bzw. von 2,3-Dihydroxy-3-methylvalerat zu 3-Methyl-2-oxobutanoat (2-Ketoisovalerat) bzw. 2-Keto-3-methyl-valerat, welche Intermediate in der Biosynthese von L-Leucin und L-Valin bzw. L-Isoleucin sind. Sie ist das am besten untersuchte Enzym der Familie und wurde je nach Quelle mit einem relativ stabilen [2Fe-2S]-Cluster oder einem labilen [4Fe-4S]-Cluster isoliert. Häufig wird sie auch mit der Abkürzung DHAD bezeichnet, obwohl dieser Begriff alle Dihydroxysäure-Dehydratasen umfasst. Eine eingehende Diskussion der IlvD kann einer 2018 verfassten Dissertation entnommen werden (15). In Abbildung 2 sind die entsprechenden Biosynthesewege dargestellt. Einige Beispiele der IlvD werden im Folgenden beschrieben.

Die IlvD aus *E. coli* hat einen [4Fe-4S]-Cluster und liegt als Homodimer mit einem Molekulargewicht des Monomers von 66 kDa vor. Die Michaelis-Menten-Konstante für das racemische Substrat bei pH 8,0 liegt bei 1,5 mM. Die Wechselzahl konnte auf $400\,s^{-1}$ bestimmt werden. Der Cluster im aktiven Zentrum wird unter Sauerstoffeinfluss abgebaut (68).

Im Gegensatz zu dem Enzym aus *E. coli* hat das Enzym aus Spinat (*Spinacea oleracea*) einen [2Fe-2S]-Cluster. Mit einem Molekulargewicht von 63,5 kDa ist es etwas kleiner liegt aber ebenfalls als Homodimer vor. Die Wechselzahl ist 16-fach geringer und liegt bei $25\,s^{-1}$. Das Enzym ist bei einem pH-Wert über 8 mehrere Tage auf Eis stabil. Die Michaelis-Menten-Konstante konnte auf 1,5 mM bestimmt werden (67).

Das Enzym aus *Arabidopsis thaliana* wurde spektroskopisch untersucht. Es zeigt sich, dass das Enzym sowohl einen [4Fe-4S]- als auch einen [2Fe-2S]-Cluster koordinieren kann,

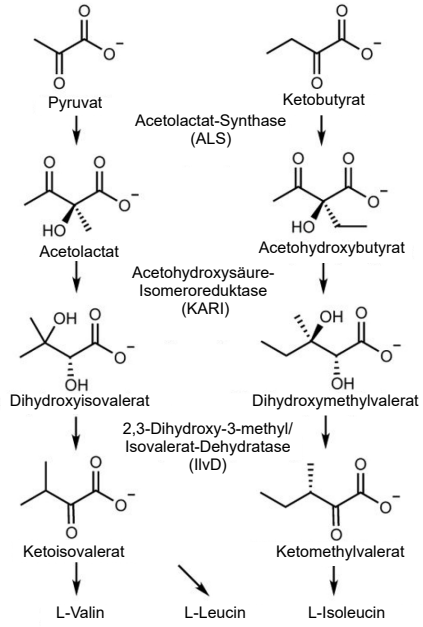


Abbildung 2: Die Biosynthese von L-Valin, L-Leucin und L-Isoleucin mit dem Fe/S-Enzym IlvD. Die Grafik wurde adaptiert nach Yan *et. al* (196)

jedoch nur letzterer zu einem aktiven Enzym führt (74). Der [2Fe-2S]-Cluster wurde durch strukturelle Charakterisierung, bei der auch ein Mg^{2+}-Ion im aktiven Zentrum nachgewiesen werden konnte, bestätigt (196).

Durch die Kristallisation des Enzyms aus *Mycobacterium tuberculosis*, welches einen [2Fe-2S]-Cluster enthält, konnten weitere wichtige Daten zum Aufbau des aktiven Zentrums gewonnen werden. An der Katalyse ist neben dem Cluster auch das Serin an Position 491 beteiligt, wie durch gezielte Mutagenese nachgewiesen werden konnte. Ein Mg^{2+}-Ion ist in einer Entfernung von 6,5 Å vom Cluster an der Substratbindung beteiligt. Des Weiteren konnten K_M auf 2,0 mM und k_{cat} auf $2\,s^{-1}$ bestimmt werden. Das Enzym katalysiert ausschließlich die Reaktion des R-Isomers. Das pH-Optimum liegt bei 7,8 (24).

1.1.3 Die D-Xylonat-Dehydratase

D-Xylose wird häufig über den Pentosephosphat-Weg metabolisiert (174). Die Entdeckung der D-Xylonat-Dehydratase (XylD, EC 4.2.1.82) eröffnete die Forschung an einem neuen Zweig des Metabolismus. Sie wurde aus einigen Organismen isoliert und charakterisiert. So konnte für das Enzym aus *Caulobacter crescentus* festgestellt werden, dass es Mg^{2+}-Ionen für die Aktivität benötigt und als Homotetramer vorliegt. Es katalysiert die Reaktion von D-Xylonat, welches der Hauptbestandteil von Hemicellulose ist, zu 2-Keto-3-deoxyxylonat mit einer Michaelis-Menten-Konstante von 1,9 mM und einer spezifischen Aktivität von 21,5 µmol/min/mg. Die Verstoffwechslung von Gluconat erfolgt mit einer Michaelis-Menten-Konstante von 4,0 mM. Das pH-Optimum liegt bei 8,5 und bei einer Lagerung in 50 mM Tris/HCl (pH 7,5) mit 5 mM $MgCl_2$ bei -80 °C konnte nach einem Monat eine Aktivität von 75 % nachgewiesen werden (17).

Die Kristallisation des Enzyms aus *Caulobacter crescentus* zeigte, dass es aus 2 Domänen besteht und in der N-terminalen Domäne einen [2Fe-2S]-Cluster sowie eine Mg^{2+}-Bindestelle enthält. Das aktive Zentrum liegt zwischen beiden Domänen. Des Weiteren können große strukturelle Parallelen zur Arabinonat-Dehydratase aus *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* festgestellt werden. Lediglich ein Unterschied im N-terminalen Arm des jeweils zweiten Dimers stellt die Substratspezifität sicher. Dies zeigt die Wichtigkeit der Dimerbildung für die Katalyse (151).

Für die D-Xylonat-Dehydratase aus *E. coli* konnte die Michaelis-Menten-Konstante auf 4,88 mM bestimmt werden. Die Größe liegt bei 70 kDa, die Wechselzahl bei $5{,}5{*}10^{-3}\,s^{-1}$, was im Vergleich mit anderen Enzymen wie beispielsweise der EDD sehr niedrig ist. Die maximale Aktivität konnte bei 30 °C und einem pH-Wert von 8,0 erreicht werden (92).

1.1.4 Die L-Arabinonat-Dehydratase

Die L-Arabinonat-Dehydratase (AraD, EC 4.2.1.25) aus *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* katalysiert die Reaktion von L-Arabinonat zu 2-Keto-3-deoxyarabinonat, benötigt wie die Xylonat Dehydratase Mg^{2+}-Ionen für die Aktivität und liegt als Homotetramer vor. Die Michaelis-Menten-Konstante liegt für das Substrat L-Arabinonat bei 1,8 mM, für D-Fructonat bei 1,8 mM und für D-Galactonat bei 3,8 mM. Die spezifische Aktivität des Enzyms liegt bei 11,4 µmol/min/mg und das pH-Optimum bei 8,0. Bei 45 °C konnte nach 150 min noch eine Aktivität von 80 % festgestellt werden (17).

Die Kristallstruktur der L-Arabinonat-Dehydratase zeigt, dass der Homotetramer als Dimer von Dimeren vorliegt. Jeder Monomer hat einen [2Fe-2S]-Cluster in der N-terminalen Domäne und einen flexiblen N-Terminus (152).

Neben der kristallisierten Variante der [2Fe-2S]-L-Arabinonat-Dehydratase aus *R. leguminosarum* gibt es allerdings auch Hinweise auf entsprechende Enzyme, welche einen [4Fe-4S]-Cluster enthalten. Ein Beispiel hierfür ist das Enzym aus *Azospirillum brasiliense* (192).

1.1.5 Die D-Gluconat-Dehydratase

Die Gluconat-Dehydratasen aus vielen Organismen, vor allem Archaea wie beispielsweise *Sulfolobus sulfataricus* gehören zur Enolase-Superfamilie (13). Eine D-Gluconat-Dehydratase (GAD, EC 4.2.1.39) der IlvD/EDD-Superfamilie wurde erstmals aus *Clostridium pasteurianum* isoliert. Sie katalysiert die Reaktion von D-Gluconat zu 2-Keto-3-deoxy-D-gluconat. Die Ergebnisse zahlreicher Experimente deuten darauf hin, dass das Enzym einen Eisen-Schwefel-Cluster hat, welcher bei Exposition an Sauerstoff schnell inaktiviert wird. Die maximale Aktivität liegt bei einem pH-Wert von 7,6. Das Molekulargewicht konnte auf 135 kDa bestimmt werden (29).

Die Zugehörigkeit der GAD aus *Achromobacter xylosoxidans* zur IlvD/EDD-Superfamilie wurde durch eine Sequenzanalyse gezeigt. Das 63 kDa große Protein liegt als Tetramer vor und hat ein Optimum bei einem pH-Wert von 8,5 und einer Temperatur von 50 °C (104). Informationen über die Art des Fe/S-Clusters sowie eine spezifische Aktivität wurden nicht veröffentlicht.

1.1.6 Die 6-Deoxy-6-sulfogluconat-Dehydratase

Die Existenz einer 6-Deoxy-6-sulfogluconat-Dehydratase (Sulfo-EDD) wurde erstmals 2003 diskutiert (160). Sie ist Teil des Metabolismus von Sulfoquinovose zu 3-Sulfolactat unter Generierung von 2 Equivalenten NADH. Sulfoquinovose wird von phototrophen Organismen weltweit produziert und macht ein Großteil des organisch gebundenen Schwefels aus. In 2015 wurde die Katalyse von 6-Deoxy-6-sulfo-D-gluconat zu 2-Keto-3,6-dideoxy-6-sulfo-D-gluconat durch das Enzym aus *Pseudomonas putida* SQ1 nachgewiesen. Eine Umsetzung des strukturell verwandten 6-Phosphogluconats konnte ausgeschlossen werden (62). Der Sulfo-ED-Weg ist mit dem ED-Weg in Abbildung 3 vergleichend dargestellt.

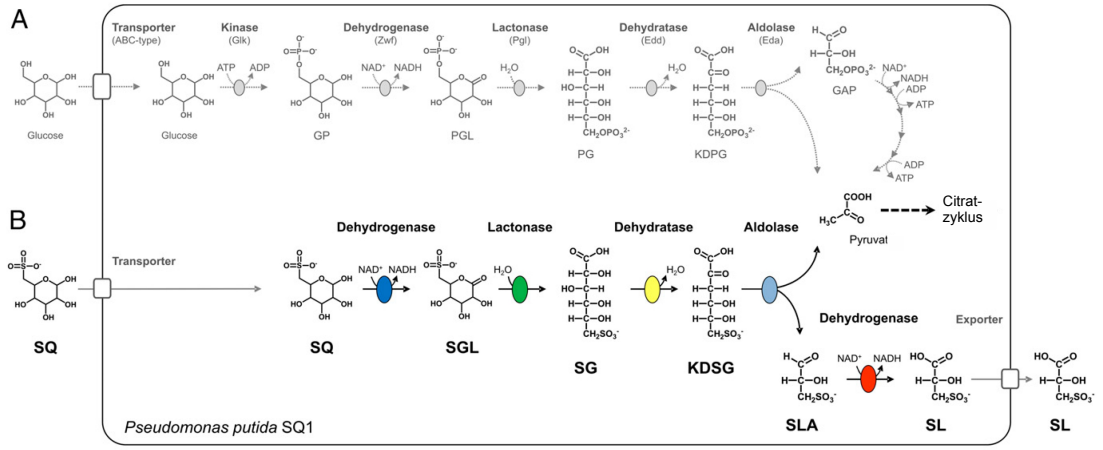


Abbildung 3: A: Der klassische ED-Weg mit den Intermediaten: GP: Glucose-6-phosphat; PGL: 6-Phosphogluconolacton; PG: 6-Phosphogluconat; KDPG: 2-Keto-3-deoxy-6-phosphogluconat; GAP: Glyceraldehyd-3-phosphat; B: Der Sulfo-ED-Weg mit den Intermediaten: SQ: Sulfoquinovose; SGL: 6-Deoxy-6-sulfogluconolacton; SG: 6-Deoxy-6-sulfogluconat; KDSG: 2-Keto-3,6-dideoxy-6-sulfogluconat; SLA: 3-Sulfolactaldehyd; SL: 3-Sulfolactat; adaptiert nach Felux *et al.* (62)

Auch für das Bakterium *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii SRDI565 konnte kürzlich der Sulfo-ED-Weg, zu dem auch die Sulfo-EDD gehört, nachgewiesen werden (120). Eine Isolation des Enzyms mit anschließender Charakterisierung ist nicht bekannt.

1.2 Eisen-Schwefel-Cluster

Bevor auf den hier untersuchten Stoffwechselweg sowie sein Schlüsselenzym, die Entner-Doudoroff-Dehydratase, eingegangen wird, soll an dieser Stelle eine kurze Einführung der Eisen-Schwefel-Cluster stehen, welche als Cofaktor essentiell für die Aktivität der EDD sind.

1.2.1 Verbreitung und Arten von Eisen-Schwefel-Clustern

Die häufigsten Vertreter der Eisen-Schwefel-Cluster sind der [2Fe-2S]- und der [4Fe-4S]-Cluster. Diese sind zusammen mit ihren üblichen Oxidationsstufen und typischen Spin-

zuständen in Abbildung 4 dargestellt und wurden bereits durch Kristallisation entsprechender Proteine belegt (84). Eine weitere häufige Clusterform ist der [3Fe-4S]-Cluster, welcher vor allem als Abbauprodukt des [4Fe-4S]-Clusters der Aconitase beschrieben wurde (26). Eine besondere Form des Eisen-Schwefel-Clusters ist der P-Cluster, der in Nitrogenasen charakterisiert wurde und aus zwei [4Fe-4S]-Clustern besteht, welche über ein gemeinsames Schwefelion verbrückt sind (168) (173).

Typischerweise werden Eisen-Schwefel-Cluster über Cysteine koordiniert, wie in Abbildung 4 dargestellt (25). Abweichend hiervon wurden auch andere Liganden beschrieben, wie beispielsweise das Histidin in einem Rieske-Type-Cluster. Hier wird ein [2Fe-2S]-Cluster über 2 Histidine und zwei Cysteine koordiniert (87). Am P-Cluster der Nitrogenase aus *Azotobacter vinelandii* ist eine Koordination von Serin beschrieben worden (147). In der Biotinsynthase aus *E. coli* ist der [2Fe-2S]-Cluster neben Cysteinen über ein Arginin koordiniert (33).

Abhängig von der Aufgabe des Clusters kann die Zahl der Liganden varriieren, so haben Cluster welche, eine Substratbindung eingehen, häufig eine „Ecke des Clusters", an der das Eisenion nicht durch eine Aminosäure koordiniert wird. Hier kann die Katalyse zum Teil unter Änderung der Koordinationsumgebung erfolgen. Dies wurde für die Aconitase durch Kristallisation dieser mit und ohne Substrat, sowie durch site-selective Mößbauerspektroskopie nachgewiesen (114) (100).

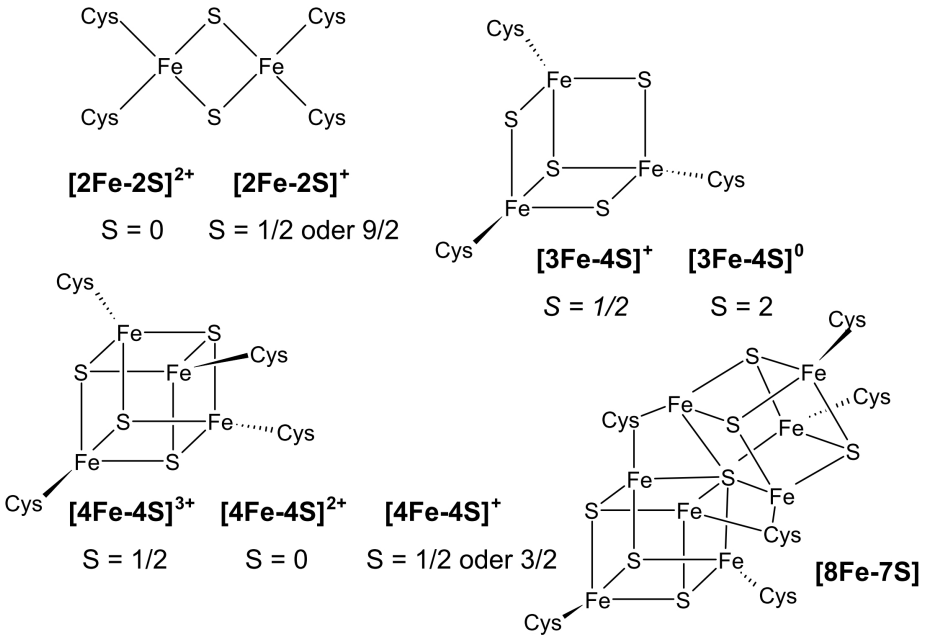


Abbildung 4: Typische Eisen-Schwefel-Cluster, ihre Oxidationsstufen sowie die typischen Spinzustände. Dargestellt ist zudem der aus der Nitrogenase bekannte P-Cluster ([8Fe-7S]) (94).

1.2.2 Aufgaben der Eisen-Schwefel-Cluster

Zuerst beschrieben wurden Eisen-Schwefel-Cluster als Cofaktor zum Elektronentransport (35). Mittlerweile ist jedoch ein Vielfaches mehr an Funktionen für den vielseitigen

Cofaktor bekannt (93).

Der Elektronentransport ist vor allem aufgrund der großen Potentialspanne der Eisen-Schwefel-Cluster von über 1 V (über alle Clusterarten) sehr verbreitet möglich. Bekannt sind hier besonders die Komplexe der mitochondrialen Atmungskette (25).

Neben einem reinen Elektronentransport ist auch ein gekoppelter Protonentransfer möglich, wie beispielsweise im Fall der Nitrogenase. Diese katalysiert die Aktivierung von Stickstoff und produziert Ammoniak für den Stickstoffkreislauf. Damit ist sie entscheidend für alle Lebewesen (168).

Als katalytisch aktives Zentrum sind Eisen-Schwefel-Cluster das Herzstück vieler Enzyme. Am bekanntesten und besten untersucht ist hier wohl die Aconitase. Zur Entdeckungszeit der Eisen-Schwefel-Cluster wurden zahlreiche Experimente zu diesen an ihr durchgeführt. An ihrem [4Fe-4S]-Cluster wird die reversible Reaktion von Citrat zu Aconitat als Teil des Citrat-Zyklus katalysiert. Hierbei fungiert der Cluster als Lewissäure und katalysiert die Abspaltung der Hydroxylgruppe und eines Protons am benachbarten Kohlenstoffatom (194). Auch die Enzyme der IlvD/EDD-Superfamilie, zur der die hier untersuchte EDD zählt, gehören zu dieser Gruppe Eisen-Schwefel-Cluster-Enzyme.

Im Fall der Hydrogenase, welche gleich mehrere Eisen-Schwefel-Cluster enthält, wird die Fähigkeit der Katalyse und des Elektronentransports zur reversiblen Aktivierung von H_2 kombiniert (146) (36).

Die Ribonukleotid-Reduktase katalysiert die Reduktion von Ribonukleotiden zu deren 2-Deoxyribonukleotiden. Hierbei aktiviert, bei einer der beiden Ribonukleotid-Reduktase-Klassen, ein [4Fe-4S]-Cluster durch Elektronenübertragung ein S-Adenosylmethionin zu einem Radikal (141). Oxygenasen, welche einen Rieske-Typ Cluster enthalten, bauen Sauerstoff in zahlreiche Substrate ein und werden auch für die Synthese von beispielsweise Indigo verwendet (188).

Auch an der Regulation der Genexpression haben Eisen-Schwefel-Cluster-Enzyme teil (101). Der Transkriptionsfaktor SoxR wirkt beispielsweise als bakterieller Detektor von oxidativem Stress. Hierbei bleibt der [2Fe-2S]-Cluster intakt (107) (132). Im Gegensatz zur cytosolischen Aconitase, welche bei Verlust ihres Clusters zum Iron-responsive Protein wird und durch die Bindung an die entprechende mRNA die Synthese von Proteinen zur Eisenaufnahme verstärkt (99) (82).

Im Fall der Biotinsynthase stellt neben einem [4Fe-4S]-Cluster für die Erzeugung eines 5‘-Deoxyadenosyl-Radikals der [2Fe-2S]-Cluster derselbigen ein Schwefelatom für die Reaktion zur Verfügung und muss nach der Katalyse wieder regeneriert werden (73).

Weiterhin sind am Einbau von Eisen-Schwefel-Clustern entsprechende Enzyme beteiligt. Bis jetzt sind 4 verschiedene Einbauwege bekannt. Die Nif-Maschinerie wurde vor allem in stickstofffixierenden Bakterien gefunden (22). In Bakterien sowie Mitochondrien sind die ISC- und SUF-Wege weit verbreitet, während Archaea und Cyanobakterien meist nur den SUF-Weg besitzen (22). Eukaryoten haben zusätzlich zur mitochondrialen ISC-Maschinerie die CIA-Machinerie für die Biosynthese zytosolischer und nukleärer Fe/S-Proteine (123). Für die Nif-Maschinerie ist z. B. bekannt, dass das Cluster-Gerüstprotein NifU auch einen permanenten redoxaktiven [2Fe-2S]-Cluster enthält (71). Auch an der Aufgabe der CIA-Maschinerie sind Eisen-Schwefel-Cluster-Proteine wie z. B. Nar1 beteiligt (123).

Diese Omnipräsenz der Eisen-Schwefel-Cluster in der Natur hat zu deren intensiven *in vitro* Synthese und Untersuchung geführt. Eine anorganische Synthese der Cluster dient vor allem der Untersuchung der Eigenschaften losgelöst von der Proteinumgebung. Dies

ist auch ein Ansatz zur Aufklärung der *in vivo* Synthese der Cluster, welche bis heute nicht vollständig aufgeklärt ist (116).

1.3 Der Entner-Doudoroff-Weg

Der klassische Entner-Doudoroff-Weg wurde 1952 von Nathan Entner und Michael Doudoroff (57) (127) in *Pseudomonas saccharophila* erstmals beschrieben und nach ihnen benannt. Er katalysiert den Abbau von Glucose über die Intermediate 6-Phosphogluconat und 2-Keto-3-deoxy-6-phosphogluconat zur Gewinnung von Energie in Form von ATP. In Abbildung 5 ist der ED-Weg (grün) neben der Glykolyse (EMP-Weg, Embden-Meyerhof-Parnas-Weg, links in schwarz) und dem Pentose-Phosphat-Weg (PP, in der Mitte angedeutet, (175)) dargestellt. Neben dem klassischen ED-Weg, welcher ausschließlich über phosphorylierte Substrate verläuft ist vor allem in thermotoleranten Bakterien und Archaea der semi-phosphorylierende ED-Weg (gestrichelte Linie) und der nicht-phosphorylierende ED-Weg (violett) verbreitet (158). Das entprechende die Abspaltung von Wasser katalysiernde Enzym, die GAD, wurde bereits in Kapitel 1.1.5 beschrieben, muss aber wie bereits erwähnt nicht in allen Fällen über einen Eisen-Schwefel-Cluster verfügen (103). Im Gegensatz hierzu ist für die EDD (Entner-Doudoroff-Dehydratase, siehe auch Kapitel 1.4.1) kein Vertreter ohne diesen bekannt.

Der Kern des klassischen ED-Weges setzt sich aus zwei Reaktionen zusammen. Im ersten Schritt wird 6-Phosphogluconat unter Abspaltung von Wasser zu 2-Keto-3-deoxy-6-phosphogluconat umgesetzt. Diese Reaktion wird durch die EDD katalysiert (Kapitel 1.4.1) und das Gleichgewicht liegt stark auf der Produktseite. Im nächsten Schritt wird das Intermediat zu Glycerinaldehyd-3-phosphat und Pyruvat gespalten. Ersteres wird durch Teile des EMP-Weges weiter verstoffwechselt. Der zweite Schritt wird durch die EDA katalysiert (Kapitel 1.4.2). Wichtig an dieser Stelle ist auch zu erwähnen, dass das Intermediat für viele Organismen in großen Konzentrationen toxisch ist und dies bei biotechnologischen Anwendungen des ED-Weges unter allem Umständen bedacht werden muss (138).

In Abbildung 5 lassen sich klar die Vorteile des ED-Weges gegenüber dem EMP-Weg erkennen. So ist es dem ED-Weg möglich, Energiequellen zu verstoffwechseln, welche nicht ohne weitere Enzyme über die Glycolyse abgebaut werden können, wie beispielsweise das Gluconat. Eine Untersuchung der thermodynamischen Eigenschaften ergab, dass die Reaktionen des ED-Weges um ein Vielfaches günstiger sind und die individuelle Gleichgewichtslage weitaus mehr auf der Produktseite liegen als die des EMP-Weges, sodass für den gleichen glykolytischen Durchsatz der EMP-Weg ein 3,5-faches an Enzym benötigt. Gleichzeitig bietet der EMP-Weg Vorteile indem hier 2 ATP pro Molekül Glucose erhalten werden, im ED-Weg ist das nur ein ATP. Der ED-Weg wird hauptsächlich von aerob lebenden Bakterien verwendet (64) (89). Eine Ausnahme ist hier das Bakterium *Zymomonas mobilis*.

Welcher Weg für die Verstoffwechslung von Kohlenstoffquellen verwendet wird, entscheidet sich demnach anhand der Energieausbeute bzw. der Proteinsynthesekosten. Unter Nährstoffmangel beispielsweise verwendet das Bakterium *Rhodococcus jostii* RHA1 den ED-Weg unabhängig von der Art der Nährstoffe (96). Ein weiterer Punkt, welcher hier eine Rolle spielt, ist die Regeneration von Redoxequivalenten. Pro Mol Glucose werden im EMP-Weg 2 mol $NADH/H^+$ produziert, im ED-Weg sind dies 1 mol $NADH/H^+$ und 1 mol $NADPH/H^+$. Ein Vergleich mit dem PP-Weg zeigt, dass dieser ebenfalls 2 ATP

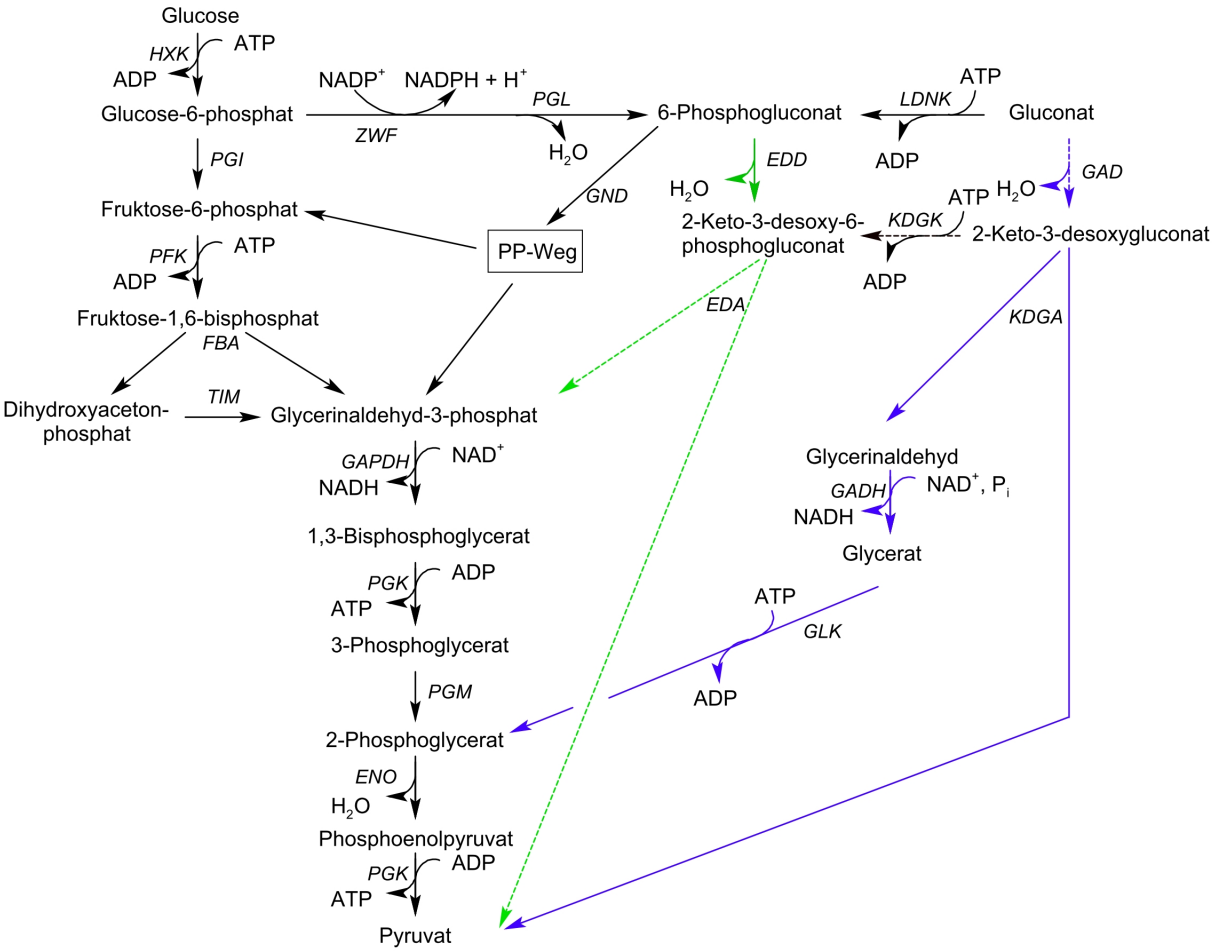


Abbildung 5: Die am weitesten Verbreiteten Stoffwechselwege zur Energiegewinnung. Abkürzungen: HXK: Hexokinase; ZWF: Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase; PGL: Phosphogluconolactonase; EDD: 6-Phosphogluconat-Dehydratase; EDA: 2-Keto-3-deoxy-6-phosphogluconataldolase; FBA: Fructosealdolase; TIM: Triosephosphatisomerase; GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; PFK: Phosphofructokinase; PGM: Phosphoglycerat-Mutase; ENO: Enolase; PYK: Pyruvatkinase; LDH: Lactatdehydrogenase; PGI: Glucose-6-phosphat-Isomerase; PGK: Phosphoglyceratkinase; LDNK: Gluconatkinase; GND: Phosphogluconat-Dehydrogenase; GADH: Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; KDGK: KDG-Kinase; GLK: Glyceratkinase

pro mol Glucose jedoch 2 mol $NADPH/H^+$ produziert. Welcher Weg für den Abbau von Energieträgern verwendet wird, hat demnach weitreichende Folgen für den gesamten Organismus.

1.3.1 Verbreitung des ED-Weges

Alle drei in Abbildung 5 dargestellten Wege bieten Organismen die Möglichkeit, Energie zu gewinnen, wobei nicht jeder Organismus alle Wege im gleichen Ausmaß verwendet. So steht den Menschen lediglich der EMP-Weg und der Pentosephosphat-Weg und kein ED-Weg zur Verfügung.

Besonders bekannt ist der ED-Weg aus dem Alphaproteobakterium *Zymomonas mobilis*. Dieses ist spezialisiert auf ein Wachstum in Pflanzensäften mit hohem Zuckergehalt und kann aus diesem Grund nur Glucose, Fructose und Sucrose als Energiequelle verwenden. Ein Glucosegehalt des Wachstumsmediums von bis zu 40 % (v/v) ist kein Problem für das Bakterium (178). Es produziert ausschließlich Ethanol und Kohlenstoffdioxid im Fermentationsprozess und ist dafür bekannt, dass es hierfür ausschließlich den ED-Weg verwendet, bis zu 98 % des Kohlenstoffanteils in den Zuckern in Ethanol umwandelt (162) und bis zu 16 % (v/v) Ethanol im Medium toleriert (178). Aus diesem Grund wird es auch als „Hefe des Tequilas“ für dessen Produktion aus Agavendicksaft verwendet (23).

In vielen anderen Organismen ist der ED-Weg induzierbar, wie beispielsweise in *E. coli*. Hier haben Versuche mit Stämmen ohne EDD (199) bzw. ohne Phosphogluconatisomerase (70) zum Ergebnis geführt, dass vor allem bei einem Überangebot von Gluconat die Enzyme des ED-Wegs vermehrt exprimiert werden, während für die Verstoffwechslung von Glucose fast ausschließlich der EMP- und der PP-Weg verwendet werden (55). Dies wurde auch für *Salmonella typhimurium* nachgewiesen (69).

Im Gegensatz hierzu wird in *Neisseria gonorrhoeae*, dem Erreger des Trippers, sowohl während des Wachstums als auch in der stationären Phase hauptsächlich der ED-Weg verwendet, obwohl Gene für den EMP-Weg und den PP-Weg vorhanden sind (135).

Viele Pseudomonadenstämme, zu denen auch der Krankenhauskeim *Pseudomonas aeruginosa* gehört, verstoffwechseln auch Glucose ausschließlich über den ED-Weg und besitzen keine Fructose-6-phosphat-Kinase, für einen glykolytischen Abbau (62) (117). Der wenig aktive PP-Weg kann die Aufgabe des ED-Weges nicht übernehmen, sodass bei einer Beeinträchtigung des ED-Weges ein Wachstum auf Gluconat oder Glucose für viele dieser Stämme nicht mehr möglich ist (117).

Erst kürzlich wurde der ED-Weg in einigen Pflanzenpathogenen entdeckt, darunter das Bakterium *Agrobacterium tumefaciens* (78) oder *Xanthomonas oryzae*, welches zu 20 bis 30 % Verlust bei der Reisernte führen kann (108).

Auch in Glucose nutzenden Meeresbakterien wurde mit 90 % vorwiegend der ED-Weg gefunden. Lediglich 10 % der untersuchten Bakterien verwenden den EMP-Weg (105). Bioinformatische Studien konnten zeigen, dass viele Kieselalgen einen aktiven ED-Weg besitzen (59), welche ihre antarktischen Vertreter, wie beispielsweise *Fragilariopsis cylindrus*, in der antarktischen Nacht vermehrt exprimieren (97).

Im Allgemeinen wurde der klassische ED-Weg vorwiegend für Bakterien beschrieben, wovon einige als Krankheitserreger bekannt sind (siehe auch Kapitel 1.3.2). Die Untersuchung zahlreicher Genome von Cyanobakterien und Pflanzen ergab, dass auch hier häufig Gene für EDD und EDA vorhanden sind. Eine weite Verbreitung konnte für

Moose und Farne sowie Algen und Pflanzen nachgewiesen werden. 92 % der untersuchten Cyanobakterien besitzen eine EDA, aber nur 57 % eine 6-Phosphofruktokinase, das Schlüsselenzym des EMP-Weges. Über die Häufigkeit der Expression des ED-Weges in diesen Organismen ist allerdings noch nichts bekannt (48). Die nah verwandten semi-phosphorylierenden und nicht-phosphorylierenden Wege sind auch in Archaea beschrieben worden (39). Hier ist allerdings zu beachten, dass nicht alle GADs zur Superfamilie der IlvD/EDD gehören.

Eine Differenzierung in die drei Wege kann durch die höhere Temperaturstabilität erklärt werden. Die Instabilität von phosphorylierten Intermediaten des klassischen ED-Weges bei höheren Temperaturen spielt hier vermutlich eine Rolle (14).

Der semi-phosphorylierende Weg wurde intensiv für *Clostridium pasteurianum* beschrieben, wobei das entsprechende GAD einen [4Fe-4S]-Cluster enthält (30) (29). In Halobakterien, die den Archaea zuzuordnen sind, ist verbreitet kein EMP-Weg vorhanden. Wie zahlreiche Genomanalysen ergaben, basiert der Metabolismus hauptsächlich auf einem semi-phophorylativen-ED-Weg (18).

Der nicht-phosphorylierende Weg ist beispielsweise in *S. sulfataricus* untersucht (158) (63).

1.3.2 Anwendung des ED-Weges und verwandter Enzyme

Da die meisten Vertreter der IlvD/EDD-Superfamilie am Energiestoffwechsel beteiligt sind, wurden die Enzyme in zahlreichen Versuchen zur Optimierung der Synthese von petrochemisch relevanten Grundbausteinen verwendet. Besonderes Augenmerk wurde häufig auf die Synthese von Ethanol aus biologischen Abfallstoffen gelegt.

So wurde beispielsweise *E. coli* so optimiert, dass es aus den Zuckern D-Xylose und L-Arabinose, welche in Lignocellulose aus Maisstroh und Rutenhirse vorkommen, und D-Galacturonat, welches in Zitronenschalen und Zuckerrübenmark vorkommt, Glutamat (ein Geschmacksverstärker) oder 1,4-Butandiol (wichtige Synthesechemikalie z. B. für Polyester) herstellt. Mehr als ein Drittel der Zucker des Abfallproduktes Lignocellulose können somit durch die heterologe Expression von Genen analog des ED-Weges in *E. coli* vergleichsweise einfach, ohne Phosphorylierung, in sehr gefragte Rohstoffe umgewandelt werden (180). Die Relevanz dieser Ergebnisse wird umso deutlicher, wirft man einen Blick auf einen der größten 1,4-Butandiolhersteller: die BASF SE (7). Ihre Produktion läuft nicht nur über den klassischen synthetischen Weg, sondern auch in Zusammenarbeit mit Genomatica, Inc. über gentechnisch optimierte Organismen. Diese können im Moment jedoch nur Glucose als Substrat verwenden und stehen damit in Konkurrenz zur Lebensmittelindustrie (8).

Die Herstellung von 1,2,4-Butantriol, ein Edukt vieler Medikamente, wurde analog über eine heterologe Expression verschiedener Gene zusammen mit der organismuseigenen XylD in *E. coli* aus Lignocellulose untersucht. Die 1,2,4-Butantriolproduktion wurde hierdurch signifikant verbessert, liegt aber nach wie vor deutlich unter dem theoretisch zu erwartenden Wert (44).

Die Biosynthese von Ethylenglycol, welches typischerweise aus fossilen Ressourcen gewonnen wird, kann ebenfalls in *E. coli* über die XylD aus D-Xylose gewonnen werden. Die Ausbeute beträgt 25 % der eingesetzten D-Xylose, wobei diskutiert wird, dass ein Ausgleich des Verhältnisses von NAD^+ und $NADP^+$ zu einer weiteren Verbesserung führen könnte. Hier könnte die zuvor diskutierte Coenzymspezifität des ED-Weges eine

Rolle spielen (125).

Für die Bioethanolproduktion, welche für zahlreiche Anwendungen wie z. B. als Zusatz zu Benzin benötigt wird, wurden zur Produktionssteigerung auch thermotolerante Stämme des Bakteriums *Z. mobilis* untersucht. Der als sicher klassifizierte Organismus, welcher mit der höchsten bekannten Umsatzrate des ED-Wegs Ethanol produziert, hat eine breite pH-Wert Toleranz von 3,5 bis 7,5 (46) (197).

Der ED-Weg selbst wurde ebenfalls in einigen Ansätzen zur Verbesserung der Synthese von Rohstoffen eingesetzt. Ein speziell für die Isobutanolproduktion optimierter *E. coli*-Stamm konnte durch die heterologe Expression des ED-Weges aus *Z. mobilis* die Produktion um 47 % auf 0,5 C-mol/C-mol verbessern. Die Produktionsgeschwindigkeit wurde um 88 % auf 0,456 g/(L*h) erhöht. Isobutanol kann beispielsweise Ethanol in Benzin ersetzen und wird hierdurch in großen Mengen benötigt. Der ED-Weg hat hier neben seiner hohen Durchsatzrate den weiteren Vorteil, dass das gesamte Edukt zum Produkt umgewandelt wird. Im Gegensatz hierzu muss im Pentosephosphatweg ein Verlust durch die Abspaltung von Kohlenstoffdioxid in Kauf genommen werden(122).

Durch den Einbau des ED-Weges in *Bacillus subtilis* konnte die Synthese von N-Acetylneuraminsäure, welches die Gehirnentwicklung bei Säuglingen unterstüzt, von 1,65 g/L auf 2,18 g/L verbessert werden (201).

Eine heterologe Expression des ED-Weges aus *E. coli* in *Saccharomyces cerevisiae* soll die Isobutanolproduktion verbessern. Auch hier liegt das Augenmerk auf der Fähigkeit des ED-Weges, $NADP^+$ zu regenerieren, welches für die Produktion von höheren Alkoholen benötigt wird. Obwohl die Expression der einzelnen Enzyme des Weges über SDS PAGE nachgewiesen werden konnten, wurde kaum Aktivität des Weges in *S. cerevisiae* detektiert. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte der fehlerhafte Einbau des [4Fe-4S]-Clusters durch die CIA-Maschinerie der Hefe in die EDD sein, was die Untersuchung dieses Enzyms besonders interessant macht (134).

Auch für die Synthese anderer Chemikalien ist die Optimierung der Redoxequivalente essentiell. Die heterologe Expression des ED-Wegs aus *Z. mobilis* in *E. coli* hat eine 25-fach höhere NADPH Regeneration zu Folge und führt damit zu einer 97 % höheren Terpenoidbiosynthese (138). In *Klebsiella pneumoniae* konnte die 1,3-Propandiol- bzw. 2,3-butandiolsynthese analog deutlich verbessert werden (190).

Neben dem großen Interesse am ED-Weg sowie den Enzymen der IlvD/EDD-Superfamilie für die Optimierung von biotechnologischen Prozessen zur Synthese von Stoffen, welche häufig nur durch fossilie Ressourcen gewonnen werden können, ist der Stoffwechselweg auch von zentralem Interesse für das Verständnis des Metabolismus zahlreicher Organismen. *E. coli*-Zellen mit einem Defekt im ED-Weg, welcher hauptsächlich für die Verstoffwechselung von Gluconat verantwortlich ist, sind deutlich in ihrer Fähigkeit, Gewebe zu besiedeln, behindert und wachsen sehr langsam (45). Im Dickdarm von Mäusen konnte festgestellt werden, dass dem Bakterium *E. coli* die Besiedelung ohne den ED-Weg nicht möglich ist (64).

Auch medizinisch ist der ED-Weg von zentralem Interesse. Da der Mensch diesen nicht besitzt, zahlreiche Krankheitserreger allerdings schon, bietet sich hier ein Angriffspunkt für neue Antibiotika. Zunächst muss jedoch die Relevanz des Stoffwechselweges nachgewiesen werden. In *Legionella pneumophila*, dem Erreger der Legionärskrankheit, beispielsweise, wird der ED-Weg hochreguliert, wenn sich das Bakterium vermehrt (42).

In *Salmonella enterica* serovar Typhimurium wird der ED-Weg zum Abbau von Gluconat und verwandten Zuckern als Kohlenstoffquelle in Macrophagen verwendet (58).

Der Weg ist der vorwiegend verwendete im Zuge einer Infektion von Maus Makrophagen. Das Bakterium verursacht Gastroenteritis mit mehr als 3 Millionen Toten im Jahr (52). Auch gibt es ein großes Problem mit multiresistenten Stämmen, sodass hier eine Inhibition des ED-Weges eine Infektion verhindern könnte (38). Möglicherweise würde auch ein nicht lethales Antibiotikum, welches lediglich die Pathogenität der Stämme beeinflusst, einen geringeren Selektionsdruck ausüben und damit weniger Resistenzen hervorrufen.

In *Streptococcus pneumoniae*, welches Meningitis auslösen kann, führt die Deletion der 2-Keto-3-deoxy-gluconat-Aldolase, dem Equivalent der EDA im nicht-phosphorylierenden Weg, zu einer erhöhten Virulenz, während die Deletion der GAD keinen Effekt zeigt. Der Effekt einer Deletion der EDD des Organismus wurde nicht untersucht (85).

Im Gegensatz hierzu regelt *Streptococcus dysgalactiae* subs. *equisimilis*, ein Erreger, der sowohl Menschen als auch Nutztiere befällt, 4 Stunden nach der Infektion die Expression der Gene des ED-Weges hoch und stellt damit seinen Energiestoffwechsel um. Dies lässt den Schluss auf eine wichtige Rolle des ED-Weges im Zuge der Infektion zu (193).

Der Erreger der Cholera, *Vibrio cholerae*, welcher jährlich etwa 95 000 Menschen das Leben kostet, produziert *in vitro* deutlich weniger Toxine, wenn der ED-Weg inaktiviert wurde (2). *In vivo* war es dem Bakterium nicht möglich, den Darm von Säuglingsmäusen zu besiedeln oder Flüssigkeitsansammlung im abgebundenen Ileum von Hasen hervorzurufen. Die Aktivierung des ED-Weges führt zur Hochregulierung der Expression von Virulenzgenen, welche für die Kolonisierung und die Toxinproduktion wichtig sind (145). Insbesondere die Deletion von EDD führt zu einer verringerten Pathogenität des Erregers (161).

Die hier genannten Beispiele machen deutlich, wie wichtig eine Erforschung der Enzyme des ED-Weges ist, und damit allen voran dessen Schlüsselenzym, der EDD.

1.4 Die Enzyme des Entner-Doudoroff-Wegs

1.4.1 Die Entner-Doudoroff-Dehydratase

Die Entner-Doudoroff-Dehydratase (EC 4.2.1.12, 6-Phosphogluconat-Dehydratase, EDD), das Schlüsselenzym des Entner-Doudoroff-Weges, katalysiert die Reaktion von 6-Phosphogluconat (6PG) zu 2-Keto-3-deoxy-6-phosphogluconat (KDPG). Das Enzym wurde erstmals 1955 aus *Pseudomonas fluorescens* isoliert und mit einer Michelis-Menten-Konstante von 0,6 mM beschrieben. Der optimale pH-Wert liegt bei 8,5, wobei die Katalyse auch bei einem pH-Wert von 6,5 stattfindet (110).

Die EDD aus *Zymomonas mobilis*, welche als die aktivste gilt, hat eine spezifische Aktivität von 245 µmol/min/mg Protein. Die Michaelis-Menten-Konstante liegt bei 0,04 mM und die Größe des Monomers wurde auf 63 kDa bestimmt. Das Protein liegt als Dimer vor (167).

Es liegt eine Kristallstruktur des Apo-Proteins aus *Shewanella oneidensis* vor (136), in welcher jedoch entscheidende Aminosäurensequenzen fehlen, um Aussagen über das Aktive Zentrum und die Art des Fe/S-Clusters treffen zu können (151).

Für das Enzym aus *Z. mobilis* wurde ein UV/Vis-Spektrum des aktiven Enzyms aufgenommen, welches dem der Aconitase mit [4Fe-4S]-Cluster ähnlich sieht. Auch wurden ESR-Spektren mit starken Mangan(II)-Signalen erhalten (157).

Die EDD aus *Caulobacter crescentus* wurde mit der Absicht, es für die Synthese von KDPG zu optimieren, rekombinant in *E. coli* exprimiert und anschließend aufgereinigt sowie charakterisiert. Die Michaelis-Menten-Konstante beträgt 0,3 mM, v_{max} liegt bei 61,6 U/mg bei einer Temperatur von 37 °C. Der Homodimer setzt 1 g 6-Phosphogluconat zu 0,81 g stereochemisch purem KDPG um, was eine Ausbeute von 90 % entspricht. Das pH-Optimum des 63,2 kDa großen Enzyms liegt bei 8,0. Nach einer Inkubation von 3 Tagen bei 4 °C wurde nur 10 % der Aktivität eingebüßt. Spektroskopische Daten wurden nicht veröffentlicht (112).

Insgesamt sind wenige Beispiele charakterisierter EDDs bekannt, und es sind kaum spektroskopische Daten vorhanden. Dies macht die Erforschung weiterer EDDs, des Schlüsselenzyms des ED-Weges, mit ausführlichen Charakterisierungen sehr wichtig.

1.4.2 Die Entner-Doudoroff-Aldolase

Die Entner-Doudoroff-Aldolase (EC 4.1.2.14, 2-Keto-3-deoxy-6-phosphogluconat-Aldolase, EDA) katalysiert die Reaktion von 2-Keto-3-deoxy-6-phosphogluconat zu Pyruvat und Glyceraldehyd-3-phosphat. Das Enzym wurde erstmals 1955 aus *Pseudomonas fluorescens* isoliert. Die Michaelis-Menten-Konstante konnte auf 0,1 mM bestimmt werden. Das pH-Optimum liegt zwischen 7,0 und 8,5. Diese Reaktion liegt im Gegensatz zu der durch EDD katalysierten Reaktion nur zu 64 % auf der Produktseite (111).

Das Enzym aus *Zymomonas mobilis* hat eine spezifische Aktivität von 600 U/mg Protein, eine Größe von 23 kDa. Das als Trimer vorliegende Enzym hat eine Michaelis-Menten-Konstante von 0,24 mM (166).

Für die EDA aus *E. coli* K12 liegt das pH-Optimum in Tris/HCl-Puffer bei 7,6. Die Michaelis-Menten-Konstante konnte auf 0,2 mM bestimmt werden. Das Produkt Glycerinaldehyd-3-Phosphat und das Edukt 6-Phosphogluconat führen zu kompetitiver Inhibition mit Konstanten von 0,4 mM bzw. 0,8 mM. Nach 10 Min bei 78 °C ist die Hälfte der Proteine eines Testansatzes denaturiert. Das Enzym ist sehr spezifisch für die Reaktion und mehrere Tage bei 4 °C stabil (90).

Die EDA aus *Pseudomonas putida* wurde kristallisiert. Das Enzym setzt sich auch 3 identischen Untereinheiten von je 225 Aminosäuren Länge zusammen. Durch die Proteinsequenzierung konnte die Größe einer Untereinheit auf 24 kDa bestimmt werden (187) (177).

Die durch die EDA aus *Pseudomonas fluorescens* katalysierte Reaktion ist eine Gleichgewichtsreaktion für die eine Gleichgewichtskonstante zwischen 0,67 und $1{,}57 * 10^{-3}$ M bestimmt wurde. Abweichende Werte wurden vor allem in Tris/HCl-Puffer beschrieben, welcher mit dem Produkt Glycerinaldehyd-3-phosphat reagiert (43) und aus diesem Grund das Gleichgewicht verändert und Messungen verfälscht. Auch wurde der Mechanismus untersucht und festgestellt, dass die EDA sowohl die Spaltung des Substrats als auch die anschließende Enolisierung des Pyruvats katalysiert (130). Das Enzym aus *Pseudomonas fluorescens* liegt als Trimer vor und wird bei einem pH-Wert über 9,0 schnell inaktiv. In 1 N HCl jedoch ist nach 4 Stunden bei Raumtemperatur kein Aktivitätsverlust festzustellen, was das Enzym für industrielle Anwendungen interessant macht (195).

So wurde die Rückreaktion der EDA für die Synthese von 2-Keto-3-deoxy-6-phosphogluconat und strukturell ähnlichen Stoffen untersucht. Es konnte in Abhängigkeit davon, aus welchem Organismus die EDA stammte, eine Stereoselektivität erhalten werden.

Die EDA aus *Z. mobilis* ist nicht stereoselektiv (171). Das Enzym aus *Pseudomonas putida* hat ein großes Substratspektrum und ist aus diesem Grund auch für die Industrie interessant. Eine polare Gruppe an C2 oder C3 ist die einzige strukturelle Anforderung für die elektrophile Komponente der Rückreaktion. Die Gleichgewichtskonstante für die Spaltung des 2-Keto-3-deoxy-6-phosphogluconats liegt bei $K_{eq} = 1*10^{-3}$ M und deckt sich damit mit den Ergebnissen der EDA aus *Pseudomonas fluorescens* (16).

1.5 Zielsetzung

Bis heute konnten nur solche Holoenzyme der IlvD/EDD-Superfamilie kristallisiert und dadurch räumlich aufgeklärt werden, welche einen [2Fe-2S]-Cluster besitzen. Enzyme mit einem [4Fe-4S]-Cluster wurden aufgrund ihrer Labilität und Sauerstoffempfindlichkeit nur wenig hinsichtlich ihrer Katalyseeigenschaften untersucht. Teil dieser großen Gruppe ist die EDD, das Schlüsselenzym des Entner-Doudoroff-Wegs. Die Omnipräsenz dieses wichtigen Stoffwechselweges wurde in den letzten Jahren immer deutlicher, nachdem dieser nicht nur in Bakterien sondern auch in Pflanzen gefunden wurde. Seine Relevanz nicht zuletzt für die Virulenz und das Überleben von Krankheitserregern wurde in zahlreichen Organismen nachgewiesen. Auch für die biotechnologische Anwendung ist der sich durch geringe Proteinkosten auszeichnende ED-Weg aufgrund seiner hohen Durchsatzrate im Vergleich zum EMP-Weg äußerst interessant. Umso erstaunlicher ist es, dass zwar die heterologe Expression der Enzyme des ED-Weges zahlreich untersucht wurde, über die Enzyme, allen voran die EDD, selbst allerdings wenig bekannt ist.

Unter Einsatz von bioinformatischen Methoden, heterologer Expression verschiedener EDDs in *E. coli*, gezielter Mutagenese sowie zahlreicher Spektroskopiearten soll in dieser Arbeit die Struktur des Enzyms, die Anordnung im aktiven Zentrum, darunter die Koordination des Clusters, und der Ablauf der Katalyse untersucht werden.

Zu Beginn dieser Arbeit stand die Suche nach einer stabileren Variante der EDD, um an dieser auch langwierige Untersuchungen, wie beispielsweise Kristallisationsexperimente, durchführen zu können, im Vordergrund. Hierzu wurden vor allem bioinformatische Methoden herangezogen. Im Zuge dieser wurde die Verbreitung der EDD unter Bakterien untersucht, sowie ein Augenmerk auf konservierte Aminosäuren gelegt.

Nach der Auswahl einer EDD aus einem thermotoleranten Organismus, *Thermomonospora curvata*, wurde diese eingehend untersucht und charakterisiert. Ein Vergleich mit der EDD aus *E. coli* und aus *Zymomonas mobilis*, der „Hefe des Tequilas“, auf der Basis verschiedener Spektroskopiearten sowie von Aktivitätsmessungen, soll einen tieferen Einblick in den Aufbau und die den Ablauf der Katalyse ermöglichen. Mößbauerspektroskopie sowie Resonanz-Raman-Spektroskopie werden hierzu erstmals an einer EDD durchgeführt. Experimente zur Kristallisation, sowie zahlreiche NMR-spektroskopische Untersuchungen ergänzen die Ergebnisse.

Auf Basis des hier erlangten Wissens kann möglicherweise der biotechnologische Prozess zur Produktion von Synthesechemikalien aus erneuerbaren Energieträgern verbessert werden. Auch besteht die Möglichkeit der Entwicklung von Antibiotika, da der Mensch diesen unter Bakterien weit verbreiteten Stoffwechselweg nicht besitzt. Der ED-Weg bietet so einen guten Angriffspunkt. Das Verständnis des genauen Aufbaus der EDD und des Mechanismus der Katalyse in dieser Doktorarbeit soll einen Beitrag für Biotechnologie und Antibiotikaentwicklung liefern.

2 Methodenteil

Die im folgenden als Wasser beschriebene Chemikalie ist ausschließlich bidestilliertes Wasser, bzw. Reinstwasser. Des Weiteren werden alle hier verwendeten Lösungen und ihre Zusammensetzung im Anhang in Kapitel 7.5 beschrieben. Alle sterilen Arbeiten wurden unter einer Sterilwerkbank durchgeführt.

2.1 Bioinformatik

Zur Suche nach einer stabilen EDD wurden bioinformatische Methoden herangezogen. Ausgehend von der Aminosäuresequenz der EDD aus *E. coli* als Referenz wurden Genome von Bakterien und Archaea auf identische Sequenzen untersucht. Hierzu wurde die Genomdatenbank des Joint Genome Institute (JGI) (47) verwendet. Für Archaea konnten hierbei keine signifikanten Übereinstimmungen gefunden werden, sodass sich im Folgenden auf die Verbreitung der EDD in Bakterien fokussiert wurde.

Um einen Überblick der Verbreitung in Bakterien zu erhalten, wurden die Genome von über 386 Bakterien auf identische Sequenzen untersucht (Liste siehe Anhang 6). Die untersuchten Organismen wurden so ausgewählt, dass von jeder dort verfügbaren Familie mindestens ein Vertreter untersucht wurde. Um die EDD von anderen eng verwandten Enzymen unterscheiden zu können, wurde zum einen die Aminosäurensequenzidentität heran gezogen. War diese höher als 50 %, wurde angenommen, dass ein EDD vorliegt. Andere verwandte Enzyme, wie beispielsweise die IlvD, weisen nur eine Aminosäuresequenzidentität von etwa 30 % zu EDDs auf. Zum anderen wurde das Vorliegen einer EDD, durch das Betrachten der Genumgebung verifiziert. Da Gene in Bakterien häufig in Genclustern oder sogar in Operons vorliegen, deuten Gene, welche als EDA, Zwischenferment (*zwf*), Glucokinase (*glk*), Glucose-6-phosphatisomerase (*pgi*) und 6-Phosphogluconolactonase (*pgl*) annotiert sind, in unmittelbarer Umgebung zu einem potentiell für eine EDD codierendes Gen darauf hin, dass tatsächlich dieses Enzym vorliegt.

Um weiterhin auszuschließen, dass EDD auch in anderen Bakterienklassen vorkommt, wurde EDD von *E.coli* in der NCBI Datenbank (4) gegen alle in der Datenbank des JGI aufgeführten Bakterienklassen geblastet und die Resultate wie oben beschrieben behandelt.

Die auf diese Weise erhaltenen Gensquenzen von EDDs aus verschiedenen Organismen wurden durch das Onlineprogramm Clustal Omega (128) einem Sequenzalignment unterzogen. Alignments dieser Art wurden später auch herangezogen, um die potentiell für die Aktivität oder die Multimerbildung relevante Aminosäuren zu identifizieren, was anschließend durch Mutagenese untersucht wurde.

Für die Erstellung eines phylogenetischen Baumes wurde das Onlineprogram iTOL (118) verwendet. Dieses erstellt aus der Alignmentdatei von Clustal Omega eine graphische Darstellung der Sequenzidentitäten.

Zur graphischen Darstellung der Genumgebung wurde ebenfalls die Genomdatenbank von JGI (47) verwendet. Die dort angegebenen Gene mit ihren Genloki sowie Genlängen wurden zur maßstabsgetreuen Darstellung der Abbildung 8 herangezogen.

2.2 Vorbereitung von Materialien

2.2.1 Gießen von Agarose-Gelen

Agarose-Gele dienen zur Trennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe im elektrischen Feld. Dies kann zur Verifizierung eines entstandenen Fragments (qualitatives Gel) sowie zur Isolierung desselben (präparatives Gel) dienen. Für diese Arbeit wurden ausschließlich 1 %-ige Agarose-Gele verwendet. Hierzu wurde 0,8 - 1 g Agarose in 80 - 100 ml TAE-Puffer (1x) durch Erhitzen bis zum Kochen gelöst. Anschließend wurde die Lösung in eine vorbereitete Agarose-Gelkammer gegossen und abkühlen gelassen. Für qualitative Agarose-Gele wurden kleine Kämme (Taschenvolumen max. 35 µl) verwendet, für Präparative große Kämme mit einem Taschenvolumen von ca. 80 µl. Das Gel kann mehrere Tage in Klarsichtfolie gewickelt im Kühlschrank gelagert werden.

2.2.2 Gießen von SDS-PAGE-Gelen

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS PAGE) wird zur Auftrennung von Proteinen im elektrischen Feld aufgrund ihrer Größe verwendet. Für diese Arbeit wurden, aufgrund der Größe von EDD um 65 kDa, diskontinuierliche Gele verwendet. Das bedeutet, dass sich das Gel aus einem 15 %-igen Trenngel und einem 4,5 %-igen Sammelgel zusammensetzt, sowie ein höherer Anteil an Rotiphorese-Gel verwendet wird als in beispielsweise 12 %-igen Gelen. Je höher prozentig das Gel ist, desto besser werden größere Proteine aufgetrennt.

Zunächst wurde das Trenngel gegossen. Hierzu wurden 7,5 ml Rotiphorese-Gel (30 %-ig) mit 3,75 ml Wasser und 3,75 ml Trenngelpuffer gemischt. Nach Zugabe von 30 µl TEMED und 120 µl APS-Lösung, welche die Polymerisation des Gels induzieren, wurde die Lösung zügig zwischen die Glasplatten der Gelgießapperatur bis zu einem Füllstand von etwa 1 cm unter Kammende gegossen. Um die Bildung von Blasen an der Geloberfläche zu verhindern, wurde das Gel mit 70 %-igem Ethanol überschichtet. Nach etwa einer Stunde war die Polymerisation abgeschlossen, das Ethanol wurde abgegossen und Rückstände mit Filterpapier vollständig entfernt.

Das Sammelgel setzt sich aus 0,75 ml Rotiphorese-Gel (30 %-ig) mit 3 ml Wasser und 1,25 ml Sammelgelpuffer zusammen. Hierzu wurden 10 µl TEMED und 40 µl APS-Lösung zur Polymerisation gegeben. Die Lösung wurde über das Trenngel gegossen und der Kamm zwischen die Glasplatten gesteckt. Nach einer weiteren Stunde konnte das Gel entweder verwendet oder in feuchte Tücher eingeschlagen mehrere Tage im Kühlschrank gelagert werden.

Die hier angegebenen Mengen reichen für zwei Gele.

2.2.3 Gießen von Platten

Für das Gießen von etwa 20 Platten wurde 12,5 g LB-Medium mit 7,5 g Agar-Agar in 500 ml Wasser autoklaviert. Zu der auf 60 - 70 °C abgekühlten Lösung wurden dann in steriler Umgebung, falls nötig, die entsprechenden Antibiotika gegeben, sodass folgende Endkonzentrationen erreicht wurden: Tetracyclinhydrochlorid: 10 µg/l, Kanamycinsulfat 30 µg/l, Ampicilin 100 µg/l. Anschließend wurde die Lösung gut gemischt und in Petrischalen mit Nocken gegossen. Bis zur Verwendung wurden sie im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

2.2.4 Herstellung kompetenter Zellen

Die Herstellung kompetenter Zellen wurde über eine chemische Variante realisiert. Hierzu wurde eine Vorkultur von 25 ml SOB-Medium mit den nötigen Antibiotika mit Zellen des gewünschten Stammes inokuliert und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Gleichzeitig wurden 500 ml des SOB-Mediums ohne Salze über Nacht auf 30 °C vorgewärmt. Am nächsten Morgen wurden neben den Salzen auch 36 ml einer NaCl-Lösung (5 M) zugegeben. Inokuliert wurde mit 2 % der Hauptkultur und anschließend für etwa 3 h bei 30 °C und 200 rpm bis zu einer OD_{600} von 0,5 inkubiert.

Die Zellen wurden bei 3000 rpm (Beckman J2-21, JA-10) und 4 °C 10 min geerntet, der Überstand verworfen und die Zellen vorsichtig auf Eis in 50 ml TFB resuspendiert. Nach einer Inkubation von 15 min auf Eis wurde unter Schwenken tropfenweise 1,75 ml DMSO zugegeben. Es wurde weitere 10 min auf Eis inkubiert, anschließend zu je 200 µl aliquotiert und die Aliquots in flüssigem Stickstoff weggefroren. Die Aliquots wurden bei -80 °C im Gefrierschrank gelagert.

2.2.5 Antibiotika

Für die Selektion von Bakterien wurde in diese Arbeit in der Regel die in Tabelle 1 angegebenen Endkonzentrationen verwendet.

Tabelle 1: Antibiotika und ihre Konzentrationen

Antibiotika	Endkonzentration in µg/l
Ampicilin	100
Kanamycinsulfat	30
Tetracyclinhydrochlorid	10

2.3 Vom Gen zum Enzym

2.3.1 Polymerase-Kettenreaktion

Nukleotidsequenzen, die für ein gewünschtes Enzym codieren, wurden der Genomdatenbank JGI (47) entnommen und anschließend für *E. coli* auf der Internetseite von ThermoFischer Scientific (10) codonoptimiert. Des Weiteren wurde an die Enden der Gensquenzen Schnittstellen für Restriktionsenzyme eingefügt, abhängig vom Vektor, in welchen das Gen später kloniert werden sollte. Anschließend wurde das Gen bestellt (siehe Abbildung 76).

Mit der Polymerase-Kettenreaktion wurden die synthetischen Gene dann amplifiziert, um ausreichend DNA für eine Klonierung zu erhalten. Für die PCR wurde die DNA so in sterilem Wasser gelöst, dass eine Lösung von 20 ng/µl entstanden ist, welche im Folgenden als „Template“ bezeichnet wird. Der 50 µl Ansatz setzt sich wie folgt zusammen:

34,5 µl Wasser (autoklaviert)
10,0 µl Phusion HF 5-fach Puffer
1,5 µl forward Primer 0,01 nmol/µl
1,5 µl reverse Primer 0,01 nmol/µl
1,0 µl dNTPs (10 mM)
1,0 µl Template
0,5 µl Phusion DNA Polymerase

Für die Durchführung der PCR wurden im Allgemeinen die in Tabelle 2 dargestellten Bedingungen gewählt. Nach einem initialen Denaturierungsschritt wurde das Gen im zweiten Schritt in 35 Zyklen vervielfacht. Dieser Schritt unterteilt sich in einen weiteren Denaturierungsteil, die Primerhybridisierung bei niedrigeren Temperaturen und die Elongation bei 72 °C. Bei der Primerhybridisierung ist auf den Schmelzpunkt der Primer zu achten, da eine zu hohe Temperatur das Anlagern komplett verhindert, während eine zu niedrige Temperatur auch Anlagerung an nicht zu 100 % komplementäre Sequenzen erlaubt. In dieser Arbeit wurde die Temperatur zwischen 50 °C und 60 °C variiert. Bei der Elongation ist auf die Länge des Gens zu achten. Je länger das Gen, desto mehr Zeit wird auch für dessen komplette Amplifikation benötigt. Für diese Arbeit wurde die Faustregel von 15 - 30 s/kb verwendet. Um am Ende der PCR sicher zu stellen, dass jede Kopie vollständig elongiert wurde, schließt sich nach den 35 Zyklen eine finale Elongation an. Das PCR-Produkt wurde anschließend bei 4 °C oder 12 °C bis zu 16 h gelagert. Für eine weitere Aufbewahrung wurde es bei -20 °C eingefroren.

Tabelle 2: Die Bedingungen einer PCR zur DNA-Amplifikation

Schritt	Wieder-holungen	Temperatur	Dauer
1. Initiale Denaturierung	1	98 °C	30 s
2. Denaturierung	35	98 °C	10 s
2. Primerhybridisierung (Annealing)		50 °C - 60 °C	30 s
2. Elongation		72 °C	15 - 30 s/kb
3. Finale Elongation	1	72 °C	10 min
4. Lagerung	1	4 °C oder 12 °C	max. 16 h

2.3.2 Qualitatives Agarose-Gel

Zur Überprüfung des Erfolgs einer PCR wurden 5 µl des Produktes mit 1,7 µl Loading Dye 6-fach und 1 µl GelRed 10-fach vermischt. Nachdem das Volumen mit autoklaviertem Wasser auf 10 µl aufgefüllt wurde, wurde die Lösung in eine kleine Tasche eines Agarose-Gels, welches in TAE-Puffer lag, gefüllt. In eine weitere Tasche wurden 6 µl des Markers auf 2-log DNA Ladder Basis (siehe Abbildung 80) gegeben. Das Gel wurde 30 bis 40 min bei 100 V laufen gelassen.

Eine Detektion der Banden sowie die Zuordnung der Größe und Abschätzung der Menge auf Basis des Markers erfolgte mittels des FusionSL Vilber Lourmats und der

dazugehörigen Software VisionCapt.

Im Fall der Bestimmung von DNA nach Aufreinigungsschritten wurde analog verfahren, jedoch nur 1 µl der DNA eingesetzt.

2.3.3 Präparatives Agarose-Gel

Die präparative Agarose-Gelelektrophorese dient vor allem der Aufreinigung von PCR-Produkten. Zu 45 µl des PCR-Produktes werden 11,7 µl Loading Dye 6-fach und 7 µl GelRed 10-fach gegeben. Das Gesamtvolumen von 70 µl wird durch die Zugabe von autoklaviertem Wasser erreicht. Für dieses Volumen wird ein Gel mit großen Taschen (Vgl. Kapitel 2.2.1) verwendet. Auf das Auftragen von Marker kann verzichtet werden, da ein qualitatives Agarose-Gel zum Vergleich vorher gefahren wurde. Das Gel wird bei 90 V 20 min elektrophoriert.

Anschließend wird die gewünschte DNA-Bande ausgeschnitten. Hierbei wurde darauf geachtet, sie möglichst wenig mit UV-Licht zu bestrahlen, um die DNA zu erhalten. Die DNA wurde mit dem Kit PCR clean-up Gel extraction von Macherey-Nagel aufgereinigt.

Zur Überprüfung der Reinheit sowie der Konzentration wurde ein qualitatives Agarose-Gel durchgeführt, wie in Kapitel 2.3.2 beschrieben.

2.3.4 Verdau und Ligation

Um das durch die PCR amplifizierte Gen in Zellen zu exprimieren, musste dieses als nächstes in einen Vektor kloniert werden. Hierzu wurde sowohl das Gen als auch der Vektor mit geeigneten Restriktionsenzymen verdaut und beide direkt nach dem Verdau und der Aufreinigung ligiert. Für eine Übersicht über die verwendeten Vektoren siehe Tabelle 3.

Tabelle 3: Durchgeführte Klonierungen

Gen	Vektor	1. Restriktionsenzym	2. Restriktionsenzym
EDA *E. coli*	pETDuet	SalI	BamHI
EDD *T. curvata*	pET28a TSTS	HindIII	NdeI
EDD *Z. moblis*	pET28a TSTS	NdeI	HindIII
EDD *E. coli*	pPR-IBA101	SacII	PstI

Für den Vektorverdauansatz ergab sich folgende Zusammensetzung:

5 µl Puffer CutSmart 10-fach
0,5 - 1 µg Vektor
1,5 µl Restriktionsenzym 1
1,5 µl Restriktionsenzym 2
ad 50 µl Wasser (autoklaviert)

Für den Ansatz zum Verdau des Gens galt folgende Zusammensetzung:

5 µl Puffer CutSmart 10-fach
1 - 1,5 µg Vektor
1,5 µl Restriktionsenzym 1
1,5 µl Restriktionsenzym 2
ad 50 µl Wasser (autoklaviert)

Die Ansätze wurden abhängig von der optimalen Inkubationstemperatur der Restriktionsenzyme, welche für die hier verwendeten Enzyme bei 37 °C lag, für 1 h inkubiert. Die Aufreinigung des Vektors erfolgte anschließend durch ein präparatives Agarose-Gel (siehe Kapitel 2.3.3), die des Gens analog des PCR clean-up Gel extraction Kits von Macherey-Nagel. Von beiden Aufreinigungen wurde die Konzentration und Reinheit durch ein qualitatives Agarose-Gel (siehe Kapitel 2.3.2) bestimmt.

Die Zusammensetzung des Ligationsansatzes wurde mit Formel 1 bestimmt, wobei immer von einer Vektormenge von 100 ng ausgegangen wird.

$$\frac{m(Vektor\ in\ ng) * l(Insert\ in\ bp)}{l(Vektor\ in\ bp)} * 3 = m(Insert\ in\ ng) \tag{1}$$

Für einen Ansatz, in dem X und Y von den jeweiligen Konzentrationen abhängen und sich aus Formel 1 bestimmen lassen, ergibt sich:

X µl Vektor
Y µl Insert (Gen)
1 µl T4 Ligasepuffer
0,5 µl T4 Ligase
ad 10 µl Wasser (autoklaviert)

Für eine optimale Ligation wurde die Menge des Vektors sowie des Inserts leicht variiert und mehrere Ansätze durchgeführt. Zudem wurde eine Negativkontrolle ohne Insert gemacht. Die Ansätze wurden bei 16 °C 30 min bis 1 h inkubiert und anschließend in NEB5- oder NEB10-Zellen transformiert (siehe Kapitel 2.3.8).

2.3.5 Minipräparation und Sequenzierung

Für eine Amplifikation des durch Ligation erhaltenen Plasmids wurde eine Kultur von 6 ml LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika mit einer Kolonie angeimpft. Diese wurde über Nacht bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Die Isolierung der DNA erfolgte über das Kit NucleoSpin®Plasmid (no Lid) von Macherey-Nagel. Hierbei wurde allerdings die Inkubation der Elution angepasst und auf 5 - 15 min verlängert.

Eine rasche Methode der DNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte über das Eppendorf Bio Photometer plus, welches hierzu die Peaks bei 230 nm für RNA, 260 nm für DNA und 280 nm für Proteine heranzieht.

Anschließend stehen zwei Methoden zur Überprüfung der Reinheit bzw. ob die Ligation erfolgreich war und das Plasmid das gewünschte Gen enthält zur Verfügung. Bei einer großen Zahl an möglichen positiven Proben wurde stets ein Probeverdau (siehe

Kapitel 2.3.6) durchgeführt. War nur eine Probe vorhanden, oder wollte man ein bereits positives Plasmid, welches lediglich amplifiziert wurde, überprüfen, wurden etwa 500 ng des Plasmids mit den entsprechenden Sequenzierungsprimern zu der Firma Seq-IT zur Sequenzierung geschickt. Die auf diese Weise erhaltene Datei wurde mit dem Program Chromas ausgelesen, mit der gewünschten Sequenz in Clustal Omega verglichen und so auch auf Mutationen überprüft.

2.3.6 Probeverdau

Der Probeverdau wurde angewandt, um den Erfolg einer Ligation zu überprüfen. Hierzu wurden die zu überprüfenden Plasmide mit denselben Restriktionsenzymen verdaut, mit welchen auch die Klonierung erfolgte. Ein Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

500 ng Vektor
2,5 µl Puffer CutSmart 10-fach
1 µl 1. Restriktionsenzym
1 µl 2. Restriktionsenzym
ad 25 µl Wasser (autoklaviert)

Der Ansatz wurde jeweils entsprechend der Empfehlungen für die Restriktionsenzyme 1 h bei 37 °C inkubiert und das Resultat mit einem qualitativen Agarose-Gel (siehe Kapitel 2.3.2) bestimmt. Hierzu wurden zu den 25 µl des Probeverdaus 5,8 µl LoadingDye 6-fach und 3,5 µl GelRed 10-fach gegeben. Ein positives Ergebnis wurde in jedem Fall durch Sequenzierungen überprüft.

2.3.7 Kolonie-PCR

Eine Kolonie-PCR wurde durchgeführt, wenn nach der Ligation viele Kolonien auf der Transformationsplatte waren, diese jedoch nach Minipräparation und Verdau negativ waren. Sie ermöglicht es, eine große Zahl an Kolonien kostengünstiger zu testen als durch das Animpfen einer Minipräparation und anschließende Sequenzierung und/oder Probeverdau.

Es wurden verschiedene Kolonien der Transformation nach Ligation auf Platten mit entsprechenden Antibiotika überstrichen und diese über Nacht bei 37 °C inkubiert. Von jeder überstrichenen Kolonie wurde ein Teil der gewachsenen Zellen in 30 µl Wasser (autoklaviert) resuspendiert und durch eine Inkubation von 10 min bei 95 °C aufgeschlossen. Für die PCR wurde folgende Zusammensetzung gewählt. Dabei wurden die Primer so gewählt, dass das insertierte Gen amplifiziert wurde, falls es vorhanden war.

30 µl Zellen (aufgeschlossen)
5 µl ThermoPol Puffer
2,5 µl Primer forward
2,5 µl Primer reverse
5 µl dNTPs
2,5 µl Taq-Polymerase
ad 50 µl Wasser (autoklaviert)

Die PCR wurde wie in Tabelle 4 angegeben durchgeführt. Für eine Identifikation positiver Kolonien wurde ein qualitatives Agarose-Gel (siehe auch Kapitel 2.3.2), bei dem 7 µl des PCR-Produktes mit 1 µl GelRed und 1,6 µl LoadingDye gemischt wurden, verwendet. Mittels Minipräparation und anschließender Sequenzierungen (siehe auch Kapitel 2.3.5) wurden die positiven Kolonien erneut überprüft, um beispielsweise einen Frameshift auszuschließen.

Tabelle 4: Kolonie-PCR

Schritt	Wieder-holungen	Temperatur	Dauer
1. Initiale Denaturierung	1	95 °C	3 min
2. Denaturierung	35	95 °C	30 s
2. Primerhybridisierung (Annealing)		45 °C - 68 °C	30 s
2. Elongation		68 °C	1 min/kb
3. Finale Elongation	1	68 °C	5 min
4. Lagerung	1	4 °C oder 12 °C	max. 16 h

2.3.8 Transformation von E. coli Zellen

Um ein Plasmid in *E. coli*-Zellen zu transformieren, wurden diese zunächst auf Eis aufgetaut. Anschließend wurde eine geringe Menge des gewünschten Plasmids bzw. der Ligationsansatz zu 90 - 200 µl der kompetenten Zellen (Kapitel 2.2.4) gegeben. Die Menge lag zwischen 5 und 100 ng in 1 - 5 µl. Anschließend wurde 10 min auf Eis inkubiert, dann ein Hitzeschock von 60 s bei 42 °C durchgeführt. Nach weiteren 2 min Inkubation auf Eis wurde 1 ml LB-Medium zugegeben und 40 min bei 37 °C unter Schütteln (850 rpm) inkubiert. Die Zellen wurden bei 5000 rpm (VWR MicroStar 17) 5 min zentrifugiert. 950 µl des Überstands wurden verworfen und die Zellen im Verbliebenen vorsichtig resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen auf einer Platte, mit den entsprechenden Antibiotika, unter Zuhilfenahme einer zuvor abgeflammten Pasteurpipette ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Platten können mehrere Tage im Kühlschrank gelagert werden.

2.3.9 Zellzucht und Ernte

Für die Aufzucht der Zellen wurde zunächst eine Vorkultur von 100 ml LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika mit etwa 5 Kolonien angeimpft. Für die Zellaufzucht mit dem Ziel der Proteinisolation wurden, sofern es nicht anders vermerkt ist, *E. coli* BL21-Zellen verwendet, welche mit dem Plasmid pRK-ISC transformiert wurden. Das zusätzliche Plasmid unterstützt den Einbau von Eisen-Schwefel-Clustern. Die Vorkultur wurde über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert.

Die Hauptkultur enthielt 2 L LB-Medium, die entsprechenden Antibiotika sowie 100 mg/l Kultur Ammoniumeisen(III)citrat und 176 mg/l Kultur L-Cysteinhydro-chlorid monohydrat. Die Zusätze sollen den Einbau des [Fe-S]-Clusters fördern. Inokuliert wurde mit 20 - 40 ml der Vorkultur. Anschließend wurde bei 37 °C und 150 rpm etwa 3 Stunden bis zu einem OD_{600} von 0,3 bis 0,7 inkubiert. Für die Produktion von EDD wurde meist ein OD_{600} von 0,3 gewählt. Bei diesem wurde die Proteinproduktion mit IPTG induziert.

Die Konzentration variierte auch hier von 0,005 bis 0,5 mM, wobei für die Produktion ein Optimum von 0,01 mM gefunden werden konnte. Vor der Zugabe von IPTG wurde eine Probe von 1 ml Kultur genommen (BI), um die Proteinzusammensetzung in den Zellen später über SDS-PAGE zu analysieren. Dieses Zellpellet wurde bei - 20 °C gelagert. Nach Induktion wurde die Temperatur reduziert, meist auf 30 °C. Eine Auswahl der Aufreinigungen mit den entsprechenden Parametern wird in Kapitel 3.2 diskutiert. Die Kultur wurde einige Stunden bis zu über Nacht inkubiert, um die Proteinproduktion und den Einbau des Fe/S-Clusters zu ermöglichen.

Vor der Ernte wurde ebenfalls eine Probe für die oben beschriebene SDS-PAGE genommen (AI) und nach Zentrifugation das Pellet bei -20 °C gelagert. Geerntet wurde mittels Zentrifugation. Je 1 L Kultur wurde bei 4 °C und 6000*g 15 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und der 2. Liter analog zentrifugiert. Nachdem der Überstand erneut verworfen wurde, wurde das Pellet in ein tariertes 50 ml Gefäß überführt, das Gewicht bestimmt und in eine anaerobe Umgebung eingeschleust. Um Sauerstoff zu eliminieren, wurde das Pellet in anaerobem Puffer-W-mit, pH 8 resuspendiert. Anschließend wurde 10 min bei 4 °C und 7000*g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Gefäß mit Parafilm abgedichtet. Das Pellet wurde entweder sofort aufgeschlossen, oder bei -20 °C gelagert.

2.3.10 Zellaufzucht in Minimalmedium

Zur Maximierung der Proteinausbeute sowie des [Fe-S]-Clustereinbaus wurde die Aufzucht der Zellen in Minimalmedium getestet. Die Vorkultur hierzu wurde wie bereits beschrieben in 100 ml LB-Medium, mit den entsprechenden Antibiotika und 3 - 6 Kolonien über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert.

Das Medium für die Hauptkultur wurde über Nacht auf 37 °C vorgewärmt und setzt sich wie folgt zusammen:

1550 ml	Wasser (steril)
40 ml	Glucose (20 %-ig) (steril)
400 ml	Basis Puffer (steril) (siehe Tabelle 7.5)
120 µl	$CaCl_2$ (1 M) (steril)
1 - 2 ml	$MgSO_4$ (1 M) (steril)
	Antibiotika
20 ml	resuspendierte Vorkultur

Um das LB-Medium der Vorkultur zu entfernen, wurde diese für 5 min bei 4000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5430R) und 4 °C zentrifugiert und anschließend in 20 ml Wasser (steril) resuspendiert. Die Hauptkultur wurde bei 37 °C und 150 rpm bis zu einem OD_{600} von 0,5 inkubiert und anschließend mit 0,01 mM IPTG induziert. Die Proteinproduktion erfolgte über Nacht bei 30 °C und 150 rpm. Geerntet wurde analog der Beschreibung in Kapitel 2.3.9. Auch hier wurden Proben für die SDS-PAGE genommen, wie oben beschrieben.

2.3.11 Aufschluss mit Sonicator im anaeroben Zelt

Der Aufschluss mit Sonicator im anaeroben Zelt wurde für die Isolierung von sauerstoffempfindlichen Proteinen wie beispielsweise der EDD verwendet. Hierzu wurde das Zellpellet im Anaeroben langsam auf Eis getaut. Ein Resuspendieren in 30 ml gekühltem Puffer-W-mit, pH 8 und anschließender Zentrifugation bei 4 °C und 5000*g für 8 min garantiert die Sauerstofffreiheit. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet erneut in 20 ml Puffer-W-mit, pH 8 resuspendiert. Durch die Zugabe von je einer Spatelspitze Lysozym und PMSF soll die Vereinzelung der Zellen gewährleistet werden, bei gleichzeitiger Proteaseinhibition. Die Suspension wurde 10 min auf Eis inkubiert und eine halbe Spatelspitze DNAse zugegeben. Dies führt zu einer für die Lyse besseren Konsistenz der Zellsuspension. Zum Aufschluss mit Sonicator wurde entweder ein Becherglas verwendet, welches während des Pulsens in Eis geschwenkt wurde, oder eine Rosettenzelle auf Eis. Im Allgemeinen wurde insgesamt 12 mal sonifiziert, wobei 30 s eine Power von 45 % angelegt wurde mit anschließenden 30 s Pause. Abweichungen hiervon ergaben sich in Einzelfällen, wenn ein Aufschluss schon vorher oder auch noch nicht visuell zu erkennen war. Um die Zellfragmente vom löslichen Protein zu trennen wurde 1 h bei 4 °C und 20 000 rpm (Beckman Coulter Avanti J-26SXP, JA-25.50) bzw. 30 000 rpm (Beckman Optima^{TM} LE-80K, Ti70) zentrifugiert. Für eine spätere Charakterisierung der Aufreinigung mittels SDS-PAGE wurde an dieser Stelle eine Probe des Pellets (Pel), sowie des Überstandes (Sup) entnommen.

2.3.12 Aufreinigung über Strep-Tag

Die Aufreinigung der Proteine erfolgte abhängig davon, welchen *Tag* sie trugen. Da das Imidazol einer His-*Tag*-Aufreinigung häufig zum Abbau des Fe/S-Clusters führt, wurde für die EDD mit einem Twin-Strep-*Tag* aufgereinigt. Für diese Enzyme wurde eine Strep-Tactin® Säule verwendet. Der 28 Aminosäuren zählende *Tag* (Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys) bindet mit hoher Affinität an die Biotinbindestelle des streptavidinanalogen Säulenmaterials (1).

Für die Aufreinigung aus einem aus 2 - 4 L erhaltenen Zellpellets wurde 3 - 4 ml der Säulenmaterialsuspension (1:1) verwendet, welche zuvor mit 50 ml Puffer-W-mit, pH 8 im anaeroben Zelt gespült wurde, um ihre Anaerobizität zu gewährleisten. Der in Kapitel 2.3.11 erhaltene Überstand wurde zum Säulenmaterial gegeben und 30 min unter Invertieren im Rotator bei 4 °C inkubiert, um eine möglichst vollständige Bindung des Proteins an das Säulenmaterial zu gewährleisten.

Nach der Bindung des Proteins wurde weiterhin das Säulenmaterial aufgefangen und der Überstand verworfen (auch hiervon wurde eine Probe (FT) für die SDS-PAGE genommen). Um unspezifisch gebundene Proteine ohne Strep-*Tag* zu eliminieren, wurde die Säule mit 30 ml gekühltem Puffer-W-mit, pH 8 gewaschen. Am Ende des Waschschritts wurde eine Probe (W) für die SDS-PAGE aufgehoben.

Eluiert wurde mit 18 ml eisgekühltem Puffer E. Das in diesem Puffer enthaltene Desthiobiotin bindet reversibel an das Säulenmaterial, wodurch dieses mehrmals verwendet werden kann. Das Protein wurde auf ein Volumen zwischen 100 µl und 2 ml aufkonzentriert, ein UV-Vis Spektrum (Kapitel 2.4.1) aufgenommen und in flüssigem Stickstoff portionsweise weggefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C im Gefrierschrank.

Die Säule wurde mit 50 ml Puffer-W-mit, pH 8 gewaschen und im Kühlschrank gelagert. Vor erneuter Verwendung wurde sie mit 30 ml Puffer R regeneriert. Der hierin enthaltene Azo-Farbstoff HABA verdrängt durch seinen großen Überschuss das Desthiobiotin und färbt die Säule tiefrot. Ein Waschschritt mit 30 ml Puffer-W, pH 10,5 entfernt das HABA, die Säule wird wieder weiß. Da das Säulenmaterial bei diesem pH-Wert nicht lange stabil ist wurde sofort mit 20 ml Puffer-W, pH 8 gewaschen. Das Säulenmaterial konnte so lange wieder verwendet werden, bis nach diesem Regenerierungsschritt eine starke Verfärbung zurück blieb, was auf eine Inaktiviät hindeutete.

2.3.13 Aufschluss mit French-Press

Für den Aufschluss von nicht sauerstoffempfindlichen Proteinen, wie beispielsweise EDA oder phoN-Sf (Enzym für die Synthese von 6-Phosphogluconat) wurde eine French-Press verwendet. Hierzu wurde das Zellpellet aus Kapitel 2.3.9 langsam auf Eis getaut und in 25 ml gekühltem Lysepuffer resuspendiert. Es wurde eine Spatelspitze Lysozym und PMSF zur Vereinzelung der Zellen und Proteaseinhibition zugegeben. Um die Separierung der Zellen zu gewährleisten wurde die Suspension, nach einer Inkubation von 10 min, durch eine Kanüle (0,9 mm) gedrückt.

Vor der Verwendung wurde die French-Press auf 4 °C gekühlt und mit kaltem Lysepuffer gespült. Der Aufschluss erfolgte mit einem Druck von $6{,}9*10^6\,\mathrm{Nm}^{-2}$, wobei die Suspension langsam durch eine sehr kleine Öffnung gepresst wird, sodass die Scherkräfte die Zellmembran zerstören.

Die Abtrennung der Zellteile vom löslichen Protein erfolgte über Zentrifugation (70 min, 4 °C, 30 000 rpm, Beckman Optima™ LE-80K, Ti70).

2.3.14 Aufreinigung über His-Tag

Proteine, welche über einen His-*Tag* verfügten, wurden zu ihrer Aufreinigung an eine Ni-NTA-Säule gebunden. Hierbei binden die Proteine mit ihrem Hexa-His-*Tag* an ein durch Nitriloessigsäure koordiniertes Ni(II)-Ion. Sechs Histidine garantieren eine selektive Bindung, ohne die Elution zu erschweren. His-*Tag* wird meist für Proteine ohne [Fe-S]-Cluster verwendet, da das Säulenmaterial vergleichsweise günstig ist. Für labile Fe/S-Proteine wie die EDD führt das für die Elution bei dieser Aufreinigungsmethode verwendete Imidazol häufig zum Verlust des Clusters.

Für die Bindung wird der Überstand der Zentrifugation (Kapitel 2.3.13) mit dem zuvor mit 50 ml eisgekühlten Lysepuffer equilibierten Säulenmaterial vermischt und unter Invertieren für 1 h inkubiert. Für eine spätere Charakterisierung werden auch hier, wie bei der Aufreinigung durch Strep-*Tag* (Kapitel 2.3.12) die Proben Pel, Sup, FT und W für eine SDS-PAGE entnommen. Das Säulenmaterial wird aufgefangen und der Überstand verworfen. Mit 50 ml gekühltem Waschpuffer werden unspezifisch gebundene Proteine von der Säule gewaschen. Die Elution erfolgt mit 10 ml Elutionspuffer. Der hohe Imidazolgehalt des Elutionspuffers verdrängt die Histidine am Ni(II)-Ion. Das Eluat wurde in Fraktionen von 500 - 600 µl aufgefangen und ihre Proteinkonzentration durch eine Messung der Absorption bei 280 nm bestimmt. Dies wurde nötig, da EDA und PhoN-Sf im Gegensatz zu den braunen Fe/S-Proteinen farblos sind.

Die Fraktionen mit Proteingehalt wurden vereinigt und mit einer PD10-Säule entsalzt, um das Imidazol, welches für die Elution nötig war, zu entfernen. Die Säule wurde zuvor

mit 50 ml gekühltem Entsalzungspuffer equilibriert. Nachdem das Protein aufgetragen war, wurde mit weiteren 60 ml gekühltem Entsalzungspuffer eluiert und gewaschen. Das Eluat wurde erneut in Fraktionen von 500 - 600 µl gesammelt und der Proteingehalt über die Absorption bei 280 nm bestimmt. Alle positiven Fraktionen wurden vereinigt und aliquotiert in flüssigem Stickstoff weggefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C im Gefrierschrank.

Die Ni-NTA-Säule wurde mit weiteren 50 ml Waschpuffer gespült. Diese, sowie die PD10-Säule, wurden im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

2.4 Charakterisierung der Proteine

2.4.1 UV-Vis Spektroskopie

UV-Vis-Spektren wurden von jeder Aufreinigung im Bereich von 250 - 800 nm aufgenommen. Hierfür wurde das Protein so verdünnt, dass der Proteinpeak bei 280 nm eine Absorption zwischen 0,5 und 2 aufwies. Als Blank wurde für EDD Puffer-W-mit, pH 8 verwendet. Da der Proteinpeak von der Aminosäurezusammensetzung beeinflusst wird, wurde mit ExPASy ProtParam (76) ein Umrechnungsfaktor für jedes Protein anhand der Sequenz berechnet. Dieser bietet die Möglichkeit (bei Vernachlässigung der Absorption des Fe/S-Clusters), von der Absorption bei 280 nm direkt auf die Proteinkonzentration zu schließen. Ein weiterer Wert, welcher Aufschluss über den Clustergehalt im Protein gibt, ist das Verhältnis der Absorption bei 410 nm und 280 nm, da bei 410 nm ausschließlich der Cluster absorbiert. Für EDD aus *Thermomonospora curvata* konnte beispielsweise der in Gleichung 2 dargestellte Zusammenhang für einen Cluster pro Protein festgestellt werden.

$$\frac{Absorption\ bei\ 410\ nm * 4}{Absorption\ bei\ 280\ nm} * 100 = \%\ des\ [4Fe\text{-}4S]\text{-}Clustergehalts \tag{2}$$

2.4.2 Quantitative Proteinbestimmung mit Micro-Biuret

Die Proteinkonzentrationsbestimmung mit der Micro-Biuret Methode macht sich die Koordination von Cu^{2+}-Ionen an das Rückrad der Aminosäurenkette zu nutze. Somit ist diese Methode unabhängig von der Aminosäurenzusammensetzung eines Proteins. Es ergibt sich lediglich ein Nachteil durch die geringe Farbstabilität in den basischen Reaktionsbedingungen, welcher durch zügiges Messen der Probe vermieden wird. Die Micro-Biuret-Methode wurde hier anderen Methoden zur Proteinkonzentrationsbestimmung vorgezogen, da beispielsweise eine Bestimmung nach Lowry und der BCA-Test zu großer Ungenauigkeit in Abhängigkeit der Aminosäurenzusammensetzung führen können. Die Methode nach Bradford ist sehr sensitiv, beruht allerdings auf der Bindung des Farbstoffes an bestimmte Aminosäuren, was ebenfalls zu einer Abweichung durch die Aminosäurezusammensetzung führen kann.

Das Pipettierschema für den Micro-Biuret-Test kann Tabelle 5 entnommen werden, wobei die Volumina des Proteins anhand des UV-Vis-Spektrums (Kapitel 2.4.1) angepasst wurden und von 3 µl bis 100 µl variieren konnten.

Tabelle 5: Pipettierschema für die Proteinkonzentrationsbestimmung durch Micro-Biuret. Alle angegebenen Volumina in µl

Nr.	Reagenz	Blank	BSA Standard					Probe		
1	BSA (2 mg/ml)	0	50	100	150	200	300	0	0	0
	Protein	0	0	0	0	0	0	10	20	30
2	Wasser	1000	950	900	850	800	700	990	980	970
3	DOC (0,15 %)	100	100	100	100	100	100	100	100	100
4	Mischen; 5 min bei RT inkubieren									
5	TCA (70 %)	100	100	100	100	100	100	100	100	100
6	Mischen; Zentrifugieren: 13000*g, 10 min; vorsichtiges Entfernen des Überstandes									
7	NaOH (3 %)	950	950	950	950	950	950	950	950	950
8	Vortexen									
9	Micro-Biuret-Reagenz	50	50	50	50	50	50	50	50	50
10	15 min im Dunkeln inkubieren									
11	Messen der Absorption bei 545 nm gegen Wasser									

Um die variierenden Bedingungen an verschiedenen Tagen, wie beispielsweise die Temperatur in die Bestimmung miteinzubeziehen, wurde jedes Mal eine Kalibriergerade mit einer Rinderserumalbumin-Lösung (BSA, 2 mg/ml) erstellt.

Zur Reinigung des Proteins wurde dieses zunächst mit Trichloressigsäure (TCA, 70 %) und Natriumdesoxycholat (DOC, 0,15 %) gefällt. Durch Zentrifugation wurde der Kontaminationen (wie z. B. Tris oder Glycerin) enthaltende Überstand isoliert und verworfen. Das Pellet wurde in eine Natriumhydroxid-Lösung (NaOH, 3 %) aufgenommen, welches die Stickstoffatome am Proteinrückrad deprotoniert und so eine Koordination der Cu^{2+}-Ionen des Micro-Biuret-Reagenzes ermöglicht. Es entsteht eine violette Färbung, welche bei 545 nm quantitativ detektiert werden kann.

2.4.3 Quantitative Bestimmung der Eisenkonzentration im Protein

Die Bestimmung der Eisenkonzentration erfolgte über die Bindung zu Feren. Diese Methode erlaubt sowohl Fe^{2+}-Ionen, als auch Fe^{3+}-Ionen zu detektieren. Auch hier wurde analog der Proteinbestimmung nach Micro-Biuret eine Kalibriergerade verwendet. Der Eisenstandard war in diesem Fall eine Ammoniumeisen(II)-sulfat-Lösung, auch Mohrsches Salz genannt. Das Pipettierschema ist in Tabelle 6 dargestellt. Eine Abschätzung der jeweils benötigten Proteinvolumina erfolgte auf Basis der UV-Vis-Spektren.

Zunächst werden für die Eisenbestimmung alle Eisen-Ionen durch die Zugabe von Salzsäure (HCl, 1 %) und Erhitzen auf 80 °C für 10 min aus dem Protein gelöst. Überschüssige Säure wird durch Zugabe von Ammoniumacetat-Lösung (7,5 %) neutralisiert. Ascorbinsäure (4 %) reduziert alle Eisen-Ionen zu einem Oxidationszustand von 2+. Diese können durch Feren (1,5 %) komplexiert werden, wodurch ein blauer Chelatkomplex entsteht, welcher nach Lösen von eventuellen Protein-Rückständen mit Natriumdodecylsulfat (SDS, 2,5 %) bei 595 nm detektiert werden kann.

Tabelle 6: Pipettierschema für die Bestimmung der Eisenkonzentration im Protein. Alle angegebenen Volumina in µl

Nr.	Reagenz	Blank	Eisenstandard						Probe		
1	Mohrsches Salz (0,2 mM)	0	10	20	40	60	80	100	0	0	0
	Protein	0	0	0	0	0	0	0	10	20	30
2	Wasser	100	90	80	60	40	20	0	90	80	70
3	HCl (1 %)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
4	Mischen; 10 min bei 80 °C inkubieren; abkühlen lassen										
5	Ammonium-acetat (7,5 %)	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500
6	Vortexen										
7	Ascorbinsäure (4 %)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
8	Vortexen										
9	SDS (2,5 %)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
10	Feren (1,5 %)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
11	Vortexen										
12	Zentrifugieren: 13000*g, 7 min										
13	Messen der Absorption bei 593 nm gegen Wasser										

2.4.4 Quantitative Bestimmung des säurelabilen Schwefels im Protein

Die quantitative Bestimmung des säurelabilen Schwefels im Protein dient dazu festzustellen, wie viele [Fe-S]-Cluster und welche Clustertypen in einem Protein koordiniert sind, ohne dabei den Schwefel der Aminosäuren Cystein und Methionin zu detektieren. Für das in Tabelle 7 dargestellte Pipettierschema wurde die Kalibriergerade mit Li_2S erstellt.

Bei diesem Assay wird zunächst säurelabiler Schwefel unter alkalischen Bedingungen als Zinksulfid gefällt. Hierzu dient die Zugabe von Natriumhydroxid (NaOH, 7 %) und Zinkacetat (1 %). Anschließend wird das Präzipitat vorsichtig mittels einer sauren Lösung von *N,N´*-dimethyl-p-phenylendiamin (DMPD, 0,1 %) in Schwefelwasserstoff umgewandelt. Um dessen Verlust an die Gasphase zu verhindern, wurde sofort Eisenchlorid ($FeCl_3$, 10 mM) zugegeben, welches die Bildung von Methylenblau aus DMPD und H_2S katalysiert. Dieses weißt bei einer Wellenlänge von 670 nm ein Absorptionsmaximum auf.

2.4.5 Charakterisierung der Aufreinigung über SDS-PAGE

Die Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese kurz SDS-PAGE dient hier vor allem der Überprüfung der Proteinaufreinigung. Durch die Auftrennung der Proteine im elektrischen Feld nach ihrer Größe kann auch festgestellt werden, ob etwa unlösliches Protein im Pellet vorlag, welches nicht gewonnen werden konnte. Hierzu ist es notwendig, dass die Ladung der Proteine einheitlich negativ ist. Dies wird durch die Zugabe und Inkubation der Proteine mit SDS erreicht, welches sich mit seinem hydrophoben

Tabelle 7: Pipettierschema für die Bestimmung von säurelabilem Schwefel im Protein. Alle angegebenen Volumina in µl

Nr.	Reagenz	Blank	Sulfidstandard					Probe		
1	Li_2S (2 mM)	0	5	10	15	20	25	0	0	0
	Protein	0	0	0	0	0	0	10	20	30
2	Wasser	200	195	190	185	180	175	190	180	170
3	Zinkacetat (1 %)	600	600	600	600	600	600	600	600	600
4	NaOH (7 %)	50	50	50	50	50	50	50	50	50
5	Zum Mischen einmal invertieren und 15 min bei RT inkubieren									
6	Zentrifugieren: 13000*g; 15 s									
	Schritt 7 - 10 für jedes Reaktionsgefäß am Stück durchführen									
7	DMPD (0,1 %)	150	150	150	150	150	150	150	150	150
8	Vorsichtig, durch langsames Rotieren der Pipette, mischen									
9	$FeCl_3$ (10 mM)	150	150	150	150	150	150	150	150	150
10	Reaktionsgefäß sofort schließen und 30 s vortexen									
11	20 min inkubieren									
12	Zentrifugieren: 13000*g, 7 min									
13	Messen der Absorption bei 670 nm gegen Wasser									

Ende an die Proteine anlagert. Durch den negativ geladenen Kopf des Moleküls wird die negative Gesamtladung ermöglicht. Durch die Zugabe von Dithiothreitol (DTT) wird gewährleistet, dass die Disulfidbrücken reduziert werden und so die vorgegebene Sekundärstruktur der Proteine zerstört wird. Glycerin in den Proben dient der Beschwerung der Proben, um ein Herauslaufen aus den Taschen zu verhindern. Des Weiteren wird Bromphenolblau zugegeben, welches die Lauffront sichtbar macht. Die einzelnen Fraktionen wurden wie folgt vorbereitet:

BI (Vor Induktion): Pellet in 20 µl Wasser resuspendieren
AI (Nach Induktion): Pellet in 40 µl Wasser resuspendieren
Sup (Überstand): wird direkt verwendet
Pel (Pellet): Pipettenspitze (200 µl) in 100 µl Wasser resuspendieren
FT (Durchfluss): wird direkt verwendet
W (Waschschritt): wird direkt verwendet

Es wurde je 2 µl (für Fraktion W 4 µl) der Fraktionen mit 8 µl (6 µl) Wasser und 10 µl Probenpuffer 2-fach gemischt und bei 95 °C 5 min inkubiert. Analog wurde abhängig von dessen Konzentration 1 µl des isolierten Proteins pur oder bis zu 1:30 verdünnt mit 9 µl Wasser und 10 µl Probepuffer 2-fach gemischt und erhitzt. Nach Abkühlen wurden 10 µl jeder Probe in eine Tasche eines SDS-PAGE-Gels gefüllt (siehe Kapitel 2.4.5). 6 µl des Protein Markers III (6,5 - 200 kDa) diente als Größenreferenz.

Das Gel wurde bei 75 V 45 min laufen gelassen. Nachdem die Lauffront durch das Sammelgel hindurch war, wurde die Spannung für 60 min auf 150 V erhöht. Das Färben des Gels erfolgte mit 20 ml InstantBlue™ unter leichtem Schwenken für 1 h. Entfärbt wurde mit Wasser ebenfalls unter Schwenken für 1 h. Bilder wurden mit dem FusionSL Vilber Lourmat und dem Program VisionCapt erhalten.

2.5 Der gekoppelte Enzymassay zur Aktivitätsmessung von EDD

Der gekoppelte Enzymassay zur Aktivitätsbestimmung von EDD macht sich dessen natürliches Kopplungsenzym, die Entner-Doudoroff-Aldolase (EDA), und die Lactat-Dehydrogenase (LDH) zu nutze. Zunächst wird das durch EDD aus 6-Phosphogluconat hergestellte 2-Keto-3-desoxy-6-phosphogluconat durch die EDA aus *E. coli* zu Glycerinaldehyd-3-phosphat und Pyruvat umgesetzt. Das Pyruvat wird anschließend durch LDH aus dem Kaninchenmuskel zu Lactat umgesetzt. Der letzte Reaktionsschritt benötigt zudem das Coenzym NADH. Dieses wird bei der Lactatbildung zu NAD^+ umgesetzt und führt so zur Abnahme der Absorption bei 340 nm. Über die Detektion dieses kann die Reaktion somit spektroskopisch verfolgt werden. Eine grafische Darstellung des Reaktionsweges ist Abbildung 6 zu entnehmen.

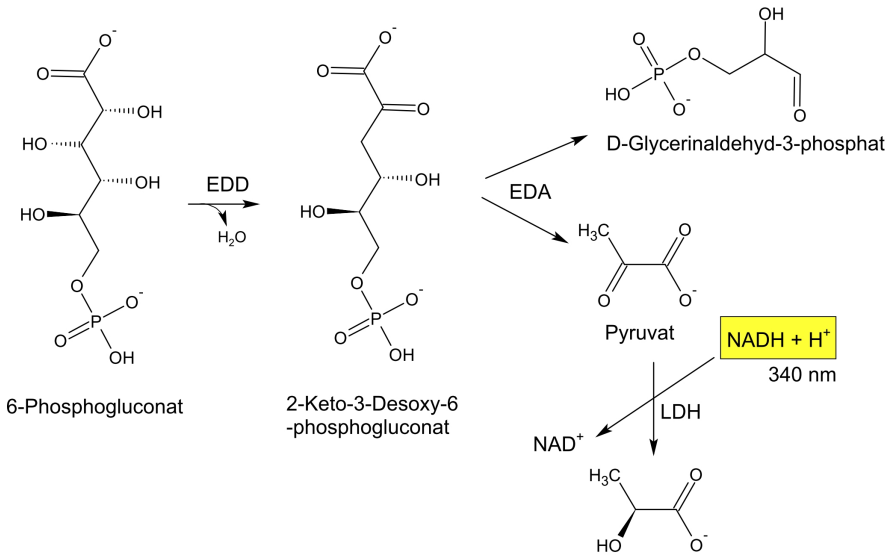


Abbildung 6: Die Reaktionen des gekoppelten Enzymassays

Um den Fehler, welcher bei gekoppelten Aktivitätsmessungen durch die Kopplungsenzyme entsteht, möglichst gering zu halten, wurde ein Überschuss an 6-Phosphogluconat zugegeben. Dies verlagert das Reaktionsgleichgewicht auf die Produktseite. Des Weiteren wurden verschiedene Konzentrationen der Kopplungsenzyme getestet, bis ein Maximum der Aktivität erreicht wurde. Die Konzentration an NADH orientiert sich an einer optimalen Absorption von ca. 1,2 zu Beginn der Messung.

Ein typischer Ansatz enthielt:

10 µl EDA (400 U/ml)
6 µl LDH (494 U/ml)
12 µl NADH (10 mM)
125 µl Puffer Tris/HCl (pH 7,5; 200 mM)
12,5 µl 6-Phosphogluconat (Substrat; 40 mM)
1 µl EDD (variable Konzentration)
ad 500 µl Wasser

Bei den Experimenten wurde bei 340 nm (ϵ_{340} = 6,22*10^3 L/(mol*cm)) die Abnahme der Absorption verfolgt. Eine Messung erfolgte über 4 oder 5 min mit einem Datenintervall von 1,1 s und einer Integrationszeit von 1 s. Es wurde ein Genesys Spektrometer mit der Software VisionLite für alle Experimente im Anaeroben verwendet. Die Sauerstoffstabilität wurde an einem Shimadzu UV-1900 Spektrometer mit der Software LabSolution im Aeroben bestimmt. Die Lösungen wurden entweder durch Durchblubbern mit einem anaeroben Gasgemisch, durch sonizieren anaerobisiert oder direkt mit anaerobem Wasser hergestellt.

2.5.1 Variationen des gekoppelten Enzymassays

Für einige Experimente wurden einzelne Parameter des gekoppelten Aktivitätsassays variiert. Für die Variation des pH-Wertes wurden beispielsweise die in Tabelle 8 notierten Good-Puffer in einer Endkonzentration von 50 mM verwendet. Auch wurden die Experimente für pH 6,5, 7,0, 7,5, 8,0 und 8,5 mit Tris-Puffer durchgeführt, um für diesen Bereich einen Effekt des Puffersystems auszuschließen.

Tabelle 8: Verwendete Good-Puffer zur Variation des pH-Werts

pH-Wert	Puffer
5	MES
5,5	MES
6	MES
7	HEPES
7,5	HEPES
8	HEPES
9	TAPS
9,5	CAPS

Für die Untersuchungen im Aeroben wurde das Enzym mehrfach mit Raumluft durchblubbert. Dies wurde als Startpunkt der zeitabhängigen Inaktivierung der Enzyme verwendet.

2.5.2 Michaelis-Menten-Experimente

Michaelis-Menten-Experimente ermöglichen sowohl die Bestimmung der maximalen Geschwindigkeit (v_{max}) einer von einem Enzym katalysierten Reaktion, als auch der Michaelis-Menten-Konstante (K_M). Dieser Wert beschreibt die Affinität des Enzyms zu seinem Substrat und entspricht der Substratkonzentration, bei welcher die Hälfte der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit erreicht wird. Für diese Bestimmung ist es notwendig, die Reaktionsgeschwindigkeit bei verschiedenen Substratkonzentrationen zu bestimmen.

Ein Ansatz setzt sich wie in Kapitel 2.5 beschrieben zusammen. Auch die Messparameter wurden analog verwendet. Es wurden 7 verschiedene Substratkonzentrationen verwendet. Ausgehend von einer 40 mM Stammlösung wurden 12,5 µl, 7,5 µl, 5 µl, 2,5 µl, 1,25 µl, 10 µl (1:10) und 7,5 µl (1:10) pro 500 µl eingesetzt.

Für die Auswertung wurde die Ableitung des ersten linearen Bereichs der Absorptionsänderung verwendet. Dies verhindert das Miteinbeziehen einer eventuellen *lag-time*. Jeder Versuch wurde dreifach durchgeführt. Ausgewertet wurde mit einem nicht-linearen

Plot auf Basis der Michaelis-Menten-Formel in Form einer Hyperbel im Kalkulationsprogram Origin, sowie mit einem Lineweaver-Burk-Plot.

2.5.3 Der abgestoppte Enzymassay

Der abgestoppte Enzymassay orientiert sich ebenfalls an der Umsetzung des Produktes durch Kopplungsenzyme. Hierbei wird jedoch zunächst in einer bestimmten Zeit die Reaktion durch EDD durchgeführt, dann die EDD inaktiviert und anschließend die Folgereaktionen durch EDA und LDH zeitunabhängig durchgeführt. Dies macht die Datenerhebung unabhängig von evtl. Inhibitionen durch die Kopplungsenzyme. Gleichzeitig können die Ergebnisse durch unterschiedliche Katalysegeschwindigkeiten der EDD, vor allem direkt nach der Zugabe und damit zusammenhängender Konzentrationsänderung, in Abhängigkeit der Multimerbildung des Enzyms nicht erkannt werden. Dies wird auch in Kapitel 3.3.5 diskutiert. Des Weiteren ist ein sehr exaktes Zeitmanagement nötig. Aus diesen Gründen wurde diese Methode zur Validierung der Michaelis-Menten-Experimente eingesetzt, aber auch, um die Aktivität bei hohen Temperaturen zu überprüfen, bei denen die Kopplungsenzyme möglicherweise inaktiv sind.

Der Ablauf dieses Assays ist in Tabelle 9 dargestellt. Die Enzymkonzentration wurde für jeden Assay so gewählt, dass eine deutlich sichtbare Abnahme der Absorption über 2 bis 3 Minuten zu beobachten war. Inkubiert wurde im 3. Schritt 30 s bis 60 s für die Michaelis-Menten-Bestimmung. Im Fall der Temperaturstabilitäsuntersuchungen wurde 45 s inkubiert. Des Weiteren wurde für die Untersuchung der Aktivität als Funktion der Temperatur die Lösung mit Puffer und Substrat vortemperiert und während der Reaktion mit EDD auf der jeweiligen Temperatur konstant gehalten.

Tabelle 9: Der Ablauf des abgestoppten gekoppelten Enzymassays

Schritt	Durchführung
1.	100 µl Puffer und eine definierte Konzentration Substrat vorlegen
2.	1 µl EDD zugeben (ca. 1 mg/ml)
3.	Inkubieren
4.	100 µl HCl (1 M) zugeben
5.	Inkubieren für 60 s
6.	100 µl NaOH (1 M) zugeben
7.	alle anderen Komponenten zugeben, außer LDH (siehe Kapitel 2.5)
8.	Messen der Absorption bei 340 nm
9.	6 µl LDH zugeben (494 U/ml)
10.	Inkubieren für 10 min
11.	Messen der Absorption bei 340 nm

Die so erhaltene Differenz wurde unter Beachtung der Inkubationszeit mit EDD für die Berechnung der Michaelis-Menten-Konstante verwendet. Alternativ wurde die Aktivität berechnet und gegen die Inkubationstemperatur aufgetragen, um das Temperaturoptimum zu finden.

2.6 Mutagenese

Punktmutationen im Gen für die EDD aus *Thermomonospora curvata* wurden durchgeführt, um gezielt Aminosäuren durch Alanin zu ersetzen und so deren Wichtigkeit für die Aktivität des Enzyms zu bestimmen. Auf diese Weise lassen sich beispielsweise die clusterkoordinierenden Aminosäuren bestimmen als auch katalytische Basen im aktiven Zentrum. Des Weiteren wurden durch Punktmutationen von Cystein zu Alanin mögliche intermolekulare Disulfidbrückenbindungen als Teil der Aufreinigungsoptimierung unterbunden. Es wurden die in Abbildung 40 dargestellten Mutationen durchgeführt. In gelb hinterlegt sind hierbei Aminosäuren zur Bestimmung der Clusterliganden, in blau solche zur Detektion der katalytischen Base.

2.6.1 Durchführung der Mutagenese

Für jede Mutagenese wurden passende Primerpaare bei Metabion bestellt. Eine Auflistung ist Anhang 7.7 zu entnehmen. Die Primer wurden in sterilem Wasser gelöst und auf eine Konzentration von 10 µM verdünnt. Als Template wurde EDD in pET28a TSTS verwendet in einer Konzentration von etwa 10 ng/µl. Für die Ansätze ergab sich folgende Zusammensetzung, wobei ein Ansatz für den Forwardprimer und einer für den Reverseprimer war:

10 µl PufferHF 5-fach
3 µl Template (10 ng/µl)
2,5 µl Primer (10 µM)
1 µl dNTP-Mix
0,5 µl Phusion Polymerase
33 µl Wasser

Für die Mutagenese wurde zunächst jeder Ansatz einzeln einer PCR unterzogen (siehe Tabelle 10). Anschließend wurden je 25 µl beider Ansätze miteinander vermischt, weitere 0,5 µl Phusion Polymerase zugegeben und eine weitere PCR (siehe Tabelle 11) durchgeführt.

Tabelle 10: Ablauf der PCR des 1. Schrittes der Mutagenese

Schritt	Wiederholungen	Temperatur	Dauer
1. Initiale Denaturierung	1	98 °C	30 s
2. Denaturierung	8	98 °C	15 s
2. Primerhybridisierung (Annealing)		55 °C - 60 °C	30 s
2. Elongation		72 °C	3 min 30 s
3. Lagerung	1	4 °C oder 12 °C	max. 16 h

Um die Template-DNA ohne Mutation zu eliminieren wurde 1 h bei 37 °C mit 1 µl DpnI verdaut. Dieses Restriktionsenzym schneidet selektiv methylierte DNA, also Plasmid-DNA des nicht mutierten Templates, welches in *E. coli* an GATC Stellen methyliert

Tabelle 11: Ablauf der PCR des 2. Schrittes der Mutagenese

Schritt	Wieder-holungen	Temperatur	Dauer
1. Initiale Denaturierung	1	98 °C	30 s
2. Denaturierung	18	98 °C	15 s
2. Primerhybridisierung (Annealing)		55 °C - 60 °C	30 s
2. Elongation		72 °C	3 min 30 s
3. Finale Elongation	1	72 °C	10 min
4. Lagerung	1	4 °C oder 12 °C	max. 16 h

wurde. Aufgereinigt wurde mit dem Kit NucleoSpin® PCR-Clean up von Machery Nagel. Das Eluat wurde in NEB10 Zellen transformiert und über Minipräparation und Sequenzierungen analysiert (siehe auch Kapitel 2.3.8 und 2.3.5).

2.6.2 Zellextraktaktivitätsmessung

Zellextraktaktivitätsmessungen dienen dazu, ohne langwierige Aufreinigung einen Überblick über die Aktivität verschiedener Mutanten zu erhalten. Hierdurch lässt sich abschätzen, welche Mutation zum Verlust einer für die Aktivität essentiellen Aminosäure geführt hat. Auch kann auf diese Weise, falls eine Mutation zu einer sehr labilen EDD führt, die Aktivität dieser detektiert werden. Die positiven Ergebnisse dieser Aktivitätsmessung wurden dann durch Aufreinigungen und anschließende Aktivitätsmessungen verifiziert.

Die Vorkultur für die Zellextraktsaktivitätsmessung setzt sich aus 8 ml LB-Medium, passenden Antibiotika sowie 1 - 2 Kolonien einer entsprechenden Transformation zusammen. Sie wurde über Nacht bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Eine Hauptkultur von 100 ml LB-Medium, passenden Antibiotika, 100 mg/l Kultur Ammoniumeisen(III)citrat, 176 mg/l Kultur L-Cysteinhydrochlorid monohydrat wurde mit 4 ml der Vorkultur inokuliert. Sie wurde bei 200 rpm und 37 °C bis zu einem OD von 0,3 bis 0,6 inkubiert. Durch die Zugabe von IPTG (0,01 mM) wurde die Proteinexpression induziert, anschließend die Temperatur auf 30 °C herunter reguliert und über Nacht inkubiert.

Für die Ernte wurde die Zellsuspension bei 4000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5810 R) und 4 °C für 15 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Da EDD sauerstoffempfindlich ist, wurden die Zellen, nach der Bestimmung des Zellpelletgewichts und dessen Einstellung auf 0,5 g, ins anaerobe Zelt eingeschleust. Durch Resuspendieren in Puffer-W-mit, pH 8 (anaerob) wurde der Sauerstoffgehalt in der Zellsuspension deutlich verringert. Anschließend wurde bei 4 °C und 7000*g für 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zur Lagerung wurde das Falcon des Zellpellet mit Parafilm abgedichtet und bei -20 °C weggefroren.

Der Aufschluss erfolgte im anaeroben Zelt durch Sonizieren in Pillengläsern auf Eis. Hierzu wurde das Pellet auf Eis in anaerober Umgebung getaut und in 15 ml Puffer-W-mit, pH 8 resuspendiert. Durch Zentrifugieren bei 4 °C und 7000*g für 10 min konnte der Überstand verworfen werden. Es wurde erneut in 5 ml Puffer-W-mit, pH 8 resuspendiert. Zur Proteaseinhibition und Vereinzelung der Zellen wurde eine halbe Spatelspitze PMSF und eine halbe Spatelspitze Lysozym in 2 ml Puffer-W-mit, pH 8 zugegeben und für

10 min auf Eis inkubiert. Nach der Zugabe von einer halben Spatelspitze DNase wurde durch Invertieren gemischt und die Suspension in das Soniziergefäß überführt. Sonifiziert wurde für 10 min bei einer Power von 45 % für je 30 s mit anschließenden 30 s Pause. Vor dem Zentrifugieren wurde das Gesamtvolumen auf 9 ml eingestellt. Zentrifugiert wurde bei 4 °C und 7000*g für 40 min, um die Zellreste zu pelletieren und vom löslichen Protein zu trennen.

Die Einstellungen am Spektrometer wurden analog den in Kapitel 2.5 beschriebenen gewählt. Die Proben setzten sich wie folgt zusammen:

10 µl	EDA (400 U/ml)
10 µl	LDH (494 U/ml)
20 µl	NADH (10 mM)
250 µl	Puffer Tris/HCl (pH 7,5; 200 mM)
25 µl	6-Phosphogluconat (Substrat; 40 mM)
10 - 100 µl	Überstand (variable Konzentration)
ad 1 ml	Wasser

Für jede Mutante wurden 3 Kulturen getestet, jede Kultur wurde 3 Mal in verschiedenen Konzentrationen vermessen. Der verbliebene Zellextrakt wurde bei -20 °C gelagert und die Proteinkonzentration im Zellextrakt über einen Micro-Biuret-Assay bestimmt (siehe Kapitel 2.4.2).

Für die Etablierung des Tests wurde sicher gestellt, dass durch die *E. coli* eigene EDD keine Verzerrung der Ergebnisse herbei geführt wird, indem die Aktivität von Kulturen ohne zusätzliches bzw. mit Leerplasmid gemessen wurde. Als Positivkontrolle dienten Kulturen, welche ein für Wildtyp-EDD codierendes Plasmid enthielten.

2.7 Synthese von 6-Phosphogluconat

6-Phosphogluconat ist als Substrat für das Enzyme EDD eine Schlüsselchemikalie für Experimente an diesem. Nicht nur für Aktivitätsmessungen ist es essentiell, auch für zahlreiche Spektroskopiemethoden ist vor allem isotopengelabeltes Substrat von großer Bedeutung für die Aufklärung der Substratbindung im aktiven Zentrum und des Reaktionsmechanismus. Aus diesem Grund wurde bereits im Rahmen meiner Diplomarbeit ein Syntheseweg für 6-Phosphogluconat etabliert (164). Dieser Weg ist im Anschluss von Florian Belitz in seiner Masterarbeit optimiert worden (28).

Der Syntheseweg bedient sich im ersten Schritt einer enzymatischen Phosphorylierung die durch eine unspezifische saure Phosphatase aus *Shigella flexneri* (PhoN-Sf) unter der Anwesenheit von Dinatriumpyrophosphat durchgeführt wird (186) (182). Aus D-Glucose bzw. der entsprechend markierten D-Glucose entsteht selektiv D-Glucose-6-phosphat.

Im zweiten Schritt der Synthese wird eine Oxidation mit Brom durchgeführt, welche Glucose-6-phosphat durch Oxidation der Aldehyd-Gruppe zu 6-Phosphogluconat umsetzt (169) (139). Dieser chemische Syntheseschritt umgeht eine weitere enzymatische Umsetzung durch beispielsweise Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase. Hierzu wäre das schwierig zu regenerierende Coenzym $NADP^+$ nötig.

Ein dritter Schritt ist erforderlich, um das schwerlösliche Bariumsalz des Produktes, welches bei der Aufreinigung entsteht, in ein leicht lösliches Trinatriumsalz zu überführen.

Ein Überblick über die Reaktionsabfolge kann Abbildung 7 entnommen werden.

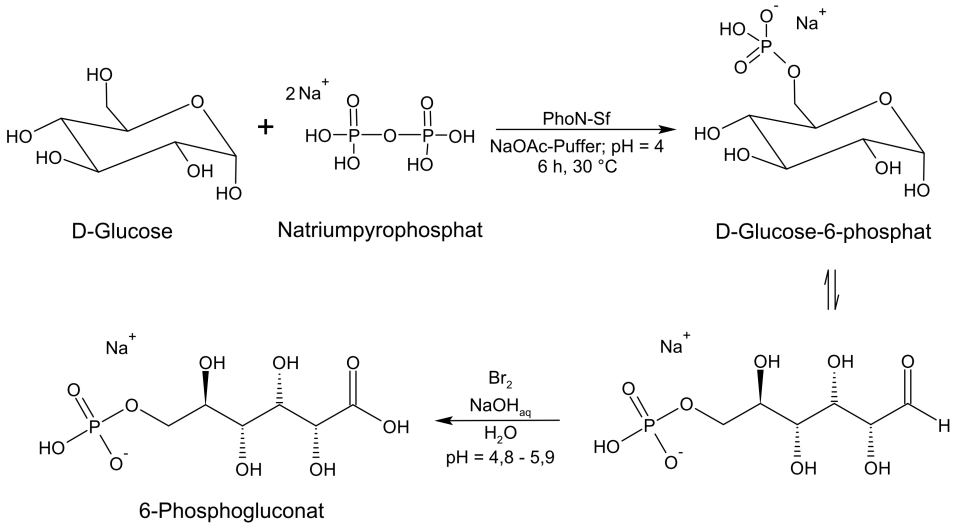


Abbildung 7: Der Reaktionsweg für die Synthese des Substrats 6-Phosphogluconat

2.7.1 Synthese von D-Glucose-6-phosphat Bariumsalz

Im Folgenden wird ein einfacher Ansatz beschrieben, welcher für die Synthese von gelabeltem Substrat verwendet wurde. Für ungelabeltes 6-Phosphogluconat wurde zumeist der 4-fache Ansatz der im Folgenden beschriebenen Synthese gewählt.

In 8,65 ml Natriumacetatpuffer (100 mM, pH 4) wurden 156 mg Glucose (867 µmol) und 193 mg Dinatriumpyrophosphat (870 µmol) gelöst. Nach Zugabe von 50 µl PhoN-Sf (235 µg, 8,70 nmol) wurde die Reaktionsmischung für 3 h bei 27 - 33 °C gerührt und weitere 290 mg Dinatriumpyrophosphat (1,31 mmol) in 1 ml Natriumacetatpuffer zugegeben. Es wurde für weitere 3 h bei 27 - 33 °C gerührt und anschließend durch die langsame Zugabe von NaOH (4 M) ein pH-Wert von 9,8 eingestellt. In 2 ml Wasser gelöstes Bariumacetat (1311 mg; 5,13 mmol) wurden zur Fällung des Produktes zugegeben. Nach Zentrifugation bei 4 °C und 4000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5810 R) für 10 min, wurde das Pellet vom Überstand getrennt und zu letzterem kaltes Ethanol bis zu einer Endkonzentration von 75 % zugegeben. Der entstandene Niederschlag wurde bei 4 °C und 4000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5810 R) für 10 min pelletiert und nach dem Verwerfen des Überstandes mit 20 ml Ethanol (75 %) gewaschen. Die Suspension wurde erneut bei 4 °C, 4000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5810 R) für 10 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet im Vakuum getrocknet. Es wurde ein weißer Feststoff erhalten, welcher im Kühlschrank bei 4 °C gelagert wurde.

2.7.2 Synthese von 6-Phosphogluconat Bariumsalz

In 1 ml HCl (3 M) wurden 179 mg Glucose-6-phosphat Bariumsalz (451 µmol) gelöst. Nach der Zugabe von 64 mg Natriumsulfat (451 µmol) in 1 ml Wasser wurde der Niederschlag 5 min bei Raumtemperatur bei 13000 rpm (VWR MicroStar 17) abzentrifugiert.

Der Überstand wurde in einen Rundkolben überführt und durch die Zugabe von Natriumhydroxid (4 M) ein pH-Wert von 5,4 eingestellt. Brom (60 µl, 1,17 mmol) wurden auf einmal zugegeben und der pH-Wert über 20 min durch die Zugabe von Natriumhydroxid konstant zwischen 4,8 und 5,9 gehalten. Das Ende der Reaktion zeigte sich in einer pH-Wert-Konstanz. Überschüssiges Brom wurde durch ein durchblubbern des Reaktionsansatzes mit Stickstoff und anschließender Einleitung des Gases in eine gesättigte Natriumthiosulfatlösung für 60 min eliminiert. Nachdem ein basischer pH-Wert durch die Zugabe von 5 ml einer gesättigten Bariumhydroxidlösung eingestellt wurde, wurden 5 ml kaltes Ethanol zugegeben und die Suspension bei 4 °C und 4000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5810 R) für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 25 ml Ethanol (20 %) gewaschen. Zentrifugiert wurde bei 4 °C und 4000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5810 R) für 5 min. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Pellet in Diethylether gewaschen. Nachdem dieses abdekantiert wurde, wurde das Pellet im Vakuum getrocknet. Es wurde ein weißer Feststoff erhalten, welcher im Kühlschrank bei 4 °C gelagert wurde.

2.7.3 Synthese von 6-Phosphogluconat Trinatriumsalz

In 1 ml HCl (3 M) wurden 157 mg 6-Phosphogluconat Bariumsalz (328 µmol) gelöst und 71 mg Natriumsulfat (500 µmol) in 1 ml Wasser zugegeben. Der Niederschlag wurde bei Raumtemperatur und 13000 rpm (VWR MicroStar 17) für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde in einem neuen Reaktionsgefäß durch die Zugabe von 1 ml Natriumhydroxid (4 M) stark basisch gemacht. Methanol (9 ml, 3 Volumen der Lösung) wurden zugegeben und es wurde bei 4 °C und 13000 rpm (VWR MicroStar 17) 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit Diethylether gewaschen. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Pellet unter Vakuum getrocknet. Es wurde ein weißer, teils schwach orangefarbener Niederschlag erhalten, welcher im Kühlschrank bei 4 °C gelagert wurde.

2.7.4 Charakterisierung der Produkte durch NMR-Spektroskopie

Um die Reinheit der Syntheseprodukte zu bestimmen wurden ^{1}H-NMR und ^{13}C-NMR-Spektren aufgenommen. Dies wurde in D_2O an einem Bruker Avance 400 Spektrometer durchgeführt. Die Messung des 400 MHz-Spektrums erfolgte bei Raumtemperatur im Bereich von 0 bis 12 ppm. Die Scanzahl wurde für jedes Spektrum individuell zwischen 16 und 512 Scans angepasst. Als Referenz wurde 50 mM Natrium-3(trimethylsilyl)propionat-[D4] zugegeben.

2.7.5 Bestimmung der Reinheit des 6-Phosphogluconats über den gekoppelten Enzymassay

Da die Umsetzung von 6-Phosphogluconat durch EDD, vor allem durch die Gleichgewichtsverschiebung im gekoppelten Enzymassay, quantitativ abläuft, wurde die Reinheit der Syntheseprodukte auch über die Enzymreaktion bestimmt. Hierzu wurde folgender Ansatz verwendet:

10 µl EDA (400 U/ml)
3 µl EDD (0,27 mM)
1 µl NADH (100 mM)
125 µl Puffer Tris/HCl (pH 7,5; 200 mM)
12,5 µl 6-Phosphogluconat (Substrat; 4 mM)
ad 500 µl Wasser
10 µl LDH (494 U/ml)

Das Experiment erfolgte in anaerober Umgebung mit einem Genesys Spektrometer bei 340 nm mit einem Datenintervall von 1,1 s, einer Messzeit von 5 min und einer Integrationszeit von 1 s. Als Blank dient die Wasser-Puffer-Mischung. Die Messung wurde vor der Zugabe von LDH gestartet, um einen Startwert zu bestimmen. Nach 1 min wurde LDH zugegeben und 4 min weiter gemessen, um sicherzustellen, dass das 6-Phosphogluconat vollständig umgesetzt wurde.

Für die Berechnung wurde die Absorptionsdifferenz zwischen Startwert und Endwert bestimmt und über das Lambert-Beersche-Gesetz (3) die tatsächliche Konzentration an 6-Phosphogluconat bestimmt.

$$\frac{\Delta Abs}{6200\ l/(mol * cm) * 1000} = c(\text{6-}Phosphogluconat)(mmol/l) \tag{3}$$

2.8 Mößbauerspektroskopie

Die Mößbauerspektroskopie basiert auf der rückstoßfreien Absorption und Emission von γ-Strahlen. Hierzu ist eine geeignete radioaktive Quelle notwendig, was zur Folge hat, dass nur bestimmt Kerne mit der Mößbauerspektroskopie untersucht werden können. Im Fall der Eisen-Schwefel-Cluster ist dies das ^{57}Fe-Isotop, welches nur zu 2,12 % natürlich vorkommt. Das bei Weitem häufigste Isotop ist ^{56}Fe mit 92 %. Dies erfordert einen expliziten Einbau des mößbaueraktiven Isotops, um eine Probe vermessen zu können. Es ermöglicht gleichzeitig aber auch das gezielte Labeln nur eines Fe-Ions des Clusters.

2.8.1 Herstellung einer ^{57}Fe-Ammoniumeisencitratlösung

In ein kleines Pillenglas werden 33,5 mg ^{57}Fe eingewogen. Nach der Zugabe von 1 ml HCl (8 M), wird über Nacht bei Raumtemperatur mit Parafilm verschlossen gerührt. Um das Entweichen des entstehenden H_2 zu ermöglichen, wurde ein kleines Loch in den Parafilm gestochen. Es entstand eine hellgelbe Lösung, zu welcher 4 ml Wasser gegeben wurde. Nach der Zugabe von 200 mg Trinatriumcitrat-dihydrat wurde mit Ammoniak (12,5 %-ig) ein pH-Wert zwischen 5 und 6 eingestellt. Hierbei gilt es zu verhindern, die Lösung überzutitrieren, was durch eine braune Färbung zu erkennen wäre.

Die tatsächliche Eisenkonzentration der Probe wurde analog zu der in Kapitel 2.4.3 beschriebenen Methode bestimmt. Die Lösung wurde bei -20 °C im Gefrierschrank gelagert.

2.8.2 Herstellung von Mößbauerproben

Um ^{57}Fe in den [Fe-S]-Cluster einzubauen, gibt es zwei Möglichkeiten. Zum einen kann das Isotop dem Zellmedium zugesetzt werden, sodass dies bei der Proteinsynthese direkt eingebaut wird. Zum anderen kann der Cluster nachträglich in die Proteine eingebaut werden, also rekonstituiert werden, wozu dann das Isotop vewendet werden würde. Für die zweite Methode spricht klar, dass sie wesentlich weniger des kostenintensiven ^{57}Fe benötigt, allerdings kann bei einer Rekonstitution nicht garantiert werden, dass der erhaltene Cluster tatsächlich dem in der Natur vorkommenden entspricht, sodass hier mit den wenigen in den folgenden Kapiteln beschriebenen Ausnahmen die erste Methode angewandt wurde.

Für die Zellkulturen wurde im Allgemeinen wie im Kapitel 2.3.9 verfahren. Der wesentliche Unterschied liegt darin, dass die zugegebene Eisenquelle durch die in Kapitel 2.8.1 hergestellte Lösung ersetzt wurde. Hiervon wurde eine Konzentration von 50 µM bei der Induktion mit IPTG eingesetzt. Auch der Aufschluss der Zellen erfolgt wie in Kapitel 2.3.11 beschrieben. Nach der Aufkonzentration auf maximal 400 µl wird die Proteinlösung in ein Mößbauerprobentöpfchen gefüllt. Dieses wird in flüssigem Stickstoff gefroren und anschließend in diesem gelagert.

2.8.3 Aufnahme von Mößbauerspektren

Die Mößbauerspektren wurden in der AG Schünemann von Dr. Christina Müller aufgenommen. Hierfür wurde in der Regel das Stickstoffffluss-Kryostat Optistat^{DN} bei 77 K verwendet. Für Untersuchungen im externen Magnetfeld wurde die Temperatur auf 4,2 K reduziert. Hierzu wurde ein Helium closed-cycle Kryostat von CRYO Industries of America Inc. und ein parallel zu den Gammastrahlen ausgerichtetes Magnetfeld verwendet. Alle Mößbauerparameter wurden relativ zum Signal einer α-Eisen Folie bei Raumtemperatur erhalten. Zur Detektion wurde ein Proportionalzählrohr verwendet, ein Vielkanalanalysator (WissEl GmbH) mit 512 Kanälen zählt die Signale.

2.8.4 Selektives Entfernen eines Fe-Ions des [4Fe-4S]-Clusters

Für das selektive Entfernen eines Fe-Ions aus dem Cluster wurden zunächst über ESR-Spektroskopie verschiedene Methoden getestet. Dies waren die Exposition an Sauerstoff (98), die Oxidation mit Kaliumhexacyanoferrat(III) (26) und die Inkubation mit Natriumdithionit im Hochsalz (100).

Für die Oxidation mit Sauerstoff wurde je 100 µl EDD (0,22 mM) mit Raumluft durchblubbert und anschließend für 3 h 20 min, 7 h und 24 h 30 min bei Raumtemperatur verschlossen inkubiert. Jede Probe wurde auf 300 µl mit Puffer-W-mit, pH 8 verdünnt.

Für die Oxidation mit Kaliumhexacyanoferrat(III) wurde je 100 µl EDD (0,24 mM) mit 1 µl bzw. 3 µl Kaliumhexacyanoferratlösung (25 mM in Puffer-W-mit, pH 8) im Anaeroben vermischt. Dies entspricht einer stöchiometrischen Zugabe sowie einer 3-fach Stöchiometrischen. Die Lösung wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert und anschließend mit Puffer-W-mit, pH 8 auf 300 µl aufgefüllt.

Die Inkubation mit Natriumdithionit erfolgte in 1 M Natriumchloridlösung (anaerob). Zu 150 µl EDD (0,16 mM) wurden 6 µl bzw. 12 µl Natriumdithionit (100 mM in 20 mM Pufffer-W-mit, pH 8) gegeben und für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur im Anaeroben inkubiert. Die Lösung wurde mit einer PD10-Säule, welche zuvor mit 30 ml

Puffer-W-mit, pH 8 equilibriert wurde, entsalzt, aufkonzentriert auf 300 µl und mit Kaliumhexacyanoferrat(III) (6 µl einer 100 mM Lösung) für 2 min oxidiert.

Alle Proben wurden in ESR-Röhrchen in flüssigem Stickstoff eingefroren und gelagert.

Nach der Auswertung der Ergebnisse (siehe Kapitel 3.8.1) wurde für alle weiteren Experimente die Oxidation mit der 3-fach stöchiometrischen Menge Kaliumhexacyanoferrat(III) verwendet.

2.8.5 Selektiver Einbau eines Fe-Ions in einen [3Fe-4S]-Cluster

Für den selektiven ^{57}Fe-Einbau in die EDD wurde die mit Kaliumhexacyanoferrat behandelte Lösung im Anaeroben über eine PD10-Säule entsalzt. Hierzu diente Puffer-W-mit, pH 8. Das Eluat wurde auf 300 µl aufkonzentriert, eine Probe zur Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Micro-Biuret genommen und DTT (15 mM Endkonzentration) zugegeben. Nach einer Inkubation von 30 min wurde ^{57}Fe-Ammoniumeisencitratlösung (siehe Kapitel 2.8.1) zugegeben. Die Eisenkonzentration variierte von 0,5-fach bis 10-fach der EDD-Konzentration je nach Experiment. Es wurde eine weitere Stunde inkubiert bevor die Probe in flüssigem Stickstoff in Mößbauerproben-gefäßen weggefroren wurde. Abhängig vom jeweiligen Experiment wurden in der letzten Stunde und teilweise darüber hinaus Aktivitätsmessungen (Kapitel 2.5) durchgeführt, welche den Einbau des Eisenions verfolgt haben.

Des Weiteren wurden für Tests der Optimierung des Eiseneinbaus die Konzentration und Inkubationszeit von DTT und den Eisenionen variiert. Auch hier wurde die Effizienz des Einbaus über Aktivitätsmessungen verfolgt, es wurden aber keine Mößbauerproben gemacht.

2.9 Kristallisieren

Das Kristallisieren mit anschließender Röntgenstrukturanalyse dient der Aufklärung der 3D-Struktur von Proteinen. Hierzu ist es erforderlich, die Proteine in stabiler, einheitlicher Form zu isolieren. So sollten in der Lösung beispielsweise keine Dimere neben Monomeren vorliegen, da dies es unwahrscheinlich macht, dass ein einheitlicher Kristall entsteht. Aus diesem Grund wurde, wie im Folgenden beschrieben, zum einen die Aufreinigung durch Größenausschlusschromatographie für die EDD optimiert und zum anderen Methoden getestet, welche, durch TEV-Protein-Behandlung, den Twin-Strep-*Tag* der Proteinaufreinigung von EDD entfernen.

2.9.1 Aufreinigung durch Größenausschlusschromatographie

Für die Größenausschlusschromatographie wurde eine Äkta Start in Kombination mit einer HiPrep^{TM}26/60 Sephacryl® S-200 HR verwendet. Diese Säule erlaubt eine Auftrennung in Abhängigkeit der Größe von Proteinen im Bereich von 5 bis zu 250 kDa. Hierfür ist es zunächst notwendig, die Säule durch das Auftragen von Proteinen bekannter Größe zu eichen (siehe Tabelle 12).

Für das Aufreinigen der EDD, sowie für das Kalibrieren wurde im Allgemeinen das in Tabelle 13 dargestellte Protokoll verwendet. Ab einer Absorptionsänderung von 0,1 mAU wurde das Eluat in Fraktionen von 2 ml gesammelt und neben der Absorption bei 280 nm auch die Absorption bei 410 nm (für Fe-S-Cluster) gemessen. Der Versuch wurde im

Tabelle 12: Proteine und ihre Größe für das Eichen der Säule der Größenausschlusschromatographie

Protein	Größe in kDa
Cytochrom *c*	13
BSA Monomer	66
BSA Dimer	132
Carboanhydrase Monomer	29
Carboanhydrase Dimer	58

Anaeroben mit entgasten Puffern durchgeführt. Eine Kühlung unter Raumtemperatur erfolgte nicht, da das Protein, wie durch vorherige Experimente nachgewiesen, stabil ist.

Tabelle 13: Ablauf der Größenausschlusschromatographie (CV: Säulenvolumen)

Schritt	Volumen	Flussrate (ml/min)	Lösung
Equilibrieren	1 CV	1	Puffer-W-mit
Auftragen	5 ml	1	EDD-Lösung dann Puffer-W-mit
Eluieren	1,5 CV	1	Puffer-W-mit

Nach der Elution wurden die Fraktionen des jeweils gleichen Peaks vereinigt und auf ca. 0,5 ml aufkonzentriert (7000 rpm; Eppendorf Centrifuge 5430 R). Zudem wurde der Protein- und Eisengehalt bestimmt (Kapitel 2.4.2, 2.4.3). In einigen Fällen wurde auch ein UV/Vis-Spektrum aufgenommen (Kapitel 2.4.1).

Je nach konkretem Versuchsaufbau wurde Puffer-W-mit durch andere Puffer ersetzt. Beispielsweise durch einen ohne Magnesiumzusatz, oder einen mit Dithiothreitol, um reduzierende Versuchsbedingungen sicherzustellen. Einen Überblick bietet Tabelle 14. Zudem wurde getestet, welche Auswirkung das Einfrieren des Proteins, sowie das schonendere Aufkonzentrieren bei 5000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5430 R) hat.

Tabelle 14: Puffervarianten für die Größenausschlusschromatographie

Puffer	Änderung im Vergleich zu Puffer-W-mit
alphaG	zusätzlich 4 µmol/ml α-Glycerophosphat (Magnesiumsalz) (10-fache EDD Konzentration)
HEPES pH 6	50 mM HEPES/NaOH pH 6 statt Tris
HEPES pH 8	50 mM HEPES/NaOH pH 8 statt Tris
Tris pH 9	20 mM Tris/HCl pH 9 statt 8
ohne Mg^{2+}	ohne $MgSO_4$
DTT	zusätzlich 1,7 mM Dithiothreitol frisch zugegeben

Für den Test auf Dimerbildung wurde das Protein aus den isolierten Peaks erneut aufgetragen, um festzustellen, ob es sich um ein Equilibrium handelt, oder ob die Abtrennung der Multimere zu Homogenität führt.

2.9.2 Nicht reduzierende SDS-PAGE

Da die Ergebnisse der Größenausschlusschromatographie auf eine Relevanz von Disulfidbrücken für die Dimerbildung hindeuteten, wurde durch eine nicht reduzierende Variation der SDS-PAGE diese Hypothese überprüft. Hierfür wurde der Probenpuffer ohne Dithiothreitol gewählt und das Protein so unter nicht reduzierenden Bedingungen inkubiert. Die generelle Durchführung einer SDS-PAGE kann Kapitel 2.4.5 entnommen werden.

2.9.3 Entfernung des Strep-Tag mit der TEV-Protease

Ein großer *Tag*, welcher zur Aufreinigung von Proteinen verwendet wird, kann die Kristallisation dieser negativ beeinträchtigen. Aus diesem Grund wurde zwischen die EDD aus *Thermomonospora curvata* und den Twin-Strep-*Tag* eine Schnittstelle für die TEV-Protease eingefügt. Diese besteht aus der Aminosäuresequenz Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-(Gly/Ser) und wird zwischen Gln und Gly/Ser geschnitten (5). Sie ermöglicht es, den *Tag* nach der Aufreinigung vom Protein zu trennen und so neben den Vorteilen einer Aufreinigung mit *Tag* auch die Vorteile eines ungetagten Proteins zu erhalten.

Für das Schneiden mittels TEV-Protease wurden zunächst verschiedene Bedingungen getestet (Tabelle 15) und der Erfolg über eine SDS-PAGE (Kapitel 2.4.5) bestimmt, bei der sowohl das abgeschnittene Fragment als auch die reduzierte Größe des Proteins zu sehen sein sollte. Variiert wurde zum einen das Puffersystem, zum anderen auch die TEV-Proteasekonzentration, welche ca. 1/100 der Proteinkonzentration betragen sollte. Wurde Puffer zugegeben, so handelte es sich um einen Glutathion-Redoxpuffer, welcher in Tabelle 7.5 beschrieben wird. In den Proben ohne Pufferzugaben war nur der Puffer der EDD vorhanden, welcher durch die Probenbereitung 1:1 verdünnt wurde. Die Endvolumina der Proben betrugen 20 µl und wurden durch die Zugabe von Wasser erreicht. Verdaut wurde jeweils über Nacht im Anaeroben bei Raumtemperatur.

Tabelle 15: TEV-Protease Ansätze

Ansatz	Puffer (µl)	Substrat (EDD) (µl)	TEV-Protease (µl)
1	je 2	10 (0,2 mg)	2,50 (2 µg)
2	je 2	10 (0,2 mg)	1,25 (1 µg)
3	-	10 (0,2 mg)	2,50 (2 µg)
4	-	10 (0,2 mg)	1,25 (1 µg)

Da die Notwendigkeit des getesteten Puffersystems nicht nachgewiesen werden konnte, wurde bei der Spaltung für die Kristallisation der 3. Ansatz verwendet. Nach dem Verdau über Nacht, wurden die beiden Proteine über eine Größenausschlusschromatographie getrennt (Kapitel 2.9.1) und die EDD aufkonzentriert.

2.9.4 Aufreinigung ohne Tag: Heparin-Säule

Heparin ist ein Polysaccharid, welches aus D-Glucosamin und D-Glucuronsäure besteht. Da die Zucker zusätzlich häufig sulfatiert sind ist das Molekül noch stärker negativ geladen (11). Aus diesem Grund binden Heparin-Säulen vor allem DNA-Bindeproteine, aber

auch andere stark positiv geladene Proteine. Die Elution erfolgt über einen Salzgradienten.

Für die Aufreinigung der EDD mittels Heparin wurde die Säule an eine ÄktaStart angeschlossen und mit 10 Säulenvolumen Puffer A equilibriert. Die Zellen wurden wie gewohnt über einen Sonicator im Anaeroben aufgeschlossen und zentrifugiert (Kapitel 2.3.11). Der Überstand wurde vor dem Auftragen auf die Säule filtriert (0,45 µm Porengröße). Das Protokoll ist Tabelle 16 zu entnehmen.

Tabelle 16: Aufreinigung mit Heparin-Säule

Volumen	Lösung	Flussrate (ml/min)
37 ml	Überstand	1
15 CV	Puffer A	3
10 CV	Gradient zu 100 % Puffer B	1
3 CV	Puffer B	1

Neben der Absorption bei 280 nm wurde die Elution bei 410 nm (Eisen-Schwefel-Cluster) überwacht. Auch wurden Proben bei verschiedenen Anteilen von Puffer B genommen, von welchen UV-Vis-Spektren aufgenommen wurden (Kapitel 2.4.1). Die Proben wurden bei -20 °C gelagert.

2.9.5 Kristallisieren der EDD

Die Kristallisationsexperimente wurden in Berlin an der Humboldt-Universität in der Arbeitsgruppe von Professor Holger Dobbek unter der Anleitung von Berta Martins durchgeführt. Für die Kristallisation ist es von Vorteil, wenn die Proteine in hoher Konzentration von beispielsweise 30 mg/ml vorliegen. Es wurde die Sitting-Drop-Methode (51) verwendet, bei der aufgrund von Konzentrationsunterschieden Wasser von einem Protein-Lösungsmittel-Tropfen in das Lösungsmittelreservoir übergeht und so die Proteinkonzentration bis zum Auskristallisieren erhöht wird. Die Experimente wurden bei 18 °C im anaeroben Zelt durchgeführt. Die anschließende Lagerung der 96-well Platten erfolgte ebenfalls bei 18 °C und im Anaeroben. Der Erfolg der Kristallisation wurde durch regelmäßige Kontrolle mittels Mikroskop bestimmt.

Durchgeführte Screens können Tabelle 7.13 entnommen werden. Für die Kristallisationsexperimente wurde EDD aus *T. curvata* mit und ohne *Tag* und *Z. mobilis*, sowie die Mutante CC53_63AA verwendet. Auch wurde das Enzym aus *T. curvata* mit seinem Substrat kokristallisiert. Im Reservoir wurde mit 80 µl Puffer gearbeitet. Die Tropfengröße der Probe varierte zwischen 1 und 1,4 µl mit einem Reservoiranteil zwischen 50 und 25 %, sodass anfängliche Proteinkonzentrationen zwischen 10 und 20 mg/ml in den Proben entstanden.

2.10 ESR-Spektroskopie

Die ESR-Spektroskopie wurde in dieser Arbeit für zahlreiche Anwendungen verwendet. So wurde beispielsweise die Clusterart nachgewiesen. Auch wurde über ESR-Experimente bestimmt, ob die Entfernung eines Eisens aus dem [4Fe-4S]-Cluster erfolgte (siehe auch Kapitel 2.8.4).

In der Regel wurde im X-Band zwischen 2800 und 3800 Gauss gemessen, da hier die Signale für Eisen-Schwefel-Cluster wie $[3Fe\text{-}4S]^{1+}$ oder $[4Fe\text{-}4S]^{1+}$ erwartet werden. Für die Detektion höherer Spinsysteme wurde der Bereich auf 200 bis 4200 Gauss ausgeweitet.

Die Messtemperatur ist von der Clusterart abhängig. $[4Fe\text{-}4S]^{1+}$- und $[3Fe\text{-}4S]^{1+}$-Cluster werden zwischen 4 und 40 K mit einer Flüssigheliumkühlung detektiert. Für $[2Fe\text{-}2S]^{1+}$-Cluster reicht meist die Kühlung durch flüssigen Stickstoff aus. Die „Modulation amplitude“ liegt bei 1,5 mT und die „Modulation frequency“ bei 100 kHz. Weitere Parameter sind für jede Messreihe spezifisch und werden an entsprechender Stelle in den Ergebnissen diskutiert.

ESR-Proben wurden in Abhängigkeit der Clusterart as-isolated, reduziert oder oxidiert hergestellt. Alle Proben wurden in anaerober Umgebung inkubiert und abgefüllt.

Für die as-isolated-Proben wurde 300 µl EDD in Puffer-W-mit in ESR-Röhrchen in flüssigem Stickstoff weggefroren.

Die oxidierten Proben von ebenfalls 300 µl wurden mit 2 mM Kaliumhexacyanoferrat(III) 2 min inkubiert, bevor sie in ESR-Röhrchen in flüssigem Stickstoff eingefroren wurden.

Reduziert wurden die Proben (300 µl) durch die Zugabe von 2 mM Natriumdithionit. Nach 2 min Inkubation wurden auch diese Proben in ESR-Röhrchen in flüssigem Stickstoff weggefroren.

Alle Proben wurden bis zur Aufnahme der Spektren in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.11 Resonanz-Raman-Spektroskopie

Die Resonanz-Raman-Spektroskopie wurde an der TU Berlin in der Arbeitsgruppe von Dr. Ingo Zebger von Charlotte Wiemann und Konstantin Laun gemessen.

Für die Proben wurde hoch konzentrierte EDD aus *Thermomonospora curvata* verwendet. Es wurden die in Tabelle 17 gelisteten Proben hergestellt. Hierzu wurde das Protein zunächst auf etwa 100 mg/ml aufkonzentriert.

Tabelle 17: Proteinproben für die Resonanz-Raman-Spektroskopie

Probe	Besonderheiten	Konzentration (mg/ml)
1	[3Fe-4S]-Cluster in H_2O	80
2	[4Fe-4S]-Cluster in H_2O	100
3	[4Fe-4S]-Cluster in D_2O	100
4	[4Fe-4S]-Cluster in $H_2{}^{18}O$	100

Für die erste Probe wurde 20 µl des Proteins mit 3,2 µl Kaliumhexacyanoferrat(III) (30 mM) vermischt und über Nacht bei 7 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde mittels SpinTrap-Säulen aufgereinigt und dabei in Phosphatpuffer (50 mM, pH 7,67) umgepuffert. Das Eluat wurde auf 15 µl aufkonzentriert und in flüssigem Stickstoff weggefroren.

Alle weiteren Proben wurden auf die folgende Weise umgepuffert. In Abhängigkeit der Probe wurde zum Teil isotopenmarkiertes Wasser gewählt. Die Proben wurde zunächst mit 180 µl Puffer (Phosphat, 50 mM, pH 7,67) auf 200 µl verdünnt und auf 20 µl aufkonzentriert. Nach der Zugabe von weiteren 60 µl Puffer wurde bis zu einem Endvolumen von 20 µl aufkonzentriert.

Auch wurde für jedes Lösungsmittel eine Substratlösung angesetzt, um diese nach dem Vermessen der Probe zu dieser zu geben. Hierzu wurde je 0,85 mg 6-Phosphogluconat in 50 µl Puffer gelöst, um eine 50 mM Lösung zu erhalten.

Die Aufnahme des Spektrums wurden an einem konfokalen Raman Spektrometer (LabRam HR-800 Jobin Yvon) mit CCD (liquid-N_2-cooled charge-coupled device) durchgeführt. Kr^+ (407 nm) oder Ar^+ (458 nm, 514 nm) Laser mit einer Leistung von 1,2 - 1,5 mW zur Anregung sowie ein Linkam Cryostage THMS600 Cryostat zur Kühlung auf 80 K wurden verwendet. Der interne Standard der Experimente war Toluol. Messungen erfolgten an Proben einer Spotgröße von 2 µl mit jeweils 30 - 33 Wiederholungen und einer Akkumulation von 180 s. Die Daten wurden mittels Bruker OPUS software 7.8 ausgewertet.

Um die Bindung des Substrats an den Cluster zu untersuchen wurde jeweils 3,4 µl EDD mit 2,4 µl 6-Phosphogluconat gemischt.

In D_2O wurde zudem eine Probe vorbereitet, bei welcher das Substrat (Endkonzentration 3 mM) zu verdünnter EDD (0,03 mM) gegeben wurde und anschließend für die Resonanz-Raman-Spektroskopie aufkonzentriert wurde. Für diese Probe wurden die Spektren bei 3 mW aufgenommen.

2.12 NMR-Spektroskopie

Als Standard wurde für alle Experimente das Signal von D_4-TMSP (5 mM) bei 0,0 ppm verwendet.

2.12.1 NMR-Spektroskopie zur Aktivitätsverfolgung von EDD

Für die Verfolgung des Umsatzes von 6-Phosphogluconat zu 2-Keto-3-desoxy-6-phosphogluconat durch EDD wurden vom 6-Phosphogluconat (20 mM) in D_2O Phosphatpuffer (50 mM, pD 7,5) auf Deuteriumoxidbasis ein ^{1}H-Spektrum aufgenommen. Nach Zugabe von 0,03 mg EDD in 1 µl Phosphatpuffer wurde sofort und etwa alle 5 min durchgehend weitere ^{1}H-Spektrum aufgenommen. Nach vollständigem Ablauf der Reaktion wurde nach 24 h ein weiteres Spektrum aufgenommen. Alle Spektren wurden mit 600 MHz und 64 Scans aufgenommen.

2.12.2 NMR-Spektroskopie zur Aufklärung der Stereoselektivität

Um die Stereoselektivität der durch EDD katalysierten Reaktion zu bestimmen, wurde von der in Kapitel 2.12.1 beschriebenen Probe vor Zugabe von EDD ein COSY-Spektrum aufgenommen. Im Anschluss an die Aktivitätsmessungen wurde zudem ein weiteres COSY und ein NOESY aufgenommen. Die für die Charakterisierung spezifischen Parameter können Tabelle 36 entnommen werden. Alle Spektren wurden mit 600 MHz bei 22 °C aufgenommen.

Des Weiteren wurde das Produkt 2-Keto-3-desoxy-6-phophogluconat käuflich erworben und von diesem ein Vergleichsspektrum aufgenommen. Auch wurde die Geschwindigkeit der Keto-Enol-Tautomerie durch die wiederholte Aufnahme von ^{1}H-NMR-Spektren mit und ohne die Zugabe von EDD bestimmt. Hierzu wurde das Produkt (30 mM) in Phosphatpuffer auf D_2O-Basis (pD 7,5, 50 mM) gelöst und jede Stunde im Verlauf von mehreren Tagen ein ^{1}H-Spektrum aufgenommen.

Tabelle 18: Parameter der NMR-Spektren

Probe	Besonderheiten
^{1}H-NMR	Pulse Sequence: zg30
COSY	Scans 4 Puls Sequence: cosygpqf
NOESY	Scans 16 Pulse Sequence: noesygpph Mixing time d8 = 0,6 s

2.13 Redoxtitration

Die Bestimmung des Redoxpotentials der EDD erfolgte automatisiert. Die Zusammensetzung des Mediatormixes (0,16 M Gesamtkonzentration) hierfür ist im Kapitel 7 dargestellt. Zur Reduktion wurde Natriumdithionitlösung (0,8 mM) in Puffer-W-mit (20 mM) verwendet. Der Ablauf der Titration ist in Tabelle 19 dargestellt.

Tabelle 19: Ablauf der Redoxtitration

	Dauer	**Schritt**
1	1 min	Zugabe von 15 µl/min Dithionitlösung
2	2 min	Inkubation unter Rühren
3	1 min	Aufnahme eines UV/Vis-Spektrums sowie des Potentials

Vor der Titration wird das Protein in Puffer-W-mit von 250 nm bis 800 nm vermessen. Nach Zugabe von Mediatormix (Endkonzentration 0,01 mM) und einer Inkubation bis zur Konstanz des Potentials wurde erneut ein Spektrum im identischen Bereich aufgenommen. Anschließend wurde die automatisierte Redoxtitration gestartet, wie sie in Tabelle 19 angegeben ist.

Um die optimale Wellenlänge zur Verfolgung der Absorptionsänderung in Abhängigkeit des Redoxpotentials zu ermitteln wurde zunächst eine Titration ohne Protein, lediglich mit Mediatormix durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Bioinformatische Einordnung

3.1.1 Abgrenzung der EDD zu anderen Dihydroxysäure-Dehydratasen

Die Entner-Doudoroff-Dehydratase (EDD) gehört zur Familie der Dihydroxysäure Dehydratasen (DHAD), wie beispielsweise auch die Gluconat-Dehydratase (GAD, EC 4.2.1.29) (29), die 2,3-Dihydroxyisovalerat-Dehydratase (IlvD, EC 4.2.1.9) (68) oder die 6-Deoxy-6-sulfogluconat-Dehydratase (Sulfo-EDD) (62) (siehe auch Kapitel 1.1).

Die Betrachtung der direkten Genumgebung ermöglicht eine Unterscheidung der verschiedenen DHADs, da Gene, welche für Enzyme eines Stoffwechselweges codieren, häufig in Operons oder Genclustern vorliegen. So deuten Gene für Enzyme wie die Acetohydroxysäure-Reduktoisomerase (EC 1.1.1.86) oder Acetolactat-Synthase (EC 2.2.1.6) darauf hin, dass das entsprechende Gen für eine IlvD codiert, während Gene für Succinatsemialdehyd-Dehydrogenase, 2,4-Dihydroxyhept-2-ene-1,7-disäure-Aldolase sowie Gluconolactonase und eine Alkoholdehydrogenase für kurzkettige Alkohole auf eine Sulfo-EDD hindeuten. In der Nähe von *edd* befinden sich häufig Gene für die Entner-Doudoroff-Aldolase (EDA), das Zwischenferment (zwf, Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase), die Glucokinase (gk), die Phosphogluconolactonase (pgl) und die Glucose-6-phosphat-Isomerase (pgi). Die Genumgebung der *edd*s aus den hier verwendeten Organismen, sowie aus *Neisseria gonorrhoeae* als Referenzorganismus ist in Abbildung 8 dargestellt.

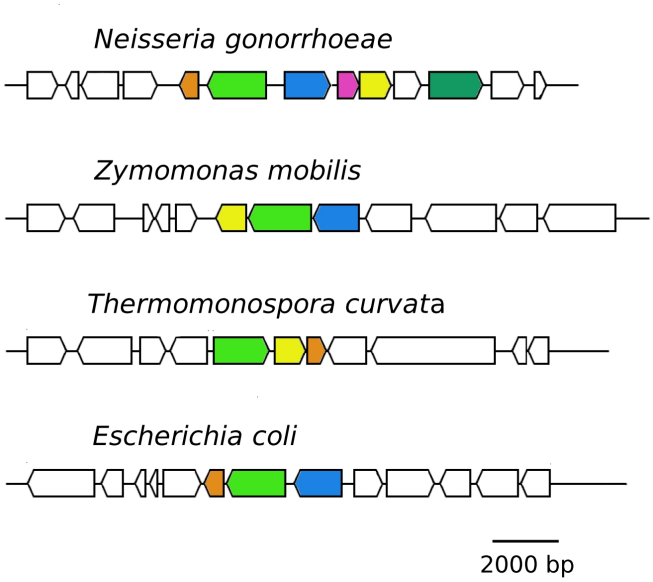


Abbildung 8: Der Gen-Cluster der *edd* aus den hier verwendeten Organismen, sowie aus *Neisseria gonorrhoeae*. In hellgrün *edd*, orange *eda*, blau Zwischenferment (*zwf*), pink Phosphogluconolactonase (*pgl*), gelb Glucokinase (*gk*), dunkelgrün Glucose-6-phosphat-Isomerase (*pgi*)

Ein Vergleich der auf diese Weise untersuchten DHADs (etwa 200) ergab, dass eine Aminosäurensequenzidentität von über 55 % zu der EDD aus *E. coli* ein zuverlässiger Indikator dafür ist, dass das untersuchte Gen für eine EDD codiert. Mindestens 50 %

konnte für die paarweise Sequenzidentität zwischen EDDs gefunden werden. Im Vergleich dazu beträgt die Aminosäuresequenzidentität von EDD zu IlvD im Schnitt nur 30 %, für die von EDD und Sulfo-EDD wurde analog eine maximale Identität von 34 % (25 Sequenzen) gefunden. Dies lässt sich auch graphisch in einem phylogenetischen Baum darstellen. Abbildung 9 basiert auf den Gensequenzen von 19 EDDs (blau), 20 IlvDs (dunkelgrün), 7 GADs (violett), 7 Sulfo-EDDs (orange) und 2 Xylonat-Dehydratasen (hellgrün) und zeigt, dass sich die verschiedenen DHADs leicht durch die Darstellung des Verwandtheitsgrades der Enzyme in einem phylogenetischen Baum unterscheiden lassen.

3.1.2 Verbreitung der EDD

Die Untersuchung von 386 Bakteriengenomen aus 353 Bakterienfamilien (alle im Januar 2000 auf JGI zur Verfügung stehenden) auf das Vorhandensein von *edd* ergab eine klare Verbreitung der *edd* in den Bakterienklassen Actinobakterien, Alphaproteobakterien, Betaproteobakterien, Deltaproteobakterien, Epsilonproteobakterien und Gammaproteobakterien (siehe Abbildung 10). Insgesamt wurden in 66 Bakteriengenomen Gene für die EDD gefunden. Für 63 Bakterien konnten klare Hinweise gefunden werden, dass es sich tatsächlich um ein Gen für EDD handelt. In der Genumgebung wurden Gene für beispielsweise EDA oder das Zwischenferment annotiert.

Hierbei wurden für 3 Stämme je zwei mögliche *edds* gefunden. Eine genauere Betrachtung der Ergebnisse für *Halioglobus pacificus* zeigt, dass hier beide Gene in der Nähe von Genen für den Entner-Doudoroff-Weg liegen. Eines der beiden ist jedoch um ein drittel kürzer, wobei eine Betrachtung der upstream und downstream Region nicht auf eine Punktmutation als Ursache hierfür hindeutet. Vielmehr fehlen etwa 600 Nukleotide, welche für den C-Terminus des Enzyms codieren.

Für *Agrobacterium tumefaciens* und *Martelella sp.* wurde für jeden Hit eine Identitätsmatrix mit Vertretern der in Abbildung 9 dargestellten Gruppen erstellt, um auszuschließen, dass es sich z. B. um eine Sulfo-EDD oder IlvD handelt. Es ergab sich keine Abweichung von der erwarteten Identität. Ein Blick auf den *edd*-Gen-Cluster zeigt, dass er in einem Fall vorliegt. Die Gene in der Umgebung der zweiten *edd* weisen auf keine bekannte Funktion der *edd* hin. Da die hier gemachten Untersuchungen auf bioinformatischen Methoden beruhen, kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich hierbei um Pseudogene handelt.

Weiterhin lässt sich Abbildung 10 entnehmen, dass eine hohe Aminosäuresequenzidentität zwischen den EDDs verschiedener Bakterien nicht automatisch auf einen hohen phylogenetischen Verwandtschaftsgrad der Organismen schließen lässt. Dies lässt sich beispielsweise an der Verteilung der EDDs in Gammaprotebakterien erkennen, welche nicht in einem Ast des phylogenetischen Baumes zusammengefasst werden können.

Um die Verbreitung der *edd* über die oben untersuchten Organismen hinaus zu untersuchten, wurde ein Augenmerk auf alle (in JGI gelisteten) Bakterienklassen gelegt, für die ein Gen für die EDD in keinem der untersuchten Bakterien gefunden wurde. Diese wurden komplett mittels NCBI-Datenbank auf *edd* hin untersucht (Stand Januar 2020). Eine Liste dieser Bakterienklassen kann Tabelle 6 im Anhang entnommen werden. Weitere 35 Übereinstimmungen ergaben sich. Da in nah verwandten Organismen kein Gen für die EDD gefunden werden konnte, wurden diese Treffer neben ihrer hohen Sequenzidentität auch durch einen Blick auf die Genumgebung verifiziert. Diese Ergebnisse sind

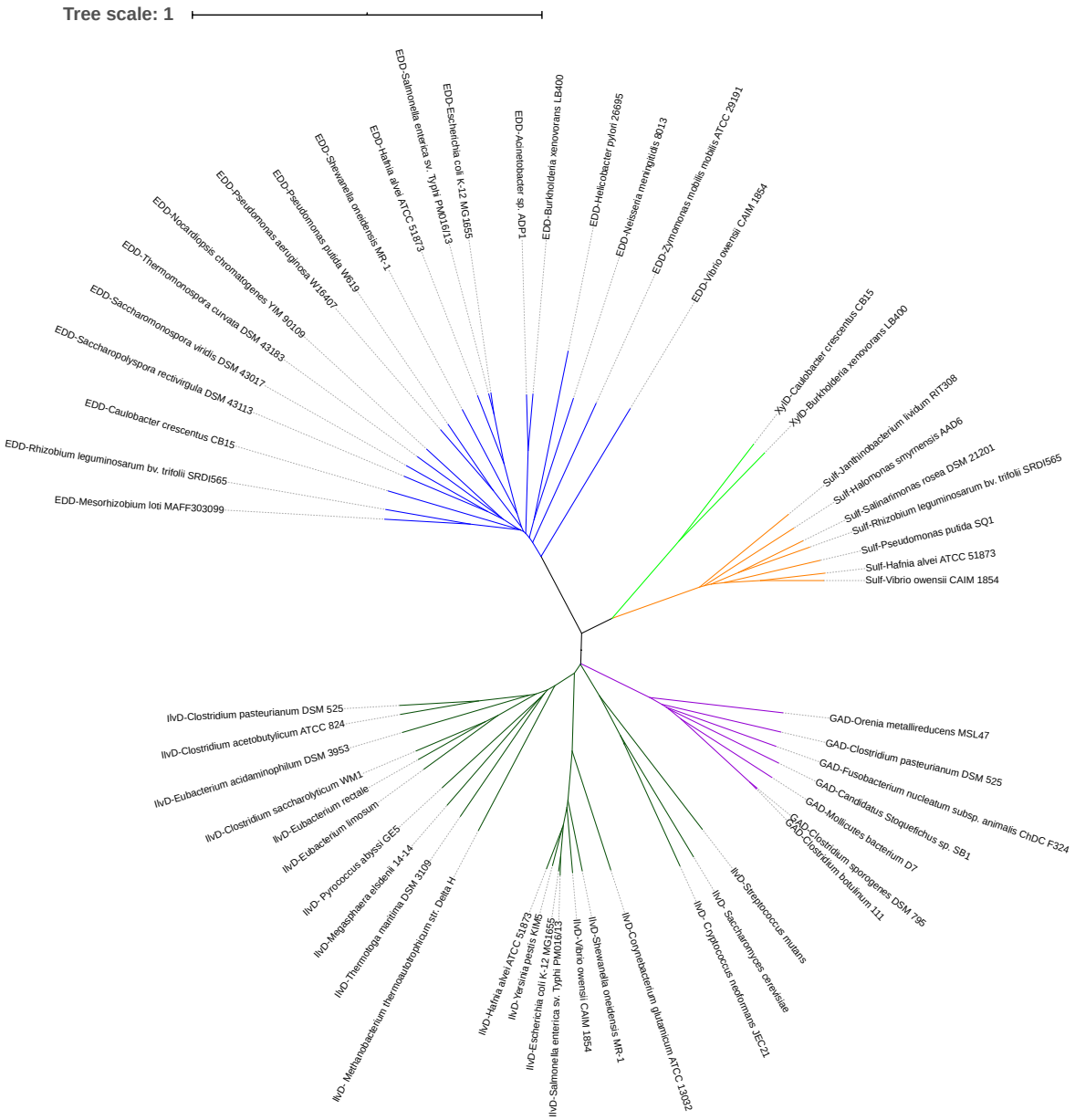


Abbildung 9: Phylogenetischer Baum ausgewählter DHADs; blau *edd*, dunkelgrün *IlvD*, violett *gad*, orange *sulfo-edd*, hellgrün Xylonat-Dehydratase

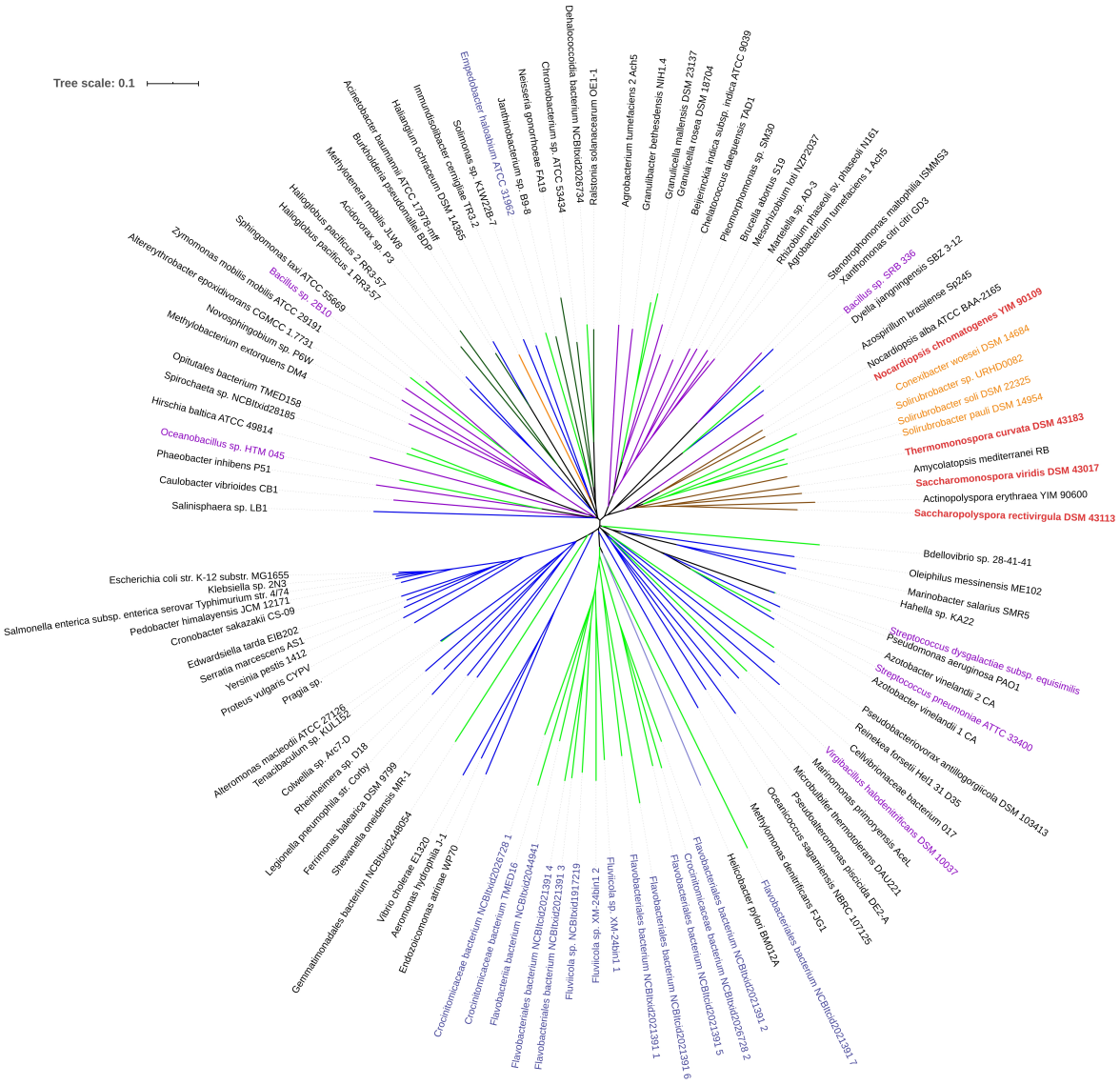


Abbildung 10: Phylogenetischer Baum zur Verbreitung der *edds*. Farbschlüssel der Äste: Gammaproteobakterien (dunkelblau), Epsilonproteobakterien (hellblau), Deltaproteobakterien (orange), Betaproteobakterien (dunkelgrün), Alphaproteobakterien (violett), Actionbakterien (braun), Bakterien anderer Klassen (hellgrün). In Rot und fett markiert sind thermotolerante Organismen mit potentiell stabilen EDDs. Farbschlüssel der Stammnamen: Flavobacteriia (hellblau), Thermoleophila (orange), Bacilli (violett)

in Tabelle 20 zusammen gefasst. Die positiven Organismen sind in Abbildung 10 mit hellgrünen Ästen dargestellt.

Sowohl in Tabelle 20, als auch in Abbildung 10 sind einige Stämme mehrfach aufgelistet. Dies begründet sich dadurch, dass für die meisten Stämme mehrere Proben isoliert und mit einer Shotgunsequenzierung analysiert wurden. In diesen Fällen wurde in mehreren Proben das Gen für die EDD gefunden. In einigen anderen Fällen war aber auch das Gegenteil der Fall. Trotz der Sequenzierung zahlreicher Proben wurde nur in einer das Gen für die EDD annotiert. Dies kann verschiedene Gründe haben. Zum einen kann es an der Lage der Contigs im Genom liegen, zum anderen an der Annotation, da hier nicht mit der Gensequenz, sondern mit der Proteinsequenz geblastet wurde. Weitere Fehler können in der Zuordnung der Proben zu verschiedenen Stämmen liegen.

Weiterhin fällt auf, dass zahlreiche auf diese Weise gefundene *edds* eine höhere Identität zu denen aus Stämmen anderer Klassen aufweisen als zu *edds* der eigenen Klasse. Besonders deutlich wird dies beispielsweise bei den *edds* aus *Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis* und *Pseudomonas aeruginosa PAO1*, oder zwei in *Bacillus sp.* gefundenen *edds*, welche im phylogenetischen Baum weit voneinander entfernt liegen. Auch stammen viele Sequenzierungen aus vorläufigen Ergebnissen.

Ein Blast der in JGI gelisteten Archaea (Referenz: EDD aus *E. coli*), wie er für die Bakterienfamilien durchgeführt wurde, führte zu keinen aussagekräftigen Ergebnissen, weswegen dieser Bereich hier nicht vertieft wurde. Möglicherweise ist der klassische ED-Weg in Archaea nicht vorhanden. Eventuell könnten die EDDs der Archaea auch eine geringere Sequenzidentität zu denen der Bakterien aufweisen, sodass sie auf die hier beschriebene Weise nicht identifiziert werden können.

Es lässt sich zusammenfassend sagen, dass *edd* hauptsächlich in Actinobacteria, Alphaproteobakterien, Betaproteobakterien, Deltaproteobakterien, Epsilonproteobakterien und Gammaproteobakterien verbreitet sind. Eine weitere Verbreitung wurde vermutlich durch horizontalen Gentransfer erreicht. Da in diesen Klassen zahlreiche Krankheitserreger vertreten sind, ist die Forschung an der EDD auch im Hinblick auf die Antibiotikaforschung interessant.

Tabelle 20: Hits des Blasts in NCBI mit dem Gen für EDD aus *E. coli* in allen in Tabelle 6 aufgeführten Bakterienklassen. Die Überschrift ist jeweils die Klasse. Abkürzungen: *zwf* (Zwischenferment, Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase), *eda* (Entner-Doudoroff-Aldolase), *g6pd* (Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase), *pgl* (6-Phosphogluconolactonase), *pgi* (Glucose-6-phosphat-Isomerase)

Organismus	**Verifiziert durch/ Anmerkungen**
Acidobacteria	
Granulicella mallensis DSM23137 Granulicella rosea DSM18704	kein Gen in Gencluster Zuckerphosphatisomerase, Glucose-Dehydrogenase

Tabelle 20: Verbreitung der EDD

Organismus	**Verfiziert durch/ Anmerkungen**
Thermoleophilia	
Solirubrobacter pauli DSM14954	*eda*
Solirubrobacter soli DSM22325	*eda*
Solirubrobacter sp. URHD0082	*eda*
Conexibacter woesei DSM14684	Glucokinase, *eda*
Flavobacteriia	
Tenacibaculum sp. KUL152	Glucokinase, Contig sehr klein
Empedobacter haloabium ATCC31962	*eda*, *pgl*, *g6pd*, *pgi*
Crocinitomicaceae bacterium NCBItxid2026728	*g6pd*, *pgl*
Crocinitomicaceae bacterium NCBItxid2026728	*g6pd*, *pgl*, *eda*
Flavobacteriia bacterium NCBItxid2044941	*g6pd*, *pgl*
Flavobacteriales bacterium NCBItxid2021391	*pgl*, *eda*
Flavobacteriales bacterium NCBItxid2021391	Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, *eda*, *edd* am Anfang des Contigs
Flavobacteriales bacterium NCBItxid2021391	*g6pd*, *pgl*, *zwf*, *eda*
Flavobacteriales bacterium NCBItxid2021391	*pgl*
Flavobacteriales bacterium NCBItxid2021391	*g6pd*, *pgl*, *eda*
Fluviicola sp. NCBItxid1917219	*g6pd*, *pgl*
Fluviicola sp. XM-24bin1 NCBItxid2133950	*g6pd*, *eda*
Fluviicola sp. XM-24bin1 NCBItxid2133950	*g6pd*, *eda*
Crocinitomicaceae bacterium TMED16	*g6pd*, *pgl*, *eda*
Sphingobacteriia	
Pedobacter himalayensis JCM12171	*zwf*, *eda*
Dehalococcoidia	
Dehalococcoidia bacterium NCBItxid2026734	*edd* am Anfang des Contigs
Bacilli	
Streptococcus pneumoniae ATTC 33400	Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, Glucokinase
Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis	Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, Glucokinase
Virgibacillus halodentrificans DSM10037	Glucokinase, *pgi*
Oceanobacillus sp. HTM 045	*eda*, *g6pd*, *pgl*, *pgi*
Bacillus sp. SRB 336	*g6pd*, *eda*, *pgl*
Bacillus sp. 2B10	*eda*, Glucokinase, *pgl*, *g6pd*

Tabelle 20: Verbreitung der EDD

Organismus	**Verfiziert durch/ Anmerkungen**
Gemmatimonadetes	
Gemmatimonadales bacterium NCBItxid2448054	*zwf*, *eda*
Oligoflexia	
Pseudobacteriovorax antillogorigiicola DSM103413	Glucokinase, *g6pd*, *pgl*, *eda*
Bdellovibrio sp. 28-41-41	*g6pd*, *pgl*, *eda*
Spirochaetia	
Spirochaeta sp. NCBItaxid28185	*g6pd*, *pgl*, Glucokinase, *eda*
Opitutae	
Opitutales bacterium TMED158	*g6pd*, *edd* am Anfang des Contigs

3.1.3 Auswahl einer EDD für die Proteinexpression

Nach ersten Untersuchungen im Zusammenhang mit meiner Diplomarbeit konnte festgestellt werden, dass die EDD aus *E. coli* nur wenige Stunden im Anaeroben stabil ist. Dies ist eine schlechte Voraussetzung für zahlreiche Experimente wie beispielsweise das Kristallisieren des Enzyms. Aus diesem Grund wurde im Zuge der bioinformatischen Analysen eine stabilere EDD gesucht. Als Kriterien wurden die Thermotoleranz sowie eine hohe optimale Wachstumstemperatur des Organismus gewählt. Mögliche Kandidaten sind in Abbildung 10 rot markiert.

Zu diesen Organismen zählt *Nocardiopisis chromatogenes*, welches von Li *et al.* (121) beschrieben wurde und ein aerobes, gram-positives Bakterium ist. Es wurde aus Salzboden in Westchina isoliert. Die optimale Wachstumstemperatur liegt zwischen 37 °C und 40 °C. Ein Wachstum ist zwischen 20 °C und 60 °C möglich.

Ein ähnliches Wachstum weist *Saccharopolyspora rectivirgula*, ein aerobes, gram-positives Bakterium, welches von Korn-Wendisch *et al.* (109) charakterisiert wurde, auf. Es wird in faulem Heu, Komposthaufen und Mist gefunden und verursacht die Krankheit Farmerlunge. Die optimale Wachstumstemperatur liegt bei 50 °C, Wachstum wird zwischen 37 °C und 63 °C beobachtet.

Saccharomonospora viridis ist ein aerobes, gram-negatives Bakterium, welches zwischen 37 °C und 60 °C wächst (172).

Das fakultativ aerobe, gram-positive Bakterium *Thermomonospora curvata*, welches von Komposthaufen und Essensresten isoliert wurde, wir durch Chertkov *et al.* (49) beschrieben. Die optimale Wachstumstemperatur liegt bei 50 °C, Wachstum wird noch bei bis zu 65 °C beobachtet.

Da *Thermomonospora curvata* DSM 43183 sowohl eine hohe optimale Wachstumstem-

peratur hat als auch noch bei 65 °C wächst, wozu keines der anderen hier genannten Bakterien fähig ist, wurde zunächst für eine EDD aus diesem Organismus ein synthetisches Gen kloniert. Die EDD wurde dann heterolog in *E. coli* exprimiert, anaerob isoliert und charakterisiert. Dies ist in den folgenden Kapiteln beschrieben.

Aufgrund der hohen in der Literatur beschriebenen spezifischen Aktivität (167) wurde zudem das Enzym aus *Zymomonas mobilis mobilis* ATCC 29191 für vergleichende Untersuchungen in Kapitel 3.3 verwendet.

3.2 Optimierung der Proteinexpression

Zur Maximierung der Ausbeute an Protein pro Liter Kultur, als auch zur Verbesserung des Einbaus an Eisen-Schwefel-Cluster in die Proteine wurden verschiedene Variationen der Zellaufzucht getestet. Diese werden in den folgenden Kapiteln diskutiert. Dabei beschränkt sich diese Optimierung auf das Enzym aus *Thermomonospora curvata* (149).

3.2.1 Wachstumstemperatur und -zeit

Für die Variation der Temperatur wurde hier zum einen 30 °C nach Induktion und zum anderen 18 °C nach Induktion gewählt. Die Wachstumszeit nach Induktion wurde zwischen 2 h und einer Inkubation über Nacht variiert. Um Aussagen über die Effektivität der gewählten Parameter treffen zu können, wurde die Proteinausbeute pro 2 l Kultur und der Eisengehalt pro Protein bestimmt. Zusammengefasst sind die Ergebnisse in Tabelle 21.

Tabelle 21: EDD-Ausbeute und Fe-Gehalt bei Variation der Wachstumstemperatur und -zeit

Nr.	Wachstum nach Induktion (h)	Temperatur nach Induktion (°C)	Protein (pro 2 L) (mg)	Fe/Protein
1	2	30	0,3	2,06
2	3	30	3,1	2,22
3	4	30	4,8	2,56
4	20	30	10,1	3,10
5	20	18	11,5	2,13

Eine Reduktion der Wachstumstemperatur nach Induktion kann dazu führen, dass weniger Stressantwort auf die Expression des rekombinanten Enzyms hervorgerufen wird. Je niedriger die Temperatur ist, desto geringer entsprechend auch die Stressantwort und damit der Abbau des gewünschten Proteins (176). Gleichzeitig korreliert eine Verringerung der Temperatur ausgehend von 37 °C mit einer Reduktion der Aktivität des *lac* Promotors (20), sodass weniger Protein produziert wird, welches häufiger richtig gefaltet vorliegt. Somit ist die Annahme, dass eine niedrigere Temperatur, wie etwa 18 °C gegenüber 30 °C, zu weniger, aber aktiverem (in diesem Fall mehr Eisen-Schwefel-Cluster enthaltenden) Protein führt. Ein Blick auf die in Tabelle 21 dargestellten Werte zeigt, dass die Temperaturvariation für die Menge des produzierten Enzyms kaum ausschlaggebend ist, während bei 30 °C erheblich mehr Eisen pro Protein eingebaut wurde. Es kann davon ausgegangen werden, dass der Einbau des Clusters bei höheren Temperatu-

ren besser funktioniert und gleichzeitig die Stabilität des Proteins nicht beeinträchtigt ist, da dieses aus einem thermotoleranten Organismus stammt.

Die Variation der Wachstumszeit nach der Induktion führt dazu, dass die Zellen, je nach Dauer, von der exponentiellen Wachstumsphase in die Stationäre übergehen können. Dies kann beispielsweise Nachteile haben, wenn die Zelle die begrenzten Ressourcen für eigene Stoffwechselwege verwendet und durch erhöhte Proteaseaktivität ein Abbau der rekombinanten Proteine stattfindet (31). In den hier dargestellten Ergebnissen zeigt sich, dass je länger das Wachstum der Zellen nach Induktion ist, desto mehr Cluster wird in die EDD eingebaut und gleichzeitig wird mehr Protein produziert, sodass gezeigt werden konnte, dass eine Inkubation über Nacht das beste Ergebnis liefert.

3.2.2 Zelldichte bei Induktion

Die Zelldichte wurde durch die Messung der optischen Dichte bei 600 nm bestimmt. Üblicherweise liegt dieser Wert bei Induktion bei 0,5. Aus diesem Grund wurde hier zwischen einer Induktion bei etwa 0,3 und etwa 0,7 variiert, um Tendenzen zu erkennen. Die Zellen wurden über Nacht bei 30 °C inkubiert. Auch diese wurden anhand von Proteinausbeute pro 2 L Kultur und dem Eisengehalt pro Protein bewertet. Dargestellt sind die Ergebnisse in Tabelle 22.

Tabelle 22: EDD-Ausbeute und Fe-Gehalt in Abhängigkeit der Zelldichte bei Induktion

Nr.	**OD_{600} bei Induktion**	**Protein (mg)**	**Eisen/Protein**
6	0,74	12,7	1,48
7	0,34	13,3	2,20

Durch die Induktion wird die Zelle einer erheblichen Mehrbelastung ausgesetzt, was dazu führen kann, dass das Zellwachstum nach der Induktion sehr eingeschränkt ist. Eine geringere Zellausbeute führt aber automatisch zu einer geringeren Proteinausbeute. Aus diesem Grund ist es wichtig den optimalen Induktionszeitpunkt zu bestimmen (31) (32) (77). In den hier dargestellten Ergebnissen zeigt sich, dass eine Induktion bei geringerer optische Dichte nicht zwangsläufig zu einer niedrigeren Proteinausbeute führt, während der Eisengehalt aber deutlich erhöht ist. Dies lässt sich so deuten, dass die Zellen mit der Produktion durch die Induktion nicht überlastet sind und weiter wachsen, bei einer zu späten Induktion allerdings die in Kapitel 3.2 erwähnte Ressourcenknappheit einsetzt, sodass die co-exprimierten Proteine der ISC-Maschinerie zum Eisen-Schwefel-Cluster-Einbau nicht mehr ausreichend produziert werden.

3.2.3 IPTG-Konzentration bei Induktion

Die Konzentration des IPTGs bei Induktion wurde zwischen 0,005 und 0,5 mM variiert. Die Zellen wurden bei einer optischen Dichte (600 nm) von 0,6 induziert und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 23 aufgelistet. Es ist die Proteinausbeute pro 2 L Kultur und der Eisengehalt pro Protein dargestellt.

Tabelle 23: EDD-Ausbeute und Fe-Gehalt in Abhängigkeit der IPTG-Konzentration bei Induktion

Nr.	IPTG Konzentration (mM)	Protein (mg)	Eisen/Protein
8	0,5	12,7	1,48
9	0,1	7,0	1,39
10	0,05	5,6	1,48
11	0,01	11,5	2,13
12	0,005	5,6	2,06

Eine zu hohe IPTG-Konzentration bei der Induktion kann zur Überlastung der Zellen führen und damit zu einer niedrigen Zielproteinausbeute (31). Vor allem für Proteine, die in das Medium segregiert werden, wurde gefunden, dass eine niedrigere IPTG-Konzentration die Ausbeute verbessert (181). Tabelle 23 zeigt, dass eine Konzentration von 0,01 mM IPTG vor allem für den Einbau des Eisen-Schwefel-Clusters in EDD zu bevorzugen ist, ohne dabei auf Proteinausbeute verzichten zu müssen. Da der Clustereinbau analog der Sekretion einen eigenen Stoffwechselweg benötigt, ist davon auszugehen, dass dieser bei zu hoher Induktion überlastet ist und so, trotz der Coexpression desselbigen, der Einbau nicht quantitativ erfolgen kann.

3.2.4 Weitere Optimierung

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Induktion möglichst früh in der exponentiellen Wachstumsphase, bei einer optischen Dichte bei 600 nm von etwa 0,3, erfolgen sollte. Induziert werden sollte mit 0,01 mM IPTG, wobei die Temperatur auf 30 °C reduziert werden sollte. Die Expression sollte dann über Nacht geschehen. Für alle weiteren Proteinexpressionen wurden diese Parameter verwendet. So konnte eine Ausbeute von typischerweise 5 bis 15 mg pro 2 L Kultur und ein Eisengehalt von 3,2 bis 4,2 Eisen/Protein erhalten werden.

Natürlich hängt die Ausbeute sowie der Clustergehalt auch von der Aufreinigung ab, weswegen weiterhin verschiedene Puffer getestet wurden. Für die Aufreinigung konnte beispielsweise festgestellt werden, dass ein Glyceringehalt von 10 % im Puffer nötig ist. Im Zuge der Optimierung der Aufreinigung für Kristallisationsexperimente wurde die Pufferkonzentration von 100 mM auf 20 mM Tris ohne Auswirkung auf die EDD Stabilität und Ausbeute heruntergesetzt. Vor allem im Zellextrakt war das Enzym instabil, was vermutlich auch mit der geringen Konzentration in diesem zusammenhängt. Die Zeit zwischen Aufschluss und Isolation des Proteins sollte so kurz wie möglich gehalten werden.

3.3 Vergleich von EDD aus verschiedenen Organismen

Für diese Arbeit wurden EDD aus drei verschiedenen Organismen verwendet. Neben dem Enzym aus *E. coli* wurde das aus *Zymomonas mobilis* aufgrund seines Anwendungsbezugs gewählt. Das Enzym aus *Thermomonospora curvata* versprach aufgrund der Wachstumstemperaturen des Organismus besondere Stabilität. In den folgenden Kapiteln werden die Gemeinsamkeiten und Unterschiede der drei Enzyme dargestellt und

diskutiert sowie herausgearbeitet, warum das Enzym aus *Thermomonospora curvata* für weitere Experimente verwendet wurde.

3.3.1 Clustergehalt

In Abbildung 11 sind die Mittelwerte von je 3 Aufreinigungen für jede EDD dargestellt. In blau ist die Proteinmenge in mg pro 2 L Kultur abgebildet. Es zeigt sich, dass für das Protein aus *E. coli* etwa 32 mg pro 2 L Kultur isoliert werden, während für das aus *Z. mobilis* und *T. curvata* nur 11 mg bzw. 7 mg isoliert werden. Diese deutliche Diskrepanz zwischen dem Protein aus *E. coli* und den anderen heterolog exprimierten Proteinen erklärt sich daraus, dass für die Expression *E. coli* BL21 Zellen verwendet wurden. Möglicherweise ist die mRNA der *E. coli*-fremden Gene trotz Codonoptimierung der Gene instabiler. Auch eine für die EDD aus *E. coli* höhere Resistenz gegenüber den organismuseigenen Proteasen kann eine Erklärung sein. Nicht zuletzt besteht die Möglichkeit, dass die EDD aus *E. coli* effizienter gefaltet wird. Die Ausbeute aller 3 EDDs ist jedoch ausreichend.

Auf den Clustereinbau konnte hier kein Effekt durch die heterologe Expression festgestellt werden. Durch den Test bedingt wurden für alle EDDs höhere Eisengehalte als Schwefelgehalte nachgewiesen. Dies ist in Abbildung 11 in rot für Eisen, sowie gelb für Schwefel pro Protein, dargestellt. Die These untermauernd, dass das Enzym aus *T. curvata* eine besondere Stabilität aufweist, wurden für dieses Enzym die höchsten Eisen/Schwefelkonzentrationen gemessen, mit 3,8 Eisenionen pro Protein und 3,0 säurelabilen Schwefelionen pro Protein. Für alle isolierten Proteine konnte hier nachgewiesen werden, dass nicht ein [2Fe-2S]-Cluster, sondern ein [3Fe-4S]- oder [4Fe-4S]-Cluster vorlag.

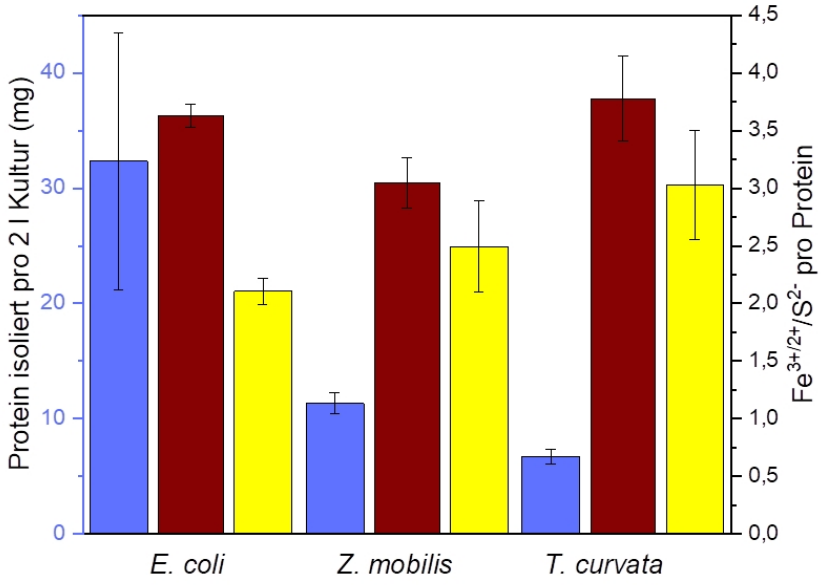


Abbildung 11: Vergleich der EDD aus verschiedenen Organismen. Isoliertes Protein pro 2 L Kultur (blau, Achse links). Eisen (rot, Achse rechts) und Schwefel (gelb, Achse rechts) pro Protein

Der [4Fe-4S]-Cluster charakterisiert sich auch durch eine deutlich braune Farbe des isolierten Enzyms. Zum Vergleich sind in Abbildung 12 die Proteine der drei Organismen abgebildet. Für alle ist die typische Farbgebung zu erkennen.

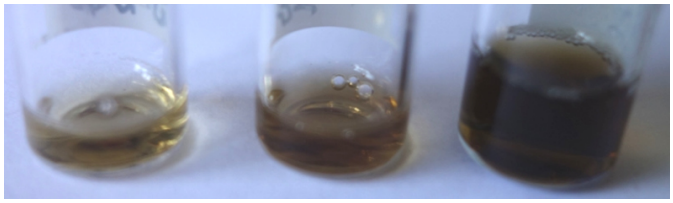


Abbildung 12: Visueller Vergleich der in *E. coli* produzierten EDD aus verschiedenen Organismen; Links: *T. curvata*, Mitte: *Z. mobilis*, Rechts: *E. coli*

3.3.2 UV-Vis Spektren

Anhand von UV/Vis-Spektren lässt sich bei einer Wellenlänge von 280 nm die Konzentration von Proteinen abschätzen. Gleichzeitig kann auch eine erste Aussage über die Clusterart gemacht werden. So hat ein typischer [4Fe-4S]-Cluster eine Schulter bei 330 nm und einen weiteren Peak bei 410 - 430 nm. Im Gegensatz dazu wird ein [2Fe-2S]-Cluster durch Peaks bei 320 nm, 440 nm und eine Schulter bei etwa 570 nm charakterisiert.

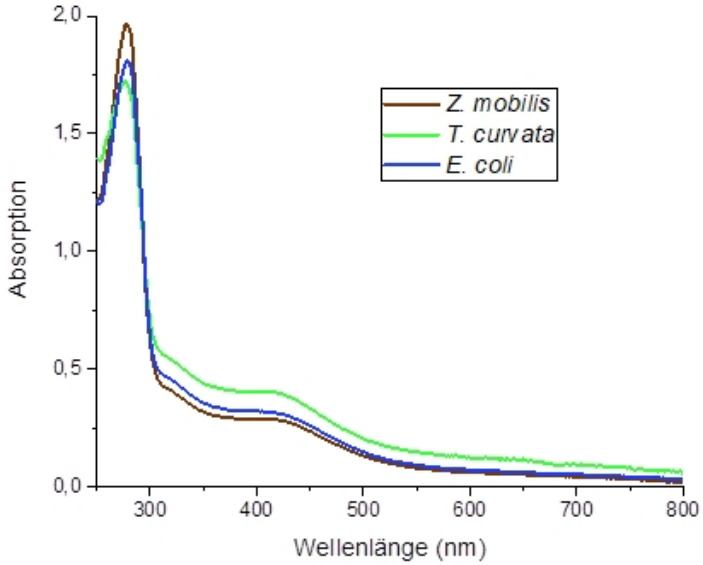


Abbildung 13: UV/Vis-Spektren der EDD aus verschiedenen Organismen

In Abbildung 13 ist für jede der drei hier betrachteten EDDs ein Spektrum im Bereich von 250 nm bis 800 nm dargestellt. Neben dem Proteinpeak bei 280 nm sind bei allen dreien die typischen Peaks bei 330 nm und 410 nm für einen [4Fe-4S]-Cluster zu erkennen.

Ein weiterer Anhaltspunkt über den Clustergehalt, neben der Bestimmung der Heteroatome pro Protein, gibt das Verhältnis der Peaks bei 280 nm und 410 nm im UV/Vis-Spektrum. Diese sind für die hier dargestellten Spektren in Tabelle 24 aufgelistet. Um diesen Wert besser einordnen zu können, wurde eine Referenz berechnet. Diese beruht auf der Anzahl der Tyrosin- (ϵ = 1,49 mM^{-1}*cm^{-1} (140)) und Tryptophan-Reste (ϵ = 5,5 mM^{-1}*cm^{-1} (140)) pro Protein, sowie der Absorption des $[4Fe\text{-}4S]^{2+}$-Clusters (ϵ = 12,5 mM^{-1}*cm^{-1} auf Basis von (189)). Berücksichtig wurde bei der Aminosäurezusammenstellung auch der *Tag*. Hieraus ergeben sich die in Tabelle 24 berechneten Werte. Es zeigt sich, dass die experimentellen Werte für die EDD aus *T. curvata* am besten mit den berechneten Werten übereinstimmten, was analog der Bestimmung des Eisen/Schwefel-Gehalts darauf schließen lässt, dass das Protein überwiegend mit vollständigem [4Fe-4S]-Cluster isoliert werden konnte. Aber auch für die Enzyme aus *Z. mobilis* und *E. coli* beträgt die Abweichung von errechneten Wert maximal 15 %.

Tabelle 24: Vergleich der Absorptionen bei 410 und 280 nm der EDD aus drei Organismen. Calc.: Berechnet auf Basis des Tyrosin- und Tryptophangehaltes sowie der Absorption des Clusters der EDD; Exp.: Auf Basis der Absorption in den UV/Vis-Spektren; Das Verhältnis ist angegeben für 410 nm/280 nm

Organismus	**Trp (Tyr) pro Protein**	**ϵ (L/(mol*cm) Tyr + Trp**	**ϵ (L/(mol*cm) $[4Fe\text{-}4S]^{2+}$**	**Verhältnis (calc.)**	**Verhältnis (exp.)**
Z. mobilis	7(17)	63,8	12,5	0,164	0,149
T. curvata	4(9)	35,4	12,5	0,261	0,255
E. coli	6(11)	49,4	12,5	0,202	0,171

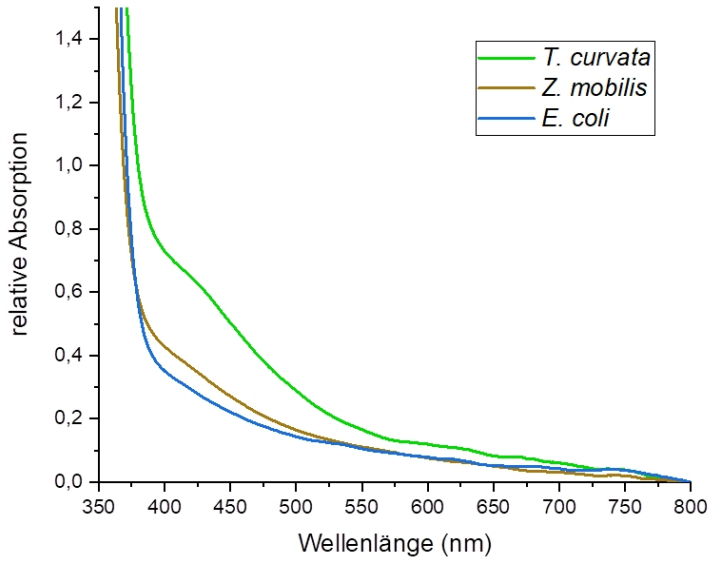


Abbildung 14: UV/Vis-Spektren der reduzierten EDD aus verschiedenen Organismen

Eine weitere Möglichkeit nachzuweisen, dass die in Abbildung 13 dargestellten Spektren tatsächlich auf Eisen-Schwefel-Clustern beruhen, ist die Reduktion der Cluster mit

Natriumdithionit. Hierbei wird die Absorption bei 410 nm durch die Reduktion des $[4Fe\text{-}4S]^{2+}$-Clusters zu einem $[4Fe\text{-}4S]^{1+}$-Cluster um etwa 50 % schwächer. In Abbildung 14 sind die Spektren der reduzierten Enzyme dargestellt, wobei die Absorption bei 800 nm als Baseline abgezogen und die Absorption bei 410 nm jeder Probe vor der Reduktion auf 1 normiert wurde, um eine bessere Vergleichbarkeit zu erreichen. Diese Spektren zeigen, dass es möglich ist, alle drei Enzyme zu reduzieren, was für die ESR-Spektroskopie relevant ist. Die Abnahme des Peaks bei 410 nm bei Reduktion wurde beispielsweise auch für die IlvD aus *E. coli* beobachtet (68). Gleichzeitig lässt sich in Abbildung 14 erkennen, dass die Reduktion der EDD aus *T. curvata* nicht vollständig ist (siehe Kapitel 3.8.6), was vor allem Einfluss auf die ESR-Spektroskopie hat, da diese nur am reduzierten, paramagnetischen $[4Fe\text{-}4S]^{1+}$-Cluster möglich ist.

3.3.3 SDS-PAGE

Durch eine SDS-PAGE lassen sich die Größe eines Proteins und seine Reinheit bestimmen. Auch für die Verfolgung der Aufreinigung werden sie häufig verwendet. In Abbildung 15 ist solch eine SDS-PAGE für die Aufreinigung von EDD aus *T. curvata* dargestellt.

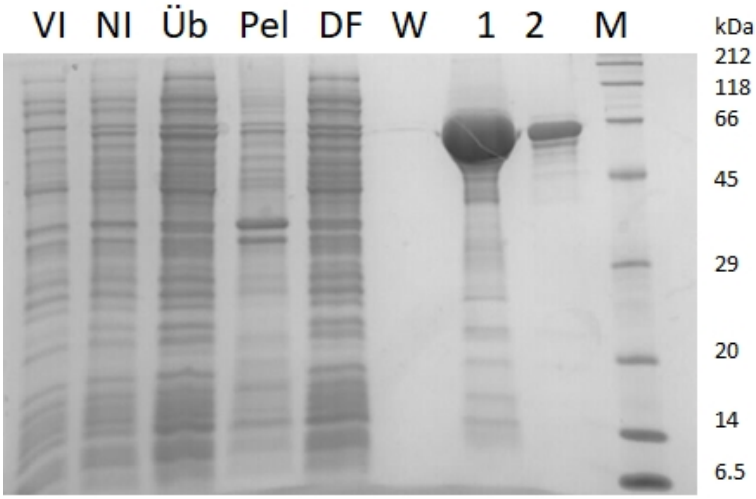


Abbildung 15: SDS-PAGE der Aufreinigung von EDD aus *Thermomonospora curvata*. VI: Vor Induktion, NI: Nach Induktion, Üb: Überstand, Pel: Pellet, DF: Durchfluss, W: Waschschritt, 1: EDD 37 µg, 2: EDD 7,2 µg, M: Marker

In den ersten beiden Spuren lässt sich die erfolgreiche Induktion erkennen, da eine Bande bei etwa 66 kDa bei der Nachinduktionsprobe dazu kommt. Diese Bande lässt sich auch im Überstand und im Pellet erkennen, was bedeutet, dass nicht das gesamte Protein gelöst im Überstand vorliegt und evtl. eine weitere Optimierung der Expression zu einer erhöhten Löslichkeit des Proteins führen kann, sodass der Anteil, welcher im Pellet vorliegt, auch gewonnen werden kann. Da dies aber möglicherweise erneut zu einer Reduktion des Clustergehaltes im Protein führen kann, wurde hier darauf verzichtet. Auch zeigt die Spur Durchfluss, dass nicht das gesamte Zielprotein an das Säulenmaterial bindet. Ein größeres Volumen an Säulenmaterial jedoch würde zu einer niedrigeren Fluss-

rate führen, die Aufreinigung verlangsamen und damit zum Verlust des in Verdünnung instabilen Proteins führen (siehe auch Kapitel 3.2.4). Die Spur Waschschritt verdeutlicht, dass das Protein ausreichend fest an das Säulenmaterial bindet und nicht nach und nach herausgewaschen wird. In Spur 1 ist zu erkennen, dass das Protein kaum verunreinigt ist. Kontaminationen lassen sich nur schwach bei einer sehr hohen Proteinkonzentration erkennen. Auch deutet dies darauf hin, dass keine Abbauprodukte entstehen und es stabil ist. Anhand von Spur 2 lässt sich die Größe auf 65 kDa abschätzen.

Für die Aufreinigungen der EDD aus *E. coli* und *Z. mobilis* sind die SDS-PAGEs der Aufreinigungen analog. Sie sind im Anhang in Abbildung 68 dargestellt.

Ein Überblick der Reinheit bzw. der Größe dieser Proteine zeigt Abbildung 16. Die errechnete Größe inklusive *Tag* liegt für das Enyzm aus *E. coli* bei 69,4 kDa, für das aus *Z. mobilis* bei 70,1 kDa und für das aus *T. curvata* bei 68,3 kDa. Dies lässt sich durch die SDS-PAGE belegen, wobei alle drei Enzyme eine etwas höhere elektrophoretische Mobilität im Vergleich zur berechneten Masse haben. Auch zeigt die Abbildung, dass die Proben stabil sind und keine signifikanten Verunreinigungen enthalten.

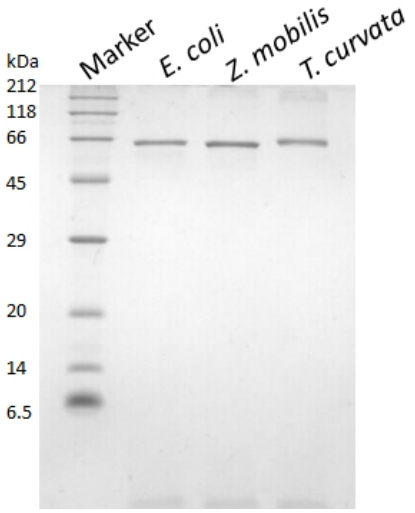


Abbildung 16: SDS-PAGE der EDD aus verschiedenen Organismen. Aufgetragen wurden je 1 µg

3.3.4 Michaelis-Menten-Kinetik

Da die verschiedenen Aufreinigungen einer EDD in ihrer spezifischen Aktivität recht heterogen sind, was an großen Standardabweichungen der Durchschnittswerte zu erkennen ist, wurden in Tabelle 25 zum einen die Mittelwerte der aus verschiedenen Aufreinigungen erhaltenen Parameter angegeben. Zum anderen wurden auch der jeweilige Maximalwert der Maximalgeschwindigkeit angegeben, welche von einer Aufreinigung erhalten werden konnte. Es wurden jeweils der Mittelwert aus drei Messungen von drei Aufreinigungen gebildet. In Abbildung 17 ist beispielhaft ein Michaelis-Menten-Plot für die EDD aus *T. curvata* dargestellt.

In Tabelle 25 werden Werte, welche durch den Stop-Time-Assay und den kontinuierlichen Assay erhalten wurden, miteinander verglichen. Lediglich für das Enzym aus

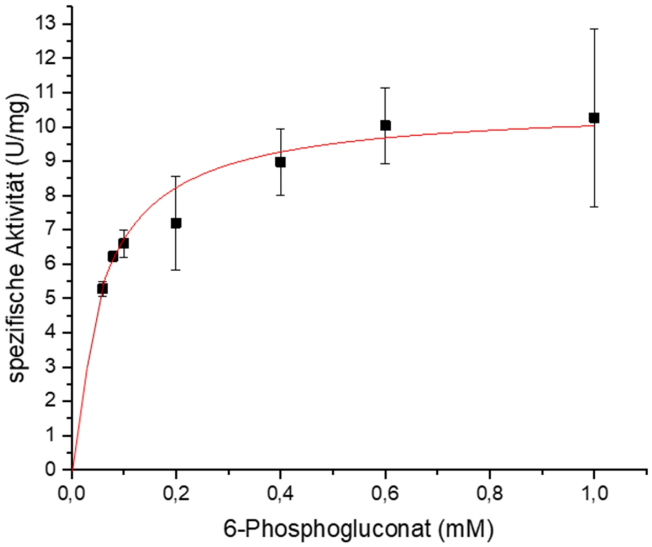


Abbildung 17: Michaelis-Menten-Plot der EDD aus *T. curvata*

Z. mobilis wurde nur der Stop-Time-Assay gewählt, da dieser für das sehr instabile Enzym geeigneter ist. Jeder Datensatz wurde mit einer Michaelis-Menten-Anpassung und einem Lineweaver-Burk-Plot ausgewertet. Auch diese Ergebnisse sind Tabelle 25 zu entnehmen.

Ein Vergleich der Auswertungsvarianten ist sehr nützlich, da beide ganz eigene Fehlerquellen aufweisen. Für die Michaelis-Menten-Anpassung wird v_{max} nur asymptotisch bestimmt und ist aus diesem Grund recht ungenau. Der Lineweaver-Burk-Plot wird durch Fehler der Messungen bei geringer Substratkonzentration überproportional stark verfälscht. Werden also, wie hier dargestellt, für beide Methoden sehr ähnliche Werte erhalten, spricht das sehr für die Belastbarkeit der Resultate.

Des Weiteren zeigt sich, dass für alle Enzyme die Michaelis-Menten-Konstante zwischen 0,029 und 0,236 mM liegt, wobei der niedrigste Wert für das Enzym aus *T. curvata* erhalten wurde. Der höchste kann der EDD aus *E. coli* zugeordnet werden.

Die Maximalgeschwindigkeiten liegen zwischen 13,1 und 96,0 U/mg. Hier führt das Enzym aus *E. coli* das Feld an, was nach zahlreichen Veröffentlichungen zur hohen Durchsatzgeschwindigkeit des Entner-Doudoroff-Weges in *Zymomonas mobilis* (167) (64) nicht zu erwarten war. Bei der Bewertung der Zahlen gilt es zu bedenken, dass das Enzym aus ebendiesem Organismus das instabilste ist (siehe Kapitel 3.3.5) und somit die hier dargestellten Zahlen die Maximalgeschwindigkeit eher unterschätzen. Die geringste Maximalgeschwindigkeit wurde für das Enzym aus *T. curvata* erhalten. Hier ist zu beachten, dass diese Werte bei ca. 24 °C gemessen wurden. Diese mag für die Enzyme aus *E. coli* und *Z. mobilis* nahe an ihrem Temperaturoptimum liegen (gemessen an der optimalen Wachstumstemperatur der Organismen, 37 °C bzw. 30 °C (41) (178)), für das Enzym aus *T. curvata* ist diese Temperatur weit entfernt vom Optimum (siehe auch Kapitel 3.4.2). Eine höhere Maximalgeschwindigkeit ist für dieses Enzym zu erwarten. Auf Basis der in Abbildung 26 bestimmten Temperaturabhängigkeit der Aktivität der EDD lässt sich eine 6-fach höhere Maximalgeschwindigkeit, etwa 80 U/mg, für das Temperaturoptimum abschätzen.

Tabelle 25: Michaelis-Menten-Konstanten und maximale Geschwindigkeit; MM: Michaelis-Menten-Plot; LB: Lineweaver-Burke-Plot

Organismus	**Plot**	**Mittelwert** $\mathbf{K}_M$ (mM)	**Mittelwert** $\mathbf{v}_{max}$ (U/mg)	$\mathbf{v}_{max}$ **(max.)** (U/mg)
Kontinuierlich				
E. coli	MM	0,149 ± 0,072	19,7 ± 13,1	34,8 ± 3,4
	LB	0,236 ± 0,153	24,5 ± 12,7	35,8
Stop-Time				
E. coli	MM	0,130 ± 0,025	61,6 ± 30,1	96,0 ± 4,9
	LB	0,144 ± 0,056	62,4 ± 28,3	95,0
Stop-Time				
Z. mobilis	MM	0,113 ± 0,062	38,2 ± 24,5	62,7 ± 2,4
	LB	0,109 ± 0,057	35,3 ± 24,1	61,2
Kontinuierlich				
T. curvata	MM	0,081 ± 0,033	13,4 ± 3,9	16,2
	LB	0,111 ± 0,076	14,7 ± 5,8	18,8
Stop-Time				
T. curvata	MM	0,029 ± 0,019	13,1 ± 7,0	17,9 ± 0,8
	LB	0,029 ± 0,018	13,2 ± 7,0	17,7

Da die Konzentration bei diesem Assay nur so weit verringert werden kann, dass die Absorptionsänderung noch verfolgt werden kann, bevor das Substrat abreagiert ist, ist die Messpunktzahl für geringe Konzentrationen begrenzt. Dies kann gegebenenfalls zu Fehlern bei der Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante führen.

Die größte Diskrepanz der Werte für den Michaelis-Menten- und den Lineweaver-Burke-Plot ergibt sich für den kontinuierlichen Assay von *E. coli* aufgrund der geringen Stabilität des Enzyms. Dies ist bereits in den Rohdaten zu sehen, was eine Anpassung der Daten erschwert, und zeigt sich vor allem in der großen Standardabweichung der Michaelis-Menten-Konstante des Lineweaver-Burke-Plots.

3.3.5 Stabilität

Die Stabilität der EDD wurde über gekoppelte Aktivitätsmessungen festgestellt. Vergleichende Stabilitätsbestimmungen erfolgten sowohl im Aeroben als auch im Anaeroben bei ca. 24 °C und einer Konzentration von 1 mg/ml Enzym.

In Abbildung 18 sind Experimente im Anaeroben dargestellt. Es zeigt sich, dass die EDD aus *Z. mobilis* innerhalb der ersten 5 Stunden ihre Aktivität fast vollständig verliert. Für die EDD aus *E. coli* wird eine deutlich langsamere Abnahme der Aktivität beobachtet. Auch nach 24 h ist noch etwa 70 % der Aktivität vorhanden, wobei dies sehr von der Probe abhängt. Eine Tendenz lässt sich nicht für den Cluster-Gehalt beobachten, aber für die Ausgangskonzentration. Dies ist die Konzentration, die die Probe nach der Aufreinigung und während der Lagerung bei -80 °C hatte. Für die Bestimmung der Stabilität wurde jede Probe mit Puffer-W-mit auf 1 mg/ml verdünnt. Hatte die Probe ursprünglich eine hohe Konzentration, verliert sie mehr Aktivität als eine Probe mit

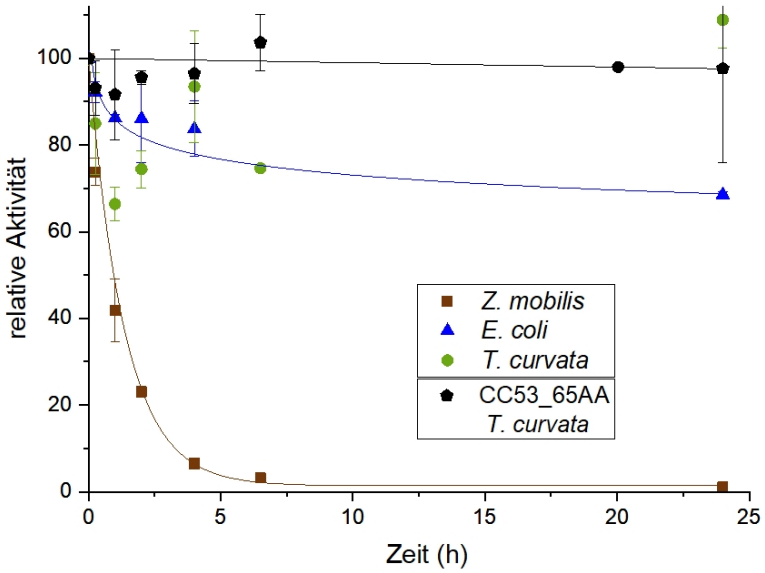


Abbildung 18: Aktivität der EDD aus verschiedenen Organismen und der Mutante CC53_63AA aus *T. curvata* über 24 h im Anaeroben bei ca. 24 °C; Anpassung *Z. mobilis*: $y = 98,64(\pm 0,49) * e^{-(x/1,34(\pm 0,04))} + 1,36(\pm 0,49)$; Anpassung *E. coli*: $y = 85,85(\pm 0,06) * x^{(-0,07(\pm 0,00))}$; Tendenz *T. curvata*: $y = (-0,1x) + 100$

geringerer Ausgangskonzentration. Dies liegt möglicherweise an einer konzentrationsabhängigen Multimerbildung des Enzyms. Dies wird auch in Kapitel 3.5.4 diskutiert.

Für die EDD aus *T. curvata* lässt sich beobachten, dass die Aktivität keine deutliche Abnahme zeigt. Sogar eine leichte Zunahme der Aktivität nach 5 bzw. 24 h wurde beobachtet. Diese Tendenz lässt sich mit mehreren Proben reproduzieren, sodass davon auszugehen ist, dass auch dieses Verhalten durch die zuvor erwähnte Multimerbildung zu begründen ist. Ein weiteres Indiz hierfür ist, dass analoge Experimente mit der CC53_63AA Mutante aus *T. curvata* , welche kaum Multimerbildung zeigt (siehe auch Kapitel 3.5.4), eine vergleichsweise konstante Aktivität von, mit nur sehr leichtem Aktivitätsverlust innerhalb der ersten Stunden, aufweisen. Leichte Schwankungen der Aktivität können durch den Zerfall von Clustern hervorgerufen werden. Ein solcher Cluster kann bis zu 4 Eisenionen für den Einbau in eventuell vorliegende [3Fe-4S]-Cluster bereitstellen und so die Aktivität erhöhen. Auch wurde, um die These der temperaturinduzierten Aktivitätsveränderung zu entkräften, eine genaue Überwachung sowohl der Probentemperatur als auch der Küvettentemperatur während des Experiments durchgeführt (Variationen von max. 0,5 °C). Der resultierende Graph entspricht dem hier dargestellten. In jedem Fall bestätigen die in Abbildung 18 dargestellten Ergebnisse, dass das Enzym aus *T. curvata* über mindestens 24 h stabil ist und es das stabilste der 3 verglichenen EDDs ist.

Ein weitere Bestätigung dieser These zeigt Abbildung 19, in welcher die Aktivität in aerober Umgebung dargestellt ist. In Tabelle 26 sind zusätzlich die durchschnittlichen Halbwertszeiten der Aktivität für beide Experimente gelistet. Im Aeroben verlieren die Enzyme aus *Z. mobilis* und *E. coli* ihre Aktivität sehr schnell, im Minutenbereich. Im

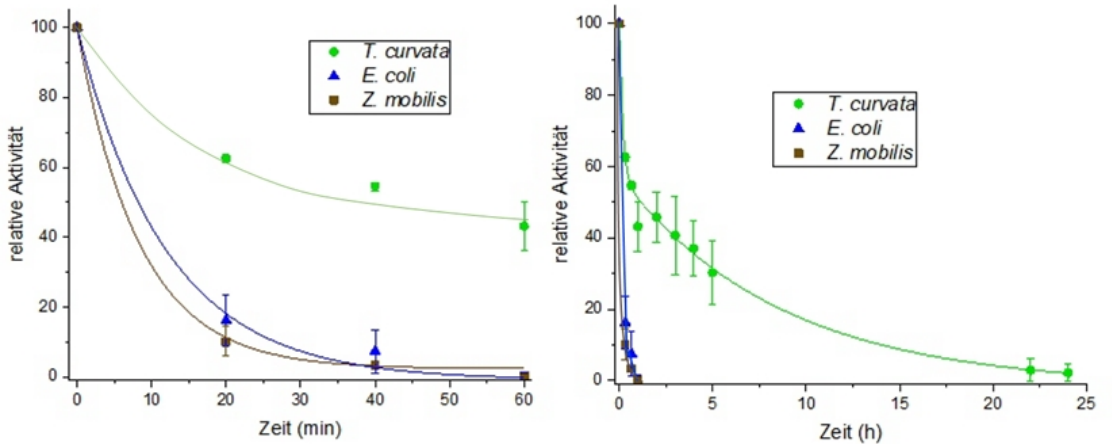


Abbildung 19: Aktivität in aerober Umgebung der EDD aus verschiedenen Organismen bei ca. 24 °C; Anpassung *E. coli*: $y = 100,8(\pm 1,5) * e^{-(x/12,0(\pm 2,4))} + 0,8(\pm 1,5)$; Anpassung *Z. mobilis*: $y = 97,6(\pm 1,0) * e^{-(x/8,4(\pm 1,6))} + 2,4(\pm 1,0)$; Anpassung *T. curvata* bis zu 1 h: $y = 47,6(\pm 0) * e^{-(x/0,2(\pm 0))} + 52,4(\pm 1,5)$; Anpassung *T. curvata* ab 1 h: $y = 60,4(\pm 1,4) * e^{-(x/8,0(\pm 0,9))} - 1,0(\pm 1,1)$

Gegensatz dazu kann für das Enzym aus *T. curvata* nach einer Stunde noch 50 % Aktivität beobachtet werden. Der Aktivitätsverlust zwischen 1 und 24 h erfolgt mit einer längeren Halbwertszeit: 32 % nach 5 Stunden und 5 % nach 24 Stunden. Möglicherweise wird dieses biphasische Verhalten durch die Multimerbildung verursacht.

Tabelle 26: Halbwertszeit der EDD aus verschiedenen Organismen aerob und anaerob bei ca. 24 °C; *: Halbwertszeit für die ersten 60 Minuten

	aerob (min)	**anaerob**
T. curvata	45 ± 2 *	7 Wochen
E. coli	12,0 ± 2,4	Tage
Z. mobilis	8,4 ± 1,6	1,3 h ± 0,05 h

Zusammenfassend sich hier, dass die Wahl der EDD aus *Thermomonospora curvata* sehr gut war und diese EDD wesentlich stabiler ist als die beiden anderen getesteten.

3.3.6 ESR-Spektroskopie

Die ESR-Spektren der 3 hier untersuchten EDDs zeigen für die reduzierten Proben eindeutige Signale für einen $[4Fe\text{-}4S]^{1+}$-Cluster, wie sie auch für die Aconitase zu finden sind (Abbildung 20) (163). Die *g*-Werte liegen für die EDD aus *E. coli* bei 2,035, 1,930 und 1,892, für die EDD aus *T. curvata* bei 2,031, 1,932 und 1,898. Für das Enzym aus *Z. mobilis* konnten *g*-Werte von 2,031, 1,932 und 1,903 festgestellt werden. Ein Vergleich der *g*-Werte zeigt die Ähnlichkeit der EDDs aus den drei Organismen.

Auch zeigen die Spektren hier, dass das Protein in seiner direkt isolierten Form oxidiert, also mit einem $[3Fe\text{-}4S]^{1+}$- oder $[4Fe\text{-}4S]^{2+}$-Cluster vorliegt (Abbildung 20).

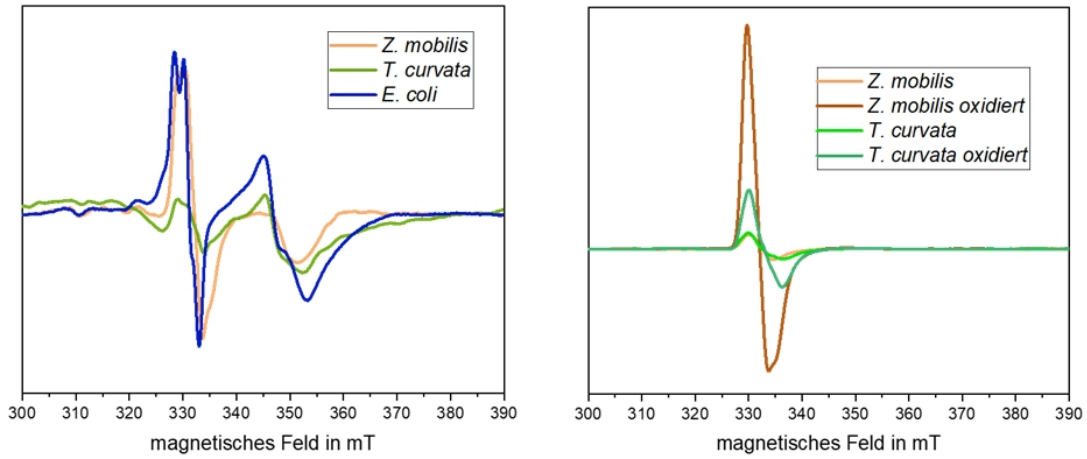


Abbildung 20: ESR-Spektren der EDD aus *T. curvata*, *Z. mobilis* und *E. coli* bei 10 K; Links: Spektren der dithionit-reduzierten Enzyme ($[4Fe\text{-}4S]^{1+}$); Rechts: Spektren der unbehandelten (as isolated) und oxidierten Enyzme ($[4Fe\text{-}4S]^{2+}$)

Vor allem nach Zugabe von Hexacyanoferrat(III) nimmt die Intensität des isotropen $[3Fe\text{-}4S]^{1+}$-Signals (g = 2,02) erheblich zu.

Auffallend sind die unterschiedlichen Intensitäten der Spektren. Diese kann nicht durch die Konzentration begründet werden, welche für alle Proben sehr ähnlich ist. Für die EDD aus *T. curvata* liegt diese beispielsweise 7,4 mg/ml, für die aus *Z. mobilis* bei 8,5 mg/ml. Eine Erklärung biete das vergleichsweise niedrige Reduktionspotential der EDD aus *T. curvata*, welches durch eine Redoxtitration nachgewiesen werden konnte. Es liegt nahe, dass in dieser Probe keine Reduktion aller aktiven Zentren erfolgt ist. Auch spielen unterschiedliche Anteile höherer Spinsysteme eine Rolle. Dies zeigt ein Blick auf Spektren, welche im Bereich von 20 bis 400 mT gefahren wurden. Diese zeigen im Bereich von 100 bis 150 mT Signale, die auf höhere Spinsysteme hindeuten. Vor allem für das Enzym aus *Z. mobilis* wurde solche Signale gefunden (siehe Abbildung 69).

3.3.7 Mößbauer-Spektroskopie

Für einen ^{57}-Fe-Einbau in den Cluster der EDD wurde diese aus auf ^{57}-Fe-Ammoniumeisencitrat gezüchteten *E. coli*-Zellen isoliert. So konnten für die EDD aus *E. coli* und *T. curvata* Mößbauerspektren aufgenommen werden. Diese sind in Abbildung 21 und 22 dargestellt. Auch hier zeigen sich im geringen Signal-Rausch-Verhältnis die Vorteile des Enzyms aus *T. curvata*.

Im Spektrum des Enzyms aus *E. coli* (Abbildung 21), welches bedingt durch das Signal-Rausch-Verhältnis mit nur einer Komponente angepasst werden kann, lassen sich die typischen Parameter eines $[4Fe\text{-}4S]^{2+}$-Clusters ablesen. Mit einer Isomerieverschiebung von 0,44 mm/s und einer Quadrupolaufspaltung von 1,15 mm/s liegt dieser als $[4Fe\text{-}4S]^{2+}$-Zentrum vor. Diese Zuordnung erfolgt durch einen Vergleich mit der Literatur (144).

Durch die wesentlich bessere Auflösung des Spektrums der EDD aus *T. curvata* im

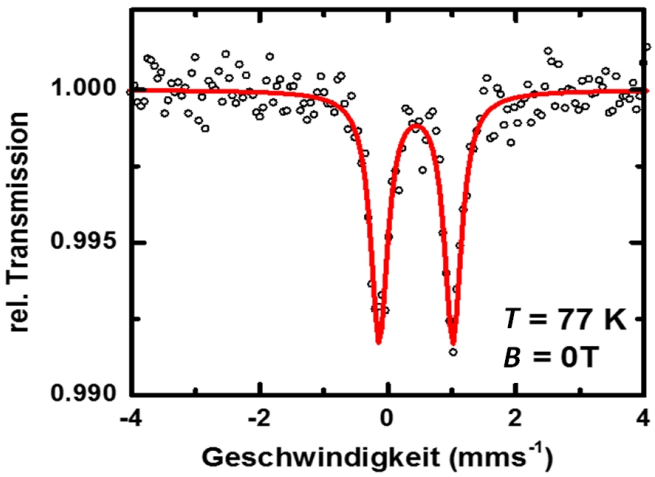


Abbildung 21: Mößbauerspektrum der EDD aus *E. coli*. Anpassung mit einer Komponente; Parameter siehe Tabelle 27

Vergleich zu der aus *E. coli* lassen sich hier verschiedene Eisen-Ionen des Clusters unterscheiden. Bei Komponente 3 (Abbildung 22) handelt es sich vermutlich um high-spin Fe^{3+} ($S = 5/2$) (115). Dieses könnte beispielsweise in einem $[2Fe\text{-}2S]^{2+}$-Cluster vorliegen, welcher als Abbauprodukt analog auch für andere [4Fe-4S]-Cluster beschrieben wurde (72). Die Isomerieverschiebung sowie die Quadrupolaufspaltung sind typisch für diesen (144). Weitere Hinweise hierauf kann auch die ESR-Spektroskopie leider nicht liefern, wobei hier zu bedenken ist, dass der Cluster für eine Untersuchung reduziert werden muss und so möglicherweise weiter zerfällt. Für die genauere Bestimmung der Komponente 3 wurden weiterhin Charakterisierungen im externen Magnetfeld vorgenommen, welche jedoch keine eindeutige Zuordnung ermöglichen, da diese sowohl paramagnetisch als auch diamagnetisch angepasst werden können. Sie sind in Abbildung 70 und Tabelle 42 dargestellt.

Die beiden Komponenten 1 und 2 der Abbildung 22 liegen zueinander in einem Verhältnis von 3 zu 1 vor. Unter der Annahme eines [4Fe-4S]-Clusters (welcher durch andere Experimente nachgewiesen wurde) kann somit davon ausgegangen werden, dass drei Eisenionen ein ähnliches Verhalten aufweisen, während die Umgebung eines Eisenions abweichend ist. Aufgrund der Isomerieverschiebung sowie der Quadrupolaufspaltung kann beiden Spezies eine formale Ladung von 2,5+ zugeordnet werden (144). Die Unterschiede in der Quadrupolaufspaltung deuten darauf hin, dass das einzelne Eisenion sich in der Symmetrie seiner Ligandenumgebung von den anderen Eisenionen des Clusters unterscheidet. Unter Beachtung der für beide Spezies nahezu gleichen Isomerieverschiebung lässt sich schließen, dass die Ladungsdichte am Kern beider Spezies gleich ist. An dieser Stelle kann vermutet werden, dass Komponente 1, Spezies A, 3 Eisenionen im Cluster zugeordnet werden kann. Komponente 2, Spezies B, bildet die Bindestelle für das Substrat. Um Spezies B weiter zu charakterisieren, wurde wie in Kapitel 3.8.2 beschrieben eine selektive Anreicherung durchgeführt.

Tabelle 27: Parameter der Anpassung der Mößbauerspektren

E. coli

Parameter	Wert
δ (mm/s)	0,44 ± 0,01
ΔE_Q (mm/s)	1,15 ± 0,01
Γ (mm/s)	0,32 ± 0,01
Area (%)	100 ± 1
Zuordnung	$[4Fe\text{-}4S]^{2+}$

T. curvata

Parameter	1. Komponente Spezies A	2. Komponente Spezies B	3. Komponente
δ (mm/s)	0,45 ± 0,01	0,45 ± 0,02	0,35 ± 0,02
ΔE_Q (mm/s)	1,20 ± 0,02	1,29 ± 0,03	0,67 ± 0,03
Γ (mm/s)	0,37 ± 0,01	0,39 ± 0,02	0,39 ± 0,02
Area (%)	57 ± 2	19 ± 2	24 ± 2
Zuordnung	$Fe^{2,5+}$ in $[4Fe\text{-}4S]^{2+}$	$Fe^{2,5+}$ in $[4Fe\text{-}4S]^{2+}$	Fe^{3+}

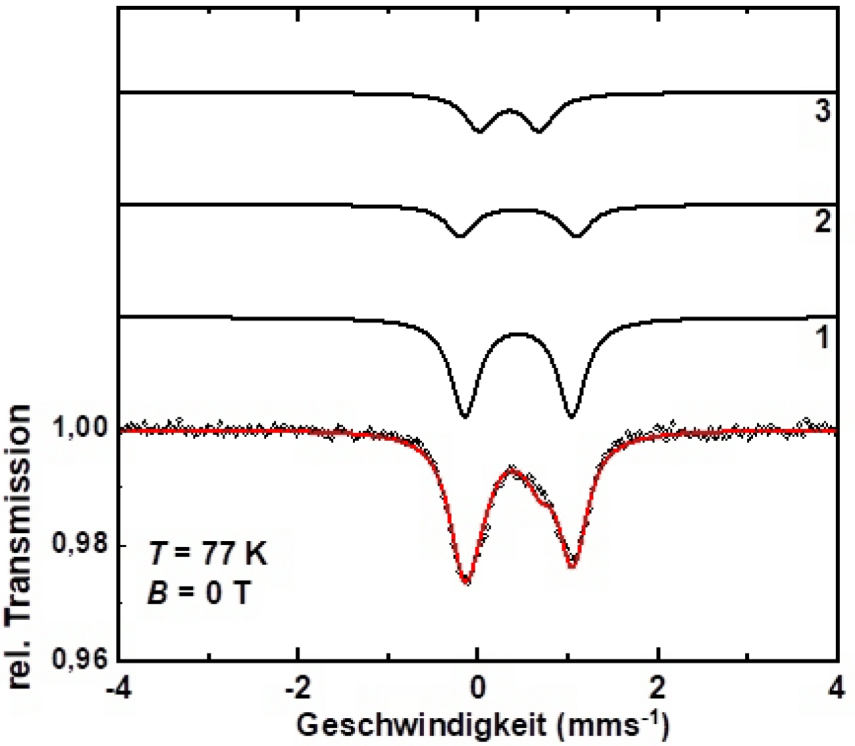


Abbildung 22: Mößbauerspektrum der EDD aus *T. curvata*. Anpassung mit drei Komponenten; Parameter siehe Tabelle 27

3.4 Charakterisierung der EDD aus Thermomonospora curvata

Da die EDD aus *Thermomonospora curvata* eine besondere Stabilität im Vergleich zu den anderen hier getesteten EDDs aufweist, wurde diese weiter untersucht, beispielsweise hinsichtlich ihres Temperatur- und pH-Wert-Optimums.

3.4.1 Stabilität der EDD aus Thermomonospora curvata

Für Kristallisationsexperimente ist es wichtig, dass die Proteine mehrere Wochen oder Monate auch bei Raumtemperatur stabil vorliegen. Dies wurde für die EDD aus *T. curvata* getestet und in Abbildung 23 dargestellt.

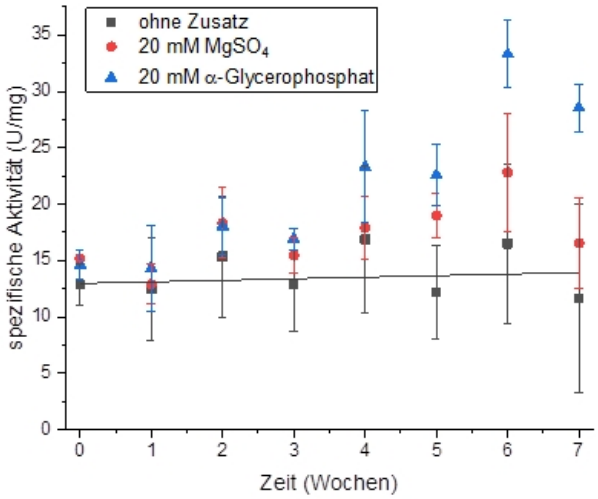


Abbildung 23: Aktivität der EDD aus *T. curvata* bei Inkubation im Anaeroben bei Raumtemperatur über mehrere Wochen

Das Enzym wurde auf 2,9 mg/ml mit 50 mM Tris-Puffer pH 7,5 verdünnt und bei Raumtemperatur (20 °C - 28 °C) im Anaeroben gelagert. Zusätzlich wurden zu einigen Proben 20 mM Mg^{2+} oder 20 mM α-Glycerophosphat (Substratanalogon) gegeben, da diese das Enzym stabilisieren sollten. Über 7 Wochen zeigt sich ein Unterschied der Aktivität, welcher vermutlich mit der Tagesdifferenz der Umgebungstemperatur zu begründen ist. Insgesamt lässt sich erkennen, dass die Aktivität des Enzyms ohne Zusatz über diesen Zeitraum im Durchschnitt gleich bleibt, das Enzym also mindestens 7 Wochen stabil ist und innerhalb dieses Zeitraums auch keine Aussage über eventuellen Aktivitätsverlust in einem längeren Zeitraum extrapoliert werden kann. Die Proben mit Zusätzen weisen während der ersten Wochen die gleiche Aktivität auf wie die Proben ohne Zusätze. Ab der 3. bzw. 4. Woche beginnen sie, sich auseinander zu entwickeln. Zum Ende der Messperiode hin zeigt sich eine deutlich höhere Aktivität der Proben mit α-Glycerophosphat und eine etwas höhere Aktivität der Proben mit Mg-Ionen. Beide verbessern also über längeren Zeitraum die Aktivität des Enzyms, sind für seine Aktivität aber nicht nötig. Für die Proben mit Mg-Ionen wurde allerdings nicht nachgewiesen,

dass der Effekt spezifisch von diesen herrührt und nicht von der generell erhöhten Ionenkonzentration in Lösung. Der These, dass eine hohe Konzentration Mg-Ionen für die Aktivität in der Lösung vorliegen müssen, kann durch dieses Experiment aber eindeutig widersprochen werden. Auch zeigt sich hier ganz deutlich, dass die auf bioinformatischen Grundlagen und auf der Basis des Temperaturoptimums des Organismus getroffene Entscheidung für das Enzym aus *T. curvata* richtig war.

3.4.2 Temperatur- und pH-Wert-Optimum der EDD aus Thermomonospora curvata

Zur Bestimmung des pH-Optimums der Katalyse durch EDD aus *T. curvata* wurde die Aktivitätsmessung in einer Reihe von GOOD-Puffern zwischen pH 5 und 9,5 durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 24 dargestellt. Die Aktivität des Enzyms erreicht ein Maximum zwischen pH 7,5 und 8, während sie zu höheren und niedrigeren pH-Werten hin abnimmt. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden alle weiteren Aktivitätsmessungen bei pH 7,5 durchgeführt.

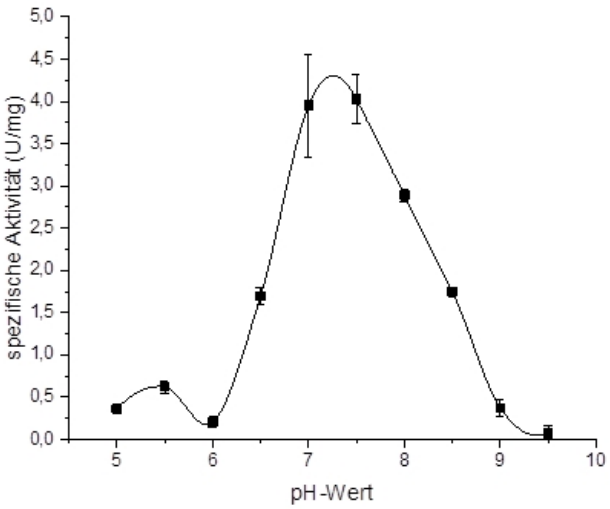


Abbildung 24: pH-Optimum der EDD aus *T. curvata* bei ca. 24 °C im Anaeroben

Um die Stabilität bei hohen bzw. niedrigen pH-Werten zu untersuchen wurde die EDD aus *T. curvata* bei den entsprechenden pH-Werten über eine in Abbildung 25 angegebene Zeitspanne inkubiert. Die anschließende Aktivitätsmessung wurde bei pH 7,5 durchgeführt. Bei pH 9,5 verliert das Enzym seine Aktivität sehr langsam irreversibel, mit einer ungefähren Halbwertszeit von 24 h, was auf eine Denaturierung des Enzyms oder einen permanenten Clusterverlust hindeutet.

Die Aktivität bei pH 6 fällt sehr schnell auf etwa die Hälfte ab, bleibt dann aber über den gesamten Messzeitraum konstant. Auch zeigt sich bei den Aktivitätsmessungen selbst, dass das Enzym eine längere *lag-time* hat. Es liegt also bei pH 6 weitestgehend inaktiv vor und kann bei anschließender pH-Wert-Anhebung auf pH 7,5 etwa die Hälfte der Aktivität, unabhängig von der Inkubationszeit bei pH = 6, zurück gewinnen, denaturiert

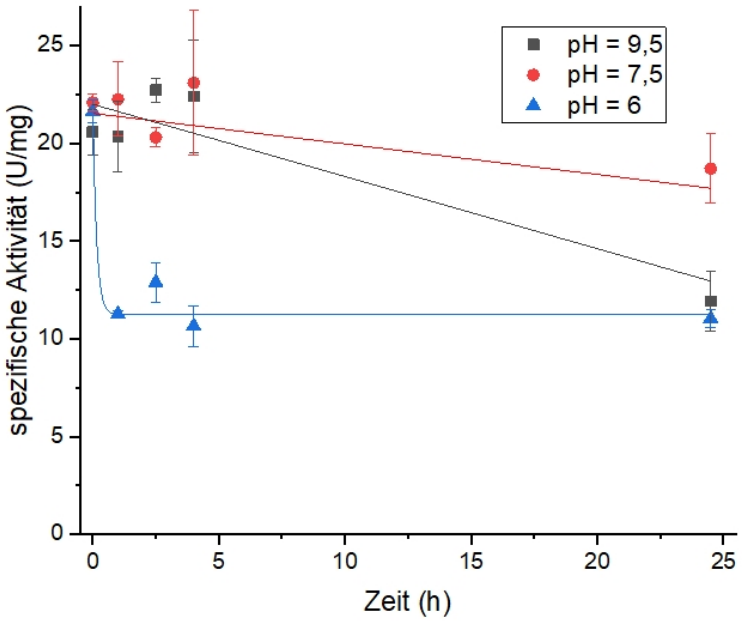


Abbildung 25: Stabilität der EDD aus *T. curvata* bei Inkubation bei pH 6 und 9,5 bei ca. 24 °C im Anaeroben; Anpassung für pH = 9,5: $y = -0,37(\pm 0,09)x + 22(\pm 0)$; Anpassung für pH = 7,5: $y = -0,16(\pm 0,10)x + 21,54(\pm 0,46)$; Anpassung für pH = 6: $y = 10,39(\pm 0,86) * e^{x/0,15(\pm 0,80)} + 11,24(\pm 0,47)$

also nicht vollständig.

Das Temperaturoptimum wurde durch einen Stop-Time-Assay der gekoppelten Enzyme bestimmt, da davon auszugehen ist, dass der Effekt von höheren Temperaturen auf die Kopplungsenzyme das Resultat verfälschen würde. Hierzu wurde die Reaktion der EDD bei der in Abbildung 26 angegebenen Temperatur über einen definierten Zeitraum durchgeführt, dann abgestoppt und im Anschluss die Kopplungsenzyme zugegeben. Da Temperaturen ab etwa 65 °C zur verstärkten Evaporation der Reaktionslösung führen, sind hier die Konzentrationen der Komponenten etwas verfälscht, was zu einer größeren Streuung der Aktivitätsmessungen führt. Trotzdem ist eine klare Tendenz zu erkennen. Das Temperaturoptimum der EDD aus *T. curvata* liegt zwischen 55 °C und 60 °C. In diesem Bereich ist die Aktivität der EDD etwa 6 Mal so hoch wie bei Raumtemperatur. Diese Ergebnisse korrelieren mit der optimalen Wachstumstemperatur des Bakteriums, welche bei 50 °C liegt.

Da das Temperaturoptimum in der der Nähe von 60 °C liegt, wurde zudem die Stabilität des Enzyms bei dieser Temperatur getestet (Abbildung 27). Hierzu wurde das Enzym bei 60 °C für die entsprechende Zeitspanne inkubiert, die Bestimmung fand bei ca. 24 °C statt. Es zeigt sich ein exponentieller Aktivitätsverlust mit einer Halbwertszeit von etwa 30 Minuten. Auch dies passt zu den typischen Wachstumstemperaturen des Bakteriums. Ein schwaches Wachstum kann bis 65 °C beobachtet werden. Mit einer Halbwertszeit von 30 min ist es dem Organismus unter erhöhtem Aufwand durchaus möglich, genug aktives Enzym für seinen Stoffwechsel bei 60 °C zur Verfügung zu stellen.

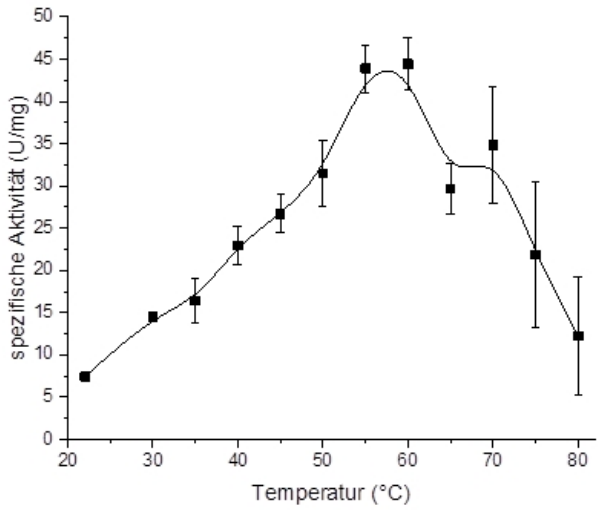


Abbildung 26: Temperaturoptimum der EDD aus *T. curvata* im Anaeroben

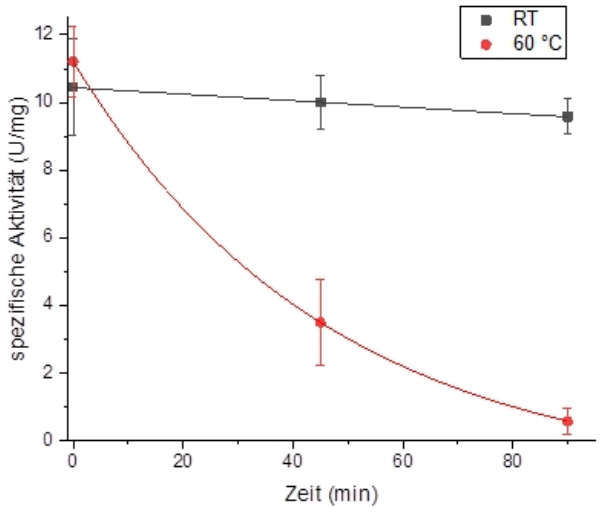


Abbildung 27: Stabilität der EDD aus *T. curvata* bei Inkubation bei 60 °C im Anaeroben

3.4.3 Relevanz von Mg^{2+}-Ionen für die Aktivität der EDD aus T. curvata

In der Literatur wird die Relevanz von Mg^{2+}-Ionen für die Aktivität und Stabilität von DHADs beschrieben (110) (167) (151) (29). Aus diesem Grund wurde hier die Aktivität der EDD aus *T. curvata* in Abhängigkeit der Mg^{2+}-Ionen-Konzentration im Reaktionspuffer bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 28 dargestellt.

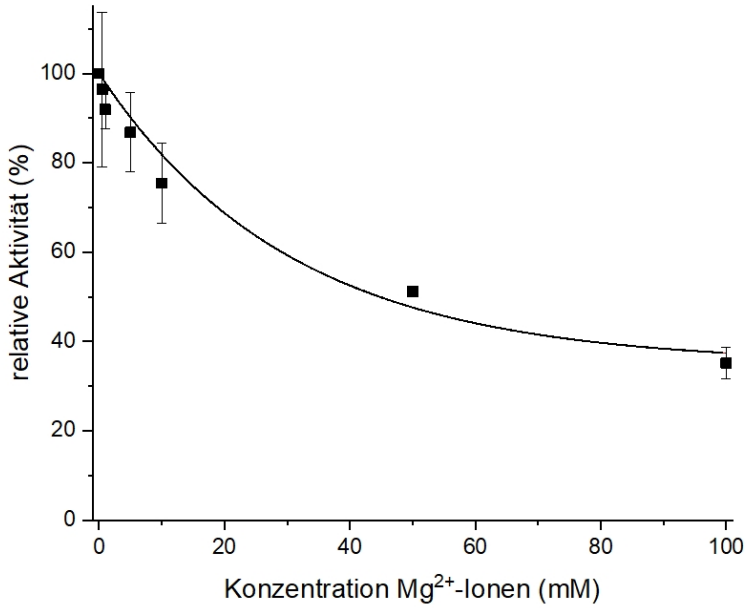


Abbildung 28: Aktivität der EDD aus *T. curvata* in Abhängigkeit der Mg^{2+}-Ionen-Konzentration im Reaktionspuffer bei ca. 24 °C im Anaeroben

Für die Aufreinigung der EDD wurde immer Medium mit 10 mM Mg^{2+}-Ionen verwendet, d. h. hier wurde nicht die Notwendigkeit des Einbaus von Mg^{2+}-Ionen in das Enzym getestet. Das Reaktionsmedium für die Aktivitätsmessung enthielt jedoch kein weiteres zugesetztes Magnesiumsalz. Das hier dargestellte Experiment wurde durchgeführt, um eine Verfälschung der Ergebnisse durch eine unterschiedliche Volumenzugabe des Enzyms auszuschließen, welches in seinem Puffer Mg^{2+}-Ionen enthält.

In Abbildung 28 zeigt sich, dass für die Aktivität keine Zugabe von Magnesiumsalzen zum Reaktionspuffer nötig ist. Viel mehr führt eine Zugabe von Mg^{2+}-Ionen zu einer Abnahme der Aktivität, also einer teilweisen Inhibition des Enzyms. Im Bereich bis zu 1 mM liegt die relative Aktivität im Vergleich zum Enzym ohne weitere Zusätze bei minimal 92 %. Dies entspricht dem Bereich der Mg^{2+}-Ionen-Konzentration, welche durch die Zugabe des Enzyms in seinem Puffer erreicht wird (zwischen 0,005 und 0,2 mM). Eine Verfälschung der Ergebnisse der Aktivitätsmessungen durch die Mg^{2+}-Ionen-Konzentration kann demzufolge ausgeschlossen werden. Eine Zugabe von Magnesiumsalzen zum Reaktionspuffer ist negativ zu bewerten.

3.5 Kristallisation von EDD

Ein homogener Kristall eines Proteins kann röntgenkristallographisch vermessen werden und so wichtige Daten zum 3D-Aufbau dieses liefern. Um einen homogenen Kristall zu

erhalten, ist zuvor jedoch die Optimierung der Aufreinigung des entsprechenden Proteins vonnöten. In den folgenden Kapiteln ist diese für die EDD aus *T. curvata* als das stabilste Enzym der hier untersuchten beschrieben. Zudem sind erste Ergebnisse der Kristallisationsexperimente dargestellt.

3.5.1 Aufreinigung mit anschließendem Verdau durch TEV-Protease

Große *Tags*, welche zu einer erleichterten Aufreinigung durch reversible Bindung der Zielproteine an Säulenmaterial führen, können die Kristallisation erschweren. Dies ist vor allem für His-*Tags*, welche eine sehr einseitige Ladungsverteilung aufweisen, bekannt, kann aber in Einzelfällen auch für Proteine mit Strep-*Tag* beobachtet werden. Aus diesem Grund wurde der *Tag* bei einigen Proben für die Kristallisation durch die TEV-Protease entfernt. Das Ergebnis zur Effektivität der TEV-Protease-Spaltung ist in diesem Kapitel beschrieben.

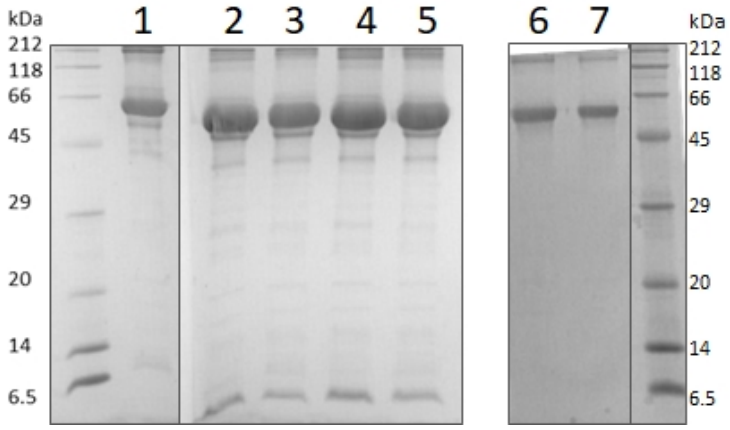


Abbildung 29: SDS-PAGE nach Inkubation der EDD aus *T. curvata* mit TEV-Protease. Spur 1: EDD vor Inkubation mit TEV-Protease; Spur 2 - 5: Variation des Puffersystems und der TEV-Proteasekonzentration, siehe Tabelle 15; Spur 6 und 7: EDD nach Abspaltung des Strep-*Tags* und Aufreinigung durch Größenausschlusschromatographie, 5 µg und 1 µg

In Abbildung 29 ist links die Optimierung des Verdaus mit TEV-Protease wie in Kapitel 2.9.3 beschrieben dargestellt. In der 1. Spur wurde ungeschnittene EDD als Referenz aufgetragen, Spur 2 bis 5 zeigen die in Tabelle 15 im Methodenteil beschriebenen Experimente. Alle 6 Spuren (inklusive Marker wurden im gleichen Gel aufgetragen, sind jedoch wegen der Übersichtlichkeit hier zusammen geschnitten dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass das EDD-Fragment in allen 4 Fällen im Vergleich zur isolierten EDD kleiner wird. Auch kann man das Strep-*Tag*-Fragment am unteren Ende des Gels in allen 4 Fällen erkennen. Dieses liegt rechnerisch bei 4,5 kDa.

Auf der rechten Seite der Abbildung ist die EDD nach dem Verdau und anschließender Aufreinigung durch Größenausschlusschromatographie aufgetragen. In Spur 6 sind dies 5 µg, in Spur 7 1 µg. Die erfolgreiche Abtrennung vom *Tag*-Fragment lässt sich hier deutlich erkennen.

Insgesamt war die Abtrennung des Strep-*Tags* durch einen Verdau mit TEV-Protease

und die anschließende Aufreinigung erfolgreich. Gleichzeitig wurde hierbei aber auch ein Verlust von Protein verzeichnet. Von der eingesetzten Proteinmenge wurden nur 63 % nach Größenausschlusschromatographie isoliert. Hierbei wurden 7 % durch die TEV-Protease abgespalten und 30 % sind tatsächlicher Verlust.

3.5.2 Aufreinigung mit Heparin-Säule

Obwohl die Abspaltung des *Tags* durch die TEV-Protease erfolgreich war, erfordert dies natürlich einen zusätzlichen Aufreinigungsschritt und damit Ausbeute- oder sogar Clusterverlust. Um diese zu vermeiden, wurde die Aufreinigung durch reversible Bindung an eine Heparin-Säule, nach Expression der EDD aus *T. curvata* ohne *Tag*, getestet. Diese wurde bereits erfolgreich für andere Fe/S-Proteine wie das Apd1/Aim32-Homolog aus *T. curvata* durchgeführt (37).

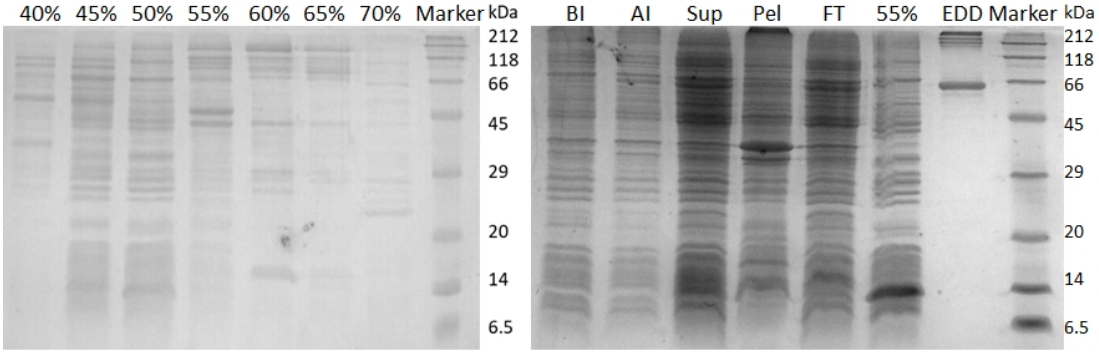


Abbildung 30: SDS-PAGE zur Aufreinigung der EDD aus *T. curvata* ohne *Tag* mit Heparin-Säule. Links: prozentualer Anteil eines 1 M NaCl-Puffers bei Entnahme der Fraktion während der Elution; rechts: SDS-PAGE der Aufreinigung (BI: Vor Induktion, AI: Nach Induktion, Sup: Überstand, Pel: Pellet, FT: Durchfluss, 55 %: Fraktion analog des Gels links zum Vergleich, EDD: Referenz aus anderer Aufreinigung

Eluiert wird die Heparin-Säule durch Erhöhung der Salzkonzentration. Dies wurde praktisch durch einen immer größer werdenden Anteil eines Puffers mit 1 M NaCl realisiert. Die Elutionsfraktionen, welche mit den verschiedenen Salzanteilen erhalten wurden, sind in Abbildung 30 links aufgetragen. Es zeigt sich, dass keine Fraktion deutliche Mengen von EDD enthält, was auf der Höhe von etwa 66 kDa zu sehen wäre. Ein Blick auf das SDS-PAGE-Gel auf der rechten Seite der Abbildung, welches den Verlauf der Aufreinigung abbildet, zeigt, dass EDD durchaus nach Induktion produziert wurde. Auch lässt sich die entsprechende Bande im Überstand und im Durchfluss wieder finden. Diese Ergebnisse führen zu der Schussfolgerung, dass EDD nicht in ausreichendem Maße an die Heparin-Säule bindet und somit eine Aufreinigung der nicht-getagten EDD aus *T. curvata* auf diese Weise nicht möglich ist.

Um diese Ergebnisse weiter zu untermauern, wurde von jeder Elutionsfraktion ein UV/Vis-Spektrum aufgenommen (hier nicht abgebildet). Es wurde keine Absorption bei 410 nm gefunden, welche auf ein Vorkommen eines [4Fe-4S]-Clusters in einer Fraktion hindeuten würde.

3.5.3 Aufreinigung durch Größenausschlusschromatographie

Für die weitere Aufreinigung der EDD im Anschluss an den Verdau mit TEV-Protease oder der Isolation des Enzyms auf Basis des Strep-*Tags* wurde eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt. Ein repräsentatives Chromatogramm für die EDD aus *E. coli* ist in Abbildung 31 dargestellt.

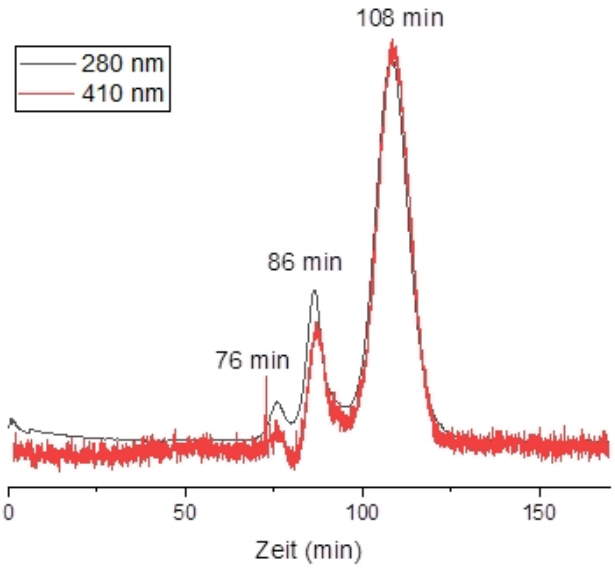


Abbildung 31: Elutionsprofil der Größenausschlusschromatographie der EDD aus *T. curvata*. Flussrate 1 ml/min, ohne Gradient

Den EDD-Peaks in Abbildung 31 kann aufgrund der Eichung mit BSA, Carboanhydrase und Cytochrom *c* eine Proteingröße von 160 kDa, 115 kDa und 56 kDa zugeordnet werden. Dies entspricht im Rahmen der Fehlertoleranz einem Trimer, Dimer und Monomer der EDD aus *T. curvata* mit Strep-*Tag*. Für diese liegt die errechnete Größe bei 68 kDa.

Die Peaks sind für die meisten Bedingungen symmetrisch, was darauf hindeutet, dass sich schon vor der Durchführung der Größenausschlusschromatographie diese Verteilung einstellt und kein Zerfall/keine Aggregation des Proteins während der Durchführung stattfindet. In Abhängigkeit der Bedingungen ist der Peak bei 76 min nicht immer zu sehen.

3.5.4 Optimierung der Größenausschlusschromatographie

Um zu testen, ob die Multimerbildung in einem Gleichgewicht geschieht, wurde der Hauptpeak des EDD-Monomers (bei 108 min in Abbildung 31) nach Lagerung bei -80 °C über Nacht erneut durch eine Größenausschlusschromatographie aufgetrennt. Es ergab sich erneut ein Chromatogramm, welches Abbildung 31 sehr ähnelt. Diese Inhomogenität erschwert die Kristallisation, weswegen nach einer Unterdrückung der Gleichge-

wichtseinstellung gesucht wurde.

Hierzu wurde jeweils eine Probe der EDD aus *T. curvata* zu bestimmten Bedingungen bzw. nach definierter Inkubation (siehe Tabelle 28) über eine Größenausschlusschromatographie aufgetrennt. Der Hauptpeak wurde dann, in der Regel nach Lagerung über Nacht bei -80 °C, erneut größenausschlusschromatographisch aufgetrennt. In Tabelle 28 ist der Anteil der Multimerpeaks (Integriert) in Relation zum Hauptpeak notiert, welcher aus der zweiten Auftrennung resultierte.

Tabelle 28: Optimierung der Bedingungen für die Größenausschlusschromatographie (ein Auszug): es wurden jeweils die Ergebnisse nach der 2. Größenausschlusschromatographie angegeben; Da die Ergebnisse auf dem Verhältnis von Integralen beruhen, kann es aufgrund der Integration zu einer Abweichung von bis zu 1,5 % kommen

Bedingungen	Anteil Multimer
Variation des pH-Wertes und Puffersystems	
pH 8 HEPES	12 %
pH 9 Tris	6 %
Variation des Umgangs mit dem Protein	
ohne Einfrieren, Lagerung bei ca. 23 °C im Anaeroben	14 %
Aufkonzentriert mit halber Zentrifugengeschwindigkeit	29 %
gekühltes Puffersystem	14 %
Variation der Zusätze	
α-Glycerophosphat 10-fache Enzymkonzentration	5 %
ohne Zusätze von Mg^{2+}-Ionen	5 %
DTT 1,7 mM	2 %
Mutanten	
C53A	11 %
C63A	10 %
C123A	5 %
C165A	7 %
C232A	9 %
CC53_63AA	3 %
ohne Cluster	
ca. 1 Eisen/Protein	1 %

Zunächst wurden Puffersysteme der Größenausschlusschromatographie variiert. Beispielsweise wurde HEPES pH 8 anstelle von Tris pH 8 verwendet. Auch wurde der pH-Wert variiert. Hier beispielhaft dargestellt zu pH 9. Beides brachte keine zufriedenstellende Verbesserung der Homogenität.

Im weiteren Verlauf wurden Behandlungen des Proteins unterlassen, welche zu einer Multimerbildung führen könnten. So wurde beispielsweise auf das Einfrieren verzichtet und das Protein, falls dies nötig wurde, bei ca. 23 °C über Nacht im Anaeroben gelagert. Auch wurde die These überprüft, dass durch das Aufkonzentrieren der Probe und die dadurch partiell erhöhte Konzentration eine vermehrte Multimerbildung statt findet. Dies konnte durch schonenderes Aufkonzentrieren bei 4500*g entkräftet werden. Viel mehr scheint es, dass nach diesen Ergebnissen die Dauer der Zentrifugation eine Rolle

spielen könnte, dies jedoch auch nicht ausreichend, um eine zufriedenstellende Verbesserung zu erreichen. In der Regel wurde alle Größenausschlusschromatographien bei ca. 24 °C durchgeführt, da in Kapitel 3.4.1 nachgewiesen wurde, dass das Enzym stabil ist. Für die Optimierung der Auftrennung wurde diese hier auch mit eisgekühltem Puffer getestet. Auch dieses Ergebnis war negativ.

Weiterhin wurden einige Zusätze zum Puffersystem getestet. Hier seien beispielsweise das α-Glycerophosphat erwähnt, welches als Substratanalogon gilt und somit zu einer Verschiebung des Gleichgewichts führen könnte. Auch wurde getestet, den Zusatz von Mg^{2+}-Ionen zum Puffer zu unterlassen. Um den Effekt von milden Reduktionsmitteln (also solche, die nicht den Cluster reduzieren) zu untersuchen, wurde DTT in einem Versuch zugesetzt. Alle drei Zusätze führten zu einer leichten Verschiebung des Gleichgewichtes in Richtung des Monomers. Besonders auffällig war hierbei der Effekt von DTT im Vergleich zu Proben, welche einer Variation der Handhabung unterzogen wurden. Dieser Effekt wurde auch mittels SDS-PAGE, bei der die Zugabe von Reduktionsmitteln sowie die Temperatur der Inkubation (95 °C bzw. 22 °C) variiert wurde, untersucht. In Abbildung 32 zeigt sich für alle Proben mit DTT keine Multimerbande, während diese bei anderen Bedingungen zu sehen ist. Die Bandenintensität, welche für die Proben ohne Multimerbande für den Monomer intensiver ist, passt zu dieser Interpreation. Die Temperatur der Inkubation spielt hier keine Rolle.

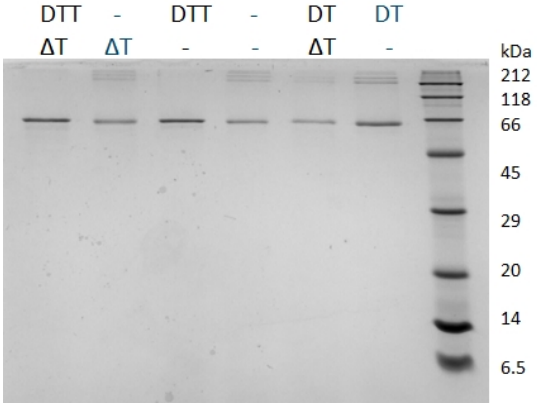


Abbildung 32: SDS-PAGE Variationen (reduziert/nicht reduziert mit DTT/DT und ohne/mit Hitzeschock)

Da DTT dafür bekannt ist, Disulfidbrücken zu reduzieren, wurden alle CxxxA-Mutanten, welche für die Suche nach den Clusterliganden (Kapitel 3.6) hergestellt wurden, untersucht. Auch eine Doppelmutante derjenigen Cysteine, welche nicht zur Clusterkoordination beitragen, in welcher nur noch die drei clusterkoordinierenden Cysteine vorliegen, wurde getestet. Es zeigt sich, dass die Doppelmutante eine Verschiebung des Gleichgewichts in Richtung des Hauptpeaks aufweist.

Aus diesem Grund wurde ein Augenmerk auf die Doppelmutante gelegt, welche auch nach der Durchführung von 2 Größenausschlusschromatographien an einer Probe keinen signifikanten Verlust des Clusters im Vergleich zum Wildtyp aufweist. Auf eine weitere Optimierung/Miteinbeziehung der oben beschriebenen Zusätze, wurde verzichtet, da ein Zusatz für die Kristallisation verschiedene Schwierigkeiten bedeutet. So werden die Kristallisationsbedingungen vor allem auch durch Zusätze und Verdünnung des Ur-

sprungspuffers realisiert. Dies kann zum Verlust des ursprünglichen Effekts des Zusatzes führen.

Auch wurde für eine Unterbindung der Multimerbildung zur Homogenisierung der Probe eine Zugabe von EDTA getestet. Da dieses auch bekannt ist für die Komplexierung von Eisen aus dem Eisen-Schwefel-Cluster, wurde mit geringen Konzentrationen von 0,2 mM gearbeitet. Bereits diese Konzentration führte zum Verlust der Aktivität und der charakteristischen Braunfärbung mit einer Halbwertszeit von etwa 20 h. Die Zugabe von EDTA ist aus diesem Grund nicht für die Kristallisation geeignet und auf Tests zur Multimerbildung mittels Größenausschlusschromatographie wurde verzichtet.

3.5.5 Kristallisationsexperimente

Kristallisationsexperimente von EDD aus *Z. mobilis* und *T. curvata* als Wild-Typ-Protein ergaben bis zur Veröffentlichung dieser Arbeit keine Resultate. Auch das Entfernen des Strep-*Tags* von der EDD aus *T. curvata* durch die TEV-Protease führte zu keiner Kristallisation.

Durch die Verwendung der EDD CC53_63AA mit Strep-*Tag* für die Kristallisation konnten erstmals „Vorkristalle“ erhalten werden (Beispiel siehe Abbildung 33). Diese sind zu klein, bzw. zu unregelmäßig, um sie mittels Röntgenstrukturanalyse zu analysieren. Sie geben aber eindeutige Hinweise, welche Bedingungen für weitere Kristallisationsexperimente zu optimieren sind.

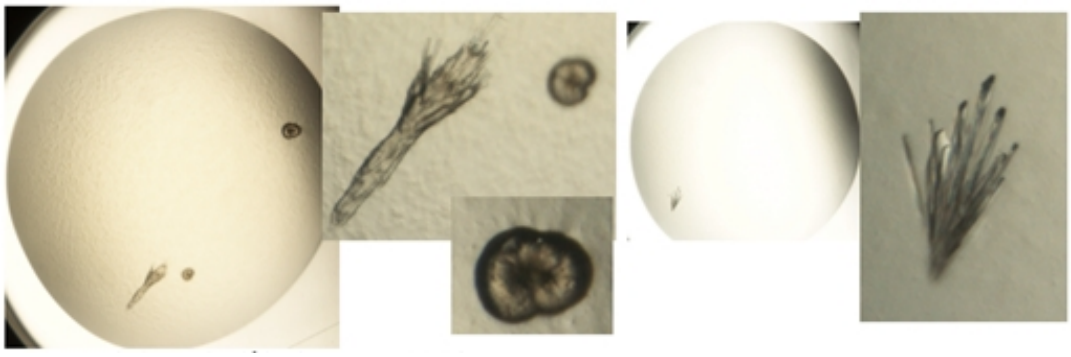


Abbildung 33: Erste Kristalle der EDD CC53_63AA aus *T. curvata*

Bedingungen, die einigen Proben, in welchen sich Kristalle gebildet haben, gemein sind, sind 0,2 M Calciumchlorid in 0,1 M Tris oder HEPES Puffer pH 7,5 - 8 und 44 % bis 53 % PEG 400. Weitere mögliche Bedingungen, bei denen sich erste Erfolge verzeichnen lassen, sind 0,2 M Magnesiumformat Dehydrat, 50 mM Tris pH 8 und 19 % PEG 3350.

Es zeigt sich, dass die Optimierung der Aufreinigungsbedingungen sehr sinnvoll war. Die hieraus gewonnene Mutante CC53_63AA bildet einen guten Ausgangspunkt für weitere Experimente.

3.6 Detektion der Cluster-Liganden

Die typischen Liganden eines [4Fe-4S]-Clusters sind Cysteine. Aus diesem Grund wurde für die Suche nach den Clusterliganden bei diesen begonnen. Wie aus Abbildung 40 hervorgeht, enthält die EDD aus *T. curvata* 5 Cysteine. Diese wurden durch Mutagenese

einzeln durch ein Alanin ersetzt, sodass folgende Mutanten entstanden: C53A, C63A, C123A, C165A, C232A. Des Weiteren wurde die Doppelmutante CC53_63AA hergestellt (Relevanz siehe oben).

3.6.1 Aktivitätsmessungen

Um den Clustereinbau in den Mutaten zu überprüfen wurde die Aktivität der jeweiligen Aufreinigungen gemessen. Dies ist in Abbildung 34 dargestellt.

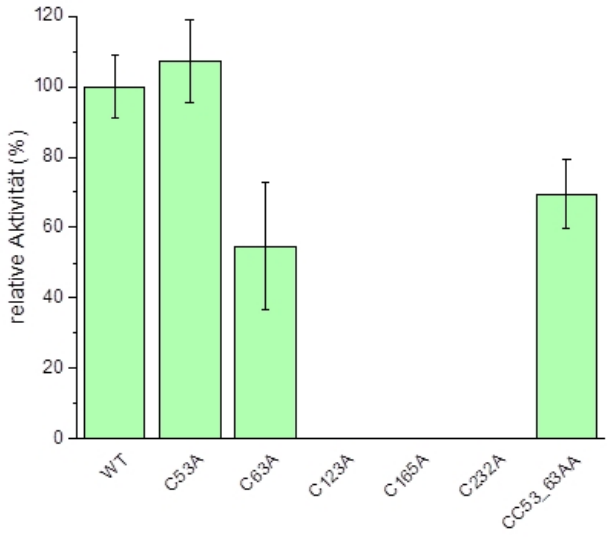


Abbildung 34: Aktivität der Mutanten im Zellextrakt zur Clusterligandenbestimmung

Die Mutante C53A weist eine nur leicht höhere Aktivität als der Wildtyp auf, welche allerdings im Rahmen der Messungenauigkeit liegt. Die Mutante C63A und die Doppelmutante CC53_63AA haben etwa die halbe Aktivität des Wildtyps. Im Gegensatz dazu liegt die Aktivität der Mutanten C123A, C165A und C232A bei unter 1 % der Aktivität des Wildtyps. Dies deutet darauf hin, dass diese drei Aminosäuren den Eisen-Schwefel-Cluster koordinieren. Um diese These weiter zu untermauern, wurden im Folgenden der Eisengehalt bestimmt und weitere spektroskopische Methoden angewandt.

3.6.2 Charakterisierung der Cluster-Ligand-Mutanten

Eine Bestimmung der pro 2 L Kultur isolierten Enzymmasse ergab für alle Mutanten einen Wert zwischen 7 und 9 mg (Tabelle 29). Für die Mutanten C53A und C63A sowie die Doppelmutante CC53_63AA wurde der Eisengehalt pro Protein auf über 3 bestimmt, was mit den Ergebnissen der Aktivitätsmessungen korreliert. Weiterhin ergab sich für die Mutanten C165A und C232A wie erwartet ein relativ niedriger Eisengehalt pro Protein (1,9 und 2,3). Dies bestätigt die Vermutung, dass es sich bei diesen beiden Aminosäuren um die clusterkoordinierenden handelt. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass der [4Fe-4S]-Cluster zu einem [2Fe-2S]-Cluster degradiert wird, sobald ihm einer dieser Liganden fehlt bzw. der Cluster so labil ist, dass lediglich die Hälfte der Protei-

ne zum Zeitpunkt der Bestimmung einen [4Fe-4S]-Cluster koordiniert. Nicht bestimmen lässt sich dies für die Aminosäure C123. Bei der entsprechenden Mutante liegt der Eisengehalt pro Protein bei 3,7. Dies kann daran liegen, dass die Aminosäure C123 kein Clusterligand ist, es kann aber auch darauf hindeuten, dass andere Aminosäuren deren Aufgabe übernehmen.

Tabelle 29: Isolierte Proteinmenge und Eisengehalt der CxxxA-Mutanten (dargestellt ist der Mittelwert aus je drei Aufreinigungen)

Mutante	Protein pro 2 L Kultur (mg)	Eisen pro Protein
C53A	8 ± 2,3	3,6 ± 0,4
C63A	8 ± 1,9	3,3 ± 0,4
C123A	7 ± 0,7	3,7 ± 0,4
C165A	7 ± 1,4	1,9 ± 0,6
C232A	7 ± 2,1	2,3 ± 0,5
CC53_63AA	9 ± 2,2	3,8 ± 0,3

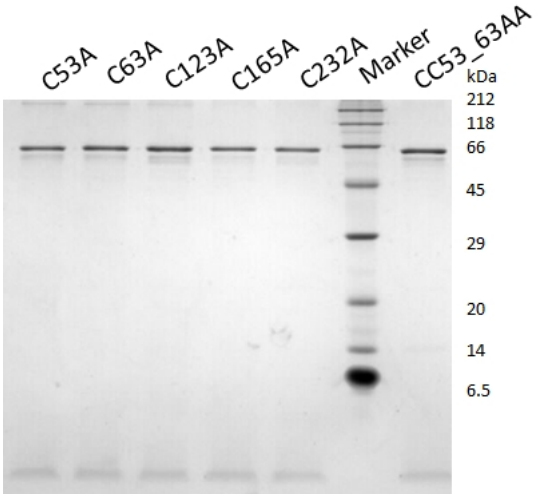
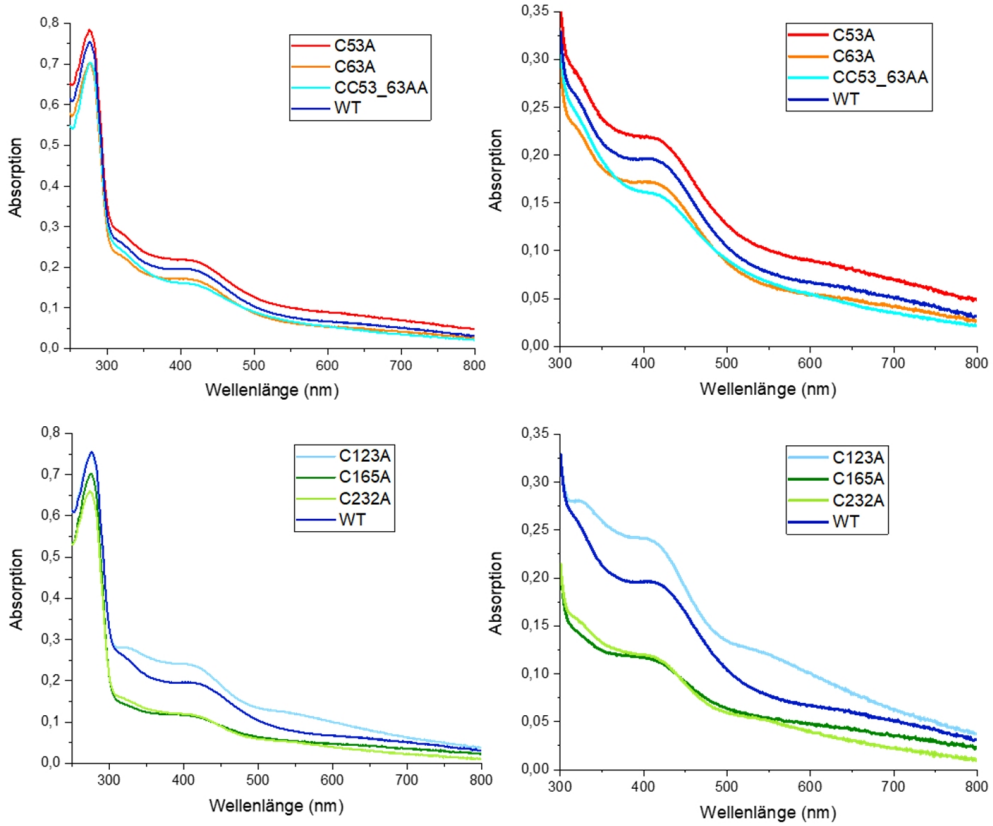


Abbildung 35: SDS-PAGE der CxxxA-Mutanten von EDD aus *T. curvata*

Zur weiteren Charakterisierung und Bestimmung der Reinheit wurden die Aufreinigungen aller Mutanten auf eine SDS-PAGE aufgetragen. Diese ist in Abbildung 35 zu sehen. Es zeigt sich, dass alle Mutanten stabil sind und die Größe der des Wildtyp-Enzyms entspricht (siehe auch Abbildung 16).

In Abbildung 36 sind die UV/Vis-Spektren der Mutanten dargestellt. Für die Mutanten C53A und C63A sowie die Doppelmutante CC53_63AA ist das Spektrum eines typischen [4Fe-4S]-Clusters zu sehen, was auch der Vergleich mit dem des Wildtyps zeigt. Die Spektren für die Mutanten C123A, C165A und C232A weichen von diesen ab und zeigen eher das Spektrum eines [2Fe-2S]-Cluster, was sich an dem zusätzlichen Peak bei etwa 550 nm erkennen lässt. Alle Mutanten lassen sich durch Dithionit reduzieren. Dies kann Abbildung 37 entnommen werden. Hier ist die relative Absorption nach der Reduktion durch Dithionit (2 min; 2 mM) dargestellt. Normiert wurde auf den Peak

bei 410 nm vor der Reduktion, sodass einer Absorption von 1 bei 410 nm der vor der Reduktion entspricht.



Mutante	C53A	C63A	C123A	C165A	C232A	CC53_63AA	WT
Verhältnis	0,259	0,246	0,331	0,246	0,187	0,282	0,274

Abbildung 36: UV/Vis-Spektren der CxxxA-Mutanten von EDD aus *T. curvata*; Tabelle: Verhältnis der Absorption bei 410 nm zu 280 nm der Mutanten zum Vergleich des Clustergehalts

Die Ergebnisse der Eisenbestimmung zusammen mit den UV/Vis-Spektren der Mutanten zeigen, dass C123, C165 und C232 den Cluster koordieren. Abweichungen im Eisengehalt lassen sich durch reversible Koordination des Clusters durch räumlich nahe, nicht-clusterligerende Aminosäuren erklären. Diese Cluster zerfallen dann während der Aufreinigung, was dazu führt, dass der experimentell bestimmte Eisengehalt höher ausfällt, als der tatsächliche im Protein. Um diese These zu untermauern, wurden die Mutanten auch mittels ESR Spektroskopie untersucht (Abbildung 38).

Die ESR-Spektren der reduzierten Proben bei 10 K zeigen für alle Mutanten, welche hier in gleicher Konzentration vorliegen, schwache Signale eines [4Fe-4S]-Clusters, wobei sich die Spektren der C123A-, C165A- und C232A-Mutanten von denen der C53A- und C63A-Mutanten sowie der Doppelmutante leicht unterscheiden. Ein Blick auf den Bereich von 50 bis 400 mT zeigt, dass vor allem für die C232A- und die C123A-Mutante Signale höherer Spinsysteme vorhanden sind.

Charakterisierung der reduzierten Proben bei 77 K (Abbildung 39) zeigt sehr schwache

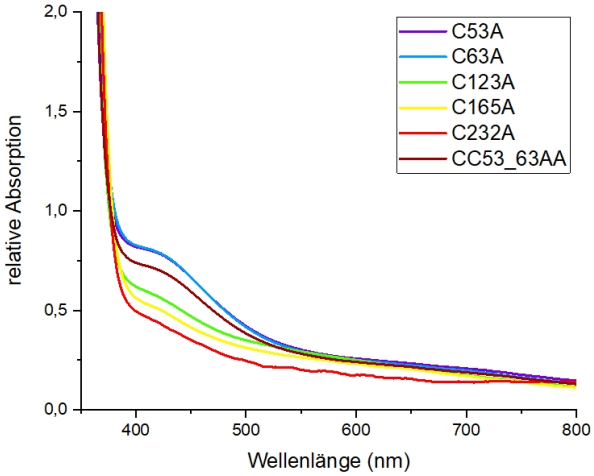


Abbildung 37: UV/Vis-Spektren der reduzierten CxxxA-Mutanten von EDD aus *T. curvata*; dargestellt ist die relative Absorption nach Inkubation mit 2 mM Dithionit; normiert auf den Peak bei 410 nm vor der Reduktion

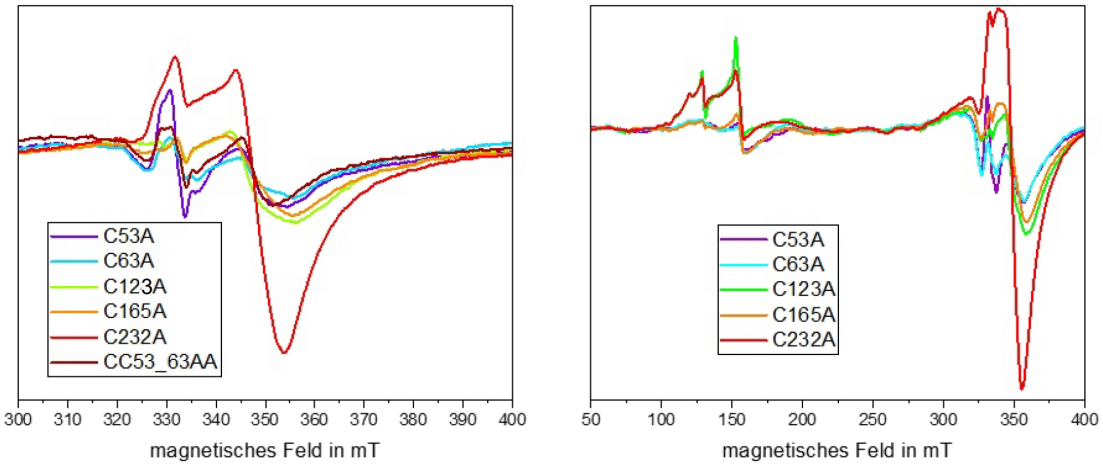


Abbildung 38: ESR-Spektrum der CxxxA-Mutanten von EDD aus *T. curvata* bei 10 K gemessen

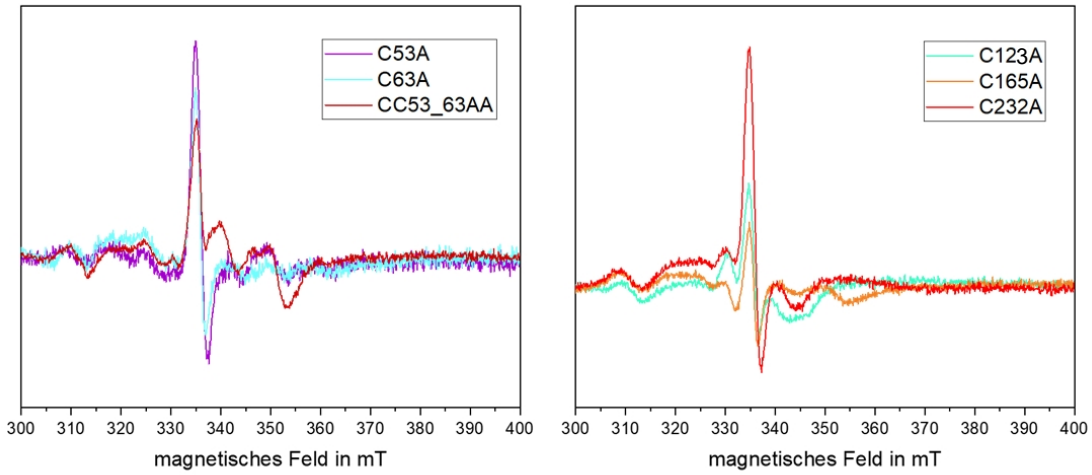


Abbildung 39: ESR-Spektrum der CxxxA-Mutanten von EDD aus *T. curvata* bei 77 K gemessen

Signale im typischen Bereich für [2Fe-2S]-Cluster. Diese treten aufgrund ihrer geringen Intensität nur sehr unspezifisch aus dem Rauschen des Spektrums hervor. Ein Vergleich mit ESR-Spektren von [2Fe-2S]-2,3-Dihydroxy-3-methyl/Isovalerat-Dehydratasen deutet darauf hin, dass dieser Clustertyp in keiner der Mutanten vorliegt (15). Demzufolge ist er kein stabiles Abbauprodukt des [4Fe-4S]-Clusters, sowohl im Fall des Austausches einer cluster-koordinierenden Aminosäure, als auch der nicht cluster-koordinierenden Cysteine.

3.7 Detektion der katalytischen Base

Zur Bestimmung der katalytischen Base wurden 18 infrage kommenden Aminosäuren zu Alanin mutiert und die Auswirkungen auf die Aktivität der Mutanten getestet.

3.7.1 Bioinformatische Grundlagen für die Auswahl der infrage kommenden Aminosäuren

Zur Suche geeigneter Aminosäuren wurden bioinformatische Analysen durchgeführt. Auf Basis der zu Beginn beschriebenen 386 EDD-Aminosäuresequenzen (Kapitel 3.1.2) wurde ein Alignment erstellt, um konservierte Aminosäuren zu identifizieren. Die Konserviertheit korreliert häufig mit der Relevanz für die Aktivität des Enzyms, so dass auf diese Weise mögliche katalytische Basen gefunden werden können. Dabei wurde das Augenmerk auf Serine, Histidine, Aspartate, Glutamate und Threonine gelegt, da diese in der Literatur als mögliche katalytische Basen beschrieben wurden (183) (61) (191). Berücksichtigt wurde auch, wenn die Aminosäure zwar nicht konserviert war, in jeder EDD aber eine Aminosäure mit den gleichen Eigenschaften an dieser Stelle vorhanden ist, wie beispielsweise ein Serin, das an der Stelle eines Threonins vorkommt.

Einen weiteren Anhaltspunkt gab auch die Visualisierung der EDD. Unter dem Namen 2GP4 ist die Kristallstruktur des Apoenzyms aus *Shewanella oneidensis* (136) in der

PDB (Proteindatenbank, rcsb.org, (34)) einsehbar. Obwohl hier nicht alle Aminosäuren sichtbar sind, gibt dies einen Anhaltspunkt, ob die durch das Alignment gewählten Aminosäuren auch in der Nähe des aktiven Zentrums liegen könnten.

Nach der Auswertung der Ergebnisse beider Methoden wurden die in Tabelle 30 gelisteten Aminosäuren mutiert. In der Aminosäuresequenz markiert sind sämtliche durch eine Mutation ausgetauschten Aminosäuren, inklusive derer für die Bestimmung der Clusterliganden in Abbildung 40, dargestellt. Hier sind auch die Ergebnisse des zu Beginn des Kapitels beschriebenen Alignments abgebildet.

```
MPPTLHPVVARVTERIAGRSAARRADYLARIADAGRGNERDGRVRPARTALGCAN   55
           :.  :  :*   *  ::                      .   .

LAHGFAACAPADKLALRGADAPNIAIVTAYNDMLSAHQPLKDYPDLLKRAIGQAG  110
 **  *      :          ..::.::*:*:***     :*  ::

GTAQVAGGVPAMCDGVTQGRAGMELSLFSRDVVAMATAVALAHDMFDGVLLLGVC  165
   ..*. . *****:***  **: :: **: :* .  :.*:*  ::    :*:*

DKIVPGLVIGALAFGHLPAILVPAGPMASGLPNAQKAKVRKLFAEGKATREELLE  220
***.**  :..  .. :   : *.* *  *  *  *   *     *      **

AEAASYHSPGTCTFYGTANSNQLLMEVMGLHLPGASFVPPGTALREALTLEAGRR  275
 *  .**  *****:****:**::.: :*.    ::*       *  .

ITELTALGGSYTPVGELLDERAFVNGVVALLATGGSTNHTLHLVAMAAAAGIELT  330
                   :  :*.   *  :*****  :*  * *   *  .

WDDFDELSAVTPLLTRLYPNGGADVNHFHAAGGTGFLIGELLEAGLLHADARTVG  385
  *   ::   * :   ****  *:* :   **   ..  *        :

GKTLDDYRVTPELGEEGELVWRPAPRDSADTSVLRPVADPFDTHGGLRTVSGNLG  440
   :                         .  :          **   :   :*

RAVVKVSAVDPAHRAVQAPARVFASQQELQEAFRAGELDGDVVVVVRHQGPRANG  495
 .  * *::        .   :                : . :  :  :*  :**

MPELHKLTPPLSVLQDRGHKVALVTDGRMSGASGSVLAAIHLSPEAAAGGPLARV  550
***** :   :  :      :.::****:***:*     ::  **    * :  :

RDGDLIRLDADEGVLQVLVPEEELAAREPAAAPGEQVGTGRELFAAFRRAVGPAE  605
  ** : .      :                         ** :*   *      :

RGAAVFTS
   *.
```

Abbildung 40: Aminosäuresequenz der EDD aus *T. curvata* mit Annotation der mutierten Aminosäuren; gelb hinterlegt: Alle Cysteine der Sequenz; grün hinterlegt: Aminosäuren, welche durch Mutation auf ihre Aktivität als katalytische Base getestet wurden; Unter jeder Aminosäure ist notiert, wie konserviert diese in einem Alignment von 386 EDDs ist.

3.7.2 Zellextraktaktivitätsmessung der Mutanten

Zunächst wurden Serine mutiert, da diese die typische katalytische Base der Enzymklasse sind. In Abbildung 41 ist die Aktivität dieser Zellextrakte dargestellt. Um sicher zu gehen, dass die Aktivität der EDD der Expressionszellen *E. coli* die Ergebnisse nicht verfälscht, wurden als Negativprobe Zellextrakte von Zellen mit Leerplasmid vermessen. Als Positivkontrolle dienten Zellen mit Wildtypenzym.

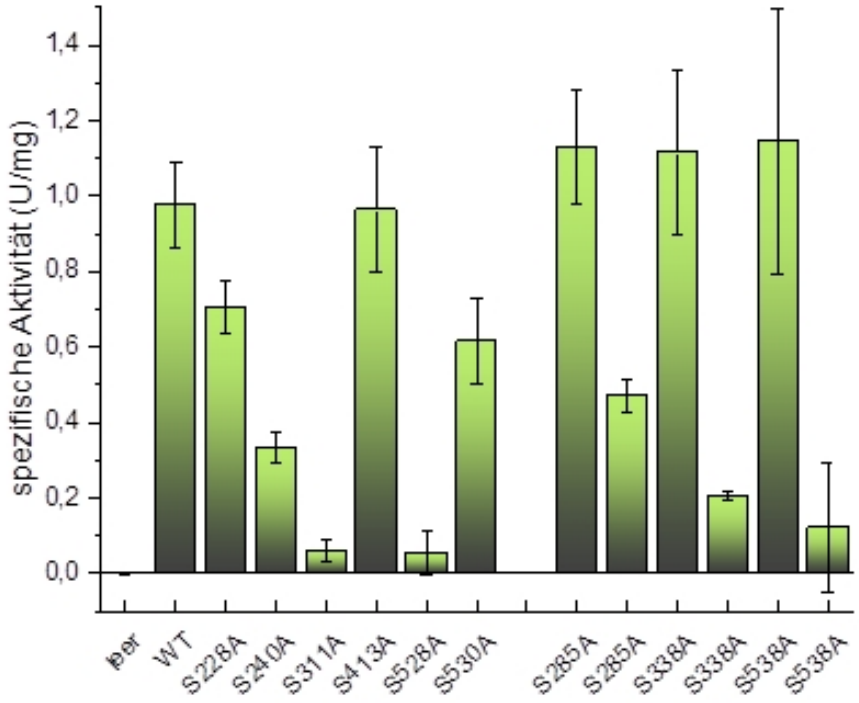


Abbildung 41: Aktivität der Zellextrakte verschiedener SxxxA-Mutanten der EDD aus *T. curvata*; links: Mittelwerte aus drei Isolationen; rechts: Mittelwert von drei Messungen des selben Zellextraktes

In Abbildung 41 sind links die Mittelwerte mehrerer verschiedener Zellextrakte der gleichen Mutante dargestellt. Für die Mutanten S285A, S338A und S538A war die Mittelung aufgrund der großen Aktivitätsunterschiede nicht sinnvoll. Aus diesem Grund sind hier für jede der drei Mutanten die Messungen zweier Zellextrakte dargestellt. Die große Diskrepanz zwischen den verschiedenen Experimenten wird vermutlich durch eine größere Instabilität des Clusters in den Mutanten im Vergleich zum Wildtypenzym hervorgerufen. Das Resultat des Experiments beeinflusst dies jedoch nicht. Da Aktivität gefunden werden konnte, ist davon auszugehen, dass keine dieser drei Serine die katalytische Base ist.

Eine wiederholt sehr schwache Aktivität weisen die Mutanten S311A und S528A auf. Aus diesem Grund wurden sie isoliert und genauer untersucht. Dies wurde auch direkt für die Mutante S525A, aufgrund der Bedeutung dieses Serins für die Katalyse anderer Enzyme der IlvD/EDD-Familie, durchgeführt (151). Die Ergebnisse sind in Kapitel 3.7.3 beschrieben.

Weiterhin wurden Mutanten weiterer Aminosäuren auf diese Weise untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 42 dargestellt. Analog der Experimente der Serin-Mutanten wurden auch hier Mutanten mit einem sehr labilen Eisen-Schwefel-Cluster gefunden, welche aufgrund der Begründung oben nicht weiter untersucht wurden. Dies trifft auf

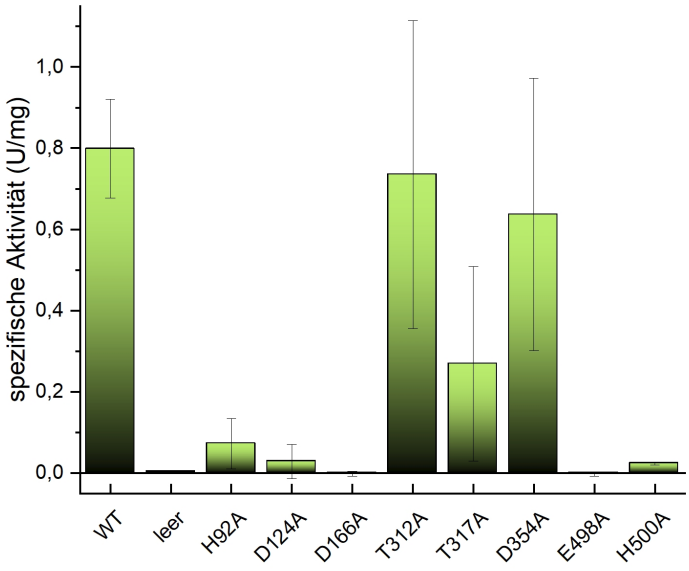


Abbildung 42: Aktivität der Zellextrakte weiterer Mutanten der EDD aus *T. curvata*

folgende Mutanten zu: H92A, T312A, T317A, D354A. Zur näheren Untersuchung wurden die Mutanten D124A, D166A, E498A und H500A aufgrund ihrer geringen Aktivität, unter 10 % der des Wildtyps, isoliert. Auch diese Ergebnisse sind im folgenden Kapitel beschrieben.

3.7.3 Charakterisierung der Mutanten

Mutanten, die im Zellextaktivitätsassay keine oder kaum Aktivität zeigten, wurden isoliert und weiter untersucht. Es gilt sicherzustellen, dass die Inaktivität durch die Mutation direkt verursacht wird und nicht etwa durch einen damit zusammenhängenden Verlust des Eisen-Schwefel-Clusters. Aus diesem Grund ist in Tabelle 30 für jede genauer untersuchte Mutante der Anteil an Eisen pro Protein angegeben. In allen untersuchten Fällen liegt der Anteil an Eisen pro Protein über 3, sodass von einem intakten [4Fe-4S]-Cluster in den Mutanten ausgegangen werden kann und die Inaktivität nicht durch den Clusterabbau verursacht wird.

Für alle Mutanten wurde die erfolgreiche Expression und Isolation zudem durch SDS-PAGE untermauert.

Es zeigt sich, dass die relative Aktivität der Mutanten (im Vergleich zu gereinigter Wildtyp-EDD) nach der Isolation dieser immer geringer ist als die im Zellextraktaktivitätsassay, was darauf hindeutet, dass der Verlust in den meisten Fällen durch die Instabilität des Proteins hervorgerufen wird. Möglicherweise sind diese Aminosäuren für die Stabilität der Faltung essentiell.

In Abbildung 43 sind beispielhaft Isolate verschiedener Mutanten abgebildet. Alle weisen unabhängig von ihrer Aktivität die typische braune Färbung der Fe/S-Cluster auf. Das Vorhandensein des intakten Eisen-Schwefel-Clusters kann auch durch UV/Vis-

Tabelle 30: Vergleich der Mutanten zur Suche der katalytischen Base. Die Aktivität wird in Relation zur Aktivität des Wildtypenzyms (EDD aus *T. curvata*) angegeben; Für das Alignment wurden 20 Aminosäuresequenzen verschiedener EDDs verwendet

Mutante	Aktivität in % im Zellextrakt	Alignment
H92A	4 -17	konserviert
S228A	72	teilweise konserviert
S240A	34	konserviert als S oder T
S285A	48 - 116	wenig konserviert
T312A	50 - 144	konserviert
H317A	3 - 63	konserviert
S338A	21 - 114	nahezu konserviert (einmal A)
D354A	32 - 111	konserviert
S413A	99	teilweise konserviert
S530A	63	nicht konserviert
S538A	13 - 117	konserviert als S oder T

Mutante	Aktivität in % des isolierten Proteins	Eisen pro Protein	Alignment
D124A	0 - 10	3,6	konserviert
D166A	0 - 0,5	4,2	konserviert
S311A	6	3,3	konserviert
E498A	0 - 0,5	3,8	konserviert
H500A	1,8 - 2,9	3,4	konserviert
S525A	59	3,4	konserviert
S528A	6	3	nahezu konserviert (einmal T)

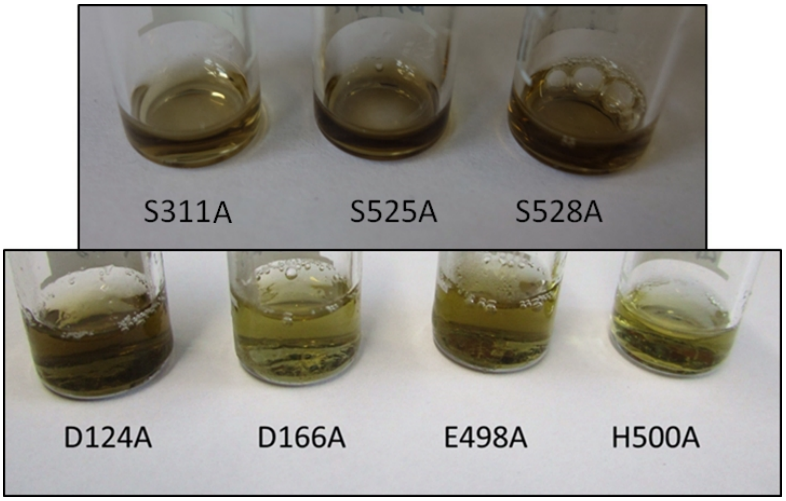
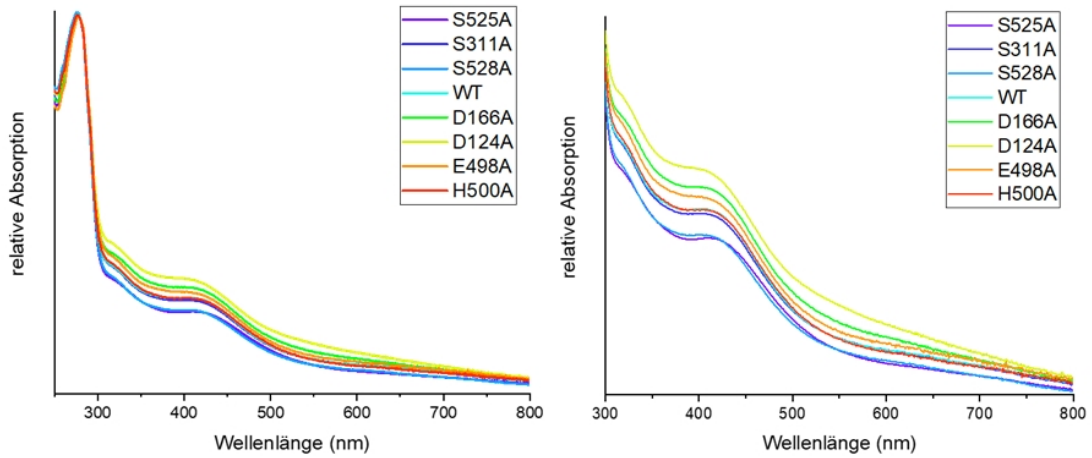


Abbildung 43: Visuelle Darstellung der Mutanten der möglichen katalytischen Basen

Spektroskopie nachgewiesen werden. Dies ist in Abbildung 44 für alle isolierten Mutanten dargestellt und untermauert die These, dass der Verlust der Aktivität nicht mit einem Clusterabbau einhergeht. Zur besseren Vergleichbarkeit der Spektren sind hier auch die jeweiligen Verhältnisse der Peaks bei 410 nm (Fe/S-Cluster) und 280 nm (Protein) gelistet.



Mutante	D124A	D166A	E198A	H500A
Verhältnis	0,289	0,285	0,272	0,246

Mutante	S525A	S311A	S528A	WT
Verhältnis	0,219	0,249	0,225	0,255

Abbildung 44: UV/Vis-Spektren der Mutanten der EDD aus *T. curvata* zur Suche der katalytischen Base; Tabelle: Verhältnis der Absorption bei 410 nm zu 280 nm der Mutanten zum Vergleich des Clustergehalts

Eine weitere Untersuchungsmethode der Mutanten stellt die ESR-Spektroskopie dar. In den Spektren in Abbildung 45 sind die ESR-Spektren für die mit Dithionit reduzierten Mutanten D124A, D166A, E498A und H500A bei 10 K dargestellt. Die Intensität der Signale des [4Fe-4S]$^{1+}$-Clusters variiert sehr stark, obwohl alle Proben die gleiche Konzentration haben. Eine mögliche Erklärung sind unterschiedliche Anteile höherer Spinsysteme in den jeweiligen Mutanten. Die erfolgreiche Reduktion der jeweiligen Cluster wurde über UV/Vis-Spektroskopie nachgewiesen.

Für die Mutanten S528A und S311A wurden zudem die Michaelis-Menten-Konstante sowie die maximale Geschwindigkeit bestimmt. K_M liegt für die S311A-Mutante bei $0{,}045 \pm 0{,}007$ mM und für die S528A-Mutante bei $0{,}009 \pm 0{,}002$ mM. Die maximale Geschwindigkeit für erstere liegt bei $1{,}68 \pm 0{,}06$ U/mg für die zweite bei $1{,}19 \pm 0{,}04$ U/mg. Somit ist die spezifische Aktivität für beide um mehr als 10-fach niedriger im Vergleich zum Wildtyp. Da für beide jedoch deutlich Aktivität gefunden werden konnte, sind die Aminosäuren S528 und S311 nicht die katalytische Base. Die Mutante S525A hat ebenfalls in ihrer isolierten Form Aktivität, kann also auch ausgeschlossen werden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Aminosäuren D124 und D166 essentiell für die katalytische Aktivität der EDD aus *Thermomonospora curvata* sind. Der Austausch der Aminosäure E498 führt zu einer äußerst geringen Aktivität.

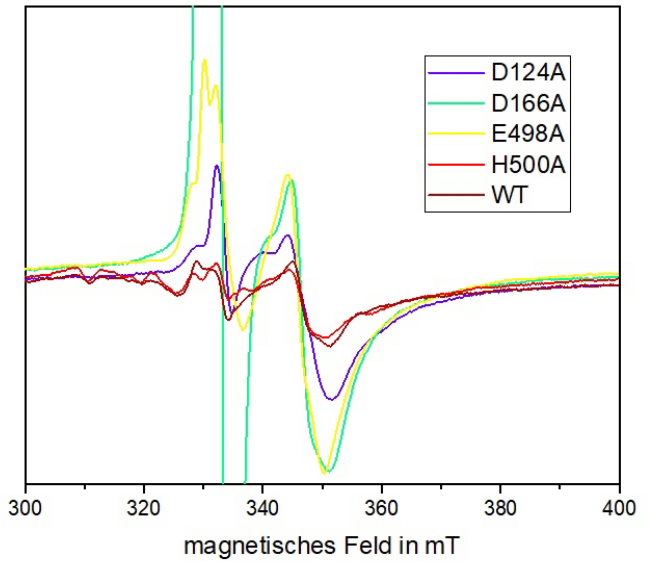


Abbildung 45: ESR-Spektren der reduzierten Mutanten der EDD aus *T. curvata* der möglichen katalytischen Basen bei 10 K

3.8 Analysen des aktiven Zentrums

3.8.1 Optimierung des selektiven Eiseneinbaus

Die Mößbauerspektroskopie ermöglicht durch seine spezielle Eigenschaft, nur das Isotop ^{57}Fe zu detektieren, eine sehr selektive Charakterisierung von einzelnen Clustern oder sogar einzelnen Positionen in einem Fe/S-Cluster. So kann beispielsweise nur an der Substratbindestelle das entsprechende Isotop eingebaut werden und damit die Umgebung dieses Eisenions genauer betrachtet werden. Um dies zu ermöglichen, waren allerdings Vorexperimente nötig, um den selektiven ^{57}Fe-Einbau zu optimieren. Zunächst wurde hierfür aus EDD mit einem intakten [4Fe-4S]-Cluster eine Ecke aus diesem entfernt. Dies ist möglich, da das Eisenion, das die Bindestelle für das Substrat bildet, wesentlich schwächer koordiniert ist. Analoge Experimente wurden bereits für die Aconitase aus dem Rinderherz durchgeführt (100).

In Abbildung 46 sind die ESR-Spektren der in Kapitel 2.8.4 beschriebenen Proben dargestellt. Detektiert wird hier ein [3Fe-4S]-Cluster in der oxidierten Form. Für alle Proben wurde die gleiche Konzentration des Enzyms eingesetzt. Durch die differenzierte Probenbehandlung ergeben sich natürlich Unterschiede in der resultierenden Konzentration, trotzdem ist klar ersichtlich, dass in allen Proben [3Fe-4S]-Cluster vorliegen. Für die durch Sauerstoff oxidierten Proben ist der Anteil allerdings so gering, dass die Methode direkt verworfen werden kann. Auch ist Sauerstoff schwierig zu dosieren, sodass das Experiment schwierig zu reproduzieren ist. Die Ergebnisse für eine Behandlung mit Kaliumhexacyanoferrat oder mit Natriumdithionit sind ähnlich. Ein Test der Aktivität zeigt nach Inkubation mit Kaliumhexacyanoferrat(III) (3 Äquivalente Enzymkonzentration) den nahezu vollständigen Verlust dieser. Auf Basis der ESR-Spektroskopie konnte zudem die [3Fe-4S]-Clusterbildung nachgewiesen werden. Dies führt zur Wahl dieser Methode für weitere Experimente.

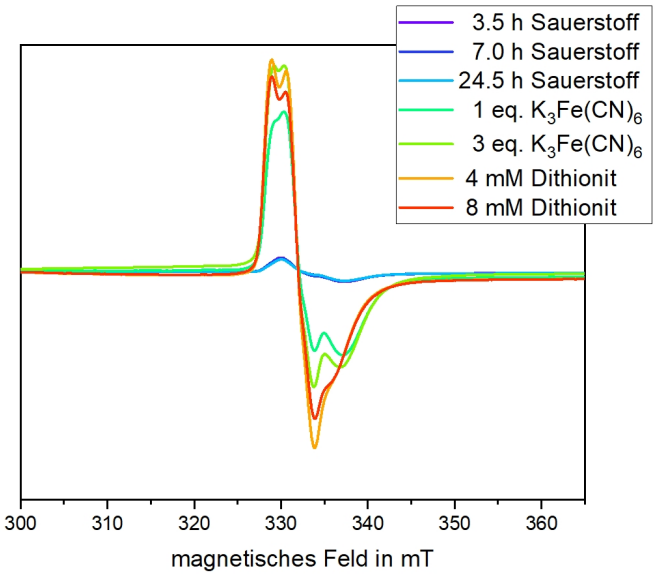


Abbildung 46: ESR-Spektren zur Überprüfung des selektiven Eisenausbaus; EDD aus *T. curvata*; Proben, welche mit Sauerstoff oder Kaliumhexacyanoferrat(III) behandelt wurden, wurden direkt vermessen; Proben, welche mit Dithionit behandelt wurden, wurden über eine PD10-Säule entsalzt und mit Kaliumhexacyanoferrat(III) oxidiert; genaue Zusammensetzung siehe Kapitel 2.8.4

Um den Wiedereinbau eines Eisenions zu realisieren, wurden verschiedene Varianten einer Inkubation mit DTT, anschließender Zugabe einer Ammoniumeisencitrat-Lösung und erneuter Inkubation getestet. In Tabelle 31 ist eine Auswahl der Resultate dargestellt. Im ersten Teil der Tabelle sind die Ergebnisse für eine unbehandelte EDD, d. h. ohne Behandlung mit Hexacyanoferrat(III) gelistet. Diese hatte zu Beginn der Experimente einen Eisengehalt von 3,4 pro Protein. Eine Inkubation mit ausschließlich Ammoniumeisencitrat für 60 min führte zu einer Verdopplung der Aktivität. Wurde nur mit DTT für 60 min inkubiert, konnte ein Verlust der Aktivität von etwa 33 % der Ursprungsaktivität beobachtet werden. Wurde zunächst eine halbe Stunde mit DTT inkubiert und dann Ammoniumeisencitrat zugegeben, konnte eine Verdreifachung der Aktivität schon nach 30 min beobachtet werden. Diese blieb bei weiterer Inkubation nahezu konstant. Die Erhöhung über 100 % der Aktivität hinaus lässt sich durch die geringe Startaktivität, welche bei 11 U/mg liegt, zumindest teilweise erklären. Dieser Wert liegt unter der in der Michaelis-Menten-Kinetik bestimmte Wert für die maximale Geschwindigkeit. Diese Experimente zeigen, dass die Kombination aus DTT und Ammoniumeisencitrat die Aktivität der EDD verbessert. Dies ist auf die Rekonstitution des [4Fe-4S]-Clusters zurückzuführen. Da sie ohne die Bereitstellung von Schwefel erfolgt, ist davon auszugehen, dass es sich lediglich um den Einbau eines Eisenions pro Cluster handelt.

In weiteren in Tabelle 31 dargestellten Experimenten wurde die Inkubationszeit mit DTT variiert und die Aktivität der Proben in Abhängigkeit von der Inkubationszeit mit Ammoniumeisencitrat vermessen. Für diese Proben wurde EDD verwendet, von welcher zuvor, durch die Inkubation mit Hexacyanoferrat(III), ein Eisen pro Protein entfernt

Tabelle 31: Experimente zum Vergleich des selektiven Eiseneinbaus; Die Konzentrationen des Eisens beziehen sich auf die Proteinkonzentration; 100 % Aktivität entspricht derer vor Beginn der Experimente (11 U/mg)

Experiment	DTT	Eisen	Inkubation (min)	relative Aktivität (%)
Aktivierung der EDD ohne vorherige Abspaltung eines Eisenions (2 mg/ml EDD)				
1	-	2 eq.	60	216
2	3,5 mM	-	60	67
3	3,5 mM	2 eq.	30	306
4	3,5 mM	2 eq.	45	288
5	3,5 mM	2 eq.	60	294
6	3,5 mM	2 eq.	70	272
Variation der Inkubationszeiten (23 µM EDD, 2,7 mM DTT, Auswahl der gemessenen Werte)				
7	0 min	2 eq.	0	5
8	30 min	2 eq.	30	62
9	30 min	2 eq.	60	105
10	30 min	2 eq.	90	109
11	0 min	2 eq.	0	7
12	40 min	2 eq.	30	109
13	40 min	2 eq.	60	141
14	40 min	2 eq.	90	172

wurde. Dies lässt sich an der Startaktivität feststellen, welche 5 % bzw. 7 % der Ursprungsaktivität beträgt. Dies belegt die Effektivität des selektiven Eisenausbaus, wie er oben beschrieben wurde. Eine längere Inkubation mit DTT von 40 min führt zu einer höheren Aktivität im Vergleich zu einer Inkubation von 30 min. Jedoch auch nach 30 min wird die ursprüngliche Aktivität wieder gewonnen. Es zeigt sich, dass für Probe 8 - 10 das Maximum nach 60 min nahezu erreicht ist, während für Probe 12 - 14 die Aktivität weiter zunimmt. Um die Möglichkeit auszuschließen, dass die anderen drei Eisenionen des Clusters im Zuge dieses Verfahrens ausgetauscht werden und somit für die Anwendung der Mößbauerspektroskopie zusätzlich gelabelt werden, wurde für weiterführende Experimente die kürzere Inkubationszeit verwendet.

Eine Variation der Ammoniumeisencitratkonzentration wurde ebenfalls getestet. Für eine Auswahl der getesteten Konzentrationen wurden Mößbauerproben angefertigt, welche zusammen mit ihrer Aktivität in Kapitel 3.8.2 dargestellt sind.

3.8.2 Mößbauerspektren des selektiven Eiseneinbaus

Um die optimale Konzentration von ^{57}Fe-Ionen für die Mößbauerspektroskopie zu bestimmen, wurden Proben analog des oben beschriebenen Vorgehens mit 0,5, 1, 1,5 und 10 Äquivalenten ^{57}Fe in Bezug auf die Proteinkonzentration inkubiert. Für alle Proben wurde die Aktivität bestimmt und bei 77 K ein Mößbauerspektrum aufgenommen. Die Spektren sind in Abbildung 47 dargestellt, die zugehörigen Parameter der Anpassung können Tabelle 32 entnommen werden.

Die Probe, welche mit einem halben Äquivalent Eisenionen inkubiert wurde, zeigt

Tabelle 32: Mößbauerparameter der Anpassung der Mößbauerspektren in Abhängigkeit von der Eisenionenkonzentration bei selektivem Eiseneinbau

Parameter	1.Komponente Spezies B	2.Komponente	3.Komponente	4.Komponente
0,5 Äquivalente ^{57}Fe				
δ (mm/s)	0,45 ± 0,05	-	-	-
ΔE_Q (mm/s)	1,29 ± 0,10	-	-	-
Γ (mm/s)	0,50 ± 0,05	-	-	-
1 Äquivalente ^{57}Fe				
δ (mm/s)	0,45 ± 0,05	1,14 ± 0,02	0,88 ± 0,02	-
ΔE_Q (mm/s)	1,29 ± 0,10	2,66 ± 0,03	3,42 ± 0,03	-
Γ (mm/s)	0,50 ± 0,05	0,29 ± 0,03	0,48 ± 0,03	-
Fläche (%)	79 ± 3	9 ± 3	12 ± 3	-
1,5 Äquivalente ^{57}Fe				
δ (mm/s)	0,45 ± 0,05	1,14 ± 0,02	0,88 ± 0,02	-
ΔE_Q (mm/s)	1,29 ± 0,10	2,66 ± 0,03	3,42 ± 0,03	-
Γ (mm/s)	0,50 ± 0,05	0,35 ± 0,03	0,49 ± 0,03	-
Fläche (%)	69 ± 3	6 ± 3	25 ± 3	-
10 Äquivalente ^{57}Fe				
δ (mm/s)	0,45 ± 0,03	1,1 ± 0,02	0,95 ± 0,02	0,35 ± 0,03
ΔE_Q (mm/s)	1,29 ± 0,05	4,03 ± 0,03	3,06 ± 0,03	0,67 ± 0,05
Γ (mm/s)	0,39 ± 0,03	0,41 ± 0,02	0,54 ± 0,02	0,4 ± 0,03
Fläche (%)	9 ± 3	11 ± 3	53 ± 3	27 ± 3
zum Vergleich Spezies B aus [4^{57}Fe-4S]-Cluster (siehe Tabelle 27)				
δ (mm/s)	0,45 ± 0,02			
ΔE_Q (mm/s)	1,29 ± 0,03			
Γ (mm/s)	0,39 ± 0,02			
Fläche (%)	19 ± 2			

nur ein Dublett, welches aufgrund seiner Parameter Eisen in einem [4Fe-4S]$^{2+}$-Cluster zugeordnet werden kann. In einer Negativprobe (ohne Enzym, 2,3 mM ^{57}Fe, entspricht etwa 4 Äquivalenten), wurde zudem kein Dublett mit den gleichen Parametern gefunden, was darauf hinweist, dass ^{57}Fe in den Cluster der EDD eingebaut wurde und dies kein Artefakt darstellt. Die vergleichsweise große Linienbreite erklärt sich durch eine inhomogene Umgebung des Eisenzentrums. Es zeigt sich, dass der selektive Einbau von Eisen an einer Ecke des Clusters erfolgreich war, da im Vergleich zum komplett gelabelten Cluster nur eine Spezies, Spezies B, gefunden wurde (siehe auch Kapitel 3.3.7). Ein Blick auf die Parameter der Proben mit höheren Äquivalenten an Eisenionen zeigt die Zunahme der Komplexität der Spektren. Es werden weiter Dubletts gefunden, welche hauptsächlich Fe(II)- und Fe(III)-Ionen zugeordnet werden können, die zum Teil durch Puffermoleküle koordiniert sein könnten. Die Anpassung der mit 10 Äquivalenten Eisenionen ist mit mehreren verschiedenen Parametersätzen möglich. Werden die Parameter für Komponente 1 und 2 verwendet, welche zuvor für EDD bestimmt wurden, werden vergleichsweise große Fehler erhalten (siehe Abbildung 47 und Tabelle 32). Dies lässt

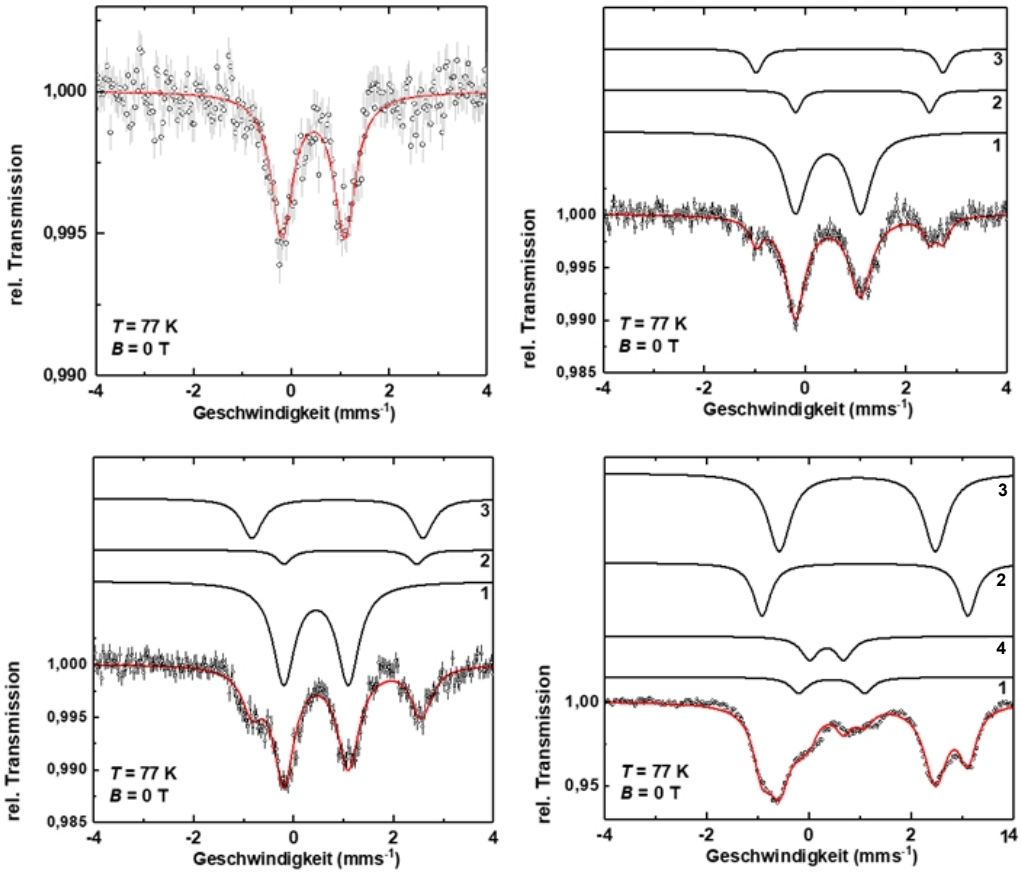


Abbildung 47: Mößbauerspektren in Abhängigkeit der Eisenkonzentration beim selektiven Eiseneinbau; 77 K; ohne externes Feld; Links oben: 0,5 Äquivalente Eisenionen; rechts oben: 1 Äquivalent Eisenionen; links unten: 1,5 Äquivalente Eisenionen; rechts unten: 10 Äquivalente Eisenionen

sich durch die große Anzahl von freien Eisenionen, welche vermutlich auf verschiedene Weise durch den Puffer koordiniert werden, erklären. Hervorzuheben ist, dass sich auch bei diesem großen Überschuss an Eisenionen kein Austausch der weiteren Eisenionen ergibt. Ein Dublett analog zu der Komponente 1 des *in vivo* homogen mit ^{57}Fe gelabelten Clusters kann nicht gefunden werden.

Die Korrelation zwischen der Aktivität der Proben sowie den für Komponente 1 ermittelten Integralen, welche durch das in den [4Fe-4S]-Cluster eingebaute ^{57}Fe begründet sind, ist in Abbildung 48 dargestellt. Die Integrale wurden für die bessere Vergleichbarkeit entsprechend normiert. Die ersten drei Proben zeigen deutlich, dass das Integral Rückschlüsse auf die Aktivität und umgekehrt zulässt. Die Abweichung der 4. Probe kann durch Schwierigkeiten bei der Anpassung des Spektrums erklärt werden (siehe oben). Auch zeigt dieser Graph, unter der Annahme, dass bei 10 Äquivalenten Eisenionenzugabe 100 % Aktivität erreicht werden, dass bei 0,5 Äquivalenten 40 % des Enzyms aktiviert werden. Bei einem Äquivalent werden 58 % erhalten, bei 1,5 Äquivalenten 82 %. Dabei sind erst bei einem Äquivalent Signale im Mößbauerspektrum zu erkennen, welche ausgefallenen Eisen-Spezies zugeordnet werden können.

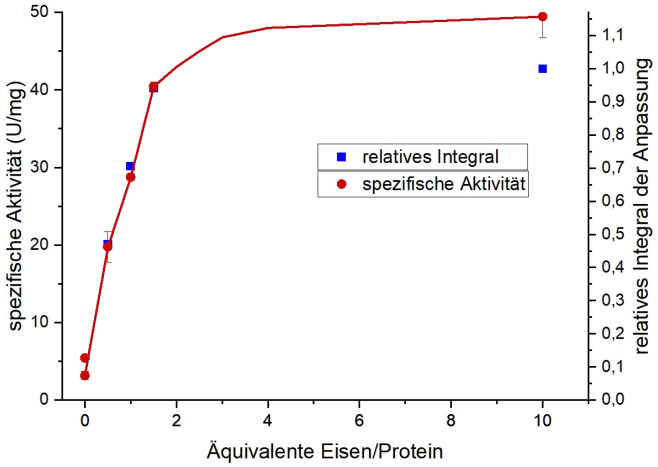


Abbildung 48: Aktivität der Mößbauerproben in Abhängigkeit der Ammoniumeisencitratkonzentration bei selektivem Eiseneinbau

3.8.3 Mößbauerspektren der mit Dithionit reduzierten Probe

Die Reduktion einer Mößbauerprobe ist unter den für die ESR-Proben verwendeten Bedingungen nicht möglich. Die Zugabe von 80 mM Dithionit (Endkonzentration) zu einer Probe in Puffer-W-mit (pH = 8) mit ^{57}Fe-S-Cluster zeigt in Mößbauerexperimenten der oxidierten Probe analoge Parameter (siehe Tabelle 33). Gleichzeitig wurde die Reduktion der Probe durch UV/Vis-Spektroskopie durch Entnahme und Verdünnung eines geringen Teils dieser teilweise nachgewiesen. Die hier beobachtete Abnahme des Peaks bei 410 nm kann nicht durch den Abbau des Clusters erklärt werden, da dies in der Mößbauercharakterisierung sichtbar werden würde. Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass nur die Protonenkonzentration die Reduktionsfähigkeit beeinträchtigt hat, da die verdünnte Probe durchaus reduziert wurde. Die sehr konzentrierte Mößbauerprobe ($>$ 25 mg/ml) kann durch Dithionit 80 mM (Endkonzentration) nur zu weniger als 5 % reduziert werden. Dieses Phänomen wurde bereits mehrfach beschrieben (170) (83).

Tabelle 33: Mößbauerparameter der Anpassung des Mößbauerspektrums der reduzierten EDD

Parameter	1.Komponente Spezies A	2.Komponente Spezies B	3.Komponente
δ (mm/s)	0,45 ± 0,01	0,45 ± 0,02	0,35 ± 0,02
ΔE_Q (mm/s)	1,19 ± 0,02	1,29 ± 0,03	0,68 ± 0,03
Γ (mm/s)	0,37 ± 0,01	0,39 ± 0,02	0,39 ± 0,02
Fläche (%)	60 ± 2	20 ± 2	20 ± 2

3.8.4 Mößbauerspektren nach Inkubation mit Substrat

Aufgrund der Ergebnisse im vorherigen Kapitel wurde sowohl die Probe mit einem Äquivalent ^{57}Fe als auch die mit vollständig gelabeltem Eisen-Schwefel-Cluster (Kapitel 3.3.7) mit Substrat inkubiert und analog der substratfreien Proben vermessen. Während

die vollständig gelabelte Probe keine signifikante Veränderung zeigt (siehe auch Abbildung 71), kann in der selektiv gelabelten Probe eine leichte Verschiebung der Signalanteile beobachtet werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 49 dargestellt. Über die Parameter der Komponenten gibt Tabelle 34 Aufschluss.

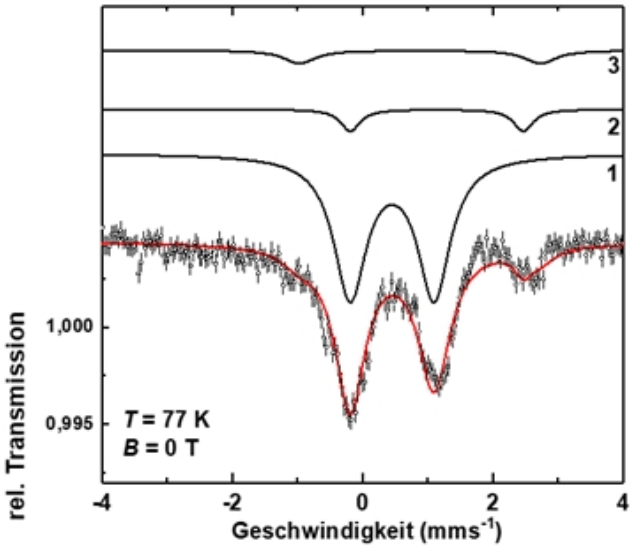


Abbildung 49: Mößbauerspektrum mit selektiven Eiseneinbau durch Zugabe von 1 Äquivalent ^{57}Fe nach Inkubation mit Substrat 6-Phosphogluconat (10 mM Endkonzentration; 2 Minuten, ca. 24 °C, anaerob)

Tabelle 34: Mößbauerparameter der Anpassung des Mößbauerspektrums der selektiv gelabelten Probe durch Zugabe von 1 Äquivalent ^{57}Fe nach Inkubation mit Substrat 6-Phosphogluconat

Parameter	1.Komponente Spezies B	2.Komponente	3.Komponente
δ (mm/s)	0,45 ± 0,05	1,14 ± 0,02	0,88 ± 0,02
ΔE_Q (mm/s)	1,29 ± 0,10	2,66 ± 0,03	3,70 ± 0,03
Γ (mm/s)	0,61 ± 0,05	0,36 ±0,03	0,59 ± 0,03
Fläche (%)	84 ± 3	8 ± 3	8 ± 3

Komponente 1, welche bereits Spezies B, also der Substratbindestelle zugeordnet wurde, bleibt auch nach Substratzugabe die Hauptkomponente mit einem ähnlichen Anteil. Jedoch ist eine Verbreiterung des Signals zu beobachten. Dies deutet darauf hin, dass die Inhomogenität des substratbindenden Eisenions zunimmt, also beispielsweise eine vorherige Sauerstoffkoordination durch eine Aminosäure teilweise durch die Koordination des Substrats ersetzt wird. Die Abwesenheit eines zusätzlichen Signals aufgrund der Substratbindung deutet darauf hin, dass zum einen lediglich ein geringer Anteil von EDD-Substratbindung vorliegt, was mit den Ergebnissen der ESR-Spektroskopie sowie der Resonanz-Raman-Spektroskopie übereinstimmt, zum anderen die Bindung sich nicht wesentlich von der Koordination bei Abwesenheit des Substrats unterscheidet. Das heißt:

Durch die Substratbindung findet keine Veränderung der Koordinationsgeometrie oder des koordinierenden Atoms statt.

3.8.5 Resonanz-Raman-Experimente

Die Resonanz-Raman-Spektroskopie wurde bereits an zahlreichen Eisen-Schwefel-Cluster Proteinen durchgeführt und gibt Auskunft über beispielsweise den Clustertyp oder den Oxidationszustand (184). Für diese Arbeit wurden vergleichende Spektren in isotopengelabeltem Wasser mit und ohne Substrat aufgenommen, um Informationen über die Koordination des Clusters zu gewinnen. Typische Spektren von [4Fe-4S]-Clustern zeigen zwischen 355 und 370 cm^{-1} terminale Schwingungen, in den Bereichen zwischen 280 und 345 cm^{-1} und 380 und 395 cm^{-1} bilden sich Brückenschwingungen ab, wobei ein Peak bei etwa 340 cm^{-1} die Symmetrie des Clusters zeigt (184) (40). Tritt die Bande der Brückenschwingung zwischen 333 und 339 cm^{-1} auf handelt es sich meist um einen durch vier Cysteine symmetrisch koordinierten Cluster (72). Bei einer Bande zwischen 340 und 343 cm^{-1} ist ein Eisenion nicht cysteinkoordiniert, wie beispielsweise im Fall der Aconitase (95) oder der IlvD aus *E. coli* wahrscheinlich ist(68).

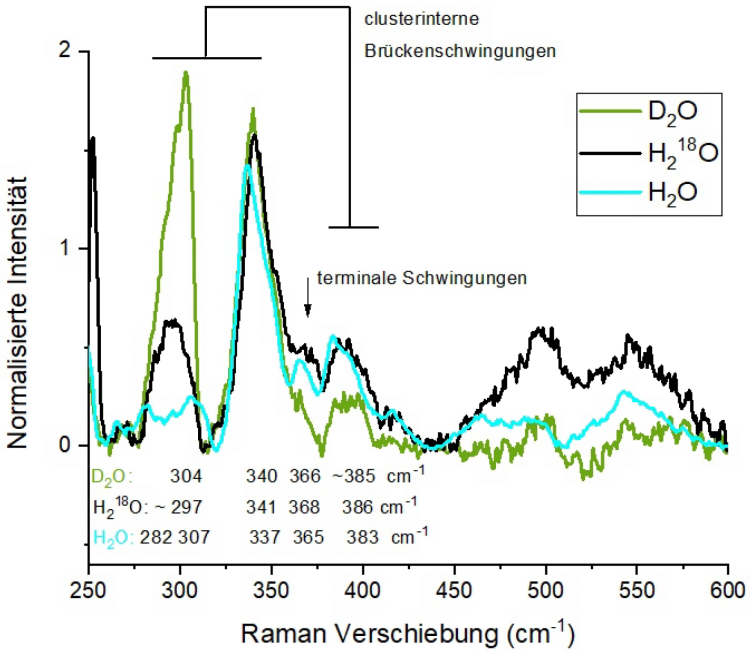


Abbildung 50: Resonanz-Raman-Experimente in Phosphatpuffer auf Basis von H_2O bzw. D_2O oder $H_2{}^{18}O$ (Anreicherung jeweils > 95 %); Anregung bei 407 nm; Angegeben sind die Maxima

Resonanz-Raman-Experimente des Holoenzyms der EDD aus *T. curvata* in H_2O, D_2O und $H_2{}^{18}O$ ergaben, dass bei Abwesenheit von Substrat kein typisches Signal für eine Koordination von Wasser an den Cluster zu erkennen ist. Dies lässt sich in Abbildung 50 zwischen 450 und 550 cm^{-1} erkennen. In keinem der Spektren ergibt sich in diesem Bereich ein Peak, der auf eine direkte Bindung von Wasser an den Cluster hindeutet. Des Weiteren liegt das Maximum des Peaks in der Region um 340 cm^{-1} in Wasser bei

337 cm^{-1}, was auf eine symmetrische Cysteinkoordination hindeutet. Ist das Wasser jedoch isotopengelabelt, liegt das Maximum des Peaks bei 340 bzw. 341 cm^{-1}. Die Tatsache selbst, dass dieser Peak eine Verschiebung in Abhängigkeit des Lösungsmittels aufweist, deutet auf eine Koordination eines Sauerstoffatoms einer Aminosäure hin. Das isotopengelabelte Wasser führt entweder durch Austausch von OH-Gruppen mit der Aminosäure oder durch Wasserstoffbrückenbindungen mit dieser zur isotopenspezifischen Verschiebung des Peaks. Eine entsprechende Koordination des [4Fe-4S]-Clusters durch ein Cystein in Abwesenheit des Substrats wurde bereits für die L-Serin-Dehydratase aus *Legionella pneumophila* beschrieben (183).

Eine weitere deutliche Verschiebung des Maximums ist für den Peak bei 307 cm^{-1} in H_2O zu erkennen. Dieses liegt in D_2O bei 304 cm^{-1} und in $H_2{}^{18}O$ bei etwa 297 cm^{-1} mit einer starken Verbreiterung des Maximums.

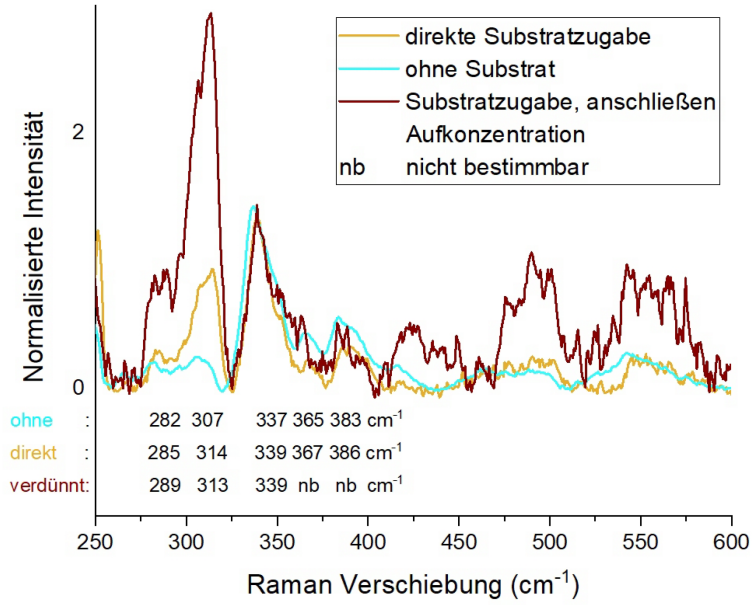


Abbildung 51: Resonanz-Raman-Experimente nach Zugabe von Substrat 6-Phosphogluconat (20 mM bzw. 3 mM Endkonzentration in Verdünnung) in H_2O; Für die Verdünnung wurde die EDD auf 0,03 mM verdünnt, Substrat zugegeben und erneut aufkonzentriert; Anregung bei 407 nm

Um die Bindung des Substrats an den Cluster nachzuweisen, wurde zum einen Substrat direkt zur EDD gegeben und nach Inkubation vermessen. Um einen Effekt durch die hohe Konzentration der EDD auszuschließen, wurde diese zudem verdünnt, das Substrat zugegeben und erneut aufkonzentriert. Für beide Proben lassen sich die gleichen Tendenzen erkennen. Sie sind in Abbildung 51 dargestellt. Die Substratzugabe verschiebt das Maximum des „Symmetriepeaks“ des Clusters von 337 cm^{-1} auf 339 cm^{-1}. Weiterhin zeigt sich eine Verschiebung des Peaks bei 307 cm^{-1} um 6 bzw. 7 cm^{-1}. Dies deutet darauf hin, dass das Substrat an den Cluster bindet, was im Einklang mit der Verbreiterung des Signals für Spezies B von 0,5 auf 0,61 mm/s in der Mößbauerspektroskopie steht.

3.8.6 Redoxpotential des [4Fe-4S]-Clusters

Für die Bestimmung des Redoxpotentials des Clusters bei pH = 8 der EDD aus *T. curvata* wurden 2 verschiedene Mediatormixe (siehe Tabelle 7.5) verwendet, welche verschiedene Potentialbereiche abdecken. Die Ergebnisse sind in Abbildung 52 dargestellt. Für die Bestimmung des Redoxpotentials wurde von jedem Mediatormix (als Baseline) die Absorption zwischen 250 und 800 nm in Abhängigkeit des Potentials aufgenommen. Diese sind exemplarisch für Mediatormix 2 ebenfalls in Abbildung 52 dargestellt. Es lässt sich erkennen, dass bei etwa 410 nm kaum Änderung der Absorption zu beobachten ist, während diese für den [4Fe-4S]-Cluster der EDD bei Reduktion zu erwarten ist. Aus diesem Grund wurde diese Wellenlänge zur Bestimmung des Redoxpotentials gewählt. Reduziert wurde mit Natriumdithionit.

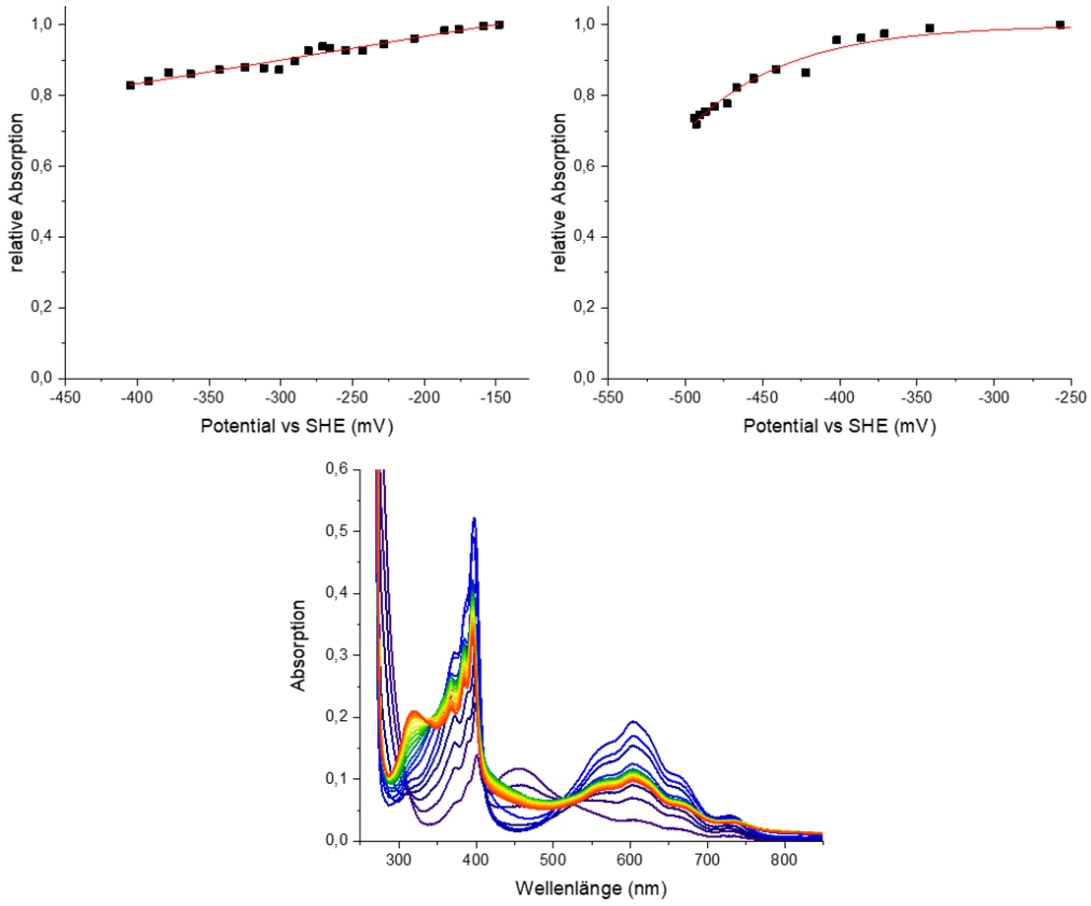


Abbildung 52: Experimente zur Bestimmung des Redoxpotentials der EDD aus *T. curvata*; pH = 8; ca. 24 °C; oben: Absorption bei 410 nm in Abhängigkeit des Potentials der Lösung mit EDD (links: Mediatormix 1 ($y = 6,7 * 10^{-4}x + 1,1$) ; rechts: Mediatormix 2 ($y = -1,3 * 10^{-4} * e^{-x/64,4} + 1,9$); unten UV/Vis-Spektren des Mediatormixes 2 in Abhängigkeit des Potentials (violett: ca. -150 mV; rot: ca. -550 mV)

Es ist deutlich zu erkennen, dass die EDD ein relativ niedriges Redoxpotential hat, welches auf die hier gewählte Weise nicht exakt bestimmt werden kann. Der rechte Graph deutet auf ein Redoxpotential im Bereich zwischen -500 und -600 mV hin.

Auch untermauern die hier dargestellten Ergebnisse die These, dass die unterschiedliche Intensität, welche in den ESR Spektren der Mutanten beobachtet werden kann, teilweise durch eine nicht vollständige Reduktion des jeweiligen Clusters verursacht wird.

3.9 Synthese des Substrats 6-Phosphogluconat

Die Synthese des 6-Phosphogluconats wurde durch Florian Belitz im Rahmen seiner Masterarbeit optimiert (28). Er hat die Synthese des 1-^{13}C und 3-^{13}C gelabelten 6-Phosphogluconats durchgeführt. Aus diesem Grund sind die Ergebnisse dieser Syntheseprodukte seiner Arbeit zu entnehmen. Hier wurde die Synthese von 6-Phosphogluconat für Aktivitätsmessungen sowie die Synthese des 2-^{13}C-6-Phosphogluconats aus käuflich erworbener 2-^{13}C-Glucose durchgeführt.

3.9.1 Bestimmung der Reinheit des synthetisierten 6-Phosphogluconats mittels NMR

Das ^{1}H-NMR-Spektrum des käuflich erworbenen 6-Phosphogluconats (Sigma Aldrich) kann Abbildung 56 entnommen werden. Des Weiteren ist in Kapitel 3.10.1 die Zuordnung der Signale erläutert. In Abbildung 53 ist das ^{1}H-NMR-Spektrum des selbst synthetisierten, ungelabelten 6-Phosphogluconats abbgebildet und in Abbildung 54 das des synthetisierten 2^{13}C-6-Phosphogluconats. In Abbildung 53 ist zusätzlich die Zuordnung der Signale angegeben.

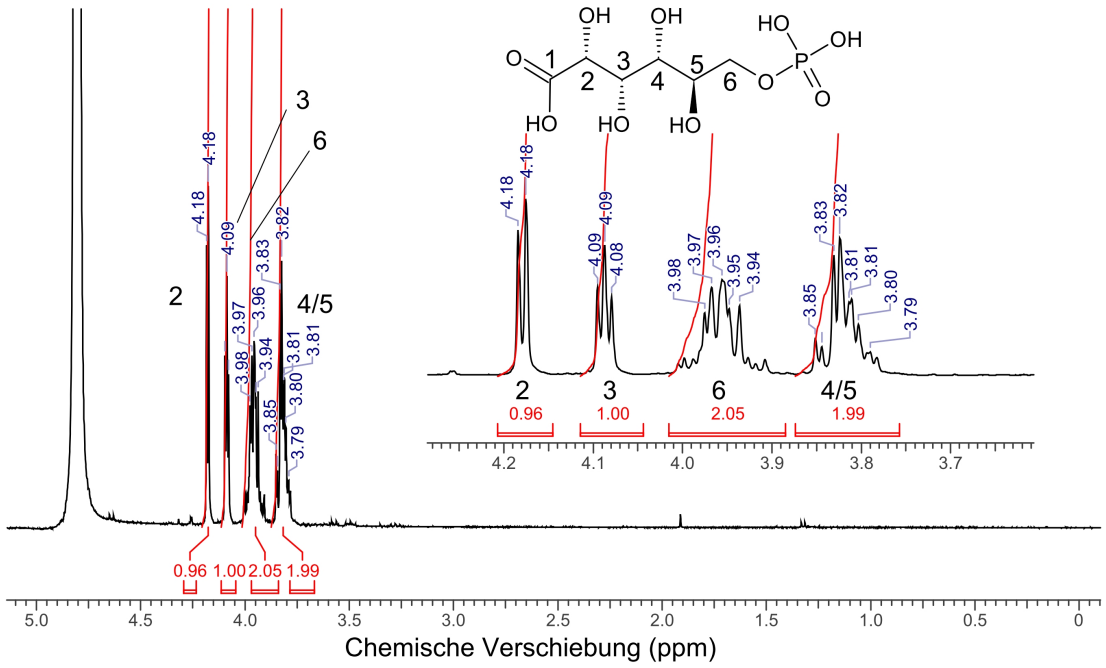


Abbildung 53: ^{1}H-NMR-Spektrum des Syntheseproduktes bei 400 MHz in D_2O

Beide Spektren bestätigen die Synthese des gewünschten Produktes ohne größere Verunreinigung. Außerhalb des hier dargestellten Bereiches der chemischen Verschiebung waren keine Signale zu erkennen. Wie erwartet koppelt das Proton an Position 2 mit dem entsprechenden Kohlenstoffatom des ^{13}C-gelabelten Produktes. Aus diesem Grund ist das Dublett bei 4,19 ppm in diesem Spektrum zu je 50 % bei 4,36 und 4,00 ppm zu finden. Dies resultiert aus der Nähe des Isotops zum Proton an Position 2. Für alle weiteren Protonen ist keine Beeinflussung der Verschiebung sichtbar, was zudem für eine selektive Labelung an der C2 Position spricht.

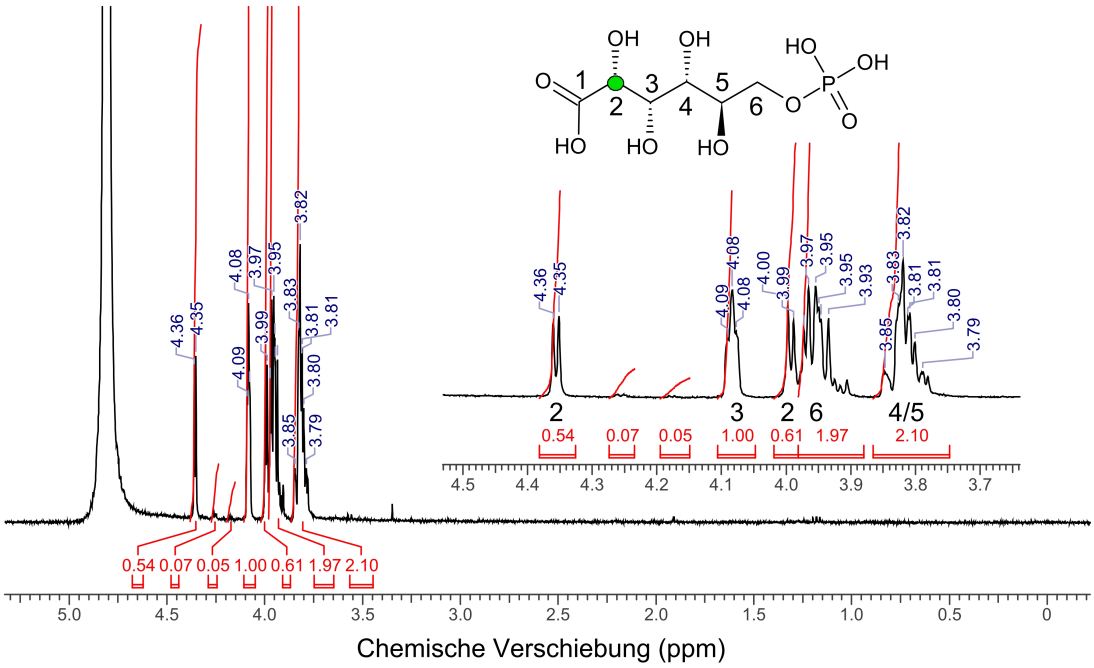


Abbildung 54: ^{1}H-NMR-Spektrum des Syntheseproduktes 2-^{13}C-6-PG (markiert mit grünem Punkt) in D_2O bei 400 MHz

In den in Abbildung 55 dargestellten ^{13}C-Spektren lässt sich die zuvor erwähnte selektive Labelung erkennen. Während die Intensität der Signale für alle Kohlenstoffatome des 6-Phosphogluconats sehr ähnlich ist, ist diese für das C2-Atom des gelabelten Substrats deutlich erhöht. Die relativ schwachen Signale des ungelabelten 6-Phosphogluconats beruhen darauf, dass nur sehr geringe Mengen ^{13}C in der Natur vorkommen. Die Zuordnung der Signale kann ebenfalls Abbildung 55 entnommen werden (28).

3.9.2 Vergleich der Reinheit der Syntheseprodukte

In der NMR-Spektroskopie können Verunreinigungen, wie beispielsweise Salze ohne Protonen, auf diese Weise nicht detektiert werden. Die Konzentration des 6-PGs in einer Lösung zur Aktivitätsmessung ist aber essentiell für die korrekte Auswertung. Deshalb wurde der Gewichtsanteil im synthetisierten 6-PG, welcher tatsächlich durch EDD umgesetzt wird, bestimmt. Die Ergebnisse, auch die der von Florian Belitz (28) durchgeführten Synthesen, sind in Tabelle 35 aufgelistet.

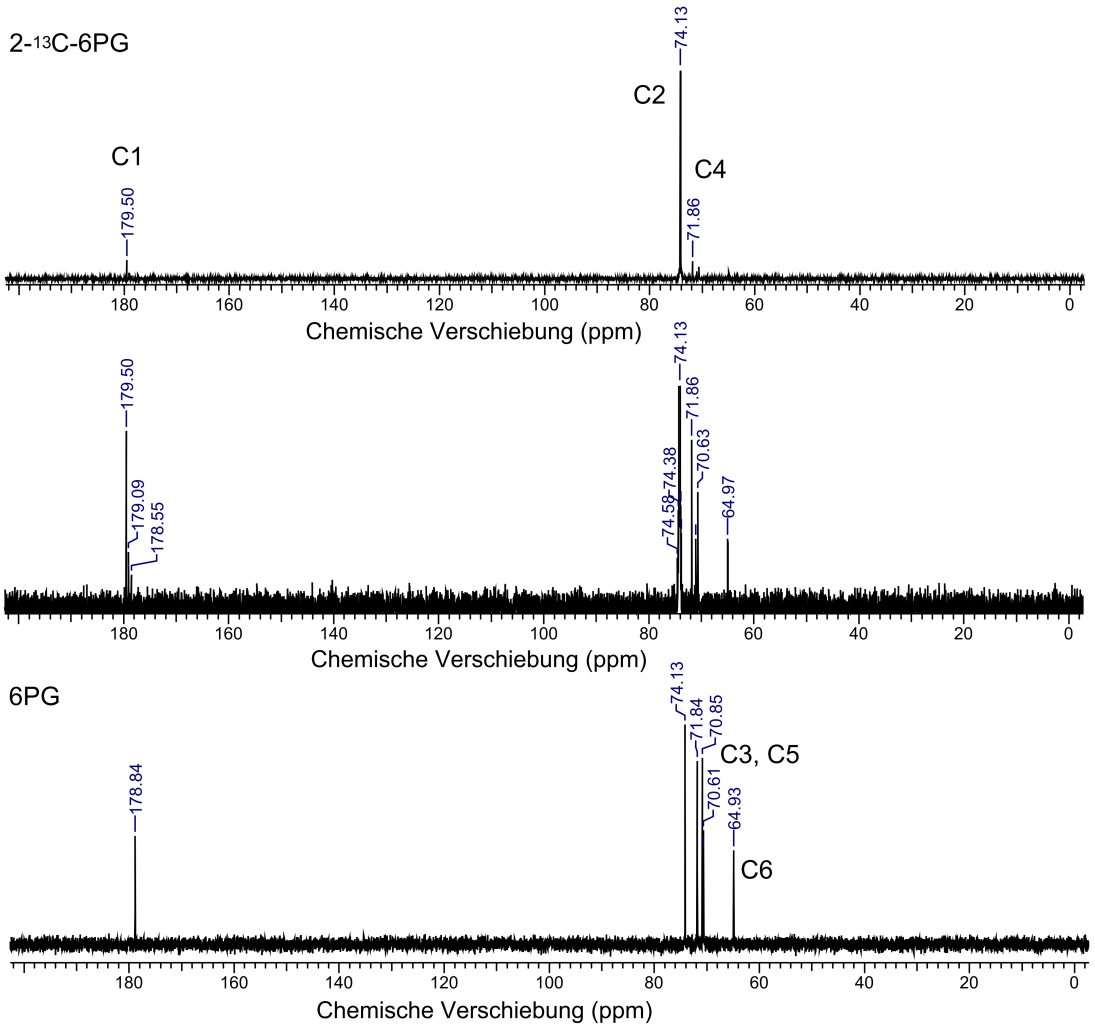


Abbildung 55: ^{13}C-NMR-Spektrum der Syntheseprodukte; 6-PG: 6-Phosphogluconat bei 100 MHz. Die Zuordnung entspricht der Darstellung in Abbildung 54

Tabelle 35: Bestimmung des 6-Phosphogluconatgehalts der Syntheseprodukte mittels Aktivitätsmessung; Es wird angenommen, dass 6-PG als Dinatriumsalz vorliegt

Produkt	aktives Substrat (%)	Ausbeute (%)
6-PG käuflich erworben	91	-
6-PG synthetisiert	bis zu 96	bis zu 35
1^{13}-C-6-PG	64	17
2^{13}-C-6-PG	54	60
3^{13}-C-6-PG	52	17

Als Referenz-Probe wurde gekauftes 6-PG verwendet, welches laut Hersteller eine Reinheit von 97 % aufweist. Dies ist nötig, um nachzuweisen, dass die Umsetzung durch die EDD quantitativ verläuft. Es zeigt sich, dass der 6-Phosphogluconatgehalt der Syntheseprodukte zwischen 52 % und 64 % für das gelabelte Produkt variiert und bis zu 96 % für das ungelabelte Produkt beträgt. Ein höherer 6-Phosphogluconatgehalt ist sicherlich mit einem weiteren Aufreinigungsschritt zu erreichen. Dies würde jedoch gleichzeitig Produktverlust bedeuten, worauf vor allem bei den gelabelten Produkten aus Kostengründen verzichtet wurde.

In Tabelle 35 sind zudem die Ausbeuten aller drei Reaktions- und Aufreinigungsschritte aufgelistet. Diese hängen naturgemäß mit der Reinheit zusammen. Bei einer Aufreinigung bis zu 96 % Reinheit kann eine maximale Ausbeute von 17 % erreicht werden. Verzicht auf zusätzliche Reinigungsschritte führt zu höheren Gewichtsausbeuten.

3.10 Katalytischer Reaktionsverlauf

3.10.1 Zuordnung der Signale der Produkt und Edukt NMR-Spektren

Das ^{1}H-NMR-Spektrum des Edukts der von der EDD katalysierten Reaktion 6-Phosphogluconat (siehe Abbildung 56) zeigt neben dem Signal des Lösungsmittels HDO bei 4,8 ppm und dem Referenzsignal von TMSP bei 0,0 ppm ein Dublett sowie 3 weitere Multipletts, welche 6-Phosphogluconat zugeordnet werden können.

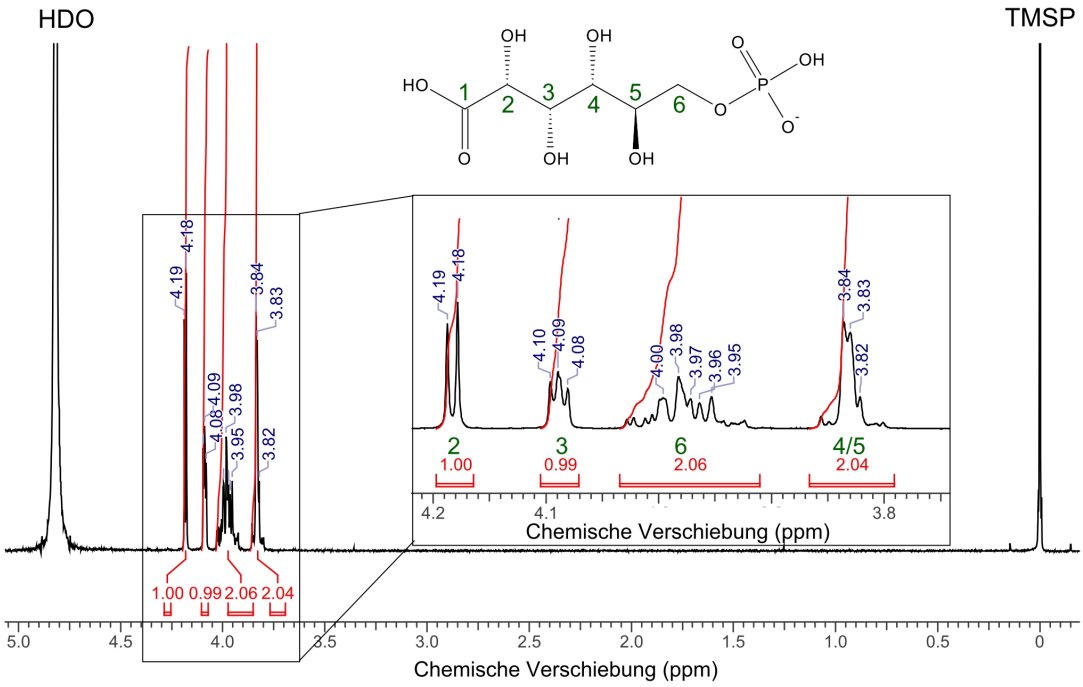


Abbildung 56: ^{1}H-NMR Spektrum des Eduktes 6-Phosphogluconat bei 600 MHz

Das Dublett bei 4,18 ppm wird durch ein Proton an Position 2 erzeugt, welches mit dem Proton an Position 3 koppelt. Weiterhin wird das Multiplett bei 4,09 ppm durch das Proton an Position 3 erzeugt, welches sowohl mit dem Proton an Position 2 als auch

mit dem an Position 4 koppelt. Für die Protonen an Position 4 und 5 mit Kopplungen zu Protonen an Position 6, 5, 4, und 3 wird eine ähnliche Verschiebung angenommen, da ihre chemischen Umgebungen vergleichbar sind. Zudem kann für sie die geringste Verschiebung angenommen werden, da sie die größte Entfernung zu elektronenziehenden Gruppen wie der Phosphat- und der Carboxylgruppe haben. Somit kann das Multiplett bei 3,84 ppm den Protonen an Position 3 und 4 und das Multiplett bei 3,98 ppm den Protonen an Position 6 zugeordnet werden. Diese Interpretation korreliert auch mit den Integrationen der Signale. Für den pH-Bereich zwischen 3.0 und 7.5 konnten bereits ähnliche Verschiebungen bestimmt werden, welche die hier gemachten Angaben untermauern (155).

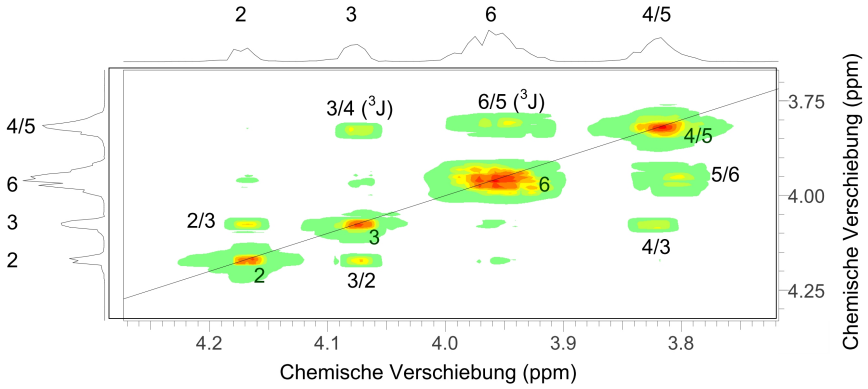


Abbildung 57: COSY des Eduktes 6-Phosphogluconat. Dargestellt ist der für dieses Molekül relevante Bereich von 3,7 ppm bis 4,3 ppm; Die Annotation der Signale korreliert mit denen des in Abbildung 56 dargestellten 6-PGs

Das COSY des 6-Phosphogluconats (siehe Abbildung 57) untermauert die oben gemachten Annahmen. Das Signal bei 3,84 ppm hat deutlich sichtbare Crosspeaks mit dem Signal bei 4,09 ppm (Position 3), während diese für das Signal bei 3,98 ppm nur sehr schwach sind.

Das Produkt 2-Keto-3-deoxy-6-phosphogluconat der von EDD katalysierten Reaktion weist ein deutlich komplizierteres ^{1}H-NMR-Spektrum auf (Abbildung 58). Hier ist neben dem Signal des Lösungsmittels von HDO bei 4,80 ppm und dem Referenzsignal von TMSP bei 0,0 ppm auch eine Verunreinigung durch Ethanol zu erkennen. Das Quartett bei 3,66 ppm und das Triplett bei 1,18 ppm sind diesem zuzuordnen.

Den beiden prochiralen Protonen H_S und H_R an Position 3 können 4 Quartette bei 2,59 ppm, 2,41 ppm, 2,30 ppm und 2,02 ppm sowie weitere kleinere breite Signale bei 3,15 bzw. 2,92 ppm zugeordnet werden. Dies begründet sich zum einen dadurch, dass an dieser Position kein Sauerstoffatom gebunden ist, was zu einer Abschirmung der Protonen und somit einer Hochfeldverschiebung führt. Zum anderen wird das Integral dieser Signale mit der Zeit kleiner, was durch einen Austausch der Protonen durch Deuterium im Zuge der Keto-Enol-Tautomerie (siehe auch Abbildung 62) zu erklären ist. Eine weiterführende Diskussion dieses Effektes sowie der exakten Zuordnung der Signale findet in Kapitel 3.10.3 statt.

Die Multipletts bei 4,47 ppm und 4,38 ppm werden durch das Proton an Position 4 verursacht, welches sowohl mit H_S und H_R als auch mit dem Proton an Position 5 koppelt.

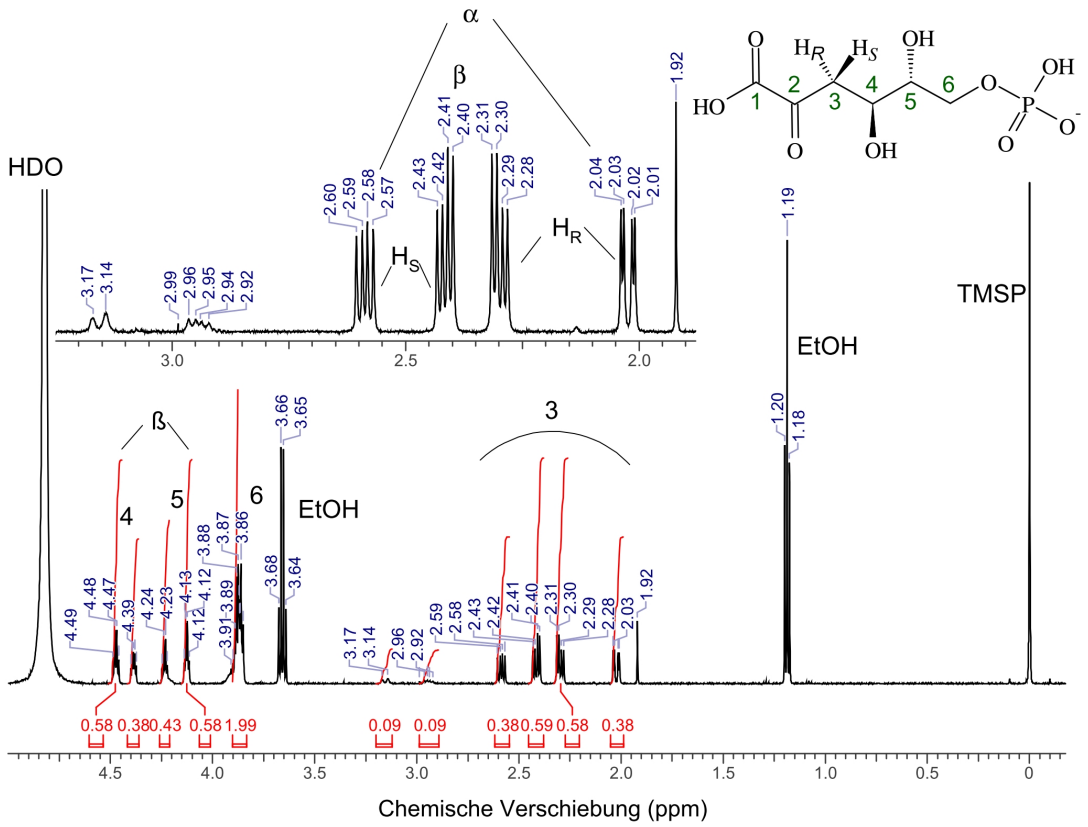


Abbildung 58: ^{1}H-NMR-Spektrum von 2-Keto-3-deoxy-6-phosphogluconat (käuflich erworben) bei 600 MHz; H_R: pro-R Proton, H_S: pro-S Proton

Beweise hierfür finden sich vor allem im COSY (Abbildung 59), welches Crosspeaks zwischen diesen beiden Signalen und denen, welche durch H_S und H_R hervorgerufen werden, zeigt, während gleichzeitig keine weiteren Crosspeaks zwischen H_S und H_R und anderen Signalen festzustellen sind. Auch weist das komplexe Aufspaltungmuster, welches formal ein Oktett ist und mit dem Austausch der Protonen H_S und H_R durch Deuterium vereinfacht wird, auf diese Zuordnung hin (siehe auch Abbildung 64).

Die Quartette bei 4,23 ppm und 4,13 ppm (formal Sextette) können dem Proton an Position 5 zugeordnet werden. Dieses koppelt sowohl mit den beiden Protonen an Position 6 als auch mit dem an Position 4. Im COSY lassen sich die entsprechenden Crosspeaks erkennen.

Das Multiplett, welches bei 3,86 ppm liegt, wird mit einer Integration von 2 von den beiden Protonen an Position 6 verursacht. Crosspeaks lassen sich im COSY wie erwartet mit den Signalen für das Proton an Position 5 erkennen.

Im COSY-Spektrum des 2-Keto-3-deoxy-6-phosphogluconats lassen sich des Weiteren die verschiedenen Signale eines Protons jeweils einer Konformation des Moleküls zuordnen. Dies kann den blauen und orangefarbenen Markierungen in Abbildung 59 sowie deren Crosspeaks entnommen werden. Eine genauere Analyse der Konformere anhand eines NOESY-Spektrums sowie die Diskussion der Stereochemie der Reaktion erfolgt in Kapitel 3.10.2.

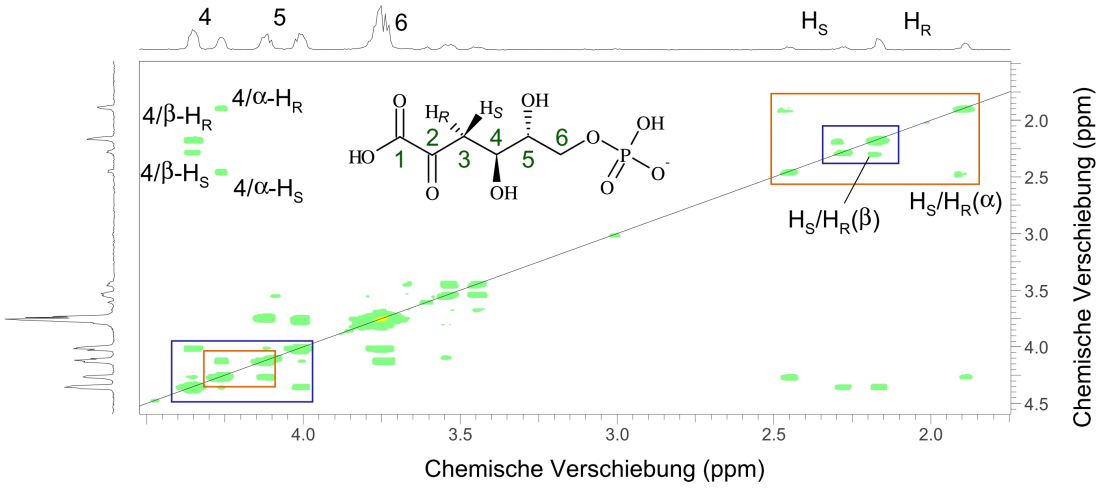


Abbildung 59: COSY des Produktes 2-Keto-3-deoxy-6-phosphogluconat bei pD = 7,5; orange: α-Anomer; blau: β-Anomer. H_R: pro-R Proton, H_S: pro-S Proton

3.10.2 Einordnung der Produktkonformere anhand von NMR-Spektren

Eine Zuordnung der verschiedenen Konformationen wird durch die Auswertung des NOESY-Spektrums ermöglicht (siehe Abbildung 60), welches im Gegensatz zum COSY die Kopplung der Protonen durch den Raum und nicht entlang einer Bindung darstellt. Aufgrund der Keto-Enol-Tautomerie (siehe Abbildung 62 und Kapitel 3.10.3) würde nahe liegen, dass Keton und Enol vorliegen, dies kann jedoch ausgeschlossen werden. Während Protonen in der Nähe einer Doppelbindung häufig eine Verschiebung zwischen 4,5 ppm und 6,0 ppm aufweisen, liegt die für Protonen in der Nähe einer Ketogruppe zwischen 1,8 ppm und 2,8 ppm ((81) S. 28). Somit sind keine der hier bereits erwähnten Konformationen Enole. Tatsächlich lassen sich im ^{1}H-Spektrum des 2-Keto-3-deoxy-6-phosphogluconats sehr schwache Signale im Bereich von 6,50 ppm und 7,06 ppm erkennen, welche der Enol-Form zugeordnet werden können. Eine Integration ist aufgrund des geringen Anteils nicht sinnvoll.

Das NOESY zeigt Crosspeaks zwischen den beiden Konformationen, sodass davon ausgegangen werden kann, dass diese leicht ineinander überführbar sind. Beispiele hierfür sind in Abbildung 60 mit rot markiert. Um die Struktur der im COSY markierten Konformere zu bestimmen, wurden die Interaktionen der Protonen an den verschiedenen Positionen integriert und gewichtet mit dem Integral der an der Interaktion beteiligten Protonen in Tabelle 36 genormt aufgelistet. Obwohl der erste visuelle Eindruck auf einen linearen und einen Ring-Konformer hindeutet, zeigt die Korrelation der Gewichtung mit den errechneten Abständen der Protonen (siehe Tab. 37), dass für beide hier dargestellte Konformere eine Ringform angenommen werden kann, das α-Anomer sowie das β-Anomer (siehe Abb. 61 und 63).

Da in einer Ringform erhebliche stereochemische Hinderungen auftreten, können die beiden Protonen an Position 3 unterschieden werden. Proton H_R mit einer schwachen Interaktion mit den Protonen an Position 4 und 5 kann den Signalen bei 2,02 ppm bzw. 2,30 ppm zugeordnet werden, das Proton H_S den Multipletts bei 2,59 ppm bzw. 2,41 ppm.

Ein Vergleich in Tabelle 38 zeigt, dass die hier gefundenen Werte und Zuordnungen

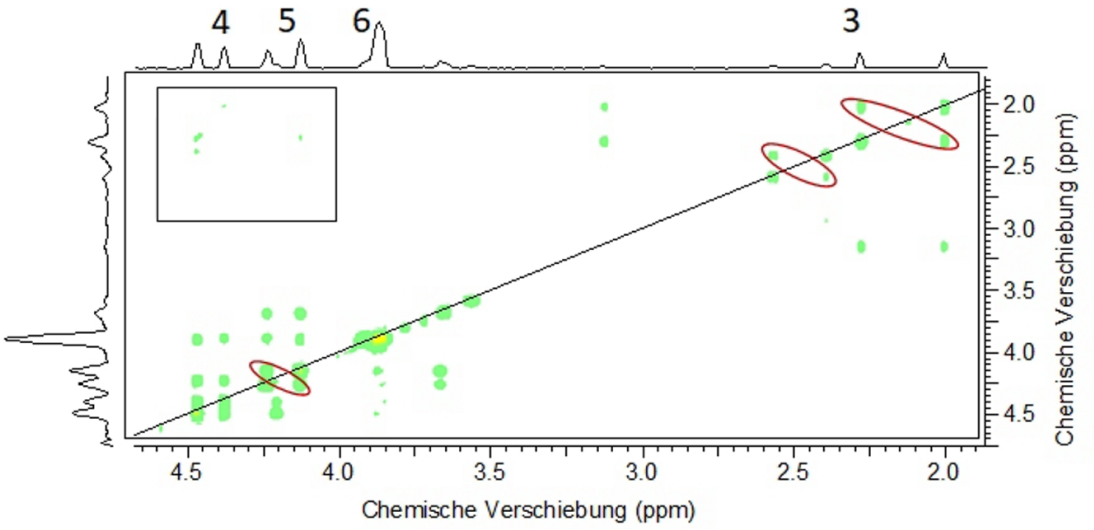


Abbildung 60: NOESY des Produktes 2-Keto-3-deoxy-6-phosphogluconat bei pD = 7,5. Im schwarzen Rechteck wurden die Signale zwischen etwa 4,3 ppm und 2,5 ppm verstärkt; eine Auswahl der Interaktionen über die Konformationsumwandlung ist in rot markiert

Tabelle 36: Auswertung des NOESYs; links β-Anomer, rechts α-Anomer; angegeben ist der relative NOE; nn: nicht nachweisbar

Proton	4	5			4	5
pro-R	1	0,87		pro-R	0,55	0,48
pro-S	0,77	nn		pro-S	0,48	nn

Tabelle 37: Abstände der Protonen in KDPG; links Ringform in Å, rechts typische lineare Form in Å; α- und β-Anomere wurden aufgrund der Vereinfachungen im Programm nicht unterschieden

	H_R	H_S	4	5	6		H_R	H_S	4	5	6
H_R	-	2,15	2,99	3,45	4,47	H_R	-	2,17	2,42	3,13	4,50
H_S	2,15	-	2,49	4,47	3,90	H_S	2,17	-	3,47	2,30	4,22
4	2,99	2,49	-	3,01	2,30	4	2,42	3,47	-	3,08	2,53
5	3,45	4,47	3,01	-	3,08	5	3,13	2,30	3,01	-	2,40
6	4,47	3,90	2,30	3,08	-	6	4,50	4,22	2,53	2,40	-

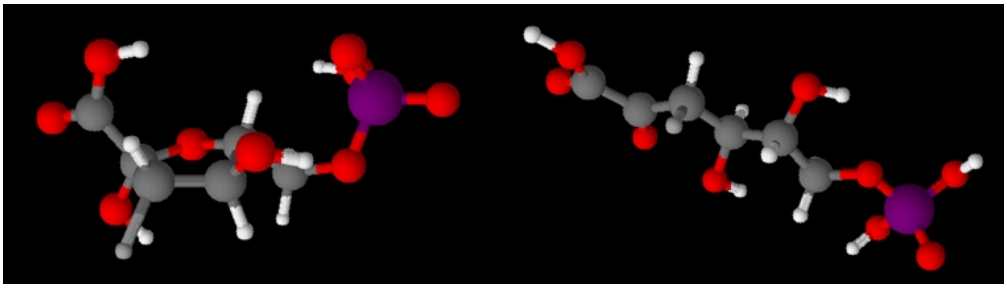


Abbildung 61: Konformere des 2-Keto-3-deoxy-6-phosphogluconats; in grau markiert wurde das pro-S H-Atom.

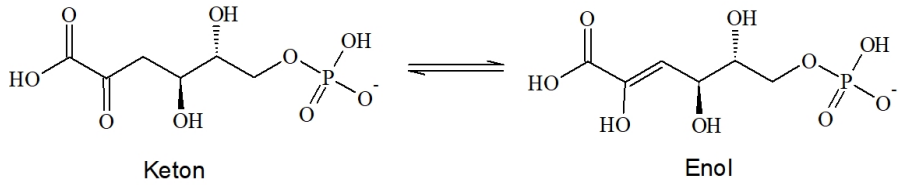


Abbildung 62: Keto-Enol-Tautomerie des 2-Keto-3-deoxy-6-phosphogluconats

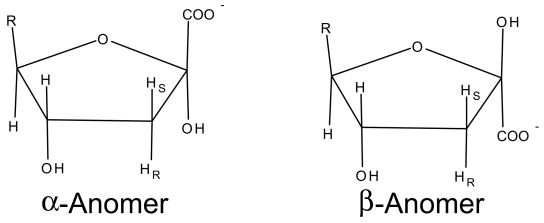


Abbildung 63: Anomere des 2-Keto-3-deoxy-6-phosphogluconats

mit denen der Literatur übereinstimmen. Auch entspricht das Verhältnis von α- und β-Anomer, welches hier bei 0,66 liegt, dem der Literatur mit 0,63 (106).

Tabelle 38: Vergleich der NMR-Spektren von 2-Keto-3-deoxy-6-phosphogluconat mit Literaturwerten; links: Verschiebung in ppm; rechts: aufsummierte Integrale (zum Vergleich: in der Literatur wird ein Verhältnis von 43 % α- zu 68 % β-Anomer beschrieben

	diese Arbeit		Literatur (106)		Integrale dieser Arbeit	
Proton	α (ppm)	β (ppm)	α (ppm)	β (ppm)	α	β
H_R	2,02	2,29	2,03	2,31	0,38	0,58
H_S	2,58	2,42	2,57	2,42	0,38	0,59
4	4,39	4,48	4,41	4,47	0,38	0,58
5	4,23	4,12	4,27	4,15	0,43	0,58
6	3,87		3,94		1,99	

Das NOESY gibt weiterhin Hinweise auf einen linearen Konformer. Die entsprechenden Signale der Protonen an Position 3 können durch Crosspeaks bei 3,01 ppm für H_R und 2,80 ppm für H_S bestimmt werden, sind jedoch zu gering um weitere Untersuchungen zu ermöglichen. Auch für das lineare Konformer (siehe Abbildung 61 für räumliche Strukturmodelle) wurden die Abstände der Protonen berechnet (Tabelle 37).

3.10.3 Untersuchung der Keto-Enol-Tautomerie von 2-Keto-3-deoxy-6-Phosphogluconat durch NMR-Spektroskopie

Um den Effekt der Keto-Enol-Tautomerie (siehe Abbildung 62) genauer zu untersuchen, wurde 2-Keto-3-deoxy-6-phosphogluconat frisch in D_2O gelöst und stündlich ein ^{1}H-NMR-Spektrum aufgenommen. Eine Auswahl dieser Spektren ist Abbildung 64 zu entnehmen, wo zum einen deutlich die Abnahme der Signale der Protonen von Position 3 zwischen 2,02 ppm und 2,59 ppm zu erkennen ist. Zum anderen wird die zunehmende Vereinfachung des Kopplungsmusters der Signale bei 4,47 ppm und 4,38 ppm (Position 4) deutlich, welche durch die Deuterierung von H_R bzw. H_S erhalten wird.

Weiterhin wurden die Signale bei 4,47 ppm und 4,38 ppm (als Referenz) und die oben genannten Signale für H_R und H_S integriert und diese Integrale in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen. Es zeigt sich, dass die Referenzsignale ein konstantes Integral aufweisen, während das Integral der Protonen an C-3 exponentiell abnimmt. Dies belegt einen Austausch der Protonen durch die Keto-Enol-Tautomerie. Für die Auswertung wurden die Integrale für H_R und H_S der Konformationen in Ringform aufaddiert sowie für jedes Integral einzeln die Anfangsgeschwindigkeit der Abnahme der Integrale bestimmt. Dargestellt ist dies in Tabelle 39. Es zeigt sich, dass im Zuge der Keto-Enol-Tautomerie bevorzugt die pro-R Position deuteriert wird. Die Anfangsgeschwindigkeit dieser Reaktion ist etwa um ein drittel schneller als die Deuterierung der pro-S Position. Dies gilt für beide Anomere gleichermaßen, was die erwartet schnelle Umwandlung der Anomere ineinander belegt.

Auch wurde der Austausch der Protonen durch Deuterium bei Zugabe von EDD (0,5 µM) untersucht. Das Experiment wurde analog dem oben beschriebenen durchgeführt. Es zeigen sich keine signifikanten Veränderungen in der Anfangsgeschwindigkeit

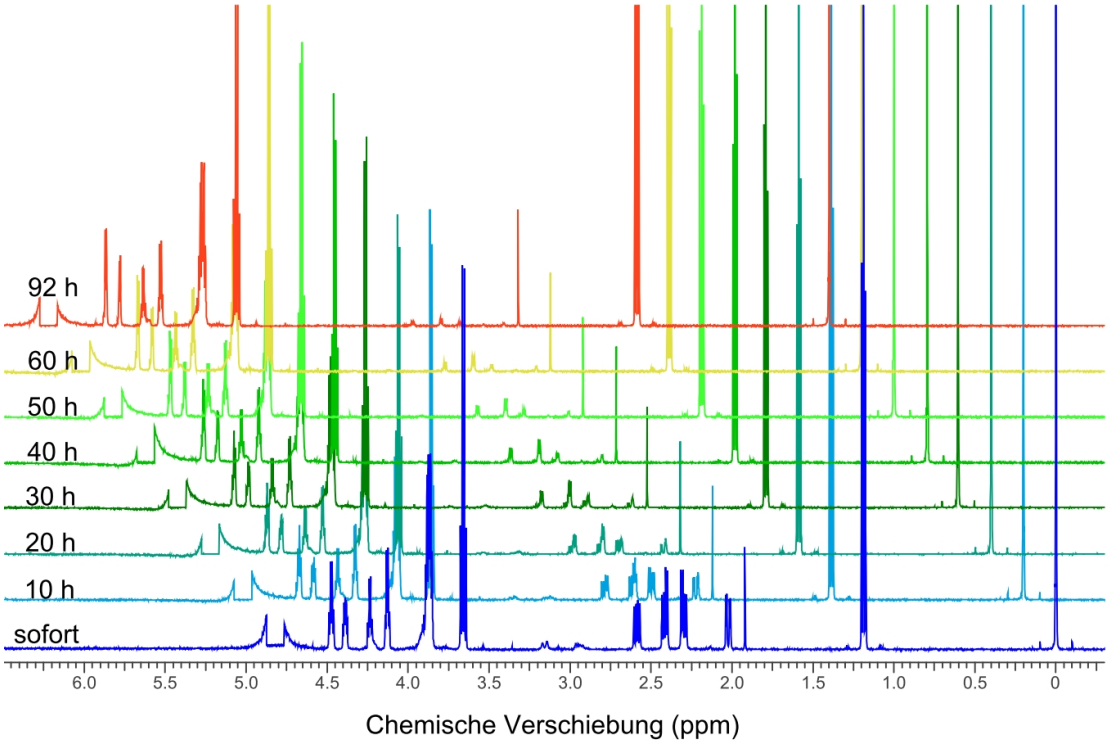


Abbildung 64: ^{1}H-NMR-Spektren von 2-Keto-3-deoxy-6-phosphogluconat in Abhängigkeit von der Zeit bei 600 MHz und pD = 7,5. Die Abszisse zeigt die Werte für das unterste Spektrum. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde das Signal für HDO nachträglich entfernt.

der Keto-Enol-Tautomerie, die EDD hat demnach auf diese in solchen Konzentrationen, wie sie hier für beispielsweise Aktivitätsmessungen verwendet wurden, keinen detektierbaren Einfluss im Vergleich zum spontanen Austausch.

In einer weiteren Untersuchung wurde mit Konzentrationen von bis zu 65 µM EDD eine Stereospezifität der Tautomerisierung bei Anwesenheit von EDD bestimmt. Hierzu wurde KDPG 4 Stunden mit EDD inkubiert und anschließend durch Aufnahme der ^{1}H-NMR-Spektren und anschließender Integration ebenfalls die Anfangsgeschwindigkeit bestimmt. Diese sind in Abhängigkeit der EDD-Konzentration in Tabelle 39 aufgelistet. Es lässt sich erkennen, dass unter Anwesenheit der EDD in höheren Konzentrationen die pro-S-Position 3 bis 4-fach schneller im Vergleich zum spontanen Clusteraustausch deuteriert wird. Veranschaulicht wird dies auch in Abbildung 65. Für die Deuterierung der pro-S-Position kann keine eindeutige Tendenz in Abhängigkeit von der EDD-Konzentration nachgewiesen werden. Die Stereoselektivität der Enolisierung der EDD konnte hier über die Tautomerisierung eindeutig nachgewiesen werden.

Eine Abschätzung der Aktivität der EDD im Bezug auf die Deuterierung auf Basis der in Tabelle 39 höchsten Konzentration (65,4 µM EDD) ergibt 0,029 U/mg. Dies ist 600-fach langsamer als für die Katalyse der Reaktion von 6-Phosphogluconat zu 2-Keto-3-deoxy-6-phosphogluconat im Rahmen der Michaelis-Menten-Kinetik nachgewiesen werden konnte.

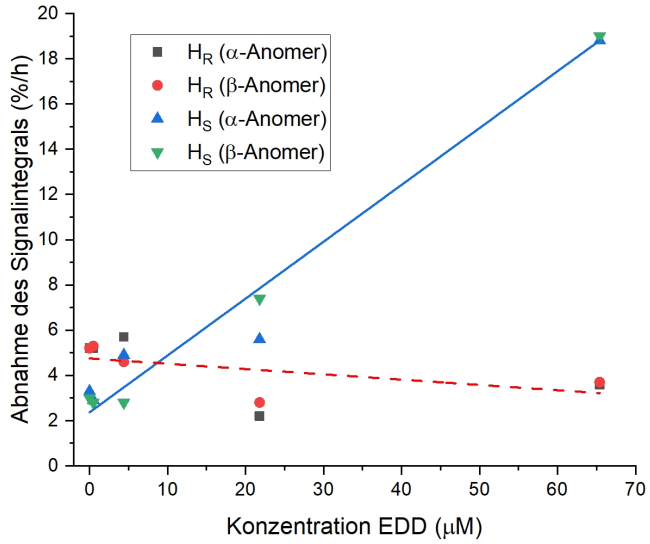


Abbildung 65: Abhängigkeit der Deuterierung von 2-Keto-3-deoxy-6-phosphogluconat von der Konzentration von EDD; siehe auch Tabelle 39

3.10.4 Stereochemische Untersuchung der von EDD katalysierten Reaktion durch NMR-Spektroskopie

Wie in Abbildung 58 dargestellt, sind die Integrale für H_R und H_S für jedes Konformer des gekauften Produkts identisch. In Abbildung 66 ist das Produkt der von EDD katalysierten Reaktion dargestellt. Es zeigt sich ein deutlicher Unterschied. In 18 % der Moleküle wurde die pro-R Position deuteriert, in 82 % der Moleküle die pro-S Position. Besonders deutlich ist, dass diese Unterschiede aus der durch EDD katalysierten Reaktion herrühren. Für diese Bestimmung wurde die Probe 3 Stunden mit 2 µM EDD inkubiert, für die zuvor beschriebenen Tautomerisierungs-Experimente sind die entsprechenden Umsetzungsraten wesentlich geringer (siehe Tabelle 39). Damit ist davon auszugehen, dass die durch die EDD katalysierte Reaktion von 6-Phosphogluconat zu 2-Keto-3-deoxy-6-phosphogluconat eine bevorzugte Stereoselektivität aufweist.

Auch konnte mit diesem Experiment die (im Rahmen der Fehlergenauigkeit der NMR-Spektroskopie) vollständige Umsetzung von 6-Phosphogluconat durch die EDD zu 2-Keto-3-deoxy-6-phosphogluconat gezeigt werden. Die Signale des Edukts können im Produktspektrum nicht mehr nachgewiesen werden. Da die Aufspaltung aller für H_R und H_S relevanten Signale jeweils zu einem Dublett ist, liegen an einem Produkt nie beide als Protonen vor. Dies deutet auch darauf hin, dass ein Proton für die Reaktion aus dem Lösungsmittel kommt und nicht aus dem Edukt. Die Katalyse der Tautomerisierung erfolgt unter Erhalt der Stereochemie.

Tabelle 39: Überblick über die Deuterierung verschiedener Protonen des 2-Keto-3-deoxy-6-phosphogluconats unter Einfluss von EDD und ohne; dargestellt ist die Anfangsgeschwindigkeit (negative Steigung der Gerade) über die ersten 4 bzw. 5 Stunden gemittelt; zur besseren Vergleichbarkeit wurde für den Startwert jeweils ein Integral von 1 angenommen; Werte wurden mit 100 multipliziert, geben somit den Prozentsatz des deuterierten Substrats pro Stunde an.

Proton/Konformer	ohne EDD	0,5 µM	4,4 µM	21,8 µM	65,4 µM EDD
pro-R α-Anomer	5,2	5,2	5,7	2,2	3,6
pro-S α-Anomer	3,3	2,9	4,9	5,6	18,8
pro-R β-Anomer	5,2	5,3	4,6	2,8	3,7
pro-S β-Anomer	3,0	2,8	2,8	7,4	19,0
pro-R beide	5,2	5,2	5,2	2,5	3,6
pro-S beide	3,2	2,8	3,8	6,4	18,9
α-Anomer beide	4,2	4,0	5,3	3,9	11,2
β-Anomer beide	4,1	4,1	3,7	5,1	11,3

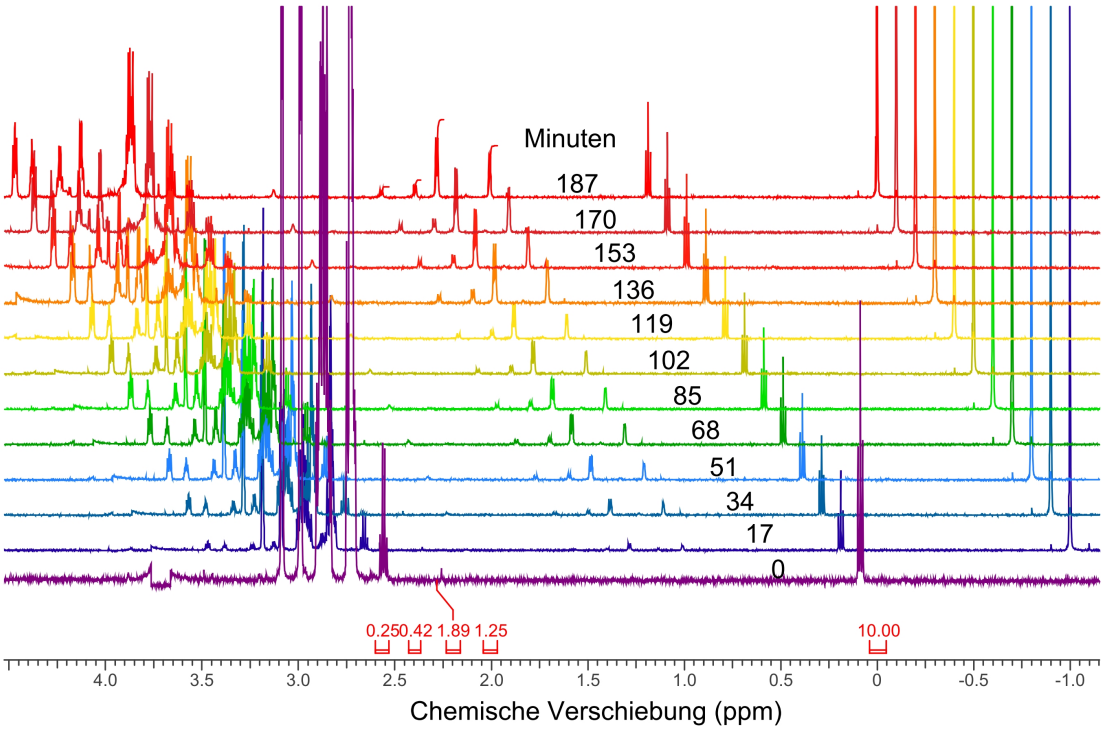


Abbildung 66: Umsetzung von 6-Phosphogluconat (violett) zu 2-Keto-3-deoxy-6-phosphogluconat (weinrot) durch EDD bei 600 MHz und pD = 7,5; Die Umsetzung wurde über 3 h verfolgt. Für das Produkt (weinrot) sind die Integrale der Signale für Position 2 angegeben. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde das Signal für HDO nachträglich entfernt.

4 Diskussion

4.1 Analyse der Verbreitung der EDD

Im Rahmen der hier beschriebenen Arbeit wurde die Verbreitung der EDD durch ausführliche bioinformatische Methoden analysiert. So wurde im Rahmen des Vergleichs von EM-Weg und ED-Weg das Vorkommen der jeweiligen Wege auf Basis der bereits zugeordneten Gene betrachtet. Der ED-Weg wurde in Übereinstimmung mit einer Analyse durch Flamholz *et. al.* vor allem in Proteobakterien gefunden (64). In Meeresbakterien, insbesondere Alphaproteobakterien, Gammaproteobakterien und Flavobakterien ist der ED-Weg stark vertreten. Diese Daten wurden durch Kultivierung verschiedener Stämme sowie anschließender GC-MS- und Schlüsselenzymaktivitätsmessungen erhalten (105). Phylogenetische Suchen zeigten zudem ein Vorkommen der EDD in Cyanobakterien, Pflanzen und Moos auf Basis der Sequenzidentität zur EDD aus *Phaeodactylum tricornutum*. Die Identitätsgrenze wurde hierbei bei 25 % Sequenzidentität gezogen (48). Die hier gemachten bioinformatischen Analysen zeigen, dass innerhalb der EDDs die Sequenzidentität mindestens 50 % beträgt. Zwischen einer EDD und einer IlvD liegt diese etwa bei 30 %. Auf Basis dieser Zahlen, kann die oben genannte Verbreitung über die Bakterien hinaus angezweifelt werden, solange keine Daten von isolierten und charakterisierten EDDs dieser Organismen vorliegen. Die Verbreitung wurde in dieser Arbeit nicht nur über Sequenzidentität sondern parallel auch im Zusammenhang mit der Untersuchung der Genumgebung bestimmt. Dabei wurden alle im Januar 2020 in NCBI (4) verfügbaren Bakterienklassen in die Suche miteinbezogen.

Zahlreiche Vertreter der EDD wurden in Gammaproteobakterien gefunden. Weitere Klassen sind die Actinobakterien (darunter auch *T. curvata*), Alphaproteobakterien und Betaproteobakterien (siehe Abbildung 10). Damit lassen sich die oben gemachten Angaben über die Verbreitung des ED-Weges in Bakterien belegen. Weitere vereinzelte Organismen, welche eine EDD besitzen, sind in den Ergebnissen diskutiert. Vermutlich wurde diese durch horizontalen Gentransfer erhalten. Die Verbreitung des ED-Weges auf diese Weise wurde bereits für *Vibrio parahaemolyticus* diskutiert (156).

Für einige Mitglieder der IlvD/EDD-Familie wurden 2 konservierte Regionen in der Aminosäuresequenz beschrieben (92) (17). Hier konnte diese Konservierung mit einem größeren Datensatz ebenfalls beobachtet werden. Für die EDD aus *T. curvata* sind die entsprechenden Sequenzen: ^{165}CDKxxP^{170} und ^{521}DxRxSG^{526} (nicht konservierte Aminosäuren sind hier mit x angegeben). Das erste Motiv enthält basierend auf Mutagenese-Daten (siehe Kapitel 3.6) ein clusterbindendes Cystein, während Aminosäuren des zweiten Motivs in anderen Enzymen der IlvD/EDD-Familie eine katalytische Aktivität aufweisen. Für die EDD aus *T. curvata* wurde für S525A kein großer Einfluss auf die Aktivität gefunden. Im Gegensatz hierzu konnte bei S528A eine starke Aktivitätsverringerung beobachtet werden (siehe auch Kapitel 4.4).

Eine Möglichkeit zur Unterscheidung der IlvDs auf Basis ihres Clustertyps bietet ein Alignment von 976 Aminosäuresequenzen (65). Für Enzyme, welche einen [2Fe-2S]-Cluster koordinieren, wurden 3 konservierte Cysteine beschrieben, für solche mit [4Fe-4S]-Cluster nur 2. Dies zeigt sich auch in den hier gemachten Untersuchungen. Während 2 Cysteine über die gesamte IlvD/EDD-Familie weitgehend konserviert sind, ist das dritte, den Cluster koordinierende Cystein nur innerhalb der EDDs, aber nicht in [4Fe-4S]-IlvDs, konserviert.

4.2 Vergleich der EDD aus verschiedenen Organismen

Für diese Arbeit wurden die EDDs aus *E. coli*, *T. curvata* und *Z. mobilis* heterolog exprimiert und analysiert. Die Ergebnisse sind in Kapitel 3.3 dargestellt. Für alle drei Enzyme wurde die erfolgreiche Aufreinigung über SDS-PAGE verfolgt. Hierdurch wurde die molekulare Masse (inklusive Strep-Tag) auf etwa 65 kDa bestimmt. Literaturwerte über ähnliche Bestimmungen zeigen für das Enzym aus *Z. mobilis* eine Größe der Untereinheit von 63 kDa (157), für das Enzym aus *C. crescentus* 63,2 kDa (112).

Über die Bestimmung des Eisen/Schwefel-Gehalts der Enzyme und die Charakterisierung dieser über UV/Vis-, ESR- und Mößbauerspektren konnte erstmals ein [4Fe-4S]-Cluster pro Protein für die EDD nachgewiesen werden. Dies wurde aufgrund des schnellen Aktivitätsverlustes des Enzyms aus *E. coli* bei Sauerstoffexposition nur vermutet (75), jedoch noch nicht experimentell nachgewiesen.

Im Fall der UV/Vis-Spektroskopie können die aufgenommenen Spektren mit Literaturspektren der EDD aus *Z. mobilis* verglichen werden (157). Sowohl in der Literatur als auch in den hier dargestellten Untersuchungen zeigt sich der für [4Fe-4S]-Cluster typische Peak bei 410 nm. Dieser wurde auch für ein verwandtes Enzym, die IlvD aus *E. coli*, welche in ihrer aktiven Form einen $[4Fe\text{-}4S]^{2+}$-Cluster enthält, gefunden (68). Im Gegensatz hierzu zeichnet sich ein [2Fe-2S]-Cluster durch weitere Peaks bei höheren Wellenlängen aus, wie sie für die IlvD aus Spinat bei 450 nm und 580 nm beobachtet werden können (67). In weiteren Vertretern der IlvD/EDD-Familie wie der D-Xylonat-Dehydratase aus *Caulobacter crescentus* und der L-Arabinonat-Dehydratase aus *Rizobium leguminosarum* können ebenfalls [2Fe-2S]-Cluster mithilfe der UV/Vis-Spektroskopie nachgewiesen werden (17).

Für alle drei hier charakterisierten EDDs kann die Reduktion des $[4Fe\text{-}4S]^{2+}$-Clusters zu einem $[4Fe\text{-}4S]^{1+}$ durch Dithionit durch UV/Vis-Spektroskopie beobachtet werden. Zu erkennen ist dies an der Verringerung der Absorption bei 410 nm, wie sie von Flint *et al.* (68) für die IlvD aus *E. coli* ([4Fe-4S]-Cluster) gezeigt wurde. Eine vollständige Reduktion deuten diese Experimente allerdings nicht an. Vielmehr deuten sie auf ein Redoxpotential nahe dem des Dithionits hin, welches vom pH-Wert abhängt (129). Besonders wichtig ist dies für die ESR-Spektroskopie, welche nur für den paramagnetischen, reduzierten $[4Fe\text{-}4S]^{1+}$-Cluster charakteristische Signale aufweist. Diese unterscheiden sich für die EDDs der 3 Organismen in ihrer Intensität, was auf eine nicht vollständige, von der EDD abhängige Reduktion hindeutet. Gleichzeitig kann die Population höherer Spinsysteme hier aber auch eine Rolle spielen.

Untersuchungen der Stabilität der gereinigten EDD bzw. ein Vergleich wurden in der Literatur bis zu diesem Zeitpunkt nicht quantitativ durchgeführt. Es ist bekannt, dass die EDDs aus *E. coli* (75) und *Z. mobilis* (167) im Zellextrakt bei Anwesenheit von Sauerstoff bzw. Abwesenheit von Reduktionsmitteln instabil sind. Die Stabilisierung der EDD durch die Zugabe von divalenten Metallionen wurde vielfach beschrieben, beispielsweise für die EDD aus *Z. mobilis* und *P. putida* (110) (157). Die deutlichsten Ergebnisse wurden hierbei bisher für die EDD aus *Caulobacter crescentus* erhalten (112). Bei Anwesenheit von Mn^{2+}-Ionen (5 mM) konnte die Aktivität über mehrere Tage bei 4 °C erhalten werden. Genauere Angaben über den Verlauf der Inaktivierung sind hier allerdings ebenfalls nicht dargestellt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass das Enzym aus *Z. mobilis* das instabilste der hier untersuchten ist. Es verliert seine Aktivität innerhalb von 5 Stunden fast vollständig bei Raumtemperatur im Anaeroben. Im

Gegensatz hierzu konnte mit der EDD aus *T. curvata* ein Enzym gefunden werden, dass im Anaeroben über Wochen stabil ist und auch bei Exposition an Raumluft erst nach 24 Stunden 95 % seiner Aktivität verliert. Dieses Enzym eignet sich hierdurch besonders für weitere Untersuchungen wie beispielsweise Kristallisationsexperimente, welche meist die Stabilität der Enzyme über Wochen voraussetzen.

Zu den kinetischen Eigenschaften wurden für verschiedene EDDs Parameter in der Literatur bestimmt. Beispielsweise liegt v_{max} für die EDD aus *Caulobacter crescentus* bei 61,6 U/mg, K_M bei 0,3 mM (pH 8,0). Für das Enzym aus *Z. mobilis* liegt die Michaelis-Menten-Konstante bei 0,04 mM, die maximale Geschwindigkeit bei 242 U/mg bei einem pH-Wert von 6,5 (167). Im Rahmen dieser Arbeit wurde für erstere ein Wert von 0,06 mM und für zweitere von 63 U/mg erhalten. Die Abweichung von der Literatur lässt sich durch die Instabilität insbesondere der EDD aus *Z. mobilis* erklären (siehe oben). Dies führt zu einem durchschnittlich geringeren Clustergehalt im Vergleich zu den anderen hier untersuchten EDDs, und somit zu einem geringeren Anteil an aktivem Enzym in den Aufreinigungen. Gleichzeitig wurde hier das pH-Wert-Optimum des Enzyms aus *T. curvata* zur besseren Vergleichbarkeit der Enzyme verwendet, welches bei 7,5 liegt.

Die kinetischen Parameter wurden über einen gekoppelten Aktivitätsassay sowohl kontinuierlich als auch abgestoppt bestimmt, da ein Einfluss der Aldolase-Reaktion mit 2-Keto-3-deoxy-6-phosphogluconat, ausgeschlossen werden soll. HPLC/gepulste amperometrische Detektion-Untersuchungen zeigen, dass eine *lag-time* von mehreren Minuten bei der Durchführung des gekoppelten Assays mit Enzymen aus *Azotobacter vinelandii* auf die Tautomerisierung zurückzuführen ist (179). Auch bei den Aktivitätsmessungen der hier untersuchten EDDs konnte eine kurze *lag-time* beobachtet werden, welche allerdings zu keinem deutlichen Fehler der Bestimmung der kinetischen Parameter führt, wie der Vergleich mit den Werten des abgestoppten Assays zeigt.

4.3 Charakterisierung und Einordnung der EDD aus T. curvata

Die EDD aus *T. curvata* wurde hier aufgrund ihrer Stabilität besonders charakterisiert (Kapitel 3.4). Ihr pH-Wert Optimum liegt bei 7,5. Das für die EDD aus *P. fluorescens* wurde ebenso wie das für die EDD aus *C. crescentus* auf 8 bestimmt (112) (131). Die maximale Aktivität wird bei 60 °C erreicht, wobei das Enzym diese bei diesen Temperaturen im Anaeroben nach 90 Minuten fast vollständig verloren hat. Eine Erhöhung der Temperatur von Raumtemperatur auf 60 °C führt zu einer 6-fach höheren spezifischen Aktivität der EDD. Vergleichbare Untersuchungen zu Aktivität am Temperaturoptimum der EDD sind für andere Organismen nicht bekannt.

In der Literatur wird häufig die Relevanz von Mg^{2+}-Ionen bzw. Mn^{2+}-Ionen für die Aktivität von Enzymen der IlvD/EDD-Familie gezeigt. Die Bindung eines Magnesiumions wurde für verschiedene Enzyme mit [2Fe-2S]-Cluster durch Röntgenstrukturanalyse nachgewiesen. Beispiele hierfür sind die L-Arabinonat-Dehydratase aus *R. leguminosarum* und die D-Xylonat-Dehydratase aus *C. crescentus* (152) (151). Für die EDD aus *C. crescentus* ist eine Konzentration von 5 mM $MnCl_2$ entscheidend für den Erhalt der Aktivität bei der Lagerung (112). Die Aufreinigung der EDD aus *Z. mobilis* muss bei Konzentrationen der Manganionen im millimolaren Bereich erfolgen, um die Aktivität des Enzyms zu garantieren. Für die spätere Aktivitätsmessung sind die Ionen nicht in der Lösung erforderlich (157). Analoge Ergebnisse konnten hier für die EDD aus *T. curvata* gewonnen werden. Der Effekt der Zugabe von Magnesiumionen bei Aktivitätsmessung

auf die Aktivität des Enzyms wurde untersucht. Es konnte sogar festgestellt werden, dass, je höher die Konzentration der Magnesiumionen war, desto geringer war die Aktivität. Dies deutet darauf hin, dass das im Protein gebundene Magnesiumion fest gebunden ist und nach Einbau nicht leicht ausgetauscht werden kann. Die Hemmung könnte durch Koordination an das 6-Phosphogluconat erklärt werden, dass in dieser Form möglicherweise schlechter an die EDD bindet.

Für die D-Xylonat-Dehydratase aus *C. crescentus* wurde weiterhin beschrieben, dass eine Inaktivierung des Enzyms durch 5 mM EDTA durch die Zugabe von Mg^{2+}-Ionen wieder aufgehoben werden kann (17). Dies ist für die EDD, welche schon bei einer Zugabe von 0,2 mM EDTA ihre charakteristische Braunfärbung verliert, entsprechend nicht möglich.

Neben der Zugabe von Magnesiumionen wird auch die Inkubation mit dem Substratanalogon α-Glycerophosphat als Methode zur Stabilisierung der EDD beschrieben (157). Für die EDD aus *Z. mobilis* wird α-Glycerophosphat als kompetitiver Inhibitor mit einem K_i von 1,0 mM beschrieben (167). Die EDD im *E. coli*-Zellextrakt wird durch 20 mM α-Glycerophosphat gegen oxidative Inaktivierung durch beispielsweise Sauerstoff geschützt (75). Die EDD aus *T. curvata* zeigt in einem Stabilitätstest über 7 Wochen im Anaeroben bei Raumtemperatur den Erhalt der Aktivität bei pH 7,5. Die Zugabe von 20 mM $MgSO_4$ führt zu einer leichten Erhöhung der durchschnittlichen Aktivität, 20 mM α-Glycerophosphat konnte die Aktivität annähernd verdoppeln. Somit kann der positive Effekt des Substratanalogons auch für die EDD aus *T. curvata* belegt werden. Eine Inhibition hingegen war nicht zu beobachten.

Einhergehend mit der Untersuchung der Reduktion der EDD durch Dithionit wurden hier auch erste Experimente zur Bestimmung des Redoxpotentials vorgenommen. Dieses wurde für eine EDD noch nicht bestimmt und konnte hier auf den Bereich von -500 mV bis -600 mV eingegrenzt werden. Ähnliche Redoxpotentiale wurden bereits für andere nicht redoxaktiven [4Fe-4S]-Cluster-Enzyme gefunden. Beispielsweise liegt das Redoxpotential der Fumarase A und B aus *E. coli* bei -480 mV, das der Glutamin-5-phosphoribosyl-1-pyrophosphat-Amidotransferase aus *B. subtilis* sogar bei $<$ -620 mV (66).

4.4 Räumliche Aufklärung der EDD

Für die EDD aus *Shewanella oneidensis* ist eine Kristallstruktur des Apoenzyms bekannt (136). Diese wurde im Zusammenhang mit den kürzlich veröffentlichten Kristallstrukturen der L-Arabinonat-Dehydratase aus *R. leguminosarum* und der D-Xylonat-Dehydratase aus *C. crescentus* diskutiert (152) (151). Beide Enzyme enthalten im Gegensatz zu allen untersuchten EDDs einen [2Fe-2S]-Cluster und weisen zueinander im aktiven Zentrum eine große Ähnlichkeit auf. Unterschiede zu der EDD aus *Shewanella oneidensis* finden sich vor allem im N-terminalen Ende der Proteine, wobei ein großer Bereich der EDD hier undefiniert ist, was auf eine hohe Flexibilität hindeutet. Ein Helix-Loop-Helix-Motiv im Bereich zwischen Pro186 und Ser214 ist ebenso wie in einer offenen Form der Arabinonat-Dehydratase um mehrere Ångström verschoben und spielt somit eventuell eine Rolle im katalytischen Zyklus (151). Weitere Aussagen über die EDD aus *S. oneidensis* können aufgrund des in der Struktur nicht sichtbaren Bereichs, vor allem des Clusters, nicht gemacht werden. Aus diesem Grund wurden im Rahmen dieser Arbeit weitere Kristallisationsexperimente durchgeführt, mit dem Ziel, ein Holoprotein

röntgenkristallographisch zu vermessen. Für diese Experimente mussten zahlreiche Optimierungen vorgenommen werden, welche in Kapitel 3.5 dargestellt sind. Die Mutation der beiden nicht clusterligierenden Cysteine an Position 53 und 63 zu Alanin verringert die Multimerbildung und homogenisiert die Proteinproben hierdurch. Vermutlich sind diese Cysteine an intermolekularen Disulfidbrückenbildungen beteiligt, was in der nicht reduzierenden SDS-PAGE gezeigt werden konnte. Auch kann anhand der Experimente festgestellt werden, dass das Apoenzym wesentlich homogener vorliegt als das Holoenzym. Im Rahmen der Kristallisationsexperimente konnten erste Kristalle erhalten werden, sodass davon ausgegangen werden kann, dass auf Basis der hier erlangten Erkenntnisse im Zusammenhang mit weiteren Experimenten eine röntgenkristallographische Untersuchung in Zukunft möglich ist.

4.4.1 Räumliche Aufklärung durch Mutation

Um Informationen über das aktive Zentrum zu erhalten, welche unabhängig von Kristallisationsexperimenten sind, wurden eine Reihe von Mutanten der EDD aus *T. curvata* hergestellt. Hierbei wurden zu untersuchende Aminosäuren bevorzugt durch Alanin ersetzt, um die funktionelle Gruppe dieser zu eliminieren ohne eine weitere einzufügen. Auf die sterischen Anforderungen sowie die Hydrophobizitätsänderung wurde hierbei nicht eingegangen. Aus diesem Grund ist es eventuell sinnvoll einzelne Experimente mit anderen Mutationen zu wiederholen. Dies wurde hier allerdings nicht näher betrachtet.

Auf der Suche nach den clusterkoordinierenden Aminosäuren des Enzyms aus *T. curvata* wurden 3 konservierte Cysteine gefunden (Kapitel 3.6). Das Cystein an Position 123 ist in allen untersuchten EDDs sowie GADs und einigen IlvDs konserviert. Die Cysteine an den Positionen 165 und 232 sind sogar innerhalb der gesamten IlvD/EDD-Familie konserviert. Zwei weitere, nicht vollständig konservierte Cysteine (C53 und C63) innerhalb der untersuchten EDDs wurden ebenfalls mutiert. Die Relevanz der Aminosäuren für die Clusterkoordination korreliert direkt mit dem Grad ihrer Konservierung, wie verschiedene Ergebnisse dieser Arbeit zeigen. Während der Eisengehalt für die C123A Mutante mit 3,7 Fe/Protein noch auf einen Cluster hindeutet, welcher bei der Aufreinigung zerfällt, liegen die Zahlen für die Mutante C165A bei 1,9 Fe/Protein und für C232A bei 2,3 Fe/Protein, was auf den Abbau zu einem [2Fe-2S]-Cluster hindeutet. Möglicherweise zeigt dies aber auch den Verlust der Hälfte der [4Fe-4S]-Cluster. Die Mutation dieser Cysteine beeinträchtigt demzufolge die Stabilität des Clusters. Im Vergleich dazu liegen die Werte für die C52A und die C63A Mutanten bei deutlich über 3 Fe/Protein. UV/Vis-Spektroskopie zeigt für alle drei Mutanten der konservierten Cysteine Signale eines [2Fe-2S]-Clusters. Dieser lässt sich mit ESR-Spektroskopie bei 77 K nicht eindeutig nachweisen. Hier gilt jedoch zu beachten, dass der Cluster für das Experiment mit Dithionit reduziert werden muss, um paramagnetisch vorzuliegen. Möglicherweise zerfällt der ohnehin instabile Cluster bei der Reduktion. Auch Aktivitätsmessungen der Mutanten zeigen eindeutig, dass C123, C165 und C232 entscheidend für die Katalyse sind (Restaktivität $< 1\,\%$), während für C53A keine und für C63A und die Doppelmutante CC53_63AA ein nur moderater Aktivitätsverlust (Restaktivität $> 50\,\%$) gefunden werden. Ähnliche Experimente zur Bestimmung der Clusterliganden einer EDD wurden in der Literatur noch nicht beschrieben. Aus diesem Grund gibt es auch keine Referenzwerte für die hier erstmals bestimmten Michaelis-Menten-Konstante von entsprechenden Mutanten.

Auf der Suche nach der katalytischen Base wurden neben einem Alignment von EDDs bzw. der IlvD/EDD-Familie auch Ergebnisse anderer Mitglieder dieser Familie herangezogen. Für die D-Xylonat-Dehydratase aus *C. crescentus* wurde das Serin an Position 490 als entscheidend für die Reaktion bestimmt (151). Es ist Teil des bereits beschriebenen konservierten Bereichs innerhalb der IlvD/EDD-Familie. Dieses Serin befindet sich in *T. curvata* an Position 525. Eine Mutation zu Alanin konnte die Aktivität des Enzyms im Vergleich zum Wildtyp allerdings nur um 40 % verringern. Die Mutante des unter den EDDs konservierten S528 hatte noch 6 % der WT-Aktivität. Ohne die genaue räumliche Aufklärung der EDD lässt sich vermuten, dass im Falle einer katalytischen Aktivität einer der beiden Aminosäuren die jeweils andere in der Mutante die Aufgabe übernimmt. Gegen diese These spricht, dass für die Aktivität der L-Arabinonat-Dehydratase aus *R. leguminosarum* sowohl S480 als auch T482 nötig sind. Eine S480A oder T482V Mutante ist komplett ohne Aktivität (152).

Neben Serin sind in der Literatur auch andere Aminosäuren als katalytische Basen beschrieben. Die L-Serin-Dehydratase aus *Legionella pneumophila* hat neben einem [4Fe-4S]-Cluster ein Histidin an Position 61 als katalytische Base (183). In der Mannonat-Dehydratase aus *Streptococcus suis* wurden H311 und Y325 als katalytische Basen bestimmt (200). In *Leishmania major* sind die an der von der Fumarat-Hydratase katalysierten Reaktion beteiligten Aminosäuren D135 und T467 (60). Ein Beispiel für eine Glutaminsäure als katalytische Base ist E440 der Diol-Dehydratase aus *Roseburia inulinivorans* (119).

Aus den hier untersuchten Aminosäuren (siehe Abbildung 40) stechen einige wenige hervor. Während für alle isolierten Mutanten ein [4Fe-4S]-Cluster aufgrund des Eisen pro Protein Gehalts und der UV/Vis-Spektren angenommen werden kann, zeigen sich für die Mutanten D166A und E498A Aktivitäten unter 0,5 % der des Wildtyp-Proteins. Auch die Mutante H500A hat mit weniger als 3 % eine sehr niedrige Aktivität. Somit sind alle drei mögliche katalytische Basen. Besonders hervorzuheben ist hier, dass die Aminosäure D166 direkt neben dem Clusterligand C165 liegt und ihre Mutation aus diesem Grund auch Auswirkungen auf die Eigenschaften des Clusters haben kann, ohne direkt als katalytische Base aktiv zu sein. Eine Reduktion der Aktivität auf maximal 10 % ist analog auch für die D124A Mutante zu erkennen. C123 ist ein Clusterligand. Ein Blick auf E498 und H500 im Alignment zeigt, dass E498 über die gesamte IlvD/EDD-Familie konserviert ist für H500 gilt das für alle untersuchten EDDs. Für beide Aminosäuren konnte nachgewiesen werden, dass sie essentiell für die katalytische Aktivität sind, möglicherweise interagieren sie miteinander. Die Nähe zueinander in der Aminosäuresequenz gibt Anlass zu dieser Vermutung. In der Xylonat-Dehydratase ([2Fe-2S]-Cluster) aus *C. crescentus* ist das entsprechende Glutamat an Position 463 an der Koordination des Magnesiumions beteiligt (151). Die dem Histidin entsprechende Aminosäure ist jedoch ein Valin, sodass diese Analogie zu keiner abschließenden Aussage führt.

4.4.2 Räumliche Aufklärung durch Spektroskopie

Die Ergebnisse der Resonanz-Raman-Untersuchungen zeigen, dass in Abwesenheit von Substrat bzw. Produkt kein Wasser, aber eine Aminosäure über ein Sauerstoffatom ihrer Seitenkette an den Cluster koordiniert (Kapitel 3.8.5). Dies könnte beispielsweise das oben erwähnte Glutamat an Position 498 oder die Aspartate an Position 166 bzw. 124 sein. Ein Blick auf die Xylonat-Dehydratase aus *Caulobacter crescentus* zeigt

ein Aspartat (D129) in direkter Nachbarschaft eines clusterkoordinierenden Cysteins (C128), welches den dort vorliegenden [2Fe-2S]-Cluster an seiner freien Koordinationsstelle koordinieren könnte (151). Für die IlvD aus *Mycobacterium tuberculosis*, ebenfalls ein [2Fe-2S]-Enzym, wird die Bindung der D138 über eine Hydroxygruppe beschrieben (24). Auch das stark konservierte Serin der EDD an Position 525 könnte diese Aufgabe übernehmen. Dagegen spricht allerdings, dass die Mößbauerspektroskopie an dieser Mutante keine Unterschiede zum Wildtyp ergibt. Abschließend kann dies wohl erst durch eine Kristallisation der EDD bzw. gezielte Resonanz-Raman-Bestimmungen der entsprechenden Mutanten geklärt werden.

Ein Vergleich der Resonanz-Raman-Spektren (Kapitel 3.8.5) mit denen der Aconitase bei einer Anregungswellenlänge von 458 nm zeigt, dass auch für diese keine Fe-OH bzw. Fe-OH_2 Streckschwingungen im Bereich von 400 bis 600 cm^{-1} gefunden werden. Spektren ohne Substrat zeigen neben einer Bande bei 339 cm^{-1} (vgl. EDD 337 cm^{-1}) eine schwache Bande bei 299 cm^{-1} (vgl. EDD 307 cm^{-1}), welche clusterinternen Schwingungen zugeordnet wird. Eine Substratbindung führt hier zur Verschiebung der Bande um 7 cm^{-1}, während die Hauptbande nicht beeinflusst wird. Dies deutet darauf hin, dass Veränderungen am substratkoordinierenden Eisen vor allem im Bereich zwischen 290 cm^{-1} und 310 cm^{-1} zu sehen sind. Für die EDD ist dies bei Zugabe von isotopengelabelten Wasser ebenfalls zu beobachten, was mit der Annahme der Koordination des Clusters durch das Sauerstoffatom einer Aminosäure übereinstimmt (102). Ein exakter Vergleich ist nicht möglich, da für die EDD keine ausreichende Signalverstärkung durch die Anregung bei 457 nm erhalten werden konnte. Alle hier gezeigten Spektren wurden bei 407 nm angeregt.

In der Literatur sind keine Mößbauerspektren für die EDD/IlvD-Familie bekannt. Für die IlvD aus *S. mutans* und die IlvD aus *E. coli* mit einem [4Fe-4S]-Cluster wurden in der AG Pierik und Schünemann aber bereits noch nicht veröffentliche Daten erhalten (15). Letzteres Spektrum setzt sich aus drei Komponenten zusammen, von welchen eine auf den vollständigen Cluster zurück geführt werden kann. Ein Vergleich der Parameter zeigt für die hier gemessenen Spektren sowie für das Spektrum der IlvD aus *E. coli* eine Isomerieverschiebung im Bereich von 0,41 bis 0,45 mm/s und damit sehr ähnliche Werte. Im Gegensatz hierzu weist die Quadrupolaufspaltung deutliche Unterschiede auf. Für die IlvD liegt diese bei 0,94 mm/s, für die EDD aus *E. coli* bei 1,15 mm/s und für die aus *T. curvata* bei 1,19 mm/s bzw. 1,29 mm/s. Dies deutet auf eine weniger regelmäßige Geometrie am aktiven Zentrum der EDD im Vergleich zu der IlvD hin. Durch gezielten Einbau von ^{57}Fe konnten die Eisenionen im Cluster aufgrund ihrer Quadrupolaufspaltung in der EDD aus *T. curvata* unterschieden werden. Ein Vergleich der Ergebnisse mit denen der Aconitase, ebenfalls einem [4Fe-4S]-Enzym, zeigt Ähnlichkeiten der Werte. Für die Aconitase kann wie auch für die EDD ein Eisenion von den 3 weiteren unterschieden werden. Die Werte für die Quadrupolaufspaltung liegen bei 1,30 mm/s bzw. 0,83 mm/s, die für die Isomerieverschiebung bei 0,46 mm/s (56). Analog der EDD ist die Isomerieverschiebung für alle Eisenionen gleich, die verschiedenen Positionen unterscheiden sich nur durch die Quadrupolaufspaltung, wobei dieser Unterschied für die EDD kleiner ausfällt als für die Aconitase.

Im Gegensatz zur Aconitase kann die Reduktion des Clusters durch Dithionit nicht durch Mößbauerspektroskopie verfolgt werden. Die Spektren der reduzierten EDD lassen sich mit den gleichen Parametern anpassen wie die der isolierten (oxidierten) EDD. Zum einen liegt dies am niedrigen Redoxpotential der EDD und zum anderen kann eine höhere

Clusterabschirmung durch Dimerbildung bei konzentrierten Proben eine Rolle spielen. Für die Aconitase wurde weiterhin der teilweise Abbau des Clusters bei Reduktion durch das Auftreten eines Dubletts mit einer Isomerieverschiebung von 1,15 mm/s und einer Quadrupolaufspaltung von 3,2 mm/s nachgewiesen. Dieses Signal lässt sich freien Fe^{2+}-Ionen zuordnen (56).

Trotz des niedrigen Redoxpotentials konnten ESR-Spektren für die EDD von allen Organismen erhalten werden, welche sich durch verschiedene Signalintensitäten in Abhängigkeit des Systems und durch Signale für höhere Spinsysteme auszeichnen. Letztere wurden bereits für die IlvD aus *E. coli* beschrieben. Neben dem typischen Signal für S = 1/2 $[4Fe\text{-}4S]^{+}$-Cluster bei g = 1,96 sind hier Signale für die Grundzustände S = 3/2 und S = 5/2 beschrieben worden. Der Großteil dieser Signale findet sich bei g = 4,7 bzw. 3,3, die g_z-Komponente wird jedoch bei 1,9 vermutet, sodass diese mit dem Signal des S = 1/2-Systems überlappt. Für dieses System liegt der Großteil des Clusters möglicherweise im S = 3/2 Grundzustand vor. Eine Quantifizierung ist aufgrund der Heterogenität der Zustände schwierig (68). Auch für den $[4Fe\text{-}4S]^{1+}$-Cluster des Fe-Proteins der Nitrogenase aus *Azotobacter vinelandii* wurde dieses Phänomen bereits beschrieben (124).

4.4.3 Kristallisationsexperimente

Die EDD wurde bisher hauptsächlich als Dimer beschrieben, so auch für das Bakterium *C. crescentus* (112). Für kristallisierte Vertreter der IlvD/EDD-Familie wurde zudem die Notwendigkeit der Dimerbildung für die Aktivität berichtet. In der D-Xylonat-Dehydratase aus *C. crescentus* bedeckt eine N-terminale Helix des zweiten Monomers das aktive Zentrum des ersten Monomers. Ihr wird die Aufgabe der Substraterkennung zugesprochen. Das Histidin an Position 591 des C-Terminus des zweiten Monomers bildet mit E463, einer Aminosäure nahe dem aktiven Zentrum des ersten Monomers, eine Salzbrücke (151). Für die L-Arabinonat-Dehydratase aus *R. leguminosarum* wird beschrieben, wie erst durch die Dimerbildung eine Bindungstasche entstehen kann (152). In der Kristallstruktur der EDD aus *S. oneidensis* fehlen die hier als essentiell für die Aktivität angegebenen Aminosäuren, sodass auf diesem Weg keine Aussage getroffen werden kann. Ein Argument dagegen ist, dass in dieser Arbeit EDD-Aktivität unabhängig von ihrem Assoziationsgrad beobachtet werden kann.

Daten einer Röntgenstrukturanalyse einer Holo-EDD liegen noch nicht vor. Nichtsdestotrotz ist in dieser Arbeit ein wichtiger Schritt auf dem Weg zur Kristallisation einer EDD gelungen. Nach Mutation zweier Cysteine zu Alaninen (C53 und C63), um die Multimerbildung zu unterdrücken, und mehrfachem Anpassen der Kristallisationsbedingungen, konnten erste Kristalle erhalten werden. Diese waren zum Zeitpunkt dieser Arbeit nicht ausreichend homogen, um sie Röntgenkristallographisch zu vermessen, aber sind ein großer Schritt in die richtige Richtung. Weiterhin könnte die gezielte Kristallisation des Enzyms mit [3Fe-4S]-Cluster die erforderliche Homogenität herstellen.

Weitere Verbesserung könnte ein Blick auf die Kristallisationsbedingungen der oben genannten Vertreter der IlvD/EDD-Familie bringen. Für beide lag die Konzentration der Proteinvorratslösung zwischen 5 und 10 mg/ml in einem Tris/HCl-Puffer (50 mM, pH 7,5) mit Magnesiumchlorid (5 mM). Die Kristallisation erfolge in Natrium- bzw. Magnesiumformat (4 - 3,8 M bzw. 5 mM), MES oder TES Puffer (pH 7, 0,1 M) und teilweise PEG33509 (4 %) (150). Bedingungen, unter denen erste Kristalle der EDD erhalten wur-

den, sind ähnlich. Puffersysteme sind Tris oder HEPES (pH 7,5 - 8; 50 - 100 mM). Weitere Zusätze waren PEG (19 % 3350, 44 - 53 % 400), Magnesiumformat (200 mM) und Calciumchlorid (200 mM). Auch ein Blick auf die Kristallisationsbedingungen von Proteinen mit einem [4Fe-4S]-Cluster können weitere Hinweise für die Optimierung bieten (60). Ein Zusatz von α-Glycerophosphat, als Substratanalogon, zu der Mutante CC53_63AA bietet einen zusätzlichen Ansatzpunkt für Kristallisationsexperimente.

4.5 Stereochemische Aspekte der von EDD katalysierten Reaktion

4.5.1 Stereochemie am 2-Keto-3-deoxy-6-phosphogluconat

Generell reichen für die Keto-Enol-Tautomerie in wässriger Lösung sehr geringe Mengen an Säure oder Base aus, um die Umwandlung zu katalysieren. Dabei verläuft die Protonierung des Enols in der Regel nicht stereoselektiv. Eine Ausnahme wurde bei der Guanitrypmycin-Synthese in *Streptomyces monomycini* beobachtet. Hier erfolgt die Keto-Enol-Tautomerie spontan und stereoselektiv aufgrund sterischer Hinderungen (126). Ein wichtiger Einfluss kann hierbei die Zugänglichkeit der Reaktionsstelle für Wassermoleküle spielen. Sind diese im Reaktionsmedium vorhanden, so kann eine Herabsenkung der Aktivierungsenergie nachgewiesen werden (91) (50).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Protonierung von 2-Keto-3-deoxy-6-phosphogluconat im Zuge der Keto-Enol-Tautomerie in D_2O bei pD 7,5 sehr langsam verläuft. Nach einem Tag waren 60 % der Protonen durch Deuterium ersetzt worden. Der komplette Austausch der entsprechenden Protonen durch Deuterium findet erst im Zeitrahmen von mehreren Tagen statt. Dabei wurden 50 % der Protonen in der pro-S-Position ersetzt und 70 % der Protonen in der pro-R-Position, welche dementsprechend bevorzugt im Zuge der Keto-Enol-Tautomerie protoniert wird. Im Gegensatz hierzu wurde postuliert, dass eine spontane Keto-Enol-Tautomerie für 2-Keto-3-deoxy-D-galactonat bei pH 7 nicht stattfindet (53). Auch für 2-Ketoisovalerat, dem Produkt der IlvD, konnten erste Experimente zeigen, dass ein spontaner Austausch der Protonen an C-3 im Zeitrahmen von mehreren Tagen bei pH 7,4 nicht zu beobachten ist (113).

Abweichungen ergeben sich daraus, dass 2-Keto-3-deoxy-6-phosphogluconat in Lösung als 4 Isomere vorliegt. Neben dem offenkettigen Keton und dem offenkettigen Enol sind ein α-Anomer und ein β-Anomer der Furanose-Ringform bekannt. Untersuchungen zeigen, dass sich auf die letzteren 41 % bzw. 50 % des Substrats verteilen. In der Ketoform liegen 9 % vor, die Enolform lässt sich aufgrund ihrer geringen Konzentration nicht quantifizieren, da die Bestimmungen auf ^{13}C-NMR beruhen. Die Anteile variieren leicht mit der Temperatur (133). Dies wurde auch für strukturell ähnliche Verbindungen beschrieben, wie beispielsweise das 2-Keto-3-deoxy-L-rhamnonat (153) oder das 2-Keto-3-deoxypentonat (191).

Diese Verteilung lässt sich in hier gemessenen ^{1}H-NMR-Spektren reproduzieren. KDPG liegt zu 36 % als α-Anomer und zu 55 % als β-Anomer vor. Auf das Keton entfallen 9 %, die Enolform kann nicht quantifiziert werden. Die auf Basis des COSY und NOESY-Spektrums gemachte Zuordnung der Signale wird durch einige Quellen untermauert. Für 2-Keto-3-deoxy-D-gluconat werden für die Furanosen vergleichbare Verschiebungen erhalten, geht man davon aus, dass sich die in Abbildung 4 der Quelle fehlerhaft definierte pro-R/pro-S Nomenklatur durch die gesamte Abbildung durchzieht (154). Auch die Zuordnung der NMR-Signale des 2-Keto-3-deoxy-L-rhamnonats deutet

an, dass die Signale des der benachbarten OH-Gruppe näheren Protons weniger stark entschirmt sind (153). Dies lässt sich auch für 2-Keto-3-deoxy-galactarat beobachten (79).

Die Inkubation von EDD mit dem Reaktionsprodukt zeigt, dass in Abhängigkeit der Konzentration der EDD die Deuterierung der pro-S Position schneller erfolgt. Durch diese Ergebnisse konnte widerlegt werden, dass das Reaktionsprodukt der EDD ausschließlich das Enol ist und die Tautomerisierung nicht durch die EDD beeinflusst wird, wie von Meloche und Wood auf Basis von NMR-Spektren mit, dem Stand der Technik im Jahre 1964 entsprechend, sehr niedriger Auflösung und einem schlechten Signal-Rausch-Verhältnis postuliert (131). Dieser Effekt kann nur bei Konzentrationen von EDD, welche deutlich größer sind als die in dieser Arbeit beispielsweise für Aktivitätsmessungen verwendeten, beobachtet werden. Im Gegensatz hierzu reicht im Fall der Katalyse der Reaktion von 6-Phosphogluconat zu 2-Keto-3-deoxy-6-phosphogluconat eine geringe Konzentration der EDD aus. Ist die Konzentration der EDD nicht ausreichend, wird trotz Anwesenheit des Enzyms die Autokatalyse bevorzugt. Dies wurde bereits für die IlvD angedeutet (19). Eine Beschleunigung der Deuterierung und damit der Keto-Enol-Tautomerie lässt sich ebenfalls in Abhängigkeit der EDD-Konzentration beobachten. Bei 4,2 mg/ml führt die katalytische Enolisierung zu einer fast 4-fachen Beschleunigung der stereospezifischen pro-S Deuterierung des 2-Keto-3-deoxy-6-phosphogluconats (siehe auch Kapitel 3.10.3 und 3.10.4). Für andere Enzyme wurde dies, soweit bekannt, bisher nicht untersucht.

Der Blick auf einige Dehydratasen der Enolase-Familie zeigt, dass sie Reaktionen häufig stereoselektiv katalysieren. Ein Beispiel hierfür ist die Galactonat-Dehydratase aus *E. coli*. Sie katalysiert die Deuterierung der 4-pro-S Position von Galactonat, was einer Substitution der OH-Gruppe durch ein Deuterium entspricht. Im Fall von L-Idarat katalysiert die Glucarat-Dehydratase aus *P. putida* die Deuterierung des 4-pro-S Position, welche im Edukt einem Proton entspricht (143). Die L-Fuconat-Dehydratase aus *Xanthomonas campestris* katalysiert ebenfalls die Ketonisierung stereoselektiv. Hier wird die pro-S Position deuteriert, was zur Inversion der Konfiguration führt (198). Für die D-Mannonat-Dehydratase aus *Novosphingobium aromaticivorans* wird die Retention der Stereoisomerie beschrieben. Hier wird ebenfalls die pro-S Position protoniert, welche im Edukt eine Hydroxygruppe ist (154). Die L-Rhamnonat-Dehydratase aus *E. coli* zeigt eine bevorzugte, jedoch nicht stereoselektive, Deuterierung der pro-R Position und ersetzt damit die Position eines Protons (153). Für die D-Arabinonat-Dehydratase aus *Herbaspirillum huttiense* wiederum wird die Deuterierung der pro-S Position beschrieben (191). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es keine klare Tendenz der Dehydratasen gibt, welche Stereochemie und in welchem Umfang diese für das Produkt durch die Katalyse erhalten wird.

Für die EDD wird eine bevorzugte Deuterierung des pro-S Protons bei Katalyse der Reaktion von 6-Phosphogluconat zu KDPG beobachtet. Dies stimmt mit dem Ergebnis der Katalyse der Tautomerisierung von KDPG überein und zeigt, dass die EDD die Katalyse unter Protonierung der pro-S Position bevorzugt. Bei der Reaktion ergibt sich durch die Katalyse ein Enantiomerenüberschuss von 64 %.

4.5.2 Mechanismus der durch die EDD katalysierten Reaktion

Der Reaktionsmechanismus der EDD wurde bisher lediglich in einer Veröffentlichung über die EDD aus *P. fluorescens* diskutiert (131). Hier soll kurz auf die dort gemachten Annahmen im Zusammenhang mit meinen Ergebnissen eingegangen werden.

Meloche *et al.* stellen die These auf, dass der Einbau von Protonen aus dem Lösungsmittel in 2-Keto-3-deoxy-6-phosphogluconat nicht durch die EDD katalysiert wird. Diese Beobachtung beruht allerdings auf Inkubationszeiten von bis zu 30 min. In den hier durchgeführten Experimenten lässt sich deutlich zeigen, dass die EDD einen Einfluss auf den Einbau hat und dabei eine Stereobevorzugung zu sehen ist.

Diese wird hier ebenfalls für die durch EDD katalysierte Reaktion des Substrats 6-Phosphogluconats beobachtet, im Gegensatz zu den Ergebnissen von Meloche *et al.* (131). Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die Auflösung der NMR-Spektren heute wesentlich besser ist. So können pro-S und pro-R Protonen verschiedener Anomere sehr gut in 600 MHz ^{1}H-Spektren unterschieden werden. Möglicherweise sind die Signale, welche in der Quelle mit dem Ergebnis gleicher Integrale bestimmt wurden, die unterschiedlicher Anomere und nicht verschiedener Protonenpositionen, da diese sehr nah beieinander liegen. Die Ergebnisse hier widersprechen klar der These, die Reaktion wäre nicht stereoselektiv. Auch konnte gezeigt werden, dass die EDD die Ketonisierung katalysiert.

Auch wird in der Quelle die spontane Ketonisierung als „rate limiting step“ bezeichnet. Dies kann hier nicht sicher widerlegt, jedoch in Frage gestellt werden, da die Ketonisierung nicht spontan abläuft, sondern von der EDD katalysiert wird.

Die Bestimmung des exakten Mechanismus ist hier aufgrund der fehlenden Daten der Röntgenstrukturanalyse nicht möglich. Hinweise auf das Protein in substratfreiem Zustand geben aber Mößbauer-, ESR- und Resonanz-Raman-Spektroskopie (siehe auch Kapitel 4.4.2). Sehr wahrscheinlich bindet eine Aminosäure über ein Sauerstoffatom an den Cluster im Ausgangszustand.

Sowohl für die IlvD aus *E.coli* ([4Fe-4S]-Cluster) als auch die aus *Arabidopsis thaliana* ([2Fe-2S]-Cluster) wird ein Mechanismus postuliert, bei dem das Substrat im Übergangszustand über ein Sauerstoffatom einer OH-Gruppe an die freie Koordinationsstelle des Clusters gebunden ist unter Beibehaltung einer tetraedrischen Koordinationsumgebung. Die Abstraktion eines Protons in der *trans*-Position wird anschließend durch eine basische Aminosäure katalysiert (74).

Mößbaueruntesuchungen der mit Substrat inkubierten EDD zeigen hauptsächlich eine Verbreiterung des Signals für das austauschbare Eisenion des Clusters auf halbmaximaler Höhe von 0,50 mm/s auf 0,61 mm/s. Dies deutet darauf hin, dass mehrere Spezies mit sehr ähnlichen Eigenschaften, wie z. B. Koordinationsgeometrie und Elektronegativität des Liganden, vorliegen. Dies führt zu dem Schluss, dass die Koordination durch eine Aminosäure über ein Sauerstoffatom durch eine analoge Koordination durch das Substrat ersetzt wird. Die Resonanz-Raman-Spektroskopie an mit Substrat inkubierter EDD unterstützt diese These. Spektren der Aconitase mit einer Anregungswellenlänge von 458 nm zeigen bei Substratzugabe eine Verschiebung des Peaks bei 299 cm^{-1} auf 292 cm^{-1} (102). Für die EDD wird eine Verschiebung des Peaks bei 307 cm^{-1} auf 314 cm^{-1} beobachtet. Dies zeigt, dass das Substrat an das austauschbare Eisenatom des Clusters koordiniert, wie dies im Fall der Aconitase nachgewiesen wurde. Die tatsächlichen Eigenschaften unterscheiden sich allerdings von dieser.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit wurde für die Aconitase nach Inkubation mit Substrat zwei Spezies im Mößbauerspektrum gefunden. Bei beiden deutet die Isomerieverschiebung mit 0,84 bis 0,89 mm/s auf eine deutliche Änderung der Koordinationsumgebung hin. Vor Substratzugabe war die Isomerieverschiebung bei 0,46 mm/s (56). Basierend auf diesen Ergebnissen wird für die Aconitase ein Übergangszustand der Katalyse postuliert, in dem das Substrat über zwei Sauerstoffatome an ein Eisenion des Clusters koordiniert und dadurch ein Ring entsteht (68). Cokristallisation der Aconitase mit Substratanaloga zeigt, dass diese das freie Eisenion am Cluster über die Carboxylgruppe und die Hydroxylgruppe der C2-Position koordinieren. Zudem wurde die Koordination eines weiteren Wassermoleküls an dieses Eisenion gefunden. (114).

Bei der Untersuchung der Substratbindung an das aktive Zentrum der EDD wurde in allen Spektroskopiearten deutlich, dass immer ein Gleichgewicht zwischen Enzym mit und ohne Substratkoordination vorliegt, wobei dieses eher auf der Seite des Enzyms ohne gebundenes Substrat oder Produkt liegt. Dies wurde bereits für die Aconitase anhand von Mößbauer und ESR-Spektroskopie beschrieben. Auch bei einem großen Überschuss an Substrat liegt immer ein großer Teil der Aconitase in nicht Substrat-/Produkt-gebundener Form vor (27). Ein weiterer Grund für eine geringe Substratbindung kann auch die Dimerbildung der EDD sein, welche möglicherweise den Zugang zum aktiven Zentrum behindert. Genaue Aussagen hierzu könnte jedoch nur eine Struktur der EDD liefern.

Eine abschließende Aussage über den Mechanismus ist im Moment nicht möglich. Auf Basis der Daten lassen sich jedoch Mechanismen, welche für verwandte Enzyme postuliert wurden, diskutieren. Der Mechanismus, welcher für die EDD aufgrund der hier erhaltenen Daten angenommen wird, ist in Abbildung 67 dargestellt.

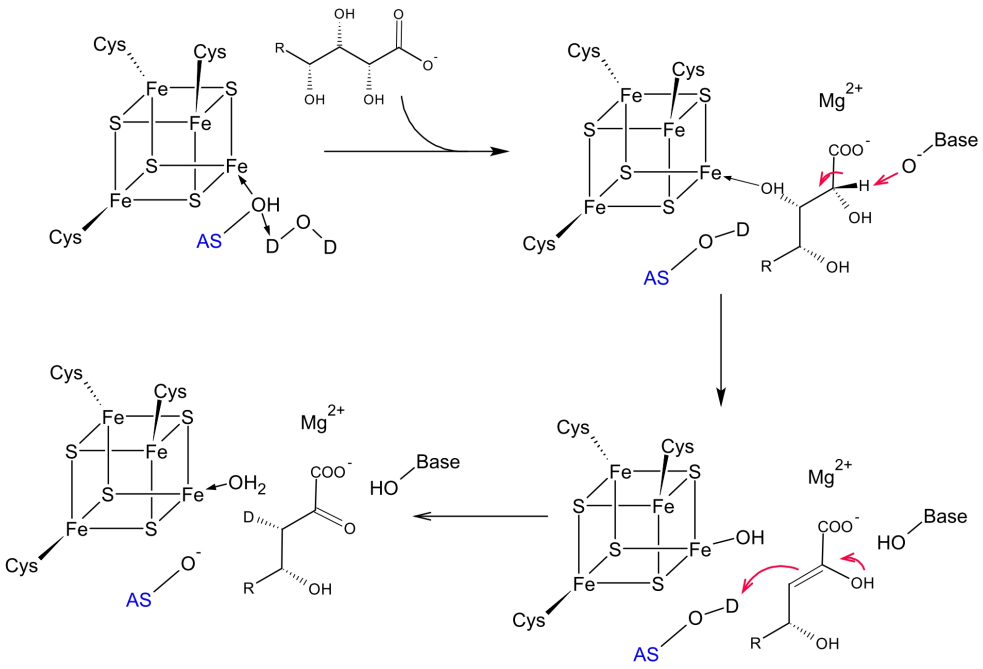


Abbildung 67: Reaktionsmechanismus der EDD

Für Xylonat-Dehydratase aus *Caulobacter crescentus* und die Arabinonat-Dehydratase aus *Rhizobium leguminosarum*, welche beide einen [2Fe-2S]-Cluster besitzen und Teil der IlvD/EDD-Familie sind, wird eine *anti*-Eliminierung postuliert. Bei dieser wirkt ein Serin (S480 in der Arabinonat-Dehydratase) als Protonenakzeptor und der Cluster als Lewissäure, der sowohl ein Elektronenpaar aufnimmt als auch die Hydroxylgruppe, welche das Substrat verlässt, koordiniert. Der Übergangszustand wird durch ein Magnesiumion im aktiven Zentrum stabilisiert (151) (152). Auch für die IlvD aus *E. coli* ([4Fe-4S]-Cluster) und Spinat ([2Fe-2S]-Cluster) wird ein analoger Mechanismus postuliert, wobei die Base, welche das Proton bindet, nicht genauer bestimmt wurde (74) (68). Für die IlvD aus *Mycobacterium tuberculosis* ([2Fe-2S]-Cluster) wurde das Serin an Position 491 als katalytische Base bestimmt. Die Ketonisierung verläuft, wie auch für das Enzym aus *E. coli*, stereospezifisch, was darauf hindeutet, dass diese durch das Enzym katalysiert wird (24) (68). Der postulierte Mechanismus beinhaltet die bereits genannten Schritte. Des Weiteren konnte in der Struktur die Bindung eines Wassermoleküls an den Cluster im substratfreien Zustand nachgewiesen werden. Berechnungen durch das Dockingprogram GOLD ergaben zudem, dass das Substrat dieses Wassermolekül verdrängt und die Keto-Enol-Tautomerie durch die nach der Reaktion an den Cluster koordinierte Hydroxylgruppe katalysiert wird. Dies bedeutet, dass die Protonierung der Ketonbildung mit einem zuvor aus dem Substrat abstrahierten Proton, als Protonenverschiebung, erfolgt (24). Für die Aconitase wurde im substratfreien Zustand eine tetraedrische Koordination des Clusterecken-Eisens beschrieben, welche durch die Substratbindung zu einer oktaedrischen Koordination wird, wobei das Substrat als Chelatligand fungiert, wie durch Mößbauercharakterisierung nachgewiesen werden konnte (27).

Ein Blick auf die Ergebnisse zur EDD aus *T. curvata* zeigt, dass kein entsprechendes Serin als katalytische Base gefunden werden konnte (Kapitel 3.7). Mehrere essentielle Aminosäuren konnten bestimmt werden (siehe oben), wobei diese auch an der Koordination des Magnesiumions beteiligt sein können. Möglicherweise können mehrere Aminosäuren als katalytische Base oder als Dyade oder Triade fungieren und so die Mutation einer dieser Aminosäuren nicht phänotypisch wirksam werden lassen. Mögliche Kandidaten sind hier beispielsweise S525 und S528. Die oben beschriebene Koordination des Clusters im Zuge der Katalyse an das Substrat konnte durch Resonanz-Raman- und Mößbauerspektroskopie nachgewiesen werden. Wobei vor allem letztere eine Ringbildung, wie sie für die Aconitase beschrieben wurde, ausschließt. Analog der IlvD konnte für die EDD eine Stereobevorzugung bei der Ketonbildung nachgewiesen werden.

Aufgrund des Aufspaltungsmusters im NMR-Spektrum lässt sich sagen, dass die Enolform des Produkts bei der Ketonisierung stereospezifisch deuteriert wird. Dieses Deuterium kann zum einen aus dem Lösungsmittel, zum anderen von einer OD-Gruppe des Substrats stammen. Da dies den Austausch eines Protons gegen ein Deuterium im Substrat vor der Reaktion erfordert, ist es eher unwahrscheinlich, dass die Reaktion über einen Protonenverschiebung, wie für die IlvD aus *M. tuberculosis* beschrieben, verläuft, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Analoge Experimente wurden für die IlvD aus *S. typhimurium* durchgeführt. Das Edukt 2,3-Dihydroxyisovalerat wurde in alpha-Position mit Tritium gelabelt. Das Produkt der durch die IlvD katalysierten Reaktion wies indes keine Radioaktivität auf, was eine Verschiebung des Tritiumatoms ausschließt. Im Gegenzug konnte der Einbau von Tritium aus T_2O im Zuge der Reaktion nachgewiesen werden (19). Diese zeigt analog meiner Ergebnisse, dass die Reaktion über ein Enol verläuft und der stereospezifische Protonierungsschritt das Lösungsmittel miteinbezieht.

5 Ausblick

Auf Basis der in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse bietet sich eine Vielzahl von weiteren Forschungsansätzen.

In Zukunft ist besonders die Erforschung der Verbreitung der EDD bzw. anderer Vertreter der IlvD/EDD-Familie interessant, wie die kürzlich entdeckte Sulfo-EDD (62). Eine genauere Untersuchung der in den hier dargestellten bioinformatischen Studien hervortretenden EDDs kann hierzu eine vielversprechende Möglichkeit zur Entdeckung weiterer Familienmitglieder bieten.

Auch für die weitere Forschung an der EDD selbst bietet diese Arbeit zahlreiche Ansatzpunkte. Bioinformatische Studien geben Hinweise auf die Verbreitung der EDD über die Bakterien hinaus. Hier ist es äußerst interessant, eine solche auf Basis der Sequenz identifizierte, mögliche EDD heterolog zu Exprimieren und zu charakterisieren, um die tatsächliche Verbreitung der EDD nachzuweisen und ein weiteres Datenspektrum der EDDs zu gewinnen. Grundlagen hierfür wurden in dieser Arbeit geschaffen mit der erstmaligen vergleichenden Charakterisierung dreier EDDs, darunter die aus *T. curvata*. Diese ermöglicht durch ihre wochenlange Stabilität bei Raumtemperatur eine Vielzahl von weiteren Experimenten bzw. ihren Einsatz für biotechnologische Anwendungen, wie sie bereits für die EDD aus *C. crescentus* getestet wurden (112). Einen Vorteil bietet die EDD aus *T. curvata* hier, da für die Katalyse keine Magnesiumionen in der Lösung erforderlich sind und diese so im großen Maßstab kostengünstiger ist.

Im Zuge dieser Arbeit wurde auch ein Augenmerk auf die Synthese des Substrates der EDD, 6-Phosphogluconat, gelegt. Auf Basis von Ergebnissen verschiedener Vorarbeiten konnte durch eine neuartige Synthese das Substrat in guter Reinheit erhalten werden. Der entscheidende Vorteil jedoch ist die Möglichkeit der Synthese von gelabeltem Substrat, welche für das 1-^{13}C, das 2-^{13}C und das 3-^{13}C-6-Phosphogluconat bereits erfolgreich durchgeführt wurden. Diese gelabelten Substrate sind kommerziell nicht verfügbar und ermöglichen weitere Experimente, wie beispielsweise ENDOR-Messungen und Resonanz-Raman-Messungen zur Aufklärung der Bindung des Substrats an das aktive Zentrum. Zur Analyse von kurzlebigen Intermediaten kann eine Stopped-Flow- oder Rapid-Freeze Quench-Methode beitragen.

Der Mechanismus konnte hier nicht abschließend geklärt werden. Durch zahlreiche spektroskopische Methoden konnten jedoch Teile des Mechanismus bestimmt werden. Insbesondere die Annahme, dass die Ketonisierung nicht von der EDD katalysiert wird, konnte widerlegt werden (131). Zur weiteren Aufklärung des Mechanismus können Aktivitätsmessungen von Doppelmutanten beitragen, um die katalytische Base eindeutig zu bestimmen. Auch eine Untersuchung der Carbamylierung der Lysine durch Massenspektrometrie steht noch aus, um die Koordination des Magnesiumions, welche für andere Mitglieder der IlvD/EDD-Familie bereits durch Bestimmung der Struktur belegt wurde, zu bestimmen (151) (152). In ersten Untersuchungen wurde bereits der Verdau der EDD aus *E. coli*, *Z. mobilis* und *T. curvata* mit der Protease Thermolysin getestet. Mit anschließender chromatographischer Auftrennung und Elektronenspray Tandem Massenspektrometrie soll analog der Untersuchungen für die Xylonat-Dehydratase aus *C. crescentus* (151) die Carbamylierung bestimmt werden. Diese Experimente erfordern allerdings weitere Optimierung, um die passende Peptidgröße durch den Verdau zu erhalten, sind jedoch sehr vielversprechend. Notwendige Tests wie die Bestimmung der Inkubationsdauer im Hitzeschock (bei 60 °C) der thermostabilen EDD aus *T. curvata*

für deren Denaturierung wurden hier bereits durchgeführt.

Wie in den bioinformatischen Analysen dieser Arbeit gezeigt, ist die Verbreitung der EDD in Krankheitserregern besonders hoch. Da der Mensch keinen ED-Weg besitzt, zeigen sich hierdurch Möglichkeiten für neue Angriffspunkte in der Antibiotikaforschung auf. Die hier erstmals charakterisierte EDD aus *T. curvata* bietet hierfür hervorragende Vorraussetzungen für *in vitro*-Studien. Auch für biotechnologische Anwendungen, wie sie für die EDD aus *C. crescentus* zur Synthese von KDPG im Labormaßstab beschrieben wurde, bringt sie durch ihre Thermostabilität ausgezeichnete Voraussetzungen mit, sodass die hier gewonnenen Erkenntnisse für die weitere Forschung von Bedeutung sind.

6 Anhang

Tabelle 40: Bakterienstämme, deren Genome auf *edd* untersucht wurden

Familie	**Stamm**
Acidobacteriaceae	*Candidatus Koribacter versatilis* Ellin345
	Terriglobus roseus KBS 63, DSM 18391
Bryobacterales	*Candidatus Solibacter usitatus* Ellin6076
nicht klassifiziert	*Chloracidobacterium thermophilum* B
	Luteitalea pratensis DSM 100886
Acidimicrobiaceae	*Acidimicrobium ferrooxidans* ICP, DSM 10331
Ilumatobacteraceae	*Ilumatobacter coccineum* YM16-304
Acidothermaceae	*Acidothermus cellulolyticus* 11B
Actinomycetaceae	*Actinomyces sp.* 2129T
	Trueperella pyogenes TP1
Actinopolysporaceae	*Actinopolyspora erythraea* YIM 90600
Bifidobacteriaceae	*Bifidobacterium longum infantis* ATCC 15697
	Gardnerella vaginalis AMD
Candidatus Nanopelagicaceae	*Candidatus Planktophila dulcis* MMS-21-155
Catenulisporaceae	*Catenulispora acidiphila* ID139908, DSM 44928
Corynebacteriaceae	*Corynebacterium diphtheriae* 241
Dietziaceae	*Dietzia psychralcaliphila* ILA-1
Gordoniaceae	*Gordonia sp.* 1D
Mycobacteriaceae	*Mycobacterium tuberculosis* 0A012DS
	Mycobacteroides abscessus FLAC003
Nocardiaceae	*Nocardia brasiliensis* ATCC 700358
	Rhodococcus sp. 008
Segniliparaceae	*Segniliparus rotundus* CDC 1076, DSM 44985
Tsukamurellaceae	*Tsukamurella tyrosinosolvens* MH1
Frankiaceae	*Frankia sp.* BMG5.30
Geodermatophilaceae	*Geodermatophilus obscurus* G-20, DSM 43160
Glycomycetaceae	*Stackebrandtia nassauensis* LLR-40K-21, DSM 44728
Kineosporiaceae	*Kineococcus radiotolerans* SRS30216
Beutenbergiaceae	*Miniimonas sp.* S16
Bogoriellaceae	*Georgenia sp.* ZLJ0423
Brevibacteriaceae	*Brevibacterium aurantiacum* SMQ-1419
Cellulomonadaceae	*Cellulomonas flavigena* 134, DSM 20109
Dermabacteraceae	*Brachybacterium sp.* P6-10-X1
Dermacoccaceae	*Luteipulveratus mongoliensis* MN07-A0370
Dermatophilaceae	*Dermatophilus congolensis* NCTC 13039
Intrasporangiaceae	*Arsenicicoccus sp.* F0371
Jonesiaceae	*Jonesia denitrificans* FDAARGOS_301
Microbacteriaceae	*Agromyces sp.* FW100M-8
	Microbacterium aurum KACC 15219
Micrococcaceae	*Arthrobacter sp.* DCT5
	Micrococcus luteus AS2
Promicromonosporaceae	*Cellulosimicrobium cellulans* PSBB019
Sanguibacteraceae	*Sanguibacter keddieii* ST-74, DSM 10542
Micromonosporaceae	*Actinoplanes sp.* N902-109
Nakamurellaceae	*Nakamurella multipartita* Y-104, DSM 44233
Nocardioidaceae	*Aeromicrobium sp.* 592
Propionibacteriaceae	*Cutibacterium acnes* ATCC 11828
Pseudonocardiaceae	*Amycolatopsis mediterranei* RB
Streptomycetaceae	*Streptomyces albus* ZpM
Nocardiopsaceae	*Nocardiopsis alba* ATCC BAA-2165
Streptosporangiaceae	*Nonomuraea sp.* ATCC 55076
Thermomonosporaceae	*Thermomonospora curvata* DSM 43183
Atopobiaceae	*Atopobium parvulum* IPP 1246, DSM 20469
Eggerthellaceae	*Denitrobacterium detoxificans* NPOH1
Egibacteraceae	*Egibacter rhizosphaerae* EGI 80759
Egicoccaceae	*Egicoccus halophilus* EGI 80432
Euzebyaceae	*Euzebya sp.* DY32-46
Rubrobacteraceae	*Rubrobacter radiotolerans* DSM 5868

Tabelle 40: Bakterienstämme, deren Genome auf *edd* untersucht wurden (Fortsetzung)

Familie	**Stamm**
Conexibacteraceae	*Conexibacter woesei* ID131577, DSM 14684
Aquificaceae	*Hydrogenobacter thermophilus* TK-6, DSM 6534
Hydrogenothermaceae	*Sulfurihydrogenibium azorense* Az-Fu1
Desulfurobacteriaceae	*Desulfurobacterium thermolithotrophum* BSA, DSM 11699
Chthonomonadaceae	*Chthonomonas calidirosea* T49, DSM 23976
Fimbriimonadaceae	*Fimbriimonas ginsengisoli Gsoil* 348
Bacteroidaceae	*Bacteroides fragilis* BE1
Barnesiellaceae	*Barnesiella viscericola* C46, DSM 18177
Dysgonamonadaceae	*Proteiniphilum saccharofermentans* M3/6
Muribaculaceae	*Muribaculum sp.* H5
Odoribacteraceae	*Odoribacter splanchnicus* 1651/6, DSM 20712
Paludibacteraceae	*Paludibacter propionicigenes* WB4, DSM 17365
Porphyromonadaceae	*Porphyromonas gingivalis* AJW4
Prevotellaceae	*Prevotella melaninogenica* ATCC 25845
Rikenellaceae	*Alistipes sp.* Marseille-P5997
Tannerellaceae	*Parabacteroides distasonis* ATCC 8503
Marinifilaceae	*Marinifilaceae bacterium* SPP2
Prolixibacteraceae	*Draconibacterium orientale* FH5
Salinivirgaceae	*Salinivirga cyanobacteriivorans* L21-Spi-D4
Chitinophagaceae	*Chitinophaga sp.* MD30
Amoebophilaceae	*Candidatus Amoebophilus asiaticus* 5a2
Bernardetiaceae	*Bernardetia litoralis* DSM 6794
Cyclobacteriaceae	*Aquiflexum balticum* BA160, DSM 16537
Cytophagaceae	*Spirosoma linguale* DSM 74
Flammeovirgaceae	*Flammeovirga pectinis* L12M1
Hymenobacteraceae	*Hymenobacter sp.* APR13
Persicobacteraceae	*Persicobacter sp.* JZB09
Blattabacteriaceae	*Blattabacterium punctulatus* CPUml
Crocinitomicaceae	*Fluviicola taffensis* RW262, DSM 16823
Cryomorphaceae	*Owenweeksia hongkongensis* DSM 17368
Flavobacteriaceae	*Capnocytophaga sp.* H2931 *Chryseobacterium indologenes* AA5 *Flavobacterium psychrophilum* MH1
Ichthyobacteriaceae	*Ichthyobacterium seriolicida* JBKA-6
Haliscomenobacteraceae	*Haliscomenobacter hydrossis* O, DSM 1100
Saprospiraceae	*Saprospira grandis Lewin*
Sphingobacteriaceae	*Sphingobacterium sp.* 21
Caldisericaceae	*Caldisericum exile* AZM16c01, NBRC 104410
Calditrichaceae	*Caldithrix abyssi* LF13, DSM 13497
nicht klassifiziert	*Candidatus Cloacimonetes bacterium* bin 108 *Candidatus Saccharimonas aalborgensis*
Chlamydiaceae	*Chlamydia pneumoniae* AR39
Parachlamydiaceae	*Candidatus Protochlamydia amoebophila* UWE25
Simkaniaceae	*Simkania negevensis* Z, ATCC VR-1471
Waddliaceae	*Waddlia chondrophila* WSU 86-1044
Chlorobiaceae	*Chlorobium phaeobacteroides* DSM 266
Anaerolineaceae	*Anaerolinea thermophila* UNI-1
Ardenticatenaceae	*Candidatus Promineofilum breve* Cfx-K
Caldilineaceae	*Caldilinea aerophila* STL-6-O1, DSM 14535
Chloroflexaceae	*Chloroflexus aurantiacus* J-10-fl
Oscillochloridaceae	*Oscillochloris trichoides* DG6
Roseiflexaceae	*Roseiflexus sp.* RS-1
Herpetosiphonaceae	*Herpetosiphon aurantiacus* DSM 785
Dehalococcoidaceae	*Dehalococcoides mccartyi* DCMB5
Ktedonobacteraceae	*Ktedonobacter racemifer* SOSP1-21, DSM 44963
Sphaerobacteraceae	*Sphaerobacter thermophilus* 4ac11, DSM 20745
Thermomicrobiaceae	*Thermomicrobium roseum* DSM 5159
Chrysiogenaceae	*Desulfurispirillum indicum* S5, DSM 22839
Coprothermobacteraceae	*Coprothermobacter proteolyticus* DSM 5265
Gloeobacteraceae	*Gloeobacter kilaueensis* JS1

Tabelle 40: Bakterienstämme, deren Genome auf *edd* untersucht wurden (Fortsetzung)

Familie	**Stamm**
Aphanothecaceae	*Crocosphaera subtropica* BH68
Chroococcaceae	*Geminocystis sp.* NIES-3708
Cyanobacteriaceae	*Cyanobacterium sp.* HL-69
Microcystaceae	*Microcystis aeruginosa* NIES-2481
Chroococcidiopsidaceae	*Chroococcidiopsis thermalis* PCC 7203
Gloeomargaritaceae	*Candidatus Gloeomargarita lithophora* D10
Aphanizomenonaceae	*Nodularia spumigena* CCY9414
Calotrichaceae	*Calothrix sp.* 336/3
Fortieaceae	*Aulosira laxa* NIES-50
Hapalosiphonaceae	*Fischerella sp.* NIES-3754
Nostocaceae	*Nostoc sp.* N6
Rivulariaceae	*Rivularia sp.* PCC 7116
Scytonemataceae	*Scytonema sp.* NIES-2130
Tolypothrichaceae	*Tolypothrix tenuis* PCC 7101 NIES-37
Coleofasciculaceae	*Geitlerinema sp.* PCC 7407
Cyanothecaceae	*Cyanothece sp.* PCC 7425
Gomontiellaceae	*Crinalium epipsammum* PCC 9333
Microcoleaceae	*Arthrospira platensis* YZ
Oscillatoriaceae	*Moorea producens* JHB
Dermocarpellaceae	*Stanieria sp.* NIES-3757
Hyellaceae	*Pleurocapsa minor* PCC 7327
Spirulinaceae	*Spirulina major* PCC 6313
Acaryochloridaceae	*Acaryochloris marina* MBIC11017
Chamaesiphonaceae	*Chamaesiphon minutus* PCC 6605
Leptolyngbyaceae	*Leptolyngbya boryana* dg5
Merismopediaceae	*Synechocystis sp.* PCC 6714
Prochloraceae	*Prochlorococcus marinus* MIT1312
Prochlorotrichaceae	*Halomicronema hongdechloris* C2206
Pseudanabaenaceae	*Pseudanabaena sp.* PCC 7367
Synechococcaceae	*Synechococcus sp.* JA-3-3Ab *Thermosynechococcus elongatus* BP-1
Deferribacteraceae	*Flexistipes sinusarabici* MAS10, DSM 4947
Deinococcaceae	*Deinococcus deserti* VCD115
Trueperaceae	*Truepera radiovictrix* RQ-24, DSM 17093
Thermaceae	*Thermus thermophilus*
Dictyoglomaceae	*Dictyoglomus thermophilum* H-6-12, ATCC 35947
Elusimicrobiaceae	*Elusimicrobium minutum* Pei191
Endomicrobiaceae	*Candidatus Endomicrobium trichonymphae* Rs-D17
Fibrobacteraceae	*Fibrobacter succinogenes* S85
Alicyclobacillaceae	*Alicyclobacillus acidocaldarius* LAA1
Bacillaceae	*Bacillus amyloliquefaciens* DSM 7 *Bacillus anthracis* Pasteur *Bacillus subtilis* 916 *Geobacillus stearothermophilus* 10 *Parageobacillus thermoglucosidasius* DSM 2542
Listeriaceae	*Brochothrix thermosphacta* BI *Listeria monocytogenes* R479a
Paenibacillaceae	*Paenibacillus sp.* CAA11
Planococcaceae	*Planococcus donghaensis* DSM 22276
Sporolactobacillaceae	*Sporolactobacillus terrae* DLG3
Staphylococcaceae	*Staphylococcus aureus* 502A
Thermoactinomycetaceae	*Novibacillus thermophilus* SG-1
Aerococcaceae	*Aerococcus urinae* ACS-120-V-Col10a
Carnobacteriaceae	*Carnobacterium divergens* MFPA43A1505
Enterococcaceae	*Enterococcus faecalis* D32
Lactobacillaceae	*Lactobacillus plantarum* 16
Leuconostocaceae	*Leuconostoc mesenteroides* KFRI-MG
Streptococcaceae	*Lactococcus lactis lactis* CV56 *Streptococcus mutans* GS-5 *Streptococcus pyogenes* NS53
Christensenellaceae	*Christensenella massiliensis* Marseille-P2438

Tabelle 40: Bakterienstämme, deren Genome auf *edd* untersucht wurden (Fortsetzung)

Familie	**Stamm**
Clostridiaceae	*Clostridium botulinum* 111
Clostridiales Family XIII.	*Mogibacterium diversum* CCUG 47132
Clostridiales Family XVI.	*Carboxydocella thermautotrophica* 041
Clostridiales Family XVII.	*Thermaerobacter marianensis* 7p75a, DSM 12885
Eubacteriaceae	*Eubacterium limosum* ERS2913220
Heliobacteriaceae	*Heliobacterium modesticaldum* Ice1
Hungateiclostridiaceae	*Hungateiclostridium thermocellum* ATCC 27405
Lachnospiraceae	*Blautia sp.* KCTC 15426
Oscillospiraceae	*Oscillibacter sp.* PEA192
Peptococcaceae	*Desulfotomaculum ferrireducens* GSS09
Peptostreptococcaceae	*Clostridioides difficile* 630
Ruminococcaceae	*Ethanoligenens harbinense* W1
Symbiobacteriaceae	*Symbiobacterium thermophilum* IAM 14863
Syntrophomonadaceae	*Syntrophomonas wolfei* Goettingen, DSM 2245B
Halanaerobiaceae	*Halothermothrix orenii* H 168
Halobacteroidaceae	*Halobacteroides halobius* DSM 5150
Natranaerobiaceae	*Natranaerobius thermophilus* JW/NM-WN-LF
Thermoanaerobacteraceae	*Thermoanaerobacter ethanolicus* JW 200
Thermoanaerobacterales Family III.	*Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* DSM 571
Thermoanaerobacterales Family IV.	*Mahella australiensis* 50-1 BON, DSM 15567
Thermodesulfobiaceae	*Thermodesulfobium narugense* Na82, DSM 14796
Erysipelotrichaceae	*Erysipelothrix rhusiopathiae* GXBY-1
Limnochordaceae	*Limnochorda pilosa* HC45
Acidaminococcaceae	*Acidaminococcus fermentans* VR4, DSM 20731
Selenomonadaceae	*Selenomonas sp.* F0591
Sporomusaceae	*Pelosinus fermentans* JBW45
Veillonellaceae	*Veillonella parvula* Te3, DSM 2008
Gottschalkiaceae	*Gottschalkia acidurici* 9a
Peptoniphilaceae	*Anaerococcus mediterraneensis* Marseille-P2765
Tissierellaceae	*Soehngenia sp.* W6
Fusobacteriaceae	*Fusobacterium nucleatum nucleatum* ATCC 25586
Leptotrichiaceae	*Leptotrichia goodfellowii* F0264
Gemmatimonadaceae	*Gemmatimonas aurantiaca* T-27T
Ignavibacteriaceae	*Ignavibacterium album* Mat9-16, JCM 16511
Melioribacteraceae	*Melioribacter roseus* P3M
nicht Klassifiziert	*Victivallales bacterium* CCUG 44730
Nitrospiraceae	*Leptospirillum ferriphilum* ML-04
Candidatus Brocadiaceae	*Candidatus Kuenenia stuttgartiensis* MBR1
Phycisphaeraceae	*Phycisphaera mikurensis* NBRC 102666
Sedimentisphaeraceae	*Sedimentisphaera cyanobacteriorum* L21-RPul-D3
Gemmataceae	*Gemmata obscuriglobus* DSM 5831
Isosphaeraceae	*Paludisphaera borealis* PX4
Planctomycetaceae	*Planctomyces sp.* SH-PL14
Acidithiobacillaceae	*Acidithiobacillus caldus* ATCC 51756
Caulobacteraceae	*Caulobacter vibrioides* CB1
Emcibacteraceae	*Emcibacter sp.* MEBiC09520
Caedimonadaceae	*Candidatus Nucleicultrix amoebiphila* FS5
Candidatus Paracaedibacteraceae	*Candidatus Paracaedibacter acanthamoebae* PRA3
Holosporaceae	*endosymbiont of Acanthamoeba sp.* UWC8
Magnetococcaceae	*Magnetococcus marinus* MC-1
Parvularculaceae	*Parvularcula bermudensis* HTCC2503
Pelagibacteraceae	*Candidatus Pelagibacter sp.* RS39
Aurantimonadaceae	*Martelella sp.* AD-3
Bartonellaceae	*Bartonella sp.* 114
Beijerinckiaceae	*Beijerinckia indica indica* ATCC 9039
Bradyrhizobiaceae	*Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5079
Brucellaceae	*Brucella abortus* S19
Chelatococcaceae	*Chelatococcus daeguensis* TAD1
Hyphomicrobiaceae	*Blastochloris viridis* DSM 133
Methylobacteriaceae	*Methylorubrum extorquens* DM4
Methylocystaceae	*Pleomorphomonas sp.* SM30

Tabelle 40: Bakterienstämme, deren Genome auf *edd* untersucht wurden (Fortsetzung)

Familie	**Stamm**
Phyllobacteriaceae	*Mesorhizobium loti* NZP2037
Rhizobiaceae	*Agrobacterium tumefaciens* Ach5
	Rhizobium phaseoli sv. phaseoli N161
Rhodobiaceae	*Parvibaculum lavamentivorans* DS-1
Xanthobacteraceae	*Pseudolabrys taiwanensis* CC-BB4
Hyphomonadaceae	*Hirschia baltica* ATCC 49814
Rhodobacteraceae	*Ketogulonicigenium vulgare* SKV
	Phaeobacter inhibens P51
Acetobacteraceae	*Acetobacter pasteurianus* IFO 3283-01
	Granulibacter bethesdensis NIH1.4
Rhodospirillaceae	*Azospirillum brasilense* Sp245
Anaplasmataceae	*Anaplasma phagocytophilum* HZ
	Ehrlichia chaffeensis Osceola
Candidatus Midichloriaceae	*Candidatus Midichloria mitochondrii* IricVA
Rickettsiaceae	*Rickettsia japonica* HH07167
Erythrobacteraceae	*Altererythrobacter epoxidivorans* CGMCC 1.7731
Sphingomonadaceae	*Novosphingobium sp.* P6W
	Sphingomonas taxi ATCC 55669
	Zymomonas mobilis mobilis ATCC 29191
Alcaligenaceae	*Achromobacter xylosoxidans* C54
	Bordetella pertussis ATCC BAA-1335D-5
Burkholderiaceae	*Burkholderia pseudomallei* BDP
	Ralstonia solanacearum OE1-1
Comamonadaceae	*Acidovorax carolinensis* P3
Oxalobacteraceae	*Janthinobacterium sp.* B9-8
Sutterellaceae	*Sutterella sp.* 6FBBBH3
Chromobacteriaceae	*Chromobacterium sp.* ATCC 53434
Neisseriaceae	*Neisseria gonorrhoeae* FA19
Gallionellaceae	*Ferriphaselus amnicola* OYT1
Methylophilaceae	*Methylotenera mobilis* JLW8
Nitrosomonadaceae	*Nitrosomonas eutropha* C91
Sterolibacteriaceae	*Methyloversatilis sp.* RAC08
Thiobacillaceae	*Thiobacillus denitrificans* ATCC 25259
Azonexaceae	*Dechloromonas aromatica* RCB
Rhodocyclaceae	*Aromatoleum aromaticum* EbN1
Zoogloeaceae	*Azoarcus sp.* BH72
Bradymonadaceae	*Bradymonas sediminis* FA350
Desulfarculaceae	*Desulfarculus baarsii* 2st14, DSM 2075
Desulfobacteraceae	*Desulfobacterium autotrophicum* HRM2, DSM 3382
Desulfobulbaceae	*Desulfobulbus oralis* ORNL
Desulfohalobiaceae	*Desulfohalobium retbaense* HR100, DSM 5692
Desulfomicrobiaceae	*Desulfomicrobium orale* DSM 12838
Desulfovibrionaceae	*Desulfovibrio vulgaris* RCH1
Desulfurellaceae	*Desulfurella acetivorans* A63, DSM 5264
Desulfuromonadaceae	*Desulfuromonas soudanensis* WTL
Geobacteraceae	*Geobacter sp.* M18
Anaeromyxobacteraceae	*Anaeromyxobacter sp.* Fw109-5
Archangiaceae	*Stigmatella aurantiaca* DW4/3-1
Kofleriaceae	*Haliangium ochraceum* SMP-2, DSM 14365
Labilitrichaceae	*Labilithrix luteola* DSM 27648
Myxococcaceae	*Myxococcus stipitatus* DSM 14675
Polyangiaceae	*Sorangium cellulosum* So ce 56
Sandaracinaceae	*Sandaracinus amylolyticus* DSM 53668
Vulgatibacteraceae	*Vulgatibacter incomptus* DSM 27710
Syntrophaceae	*Desulfomonile tiedjei* DCB-1, DSM 6799
Syntrophobacteraceae	*Syntrophobacter fumaroxidans* MPOB
Campylobacteraceae	*Campylobacter coli* BG2108
Helicobacteraceae	*Helicobacter pylori* BM012A
Nautiliaceae	*Lebetimonas sp.* JH369
Acidiferrobacteraceae	*Acidiferrobacter sp.* SPIII_3
Aeromonadaceae	*Aeromonas hydrophila* J-1

Tabelle 40: Bakterienstämme, deren Genome auf *edd* untersucht wurden (Fortsetzung)

Familie	**Stamm**
Alteromonadaceae	*Alteromonas macleodii* ATCC 27126
	Marinobacter salarius SMR5
Colwelliaceae	*Colwellia sp.* Arc7-D
Ferrimonadaceae	*Ferrimonas balearica* PAT, DSM 9799
Idiomarinaceae	*Idiomarina piscisalsi* 10PY1A
Moritellaceae	*Moritella viscosa* 06/09/139
Pseudoalteromonadaceae	*Pseudoalteromonas piscicida* DE2-A
Psychromonadaceae	*Psychromonas sp.* CNPT3
Shewanellaceae	*Shewanella oneidensis* MR-1
Cardiobacteriaceae	*Dichelobacter nodosus* VCS1703A
Cellvibrionaceae	*Cellvibrionaceae bacterium* 017
Halieaceae	*Halioglobus pacificus* RR3-57
Microbulbiferaceae	*Microbulbifer thermotolerans* DAU221
Spongiibacteraceae	*Oceanicoccus sagamiensis* NBRC 107125
Chromatiaceae	*Rheinheimera sp.* D18
Ectothiorhodospiraceae	*Acidihalobacter prosperus* F5
Granulosicoccaceae	*Sulfuriflexus mobilis* aks1
Halothiobacillaceae	*Halothiobacillus neapolitanus* c2, ATCC 23641
Thioalkalispiraceae	*Sulfurivermis fontis* JG42
Wenzhouxiangellaceae	*Wenzhouxiangella marina* KCTC 42284
Woeseiaceae	*Woeseia oceani* XK5
Budviciaceae	*Pragia sp.* CF-458
Enterobacteriaceae	*Candidatus Hamiltonella defensa* A2C
	Cronobacter sakazakii CS-09
	Klebsiella pneumoniae 2N3
	Salmonella enterica enterica sv Typhimurium 4/74
Erwiniaceae	*Buchnera aphidicola* Ct
Hafniaceae	*Edwardsiella tarda* EIB202
Morganellaceae	*Proteus mirabilis* CYPV1
Pectobacteriaceae	*Pectobacterium carotovorum* SCC1
Yersiniaceae	*Serratia marcescens* AS1
	Yersinia pestis 1412
Immundisolibacteraceae	*Immundisolibacter cernigliae* TR3.2
Coxiellaceae	*Coxiella burnetii* CbuG_Q212
Legionellaceae	*Legionella pneumophila Corby*
Methylococcaceae	*Methylomonas denitrificans* FJG1
Sinobacteraceae	*Solimonas sp.* K1W22B-7
Alcanivoracaceae	*Alcanivorax sp.* N3-7A
Endozoicomonadaceae	*Endozoicomonas atrinae* WP70
Hahellaceae	*Hahella sp.* KA22
Halomonadaceae	*Candidatus Portiera aleyrodidarum*
Kangiellaceae	*Kangiella koreensis* SW-125, DSM 16069
Oceanospirillaceae	*Marinomonas primoryensis* AceL
Oleiphilaceae	*Oleiphilus messinensis* ME102
Saccharospirillaceae	*Reinekea forsetii* Hel1_31_D35
Orbaceae	*Gilliamella apicola* wkB1
Pasteurellaceae	*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* VT1169
	Haemophilus influenzae R2846
Moraxellaceae	*Acinetobacter baumannii* ATCC 17978-mff
Pseudomonadaceae	*Azotobacter vinelandii* CA
	Pseudomonas aeruginosa ATCC 15692
Salinisphaeraceae	*Salinisphaera sp.* LB1
Francisellaceae	*Francisella tularensis* T01
Piscirickettsiaceae	*Piscirickettsia salmonis* LF-89
Thiotrichaceae	*Beggiatoa leptomitoformis* D-402
Vibrionaceae	*Photobacterium damselae damselae* KC-Na-1
	Vibrio cholerae E1320
Rhodanobacteraceae	*Dyella jiangningensis* SBZ 3-12
Xanthomonadaceae	*Stenotrophomonas maltophilia* ISMMS3
	Xanthomonas citri pv. citri GD3
Hydrogenophilaceae	*Hydrogenophilus thermoluteolus* TH-1

Tabelle 40: Bakterienstämme, deren Genome auf *edd* untersucht wurden (Fortsetzung)

Familie	**Stamm**
Bacteriovoracaceae	*Bacteriovorax stolpii* UKi2
Halobacteriovoraceae	*Halobacteriovorax marinus* SJ
Bdellovibrionaceae	*Bdellovibrio bacteriovorus* HD100
Silvanigrellaceae	*Silvanigrella aquatica* MWH-Nonnen-W8red
Mariprofundaceae	*Mariprofundus aestuarium* CP-5
Brachyspiraceae	*Brachyspira hyodysenteriae* BH718
Leptospiraceae	*Leptospira interrogans sv. Copenhageni* FDAARGOS_203
Borreliaceae	*Borrelia miyamotoi* Izh-4
Spirochaetaceae	*Treponema pallidum pallidum* 15df UW254
Synergistaceae	*Aminobacterium colombiense* ALA-1, DSM 12261
Acholeplasmataceae	*Candidatus Phytoplasma australiense* NZSb11
Entomoplasmataceae	*Mesoplasma florum* CnuA-2
Spiroplasmataceae	*Spiroplasma mirum* ATCC 29335
Mycoplasmataceae	*Mycoplasma bovis* JF4278
Thermodesulfobacteriaceae	*Thermodesulfobacterium commune* DSM 2178
Kosmotogaceae	*Kosmotoga olearia* TBF 19.5.1
Petrotogaceae	*Defluviitoga tunisiensis* L3
Fervidobacteriaceae	*Thermosipho melanesiensis* 431
Thermotogaceae	*Thermotoga maritima* MSB8
Methylacidiphilaceae	*Methylacidiphilum infernorum* V4
Opitutaceae	*Nibricoccus aquaticus* HZ-65
Puniceicoccaceae	*Coraliomargarita akajimensis* DSM 45221
nicht Klassifiziert	*Candidatus Xiphinematobacter sp. Idaho Grape*
Akkermansiaceae	*Akkermansia muciniphila* AMDK-4

Tabelle 41: Liste der auf *edd* untersuchten Bakterienklassen in NCBI

Phylum	**Klasse**
Acidobacteria	Acidobacteria
	Blastocatellia
	Vicinamibacteria
Actinobacteria	Acidimicrobiia
	Coriobacteriia
	Nitriliruptoria
	Rubrobacteria
	Thermoleophilia
Aquificae	Aquificae
Armatimonadetes	Chthonomonadetes
	Fimbriimonadia
Bacteroidetes	Bacteroidia
	Chitinophagia
	Cytophagia
	Flavobacteriia
	Saprospiria
	Sphingobacteriia
Caldiserica	Caldisericia
Calditrichaeota	Calditrichae
Chlamydiae	Chlamydiia
Chlorobi	Chlorobia
Chloroflexi	Anaerolineae
	Ardenticatenia
	Caldilineae
	Chloroflexia
	Dehalococcoidia
	Ktedonobacteria
	Thermomicrobia

Tabelle 41: Liste der auf *edd* untersuchten Bakterienklassen in NCBI (Fortsetzung)

Phylum	**Klasse**
Chrysiogenetes	Chrysiogenetes
Coprothermobacterota	Coprothermobacteria
Cyanobacteria	Gloeobacteria
Deferribacteres	Deferribacteres
Deinococcus-Thermus	Deinococci
Dictyoglomi	Dictyoglomia
Elusimicrobia	Elusimicrobia Endomicrobia
Fibrobacteres	Fibrobacteria
Firmicutes	Bacilli Clostridia Erysipelotrichia Limnochordia Negativicutes Tissierellia
Fusobacteria	Fusobacteriia
Gemmatimonadetes	Gemmatimonadetes
Ignavibacteriae	Ignavibacteria
Lentisphaerae	Lentisphaeria
Nitrospirae	Nitrospira
Planctomycetes	Candidatus Brocadiae Phycisphaerae Planctomycetia
Proteobacteria	Acidithiobacillia Hydrogenophilalia Oligoflexia Zetaproteobacteria
Spirochaetes	Spirochaetia
Synergistetes	Synergistia
Tenericutes	Mollicutes
Thermodesulfobacteria	Thermodesulfobacteria
Thermotogae	Thermotogae
Verrucomicrobia	Methylacidiphilae Opitutae Spartobacteria Verrucomicrobiae

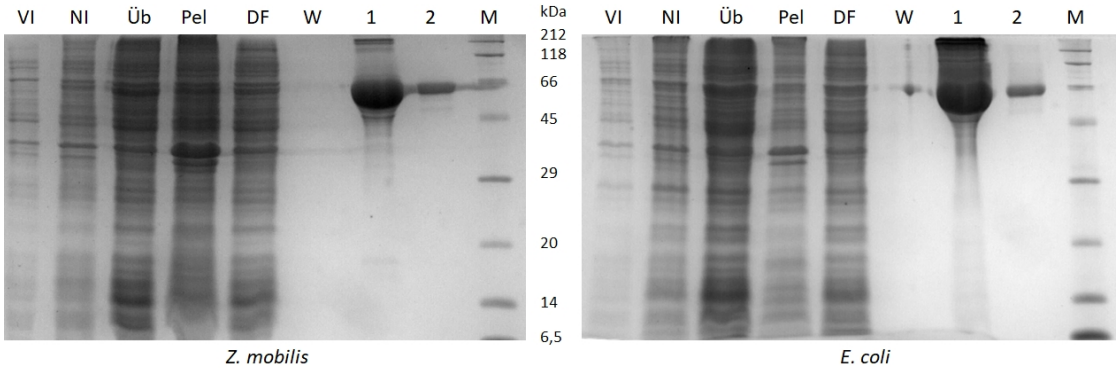


Abbildung 68: SDS-PAGE der Aufreinigung von EDD aus *Z. mobilis* und *E. coli*. VI: Vor Induktion, NI: Nach Induktion, Üb: Überstand, Pel: Pellet, DF: Durchfluss, W: Waschschritt, EDD *Z. mobilis* 1: 27 µg, 2: 1,4 µg, EDD *E. coli* 1: 70 µg, 2: 3,5 µg, M: Marker

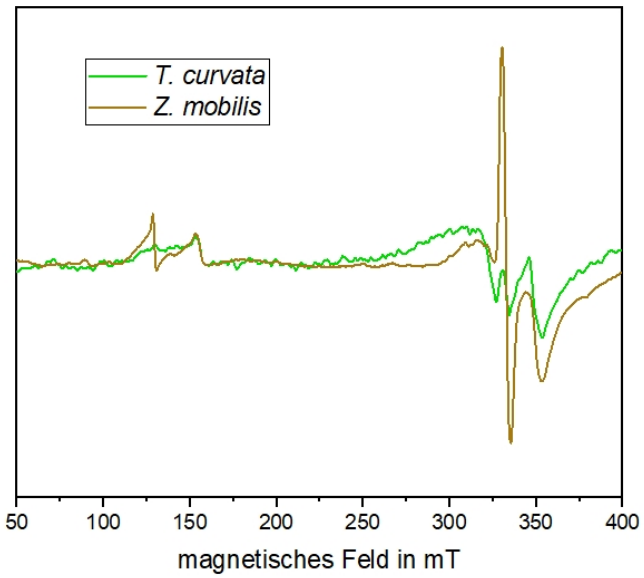


Abbildung 69: ESR Spektren der EDD aus *Z. mobilis* und *T. curvata* bei 10 K

Tabelle 42: Parameter der Anpassung der Mößbauerspektren im externen Magnetfeld (Abbildung 70)

diamagnetische Anpassung (S = 0)

Parameter	1. Komponente Spezies A	2. Komponente Spezies B	3. Komponente
δ (mm/s)	0,45 ± 0,03	0,45 ± 0,05	0,35 ± 0,05
ΔE_Q (mm/s)	1,19 ± 0,05	1,29 ± 0,10	0,68 ± 0,10
η (mm/s)	0 ± 0,5	0 ± 0,5	0 ± 0,5
$\Gamma_{0,1T}$ (mm/s)	0,35 ± 0,02	0,35 ± 0,03	0,35 ± 0,03
Γ_{5T} (mm/s)	0,33 ± 0,03	0,33 ± 0,05	0,33 ± 0,05
Area (%)	67 ± 5	22 ± 5	11 ± 5

paramagnetische Anpassung (S = 5/2)

Parameter	1. Komponente Spezies A	2. Komponente Spezies B	3. Komponente
δ (mm/s)	0,45 ± 0,03	0,45 ± 0,05	0,35 ± 0,05
ΔE_Q (mm/s)	1,19 ± 0,05	1,29 ± 0,10	-0,68 ± 0,10
η (mm/s)	0 ± 0,5	0 ± 0,5	0,2 ± 0,5
D (1/cm)	-	-	1,9
E/D	-	-	0,23
A (kG)	-	-	-165 -159 -169
$\Gamma_{0,1T}$ (mm/s)	0,45 ± 0,02	0,45 ± 0,03	0,4
Γ_{5T} (mm/s)	0,33 ± 0,03	0,33 ± 0,05	0,5
Area (%)	67 ± 5	22 ± 5	11 ± 5

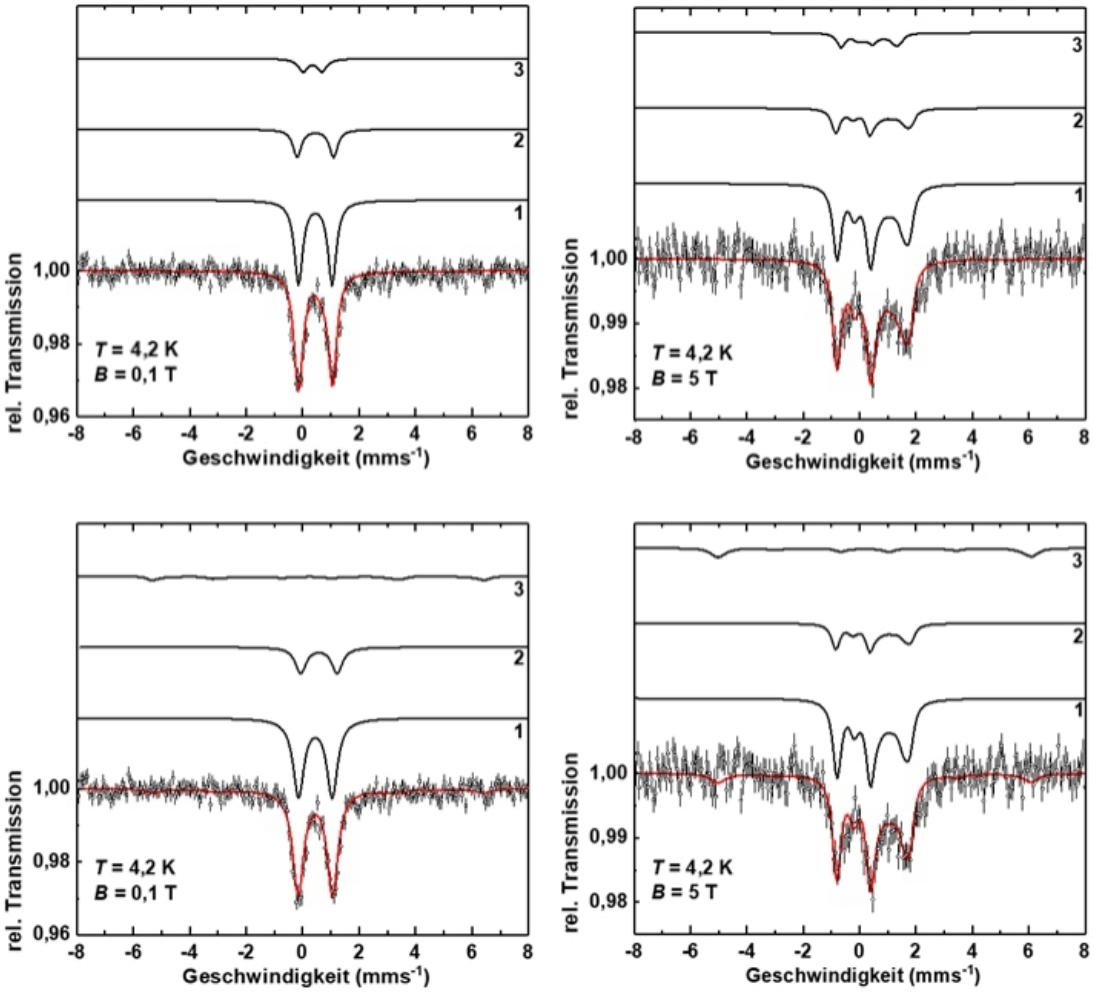
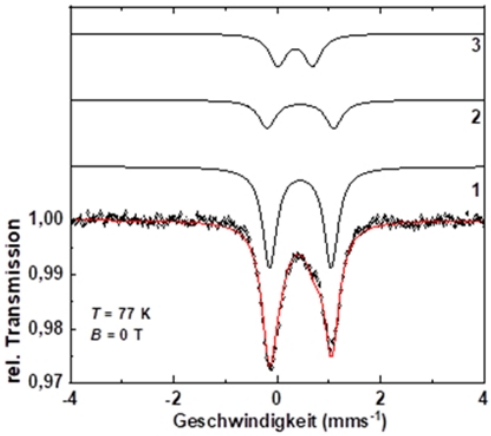


Abbildung 70: Mößbauerspektren im externen Magnetfeld von B = 0,1 T bzw. B = 5 T der EDD S525A aus *T. curvata*; oben: Anpassung unter Annahme eines diamagnetischen Verhaltens (Gesamtspin S = 0) von Komponente 3; unten: Anpassung unter der Annahme eines paramagnetischen Verhaltens (Gesamtspin S = 5/2) der Komponente 3; paramagnetische Parameter analog zu oxidierter Form von Rubredoxin gewählt; Parameter siehe Tabelle 42 (165)



Parameter	1.Komponente	2.Komponente	3.Komponente
δ (mm/s)	0,45 ± 0,02	0,45 ± 0,05	0,35 ± 0,03
ΔE_Q (mm/s)	1,19 ± 0,03	1,29 ± 0,10	0,68 ± 0,04
Γ (mm/s)	0,33 ± 0,02	0,39 ± 0,05	0,39 ± 0,03
Fläche (%) mit Substrat	59 ± 2	19 ± 2	22 ± 2
Fläche (%) ohne Substrat	58 ± 2	19 ± 2	23 ± 2

Abbildung 71: Mößbauerspektren der EDD aus *T. curvata* (vollständig gelabelt) nach Inkubation mit Substrat 6-Phosphogluconat (14 mM Endkonzentration; 2 Minuten; ca. 24 °C, anaerob); zum Vergleich sind die Flächen für die Probe ohne Substratzugabe angegeben

7 Materialien

7.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Agarosegelelektrophorese-System	Biostep®
Anaerobe Glove Box	COY Lab products JBL GmbH & Co.KG Pumpe Pro Silent a50
Autoklav	Systec V 65 Zirbus LVSA40/60
Biofreezer	Sanyo, Vip
Brutschränke	Thermo Scientific Heratherm IMC 18 VRW Incu-therm
Chromatographiesystem	GE Healthcare Äkta Start
Digitalkamera	Canon IXUS 132 Traveler IS12
Drehschiebervakuumpumpe	RZ6
Eismaschine	CMM
Elektroden	Mettler Toledo InLab® Easy-Elektrode Mettler Toledo InLab® Micro-Elektrode Bioblock Scientific
ESR und Zubehör	Bruker Elexsys E580 Electron Paramagnetic Resonance Console Bruker Pulsed Microwave Bridge E580-1010 Bruker Netzteil ER 082 (155/45) Bruker 122SHQE-W1/1017 Cavity Bruker ER 167FDS-Q Fingerdewar Oxford Instrument ESR 900 helium continuous-flow cryostat
Fraktionssammler	Beckman SC100
French Press	SLM Instruments Aminco FA-078, FA-073
Laborboy	Rudolf Grauer AG, Swiss Boy 110
Magnetrührer	IKA-Combimag RE 6 Janke & Kunkel IKA Werk KMO 2 electronic
Mikroskop	Digital sight DS-2Mv von Nikon
Mikrowelle	Privileg M401
Mößbauerspektroskopie	WissEl GmbH Analyser Optistat^{DN} Stickstoffffluss-Kryostat Oxford Instruments CRYO Industries of America Inc. Helium closed-cycle Kryostat
NMR-Gerät	Buga Avance III 400 Bruker
pH-Meter	WTW pH 521
Photoautomat	Fusion SL Vilber Lourmat

Geräte (Fortsetzung)

Gerät	Hersteller
Pipetten	Eppendorf 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1 ml
Pipettierroboter	Brand accu-jet® pro Douglas Instruments Oryx Nano
Pumpe	Pharmacia Biotech Peristaltikpumpe P-1 Pharmacia Biotech Pump P-500
Redoxtitration	Mettler Toledo Seven Excellence Multiparameter Funksteckdose der TU Kaiserslautern
Resonanz-Raman-Laser	Coherent. Innova 300C
Resonanz-Raman-Mikroskop	Olympus BS41 Horiba Jobinvon Raman Divition
Resonanz-Raman-Spektrometer	LabRam HR-800 Jobin Yvon
Resonanz-Raman-Strahlengang	Coherent.
Rollschüttler	NEO LAB D6050
Rotationsverdampfer	Rotavapor Büchi 111 Water Bath Büchi 461 Vacuumcontroller Büchi B 161
Rotator	Stuart rotator SB3
Rotoren	Beckman Ti70 Beckman JA-10 Beckman coulter JLA-8.1 Beckman coulter JA25.50 Eppendorf A-4-62
Schüttelinkubatoren	Infors HT Multitron Pro Thermo Scientific Luftschüttler MaxQ 4000 Innova 400 New Brunswick Scientific New Brunswick Excella E25
Sonicator	Bandelin Sonoplus Bandelin Electronic
Spannungsquelle	VWR Power Source 300 V BioRad PowerPAC 300
Sterilbank	Heraeus Instruments LaminAir HB 2448 Thermo Scientific Msc-Advantage
Thermocycler	Hybaid Limited PCR Sprint Thermal Cycler Bio-Rad T100 Thermal Cycler
Thermomixer	Eppendorf Thermomixer comfort Cell Media pro Eppendorf Thermomixer 5436
Thermostat für Magnetrührer	Heidolph EKT Hei-Con
Trockenschrank	Heraeus T5050 Memmert
Ultrazentrifuge	Beckman Optima™ LE-80K
UV/Vis-Spektrometer	Thermo Scientific Genesys 10 UV scanning Eppendorf Bio Photometer plus

Geräte (Fortsetzung)

Gerät	Hersteller
UV/Vis-Spektrometer	Jenway 7315 Spectrophotometer Genesys 105 UV-Vis Spektrometer Shimadzu UV-1900 UV-VIS
UV-Lichtquelle	CAMAG
Vortexer	Heidolph Reax 1 D Kunkel IKA-Labortechnik VF 2 Phoenix Instrument, RS-VA 10
Vakuumpumpe	Vacuumbrand VAP5
Waagen	Feinwaage Mettler Toledo excellence Satorius L610 D Mettler AT201 Fact Phoenix Instrument
Wasserdestillationsapparatur	Wisag Destamat Bi 18E Sartorius arium®pro
Wippschüttler	IKA Rocker 3D digital
Zentrifugen	Eppendorf Centrifuge 5810 R Eppendorf Centrifuge 5430 R Eppendorf Centrifuge 5415 C Beckmann Coulter Avanti J-26S XP Beckman Model J2-21 VWR MicroStar 17 Sigma 1-16

7.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller/Marke
Cryo-Röhrchen	Greiner
Einmal-Mikropipetten	Duran/Brand
Einwegimpfösen	Sarstedt
Einwegpipetten (5 ml, 10 ml)	Sarstedt
Filter zum Sterilfiltrieren	VWR Sarstedt
Gummiwischer	Deutsch und Neumann
Kanülen	B. Braun
Küvetten	Brand Plastibrand Einmalküvetten Eppendorf UVetten® Sarstedt
Parafilm	Bemis
Pasteurpipetten	Roth
PD10-Säulen	GE-Healthcare
PD Spin Trap™ G-25 Säulen	GE-Healthcare

Verbrauchsmaterialien (Fortsetzung)

Verbrauchsmaterial	Hersteller/Marke
Pipettenspitzen Ultratip (10 µl, 200 µl, 1 ml)	Sarstedt
Reaktionsgefäße Cellstar Tubes (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-one Sarstedt
Reaktionsgefäße Reaction Tubes (1,5 ml, 2 ml)	Greiner Bio-one
Reaktionsgefäße PCR-Tubes	Greiner Bio-one
Rosettenzelle	Spezialanfertigung Glasbläserei TUK ähnlich zu Bandelin RZ2
Spritzen	B. Braun
Ultrafiltrationseinheit	Pall Corporation Sartorius
UV-Küvetten	Brand
Zellkulturschalen	Sarstedt
Zentrifugenbehälter	Beckman Coulter Nalgene

7.3 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Aceton	VWR Chemicals
Agar-Agar	Roth
Agarose	Biozym
Ammoniak	TUK
Ammoniumacetat	Riedel-de Haën
Ammoniumchlorid	Carl Roth
Ammoniumeisen(II)-Sulfat (Mohrsches Salz)	Riedel de Haën
Ammoniumeisen(III)-Citrat	Sigma Aldrich
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma Aldrich
Ammoniumsulfat	Merck
Ampicillin	AppliChem
Ascorbinsäure	Sigma Aldrich
Bariumacetat	Roth
Bariumhydroxid	TUK
Benzylviologendichlorid	Sigma Aldrich
Brom	TUK
Bromphenolblau	Serva
Calciumchlorid	Sial
N-Cyclohexyl-3-aminopropansulfonsäure (CAPS)	Roth
L-Cysteinhydrochlorid-Monohydrat	Sigma Aldrich
Desoxycholat (DOC)	Sigma Aldrich
Desoxyribonucleosidtriphopsphate (dNTPs)	New England Biolabs
Desthiobiotin	IBA

Chemikalien (Fortsetzung)

Chemikalie	**Hersteller**
Diethylether	Fischer Scientific
Dikaliumphosphat	Merck
N,N‘-Dimethylphenylendiamin (DMPD)	Fluka
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem
Deuteriumoxid (99,96 atom-% D)	Sigma Aldrich deutero
Eisen(III)-Chlorid (97 %)	Sigma Aldrich
^{57}Fe-Pulver	bereitgestellt von AG Schünemann TUK
Essigsäure	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatrium-Dihydrat(EDTA)	AppliChem
Ethanol (absolut 99,8 %)	Roth
Feren	Sigma Aldrich
Formiergas Arcal F5 (5 % H_2/95 % N_2)	Air Liquide
Glucose-Monohydrat	Roth
D-Glucose 1-^{13}C	Sigma Aldrich
D-Glucose 2-^{13}C	Sigma Aldrich
D-Glucose 3-^{13}C	Sigma Aldrich
Glucose-6-phosphat	Sigma Aldrich
Glutathion oxidiert	AppliChem
Glutathion reduziert	AppliChem
α-Glycerophosphat (Magnesiumsalz)	Sigma
Glycerin	Roth
Glycin	AppliChem
Hefeextrakt	Roth
Helium (flüssig)	Air Liquide
Hexaammincobalt(III)-Chlorid	Fluka
4´-Hydroxyazobenzen-2-Carbonsäure (HABA)	Sigma Aldrich
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	AppliChem
2-Hydroxy-1,4-naphthochinon	Sigma Aldrich
Imidazol	AppliChem
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Roth
Kaliumchlorid	Merk
Kaliumhexacyanoferrat(III)	Sigma Aldrich
Kaliumhydroxid	J. T. Baker
Kaliumdihydrogenphosphat	Merk
Kanamycinsulfat	AppliChem
2-Keto-3-Desoxy-6-Phosphogluconat	Sigma
Kupfersulfat-Pentahydrat	AppliChem
LB-Medium	Roth

Chemikalien (Fortsetzung)

Chemikalie	**Hersteller**
Lithiumsulfid	Sigma Aldrich
Loading Dye	New England Biolabs
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Merck
Mangan(II)-Chlorid	Fluka
Methanol	Sigma Aldrich
Methylviologen	Sigma Aldrich
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	AppliChem
2-(*N*-Morpholino)ethansulfonsäure (MES)	Serva
Natriumacetat	Riedel de Haën
Natriumanthrochinon-2-sulfonat	Sigma Aldrich
Dinatriumcarbonat	Merk
Natriumchlorid	Merk
Trinatriumcitrat-Dihydrat	Merck
Natriumhydroxid	J. T. Baker
Natriumdesoxycholat	Serva
Natriumdihydrogenphosphat-monohydrat	Merck
Natriumdodecylsulfat	Roth
Natriumpyrophophat Dibasic	Sigma
Natriumsulfat	Merck
Natriumthiosulfat	Sigma Aldrich AppliChem
Natriumtrimethylsilylpropionat D_4 (TMSP)	Sigma Aldrich Alfa Aesar
Neutralrot	Sigma Aldrich
Nicotinamidadenindinukleotid (NADH)	Roche
Phenosafranin	Sigma Aldrich
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma Aldrich
6-Phosphogluconat Trinatriumsalz	Sigma Aldrich
Rinderserumalbumin (BSA)	Uptima Interchem
Rubidiumchlorid	Sigma Aldrich
Salzsäure	J. T. Baker
Safranin O	Sigma Aldrich
Schwefelsäure	Fluka
Stickstoff (technisch, 5.0)	Air Liquide
TAPS	Roth
Tetracyclinhydrochlorid	AppliChem
Trichloressigsäure	Sigma Aldrich
Trypton	AppliChem
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	AppliChem
Wasser (97 atom-% ^{18}O)	Aldrich
Zinkacetat-Dihydrat	Sigma Aldrich

7.4 Vorgefertigte Lösungen und Reagenzien

Lösungen	Hersteller
Acrylamid/Bisacrylamid Rotiphorese Gel 30 (37,5:1)	Roth
GelRed	New England Biolabs
Gel Loading Dye Purple (6-fach)	New England Biolabs
InstantBlue™	Expedeon
pH-Eichlösungen	AppliChem
Pliwa	Hansa Trading
Puffer für Enzyme:	
Cut Smart®Buffer	BioLabs
5xPhusion®HF Reaction Buffer	BioLabs
10xBuffer for T4 DNA Ligase with 10 mM ATP	BioLabs

7.5 Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	
Agarose-Gelelektrophorese		
TAE (50-fach)	242 g	Tris
	37,2 g	EDTA
	57,1 ml	Essigsäure (konz.)
SDS-PAGE		
Trenngelpuffer	45,5 g	Tris
	1 g	SDS
	pH 8,8	HCl
	ad 250 ml	H_2O
Sammelgelpuffer	15,5 g	Tris
	1 g	SDS
	pH 6,8	HCl
	ad 250 ml	H_2O
Laufpuffer (10-fach)	30 g	Tris
	10 g	SDS
	144 g	Glycerin
	pH 8,3	HCl
	ad 1 L	H_2O
Probenpuffer (2-fach)	0,15 g	Tris
	2 g	Glycerin
	0,4 g	SDS
	pH 6,8	HCl
	2 mg	Bromphenolblau
	31 mg	DTT
	ad 10 ml	H_2O

Puffer und Lösungen (Fortsetzung)

Puffer/Lösung	**Zusammensetzung**	
nicht reduzierender Probenpuffer (2-fach)	0,15 g	Tris
	10 g	Glycerin
	2 g	SDS
	pH 6,8	HCl
	10 mg	Bromphenolblau
	ad 10 ml	H_2O
APS (10 %)	1 g	Ammoniumpersulfat
	ad 10 ml	H_2O
Micro-Biuret		
BSA (2 mg/ml)	100 mg	BSA
	ad 50 ml	H_2O
DOC (0,15 %)	0,15 g	DOC
	ad 100 ml	H_2O
TCA (70 %)	35 g	TCA
	ad 50 ml	H_2O
NaOH (3 %)	3 g	NaOH
	ad 100 ml	H_2O
Microbiuretreagenz	17,3 g	Trinatriumcitrat
	10 g	Dinatriumcarbonat
	1,73 g	Kupfersulfat-Pentahydrat
	ad 100 ml	H_2O
Bestimmung der Eisenkonzentration		
Mohrsches Salz	39 mg	Mohrsches Salz
	ad 500 ml	H_2O
HCl (1 %)	1,4 ml	HCl (37 %)
	ad 50 ml	H_2O
Ammoniumacetat (7,5 %)	3,75 g	Ammoniumacetat
	ad 50 ml	H_2O
SDS (2,5 %)	1,25 g	SDS
	ad 50 ml	H_2O
Ascorbinsäure (4 %)	100 mg	Ascorbinsäure
	2,5 ml	H_2O
Feren (1,5 %)	75 mg	Feren
	ad 5 ml	H_2O
Bestimmung der Sulfidkonzentration		
Lithiumsulfid (20 mM)	45,95 mg	Lithiumsulfid
	ad 10 ml	NaOH (10 mM)
Lithiumsulfid (2 mM)	100 µl	Lithiumsulfid (20 mM)
	ad 1 ml	NaOH (10 mM)

Puffer und Lösungen (Fortsetzung)

Puffer/Lösung	**Zusammensetzung**	
Zinkacetat (10 %)	1 g	Zinkacetat
	10 ml	H_2O
NaOH (7 %)	0,7 g	NaOH
	ad 10 ml	H_2O
DMPD (0,1 %)	10 mg	DMPD
	ad 10 ml	HCl (5 M)
$FeCl_3$ (10 mM)	16,2 mg	$FeCl_3$
	2 ml	HCl
	ad 10 ml	H_2O
Kulturmedien und Zusätze		
LB-Medium	25 g	LB-Medium
	ad 1 L	H_2O
		autoklavieren
Ampicillin (100 mg/ml)	1,2 mg	Ampicillin
	ad 12 ml	H_2O
Kanamycin (30 mg/ml)	360 mg	Kanamycinsulfat
	ad 12 ml	H_2O
Tetracyclin (10 mg/ml)	120 mg	Tetracyclinhydrochlorid
	ad 12 ml	Ethanol (70 %)
IPTG (0,5 M)	1,19 g	IPTG
	ad 10 ml	H_2O
		sterilfiltrieren
MES (1 M)	4,88 g	MES
	pH 6,2	KOH
	ad 25 ml	H_2O
		sterilfiltrieren
SOB	20 g	Trypton
	5 g	Hefeextrakt
	pH 7	
		autoklavieren
	2,5 ml	Kaliumchlorid (1 M, steril)
	10 ml	Magnesiumchlorid (1 M, steril)
	10 ml	Magnesiumsulfat (1 M, steril)
	2 ml	Natriumchlorid (5 M, steril)
TFB	0,5 ml	MES (1 M)
	600 mg	Rubidiumchlorid
	450 mg	Mangan(II)chlorid
	58 mg	Calciumchlorid
	40 mg	Hexamincobalt(III)chlorid
	ad 50 ml	H_2O
		sterilfiltrieren

Puffer und Lösungen (Fortsetzung)

Puffer/Lösung	**Zusammensetzung**	
Basis für Minimalmedium	30 g	Dinatriumhydrogenphosphat
	15 g	Kaliumdihydrogenphosphat
	2,5 g	Natriumchlorid
	5 g	Ammoniumchlorid
	ad 1 L	H_2O
		autoklavieren
Glucose (20 %)	100 g	Glucose
	400 ml	H_2O
		autoklavieren
Calciumchlorid (1 M)	7,3 g	Calciumchlorid-Dihydrat
	ad 50 ml	H_2O
		sterilfiltrieren
Magnesiumsulfat (1 M)	62 g	Magnesiumsulfat-Pentahydrat
	ad 250 ml	H_2O
		sterilfiltrieren
Proteinaufreinigung		
Puffer-W (20 mM)	20 ml	Tris/HCl (1 M, pH 8 oder 10,5)
	30 ml	NaCl (5 M)
	10 ml	Magnesiumsulfat-Heptahydrat (1 M)
	ad 1 L	H_2O
		sterilfiltrieren
Puffer-W-mit (20 mM)	20 ml	Tris/HCl (1 M, pH 8)
	30 ml	NaCl (5 M)
	10 ml	Magnesiumsulfat-Heptahydrat (1 M)
	100 ml	Glycerin
	ad 1 L	H_2O
		sterilfiltrieren
Puffer E	27 mg	Desthiobiotin
	ad 20 ml	Puffer-W-mit
Puffer R (10-fach)	24,2 mg	HABA
	ad 10 ml	NaOH (10 mM)
Puffer R	1 ml	Puffer R (10-fach)
	ad 10 ml	Puffer-W
Lysepuffer	1,5 g	Natriumdihydrogenphosphat
	4,4 g	Natriumchlorid
	170 mg	Imidazol
	pH 8	
	ad 250 ml	H_2O
		sterilfiltrieren

Puffer und Lösungen (Fortsetzung)

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	
Waschpuffer	1,5 g	Natriumdihydrogenphosphat
	4,4 g	Natriumchlorid
	340 mg	Imidazol
	pH 8	
	ad 250 ml	H_2O
		sterilfiltrieren
Entsalzungspuffer	2 ml	Tris/HCl (1 M, pH 8)
	15 ml	NaCl (1 M)
	ad 100 ml	H_2O
Elutionspuffer	0,3 g	Natriumdihydrogenphosphat
	0,88 g	Natriumchlorid
	850 mg	Imidazol
	pH 8	
	ad 50 ml	H_2O
		sterilfiltrieren
Puffer A	20 ml	Tris/HCl (1 M, pH 8)
	10 ml	Magnesiumsulfat-Heptahydrat (1 M)
	100 ml	Glycerin
	ad 1 L	H_2O
		sterilfiltrieren
Puffer B	20 ml	Tris/HCl (1 M, pH 8)
	200 ml	NaCl (5 M)
	10 ml	Magnesiumsulfat-Heptahydrat (1 M)
	100 ml	Glycerin
	ad 1 L	H_2O
		sterilfiltrieren
Schneiden mit TEV-Protease		
Glutathion reduziert 30 mM	9,2 mg	Glutathion reduziert
	ad 1 ml	H_2O
Glutathion oxidiert 3 mM	3,67 mg	Glutathion oxidiert
	ad 2 ml	H_2O
Synthese		
Natriumacetatpuffer	139 mg	Natriumacetat
	0,5 ml	Essigsäure
	ad 100 ml	H_2O
Natriumhydroxid (4 M)	16 g	Natriumhydroxid
	ad 100 ml	H_2O
HCl (3 M)	25 ml	Salzsäure (37 %)
	ad 100 ml	H_2O

Puffer und Lösungen (Fortsetzung)

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	
Redoxtitration		
Mediatormix 1	2,31 mg	Neutralrot
	3,27 mg	Benzylviologen
	1,49 mg	Methylviologen
	ad 50 ml	H_2O
Mediatormix 2	1,4 mg	2-Hydroxy-1,4-naphthochinon
	2,63 mg	Natriumanthrachinon-2-sulfonat
	2,58 mg	Phenosafranin
	2,81 mg	Safranin O
	2,31 mg	Neutralrot
	ad 50 ml	H_2O

7.6 Zellstämme und Plasmide

Tabelle 43: Zellstämme

Zellstämme	Verwendung	Bemerkung
DH5α/ NEB5	Klonierung, Mutagenese, Plasmidvervielfältigung	hohe Plasmidstabilität, gut transformierbar für kleinere bis mittlere Plasmide
NEB10	Klonierung, Mutagenese, Plasmidvervielfältigung	analog NEB5, jedoch höhere Resistenz gegenüber Kanamycin und besser für größere Plasmide geeignet
BL21	Proteinexpression	für heterologe Proteinexpression in *E. coli*, T7 Expressionsstamm
BL21_pRKISC	Proteinexpression	analog BL21, mit Plasmid pRK415, welches Komponenten zum Eisen-Schwefel-Cluster-Einbau enthält

Tabelle 44: Allgemeine Plasmide

Plasmide	Größe	Resistenz	Sonstiges	Quelle	Abb.
pET Duet-1	5420 bp	Amp	T7 Promotor His-*Tag*	Novagen	72
pET28a TSTS	5444 bp	Kan	T7 Promotor, TEV-Spaltstelle, N-terminal Twin-Strep-*Tag*	Berta Martins, Humboldt-Universität Berlin	74
IBA101	2926 bp	Amp	Twin-Strep-*Tag*	iba	73
pRKISC	18,3 kbp	Tet	lac Promotor	(137)	

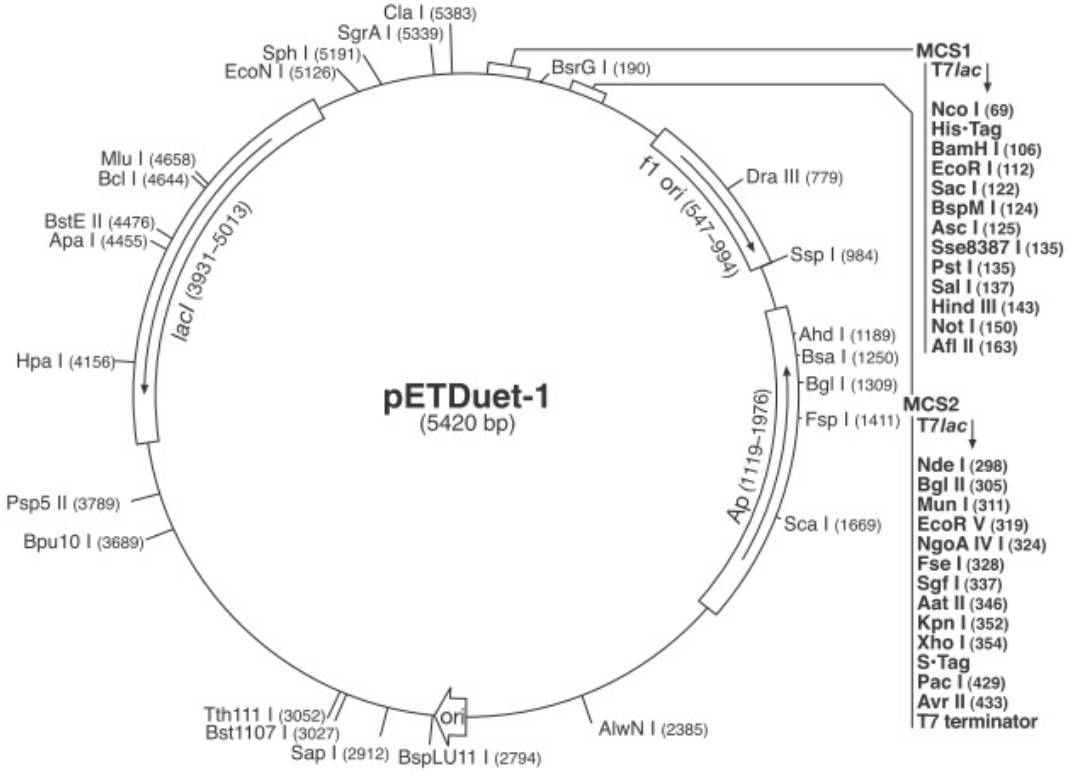


Abbildung 72: Vektorkarte von pET Duet-1 (6)

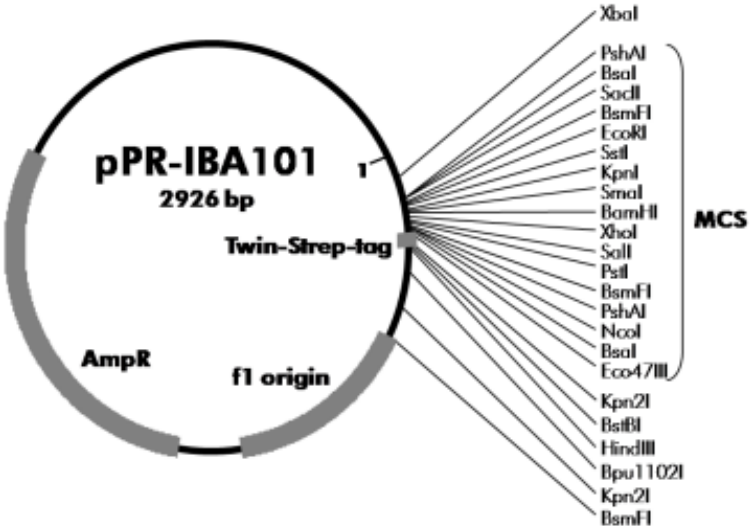


Abbildung 73: Vektorkarte IBA 101 (3)

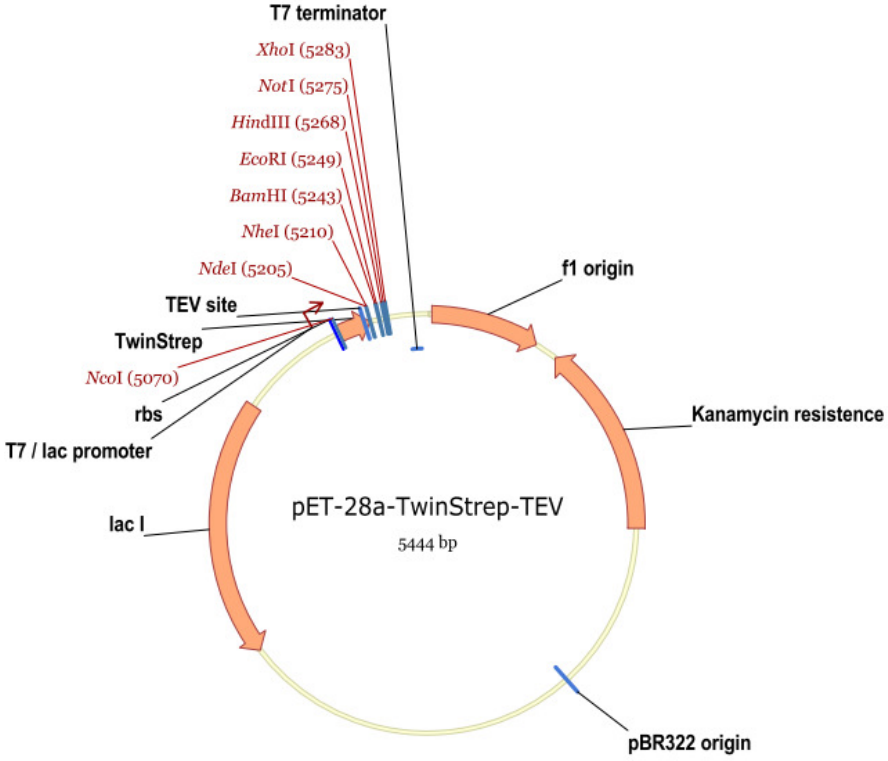


Abbildung 74: Vektorkarte pET28aTSTS (12)

Tabelle 45: Spezifische Plasmide

Plasmide	Größe	Veränderungen	Ausgangsplasmid
Spezifische Plasmide			
pET_Duet-1_EDA	6031 bp	Gen aus *E. coli* für EDA	pET_Duet
IBA101_EDD E. coli	4689 bp	Gen aus *E. coli* für EDD	IBA101
pET28a_TSTS_EDD TCur	7223 bp	synthetisches Gen der EDD aus *T. curvata* codonoptimiert für *E. coli*	pET28a_TSTS
pET28a_TSTS_EDD Zmob	7205 bp	Synthetisches Gen der EDD aus *Z. mobilis* codonoptimiert für *E. coli*	pET28a_TSTS
Das Plasmid pET28a_PhoN-Sf (His-*Tag*) wurde von der Kurt Faber Gruppe in Graz zur Verfügung gestellt und enthält ein Gen für die saure Phosphatase aus *Shigella flexneri* (28)			
Mutationen			
pET28a_TSTS_EDD TCur C53A	7151 bp	Mutation Cys an Stelle 53 zu Ala	pET28a_TSTS_EDD TCur
pET28a_TSTS_EDD TCur C63A	7151 bp	Mutation Cys an Stelle 63 zu Ala	pET28a_TSTS_EDD TCur
pET28a_TSTS_EDD TCur C123A	7151 bp	Mutation Cys an Stelle 123 zu Ala	pET28a_TSTS_EDD TCur
pET28a_TSTS_EDD TCur C165A	7151 bp	Mutation Cys an Stelle 165 zu Ala	pET28a_TSTS_EDD TCur
pET28a_TSTS_EDD TCur C232A	7151 bp	Mutation Cys an Stelle 232 zu Ala	pET28a_TSTS_EDD TCur
pET28a_TSTS_EDD TCur S228A	7151 bp	Mutation Ser an Stelle 228 zu Ala	pET28a_TSTS_EDD TCur
pET28a_TSTS_EDD TCur S240A	7151 bp	Mutation Ser an Stelle 240 zu Ala	pET28a_TSTS_EDD TCur
pET28a_TSTS_EDD TCur S285A	7151 bp	Mutation Ser an Stelle 285 zu Ala	pET28a_TSTS_EDD TCur
pET28a_TSTS_EDD TCur S311A	7151 bp	Mutation Ser an Stelle 311 zu Ala	pET28a_TSTS_EDD TCur
pET28a_TSTS_EDD TCur S413A	7151 bp	Mutation Ser an Stelle 413 zu Ala	pET28a_TSTS_EDD TCur
pET28a_TSTS_EDD TCur S525A	7151 bp	Mutation Ser an Stelle 525 zu Ala	pET28a_TSTS_EDD TCur
pET28a_TSTS_EDD TCur S528A	7151 bp	Mutation Ser an Stelle 528 zu Ala	pET28a_TSTS_EDD TCur

Tabelle 45: Spezifische Plasmide (Fortsetzung)

Plasmide	Größe	Veränderungen	Ausgangsplasmid
pET28a_TSTS_EDD TCur S530A	7151 bp	Mutation Ser an Stelle 530 zu Ala	pET28a_TSTS_EDD TCur
pET28a_TSTS_EDD TCur S538A	7151 bp	Mutation Ser an Stelle 538 zu Ala	pET28a_TSTS_EDD TCur
pET28a_TSTS_EDD TCur H92A	7151 bp	Mutation His an Stelle 92 zu Ala	pET28a_TSTS_EDD TCur
pET28a_TSTS_EDD TCur D124A	7151 bp	Mutation Asp an Stelle 124 zu Ala	pET28a_TSTS_EDD TCur
pET28a_TSTS_EDD TCur D166A	7151 bp	Mutation Asp an Stelle 166 zu Ala	pET28a_TSTS_EDD TCur
pET28a_TSTS_EDD TCur T312A	7151 bp	Mutation Thr an Stelle 312 zu Ala	pET28a_TSTS_EDD TCur
pET28a_TSTS_EDD TCur H317A	7151 bp	Mutation His an Stelle 317 zu Ala	pET28a_TSTS_EDD TCur
pET28a_TSTS_EDD TCur D354A	7151 bp	Mutation Asp an Stelle 354 zu Ala	pET28a_TSTS_EDD TCur
pET28a_TSTS_EDD TCur E498A	7151 bp	Mutation Glu an Stelle 498 zu Ala	pET28a_TSTS_EDD TCur
pET28a_TSTS_EDD TCur H500A	7151 bp	Mutation His an Stelle 500 zu Ala	pET28a_TSTS_EDD TCur

7.7 Oligonukleotide

Tabelle 46: Primer für Klonierung

Name	Sequenz
ZmobEDD_for	ATG GTA **CAT ATG** ACC GAT CTG CAT AGC
ZmobEDD_rev	TAC CAT AAG **CTT AAA** TAC CTG CAC CGG C
ThecurEDD_for	ATG GTA **CAT ATG** CCT CCG ACA CTG C
ThecurEDD_rev	TAC CAT **AAG CTT** AGC TGG TAA AAA CTG CGG

Tabelle 47: Primer für Mutagenese

Name	Sequenz 5‘ zu 3‘
EDD_TC_C53A_for	CCC TTG GGG CTG CCA ATT TAG CCC ATG GG
EDD_TC_C53A_rev	CTA AAT TGG CAG CCC CAA GGG CAG TAC GCG C

Tabelle 47: Primer für Mutagenese (Fortsetzung)

Name	**Sequenz 5‘ zu 3‘**
EDD_TC_C63A_for	GTT TGC GGC TGC TGC CCC GGC AGA TAA GTT AG
EDD_TC_C63A_rev	CCG GGG CAG CAG CCG CAA ACC CAT GGG
EDD_TC_C123A_for	CTG CGA TGG CCG ATG GCG TGA CCC AAG GCC
EDD_TC_C123A_rev	CAC GCC ATC GGC CAT CGC AGG AAC CCC GC
EDD_TC_C165A_for	CTC GGA GTG GCC GAC AAA ATC GTA CCG GG
EDD_TC_C165A_rev	CGA TTT TGT CGG CCA CTC CGA GCA GTA AAA CC
EDD_TC_C232A_for	CGG GAA CTG CCA CCT TCT ACG GTA CGG CGA AC
EDD_TC_C232A_rev	CGT AGA AGG TGG CAG TTC CCG GGG AAT GAT AC
EDD_TC_S228A_forn	CGT ATC ATG CCC CGG GAA CTT GCA CCT TCT ACG
EDD_TC_S228A_revn	GTT CCC GGG GCA TGA TAC GAG GCT GCC TCG GC
EDD_TC_S528A_for	CGC AGC TGG TAG CGT CCT TGC GGC CAT TCA CC
EDD_TC_S528A_rev	GCT ACC AGC TGC GCC GCT CAT GCG GCC GTC CG
EDD_TC_S530A_for	CTG GTG CCG TCC TTG CGG CCA TTC ACC TGT C
EDD_TC_S530A_rev	GGA CGG CAC CAG ATG CGC CGC TCA TGC GGC CG
EDD_TC_S538A_for	CAC CTG GCT CCC GAA GCA GCG GCC GGT GGT CC
EDD_TC_S538A_rev	GGG AGC CAG GTG AAT GGC CGC AAG GAC GCT
EDD_TC_S240A_for	GAA CGC TAA TCA GCT GCT CAT GGA AGT TAT GGG
EDD_TC_S240A_rev	GAT TAG CGT TCG CCG TAC CGT AGA AGG TGC
EDD_TC_S311A_for	CGG GGC TAC GAA CCA TAC CTT GCA CCT TGT TGC
EDD_TC_S311A_rev	CGT AGC CCC GCC TGT GGC CAG CAA AGC CAC C
EDD_TC_S228A_for	GTA TCA TGC CCC GGG AAC TTG CAC CTT CTA CGG

Tabelle 47: Primer für Mutagenese (Fortsetzung)

Name	**Sequenz 5‘ zu 3‘**
EDD_TC_S228A_rev	GGG GCA TGA TAC GAG GCT GCC TCG GCT TCC
EDD_TC_S285A_for	GCG GTG CCT ATA CCC CAG TTG GCG AAC TGC TGG
EDD_TC_S285A_rev	GTA TAG GCA CCG CCC AGG GCG GTC AAC TCG G
EDD_TC_S338A_for	GAA DTG GCC GCT GTG ACC CCG TTA CTG ACG CG
EDD_TC_S338A_rev	GCG GCC AGT TCG TCG AAG TCA TCC CAC GTC AG
EDD_TC_S413A_for	CGA TGC CGC CGA TAC AAG TGT CCT TCG TCC CG
EDD_TC_S413A_rev	CGG CGG CAT CGC GCG GCG CAG GAC GCC ACA CC
EDD_S525A_for	CGG CCG CAT GGC GGG CGC ATC TGG TAG CGT CC
EDD_S525A_rev	GAT GCG CCC GCC ATG CGG CCG TCC GTC ACA AG
EDD_TC_D124A_for	CTG CGA TGT GCG CTG GCG TGA CCC AAG G
EDD_TC_D124A_rev	GGG TCA CGC CAG CGC ACA TCG CAG GAA C
EDD_TC_T312A_for	GCG GGA GTG CGA ACC ATA CCT TGC ACC TTG
EDD_TC_T312A_rev	GTA TGG TTC GCA CTC CCG CCT GTG GCC
EDD_TC_E498A_for	CGG AAT GCC GGC GTT GCA CAA ACT GAC CCC
EDD_TC_E498A_rev	GTT TGT GCA ACG CCG GCA TTC CGT TAG CGC G
EDD_TC_H500A_for	GCC GGA GTT GGC CAA ACT GAC CCC GCC C
EDD_TC_H500A_rev	GGG TCA GTT TGG CCA ACT CCG GCA TTC CGT TA
EDD_TC_H92A_for	GCT GTC AGC CGC TCA ACC CCT TAA GGA TTA CC
EDD_TC_H92A_rev	TAA GGG GTT GAG CGG CTG ACA GCA TGT CG
EDD_TC_D166A_for	CGG AGT GTG CGC CAA AAT CGT ACC GGG
EDD_TC_D166A_rev	GTA CGA TTT TGG CGC ACA CTC CGA GCA G

Tabelle 47: Primer für Mutagenese (Fortsetzung)

Name	**Sequenz 5‘ zu 3‘**
EDD_TC_H317A_for	CCA TAC CTT GGC CCT TGT TGC GAT GGC AGC
EDD_TC_H317A_rev	CGC AAC AAG GGC CAA GGT ATG GTT CGT ACT CC
EDD_TC_D354A_for	GGT GGC GCG GCT GTG AAC CAC TTC CAT GC
EDD_TC_D354A_rev	GTG GTT CAC AGC CGC GCC ACC ATT CGG ATA C

Tabelle 48: Primer für Sequenzierung

Name	**Sequenz**
ZmobEDD_seq	GCA GAA GGC ACC TGT ACC TTT TAT GGC
ThecurEDD_seq	TGC CGA ATG CAC AGA AAG C
pET_up1	ATG CGT CCG GCG TAG
pET_down1	GAT TAT GCG GCC GTG TAC AA
T7_forward	TAA TAC GAC TCA CTA TAG G
T7_reverse	TGC TAG TTA TTG CTC AGC GG

7.8 DNA und Aminosäuresequenzen der Proteine

Tabelle 49: DNA und Aminosäuresequenzen der Proteine, ein Überblick

Protein	**Abbildung**
phoN-Sf	75
EDD aus *T. curvata*	76
EDD aus *E. coli*	77
EDD aus *Z. mobilis*	78
EDA aus *E. coli*	79

```
ATG AAA AGA CAG CTT TTT ACT CTT AGT ATT GTC GGG GTA TTT TCT TTA AAT ACC TTT GCA TCA ATT CCT   69
M   K   R   Q   L   F   T   L   S   I   V   G   V   F   S   L   N   T   F   A   S   I   P    23

CCG GGA AAT GAT GTG ACA ACA AAA CCT GAC CTT TAC TAC CTG ACA AAC GAT AAT GCT ATT GAC AGT CTG  138
P   G   N   D   V   T   T   K   P   D   L   Y   Y   L   T   N   D   N   A   I   D   S   L    46

GCA TTA TTA CCG CCT CCA CCA CAA ATC GGA AGT ATT GCC TTC CTG AAT GAC CAG GCC ATG TAT GAA AAG  207
A   L   L   P   P   P   P   Q   I   G   S   I   A   F   L   N   D   Q   A   M   Y   E   K    69

GGG CGT TTA TTG CGA AAT ACT GAA AGA GGG AAG CTG GCA GCT GAG GAT GCC AAT CTC AGT AGT GGT GGC  276
G   R   L   L   R   N   T   E   R   G   K   L   A   A   E   D   A   N   L   S   S   G   G    92

GTG GCA AAT GTA TTT TCT GCT GCT TTT GGT TCT CCG ATA ACG GCT AAA GAT TCA CCA GAA TTG CAT AAG  345
V   A   N   V   F   S   A   A   F   G   S   P   I   T   A   K   D   S   P   E   L   H   K   115

TTA CTG ACA AAT ATG ATT GAG GAT GCC GGA GAC CTG GCA ACG CGT TCA GCA AAA GAA TAT TAT ATG CGT  414
L   L   T   N   M   I   E   D   A   G   D   L   A   T   R   S   A   K   E   Y   Y   M   R   138

ATT CGA CCT TTT GCT TTT TAT GGT GTT TCT ACG TGT AAT ACA AAA GAA CAG GAT ACA TTA TCC AGA AAT  483
I   R   P   F   A   F   Y   G   V   S   T   C   N   T   K   E   Q   D   T   L   S   R   N   161

GGC TCT TAT CCA TCA GGT CAT ACA TCG ATT GGT TGG GCA ACA GCA CTT GTA TTG TCC GAA ATA AAT CCG  552
G   S   Y   P   S   G   H   T   S   I   G   W   A   T   A   L   V   L   S   E   I   N   P   184

GCA CGC CAG GAT ACC ATT CTG AAA CGG GGT TAT GAA CTG GGG GAC AGC AGG GTT ATT TGC GGT TAT CAC  621
A   R   Q   D   T   I   L   K   R   G   Y   E   L   G   D   S   R   V   I   C   G   Y   H   207

TGG CAA AGT GAT GTT GAC GCA GCA CGT ATT GTT GGC TCT GCT ATT GTA GCA ACA CTG CAC TCA AAT CCT  690
W   Q   S   D   V   D   A   A   R   I   V   G   S   A   I   V   A   T   L   H   S   N   P   230

GTG TTC CAG GCA CAA TTA CAA AAA GCG AAA GAT GAA TTC GCT AAC AAT CAG AAA AAA TAA             750
V   F   Q   A   Q   L   Q   K   A   K   D   E   F   A   N   N   Q   K   K   *               249
```

Abbildung 75: DNA- und Aminosäuresequenz von phoN-Sf, welches zur Synthese verwendet wurde (185)

```
ATG CCT CCG ACA CTG CAC CCG GTT GTC GCA CGC GTG ACA GAA CGC ATT GCG GGA CGC AGT GCG GCG CGT    69
M   P   P   T   L   H   P   V   V   A   R   V   T   E   R   I   A   G   R   S   A   A   R    23

CGC GCC GAC TAT TTG GCC CGC ATT GCT GAT GCC GGA CGT GGC AAT GAA CGC GAT GGT CGC GTT CGT CCA   138
R   A   D   Y   L   A   R   I   A   D   A   G   R   G   N   E   R   D   G   R   V   R   P    46

GCG CGT ACT GCC CTT GGG TGT GCC AAT TTA GCC CAT GGG TTT GCG GCT TGT GCC CCG GCA GAT AAG TTA   207
A   R   T   A   L   G   C   A   N   L   A   H   G   F   A   A   C   A   P   A   D   K   L    69

GCC CTG CGG GGC GCA GAT GCG CCG AAT ATC GCT ATC GTA ACC GCG TAT AAC GAC ATG CTG TCA GCC CAT   276
A   L   R   G   A   D   A   P   N   I   A   I   V   T   A   Y   N   D   M   L   S   A   H    92

CAA CCC CTT AAG GAT TAC CCG GAC CTC TTG AAA CGT GCT ATT GGT CAA GCC GGT GGA ACT GCA CAG GTG   345
Q   P   L   K   D   Y   P   D   L   L   K   R   A   I   G   Q   A   G   G   T   A   Q   V   115

GCC GGC GGG GTT CCT GCG ATG TGC GAT GGC GTG ACC CAA GGC CGT GCG GGC ATG GAA CTG TCG CTG TTT   414
A   G   G   V   P   A   M   C   D   G   V   T   Q   G   R   A   G   M   E   L   S   L   F   138

AGC CGC GAT GTT GTC GCG ATG GCA ACC GCG GTA GCG CTG GCT CAC GAT ATG TTC GAT GGG GTT TTA CTG   483
S   R   D   V   V   A   M   A   T   A   V   A   L   A   H   D   M   F   D   G   V   L   L   161

CTC GGA GTG TGC GAC AAA ATC GTA CCG GGG CTG GTC ATT GGC GCG TTG GCA TTC GGA CAC TTA CCG GCG   552
L   G   V   C   D   K   I   V   P   G   L   V   I   G   A   L   A   F   G   H   L   P   A   184

ATC CTG GTC CCT GCC GGC CCA ATG GCG TCA GGC CTG CCG AAT GCA CAG AAA GCG AAA GTG CGC AAA CTC   621
I   L   V   P   A   G   P   M   A   S   G   L   P   N   A   Q   K   A   K   V   R   K   L   207

TTC GCT GAA GGT AAA GCG ACT CGG GAA GAA CTG CTG GAA GCC GAG GCA GCC TCG TAT CAT TCC CCG GGA   690
F   A   E   G   K   A   T   R   E   E   L   L   E   A   E   A   A   S   Y   H   S   P   G   230

ACT TGC ACC TTC TAC GGT ACG GCG AAC AGT AAT CAG CTG CTC ATG GAA GTT ATG GGC CTG CAT CTG CCG   759
T   C   T   F   Y   G   T   A   N   S   N   Q   L   L   M   E   V   M   G   L   H   L   P   253

GGT GCG TCG TTT GTC CCG CCA GGT ACT GCA TTG CGC GAG GCA CTC ACC CTG GAA GCC GGT CGC CGC ATT   828
G   A   S   F   V   P   P   G   T   A   L   R   E   A   L   T   L   E   A   G   R   R   I   276

ACC GAG TTG ACC GCC CTG GGC GGT AGC TAT ACC CCA GTT GGC GAA CTG CTG GAT GAA CGC GCC TTT GTG   897
T   E   L   T   A   L   G   G   S   Y   T   P   V   G   E   L   L   D   E   R   A   F   V   299

AAC GGC GTG GTG GCT TTG CTG GCC ACA GGC GGG AGT ACG AAC CAT ACC TTG CAC CTT GTT GCG ATG GCA   966
N   G   V   V   A   L   L   A   T   G   G   S   T   N   H   T   L   H   L   V   A   M   A   322

GCA GCG GCG GGG ATT GAA CTG ACG TGG GAT GAC TTC GAC GAA CTG TCC GCT GTG ACC CCG TTA CTG ACG  1035
A   A   A   G   I   E   L   T   W   D   D   F   D   E   L   S   A   V   T   P   L   L   T   345

CGT CTG TAT CCG AAT GGT GGC GCG GAT GTG AAC CAC TTC CAT GCT GCG GGT GGG ACG GGT TTT CTC ATC  1104
R   L   Y   P   N   G   G   A   D   V   N   H   F   H   A   G   G   T   G   F   L   I   G   368

GGT GAA CTG CTG GAG GCA GGC CTG TTA CAT GCG GAT GCA CGT ACG GTG GGT GGT AAA ACG CTG GAC GAT  1173
E   L   L   E   A   G   L   L   H   A   D   A   A   R   T   V   G   G   K   T   L   D   D   391

TAC CGG GTT ACC CCT GAA CTC GGC GAG GAG GGT GAA CTG GTG TGG CGT CCT GCG CCG CGC GAT AGC GCC  1242
Y   R   V   T   P   E   L   G   E   E   G   E   L   V   W   R   P   A   P   R   D   S   A   414

GAT ACA AGT GTC CTT CGT CCC GTT GCC GAC CCG TTT GAT ACG CAT GGT GGT TTA CGC ACC GTA TCG GGC  1311
D   T   S   V   L   R   P   V   A   D   P   F   D   T   H   G   G   L   R   T   V   S   G   437

AAC CTG GGG CGT GCC GTA GTA AAG GTT TCT GCG GTA GAC CCC GCT CAT CGC GCT GTG CAA GCT CCT GCG  1380
N   L   G   R   A   V   V   K   V   S   A   V   D   P   A   H   R   A   V   Q   A   P   A   460

CGC GTC TTT GCC TCA CAG CAG GAG TTA CAG GAG GCT TTT CGC GCT GGC GAA CTG GAT GGC GAT GTA GTC  1449
R   V   F   A   S   Q   Q   E   L   Q   E   A   F   R   A   G   E   L   D   G   D   V   V   483

GTT GTG GTG CGC CAT CAG GGC CCG CGC GCT AAC GGA ATG CCG GAG TTG CAC AAA CTG ACC CCG CCC TTG  1518
V   V   V   R   H   Q   G   P   R   A   N   G   M   P   E   L   H   K   L   T   P   P   L   506

AGC GTC CTT CAG GAT CGT GGC CAC AAA GTC GCC CTT GTG ACG GAC GGC CGC ATG AGC GGC GCA TCT GGT  1587
S   V   L   Q   D   R   G   H   K   V   A   L   V   T   D   G   R   M   S   G   A   S   G   529

AGC GTC CTT GCG GCC ATT CAC CTG TCT CCC GAA GCA GCG GCC GGT GGT CCA TTA GCA CGC GTG CGT GAT  1656
S   V   L   A   A   I   H   L   S   P   E   A   A   A   G   G   P   L   A   R   V   R   D   552

GGG GAC CTG ATT CGT CTG GAC GCA GAC GAA GGC GTG CTG CAA GTT CTG GTT CCG GAA GAG GAG CTG GCG  1725
G   D   L   I   R   L   D   A   D   E   G   V   L   Q   V   L   V   P   E   E   E   L   A   575

GCC CGT GAA CCA GCT GCG GCA CCG GGC GAA CAG GTC GGT ACT GGC CGT GAA CTG TTT GCA GCC TTT CGG  1794
A   R   E   P   A   A   A   P   G   E   Q   V   G   T   G   R   E   L   F   A   A   F   R   598

CGC GCA GTG GGT CCT GCG GAA CGT GGC GCC GCA GTT TTT ACC AGC TAA                              1839
R   A   V   G   P   A   E   R   G   A   A   V   F   T   S   *                               613
```

Abbildung 76: DNA- und Aminosäuresequenz des synthetischen Gens der EDD aus *T. curvata* codonoptimiert für *E. coli*

```
ATG AAT CCA CAA TTG TTA CGC GTA ACA AAT CGA ATC ATT GAA CGT TCG CGC GAG ACT CGC TCT GCT TAT    69
M   N   P   Q   L   L   R   V   T   N   R   I   I   E   R   S   R   E   T   R   S   A   Y    23

CTC GCC CGG ATA GAA CAA GCG AAA ACT TCG ACC GTT CAT CGT TCG CAG TTG GCA TGC GGT AAC CTG GCA   139
L   A   R   I   E   Q   A   K   T   S   T   V   H   R   S   Q   L   A   C   G   N   L   A    46

CAC GGT TTC GCT GCC TGC CAG CCA GAA GAC AAA GCC TCT TTG AAA AGC ATG TTG CGT AAC AAT ATC GCC   207
H   G   F   A   A   C   Q   P   E   D   K   A   S   L   K   S   M   L   R   N   N   I   A    69

ATC ATC ACC TCC TAT AAC GAC ATG CTC TCC GCG CAC CAG CCT TAT GAA CAC TAT CCA GAA ATC ATT CGT   276
I   I   T   S   Y   N   D   M   L   S   A   H   Q   P   Y   E   H   Y   P   E   I   I   R    92

AAA GCC CTG CAT GAA GCG AAT GCG GTT GGT CAG GTT GCG GGC GGT GTT CCG GCG ATG TGT GAT GGT GTC   345
K   A   L   H   E   A   N   A   V   G   Q   V   A   G   G   V   P   A   M   C   D   G   V   115

ACC CAG GGG CAG GAT GGA ATG GAA TTG TCG CTG CTA AGC CGC GAA GTG ATA GCG ATG TCT GCG GCG GTC   414
T   Q   G   Q   D   G   M   E   L   S   L   L   S   R   E   V   I   A   M   S   A   A   V   138

GGG CTG TCC CAT AAC ATG TTT GAT GGT GCT CTG TTC CTC GGT GTG TGC GAC AAG ATT GTC CCG GGT CTG   483
G   L   S   H   N   M   F   D   G   A   L   F   L   G   V   C   D   K   I   V   P   G   L   161

ACG ATG GCA GCC CTG TCG TTT GGT CAT TTG CCT GCG GTG TTT GTG CCG TCT GGA CCG ATG GCA AGC GGT   552
T   M   A   A   L   S   F   G   H   L   P   A   V   F   V   P   S   G   P   M   A   S   G   184

TTG CCA AAT AAA GAA AAA GTG CGT ATT CGC CAG CTT TAT GCC GAA GGT AAA GTG GAC CGC ATG GCC TTA   621
L   P   N   K   E   K   V   R   I   R   Q   L   Y   A   E   G   K   V   D   R   M   A   L   207

CTG GAG TCA GAA GCC GCG TCT TAC CAT GCG CCG GGA ACA TGT ACT TTC TAC GGT ACT GCC AAC ACC AAC   690
L   E   S   E   A   A   S   Y   H   A   P   G   T   C   T   F   Y   G   T   A   N   T   N   230

CAG ATG GTG GTG GAA TTT ATG GGG ATG CAG TTG CCA GGC TCT TCT TTT GTT CAT CCG GAT TCT CCG CTG   759
Q   M   V   V   E   F   M   G   M   Q   L   P   G   S   S   F   V   H   P   D   S   P   L   253

CGC GAT GCT TTG ACC GCT GCC GCT GCG CGT CAG GTT ACA CGC ATG ACC GGT AAT GGT AAT GAA TGG ATG   828
R   D   A   L   T   A   A   A   A   R   Q   V   T   R   M   T   G   N   G   N   E   W   M   276

CCG ATC GGT AAG ATG ATC GAT GAG AAA GTG GTG GTG AAC GGT ATC GTT GCA CTG CTG GCG ACC GGT GGT   897
P   I   G   K   M   I   D   E   K   V   V   V   N   G   I   V   A   L   L   A   T   G   G   299

TCC ACT AAC CAC ACC ATG CAC CTG GTG GCG ATG GCG CGC GCG GCC GGT ATT CAG ATT AAC TGG GAT GAC   966
S   T   N   H   T   M   H   L   V   A   M   A   R   A   A   G   I   Q   I   N   W   D   D   322

TTC TCT GAC CTT TCT GAT GTT GTA CCG CTG ATG GCA CGT CTC TAC CCG AAC GGT CCG GCC GAT ATT AAC  1035
F   S   D   L   S   D   V   V   P   L   M   A   R   L   Y   P   N   G   P   A   D   I   N   345

CAC TTC CAG GCG GCA GGT GGC GTA CCG GTT CTG GTG CGT GAA CTG CTC AAA GCA GGC CTG CTG CAT GAA  1104
H   F   Q   A   A   G   G   V   P   V   L   V   R   E   L   L   K   A   G   L   L   H   E   368

GAT GTC AAT ACG GTG GCA GGC TTT GGT CTG TCT CGT TAT ACC CTT GAA CCA TGG CTG AAT AAT GGT GAA  1173
D   V   N   T   V   A   G   F   G   L   S   R   Y   T   L   E   P   W   L   N   N   G   E   391

CTG GAC TGG CGG GAA GGG GCG GAA AAA TCA CTC GAC AGC AAT GTG ATC GCT TCC TTC GAA CAA CCT TTC  1242
L   D   W   R   E   G   A   E   K   S   L   D   S   N   V   I   A   S   F   E   Q   P   F   414

TCT CAT CAT GGT GGG ACA AAA GTG TTA AGC GGT AAC CTG GGC CGT GCG GTT ATG AAA ACC TCT GCC GTG  1311
S   H   H   G   G   T   K   V   L   S   G   N   L   G   R   A   V   M   K   T   S   A   V   437

CCG GTT GAG AAC CAG GTG ATT GAA GCG CCA GCG GTT GTT TTT GAA AGC CAG CAT GAC GTT ATG CCG GCC  1380
P   V   E   N   Q   V   I   E   A   P   A   V   V   F   E   S   Q   H   D   V   M   P   A   460

TTT GAA GCG GGT TTG CTG GAC CGC GAT TGT GTC GTT GTT GTC CGT CAT CAG GGG CCA AAA GCG AAC GGA  1449
F   E   A   G   L   L   D   R   D   C   V   V   V   V   R   H   Q   G   P   K   A   N   G   483

ATG CCA GAA TTA CAT AAA CTC ATG CCG CCA CTT GGT GTA TTA TTG GAC CGG TGT TTC AAA ATT GCG TTA  1518
M   P   E   L   H   K   L   M   P   P   L   G   V   L   L   D   R   C   F   K   I   A   L   508

GTT ACC GAT GGA CGA CTC TCC GGC GCT TCA GGT AAA GTG CCG TCA GCT ATC CAC GTA ACA CCA GAA GCC  1587
V   T   D   G   R   L   S   G   A   S   G   K   V   P   S   A   I   H   V   T   P   E   A   529

TAC GAT GGC GGG CTG CTG GCA AAA GTG CGC GAC GGG GAC ATC ATT CGT GTG AAT GGA CAG ACA GGC GAA  1656
Y   D   G   G   L   L   A   K   V   R   D   G   D   I   I   R   V   N   G   Q   T   G   E   552

CTG ACG CTG CTG GTA GAC GAA GCG GAA CTG GCT GCT CGC GAA CCG CAC ATT CCT GAC CTG AGC GCG TCA  1725
L   T   L   L   V   D   E   A   E   L   A   A   R   E   P   H   I   P   D   L   S   A   S   575

CGC GTG GGG ACA GGA CGT GAA TTA TTC AGC GCC TTG CGT GAA AAA CTG TCC GGT GCC GAA CAG GGC GCA  1794
R   V   G   T   G   R   E   L   F   S   A   L   R   E   K   L   S   G   A   E   Q   G   A   598

ACC TGT ATC ACT TTT TAA                                                                    1812
T   C   I   T   F   *                                                                      603
```

Abbildung 77: DNA- und Aminosäuresequenz von EDD aus *E. coli*

```
ATG ACC GAT CTG CAT AGC ACC GTT GAA AAA GTT ACC GCA CGT GTT ATT GAA CGT AGC CGT GAA ACC CGT    69
M   T   D   L   H   S   T   V   E   K   V   T   A   R   V   I   E   R   S   R   E   T   R    23

AAA GCA TAT CTG GAT CTG ATT CAG TAT GAA CGC GAA AAA GGT GTT GAT CGT CCG AAT CTG AGC TGT AGC   138
K   A   Y   L   D   L   I   Q   Y   E   R   E   K   G   V   D   R   P   N   L   S   C   S    46

AAT CTG GCA CAT GGT TTT GCA GCA ATG AAT GGT GAT AAA CCG GCA CTG CGT GAT TTT AAT CGT ATG AAT   207
N   L   A   H   G   F   A   A   M   N   G   D   K   P   A   L   R   D   F   N   R   M   N    69

ATT GGT GTG GTG ACC AGC TAT AAT GAT ATG CTG AGC GCA CAT GAA CCG TAT TAT CGT TAT CCG GAA CAA   276
I   G   V   V   T   S   Y   N   D   M   L   S   A   H   E   P   Y   Y   R   Y   P   E   Q    92

ATG AAA GTT TTT GCC CGT GAA GTT GGT GCA ACC GTT CAG GTT GCC GGT GGT GTT CCG GCA ATG TGT GAT   345
M   K   V   F   A   R   E   V   G   A   T   V   Q   V   A   G   G   V   P   A   M   C   D   115

GGT GTT ACC CAG GGT CAG CCT GGT ATG GAA GAA AGC CTG TTT AGC CGT GAT GTT ATT GCA CTG GCA ACC   414
G   V   T   Q   G   Q   P   G   M   E   E   S   L   F   S   R   D   V   I   A   L   A   T   138

AGC GTT AGC CTG AGC CAT GGT ATG TTT GAA GGT GCA GCA CTG CTG GGT ATT TGC GAT AAA ATT GTT CCG   483
S   V   S   L   S   H   G   M   F   E   G   A   A   L   L   G   I   C   D   K   I   V   P   161

GGT CTG CTG ATG GGT GCA CTG CGT TTT GGT CAT CTG CCG ACC ATT CTG GTT CCG AGC GGT CCG ATG ACC   552
G   L   L   M   G   A   L   R   F   G   H   L   P   T   I   L   V   P   S   G   P   M   T   184

ACC GGT ATT CCG AAT AAA GAA AAA ATT CGT ATC CGT CAG CTG TAT GCC CAG GGT AAA ATT GGT CAG AAA   621
T   G   I   P   N   K   E   K   I   R   I   R   Q   L   Y   A   Q   G   K   I   G   Q   K   207

GAA CTG CTG GAT ATG GAA GCA GCA TGT TAT CAT GCA GAA GGC ACC TGT ACC TTT TAT GGC ACC GCC AAT   690
E   L   L   D   M   E   A   A   C   Y   H   A   E   G   T   C   T   F   Y   G   T   A   N   230

ACC AAT CAG ATG GTT ATG GAA GTT CTG GGT CTG CAC ATG CCT GGT AGC GCA TTT GTT ACA CCG GGT ACA   759
T   N   Q   M   V   M   E   V   L   G   L   H   M   P   G   S   A   F   V   T   P   G   T   253

CCG CTG CGT CAG GCA CTG ACC CGT GCA GCA GTT CAT CGT GTT GCA GAA TTA GGT TGG AAA GGT GAT GAT   828
P   L   R   Q   A   L   T   R   A   A   V   H   R   V   A   E   L   G   W   K   G   D   D   276

TAT CGT CCG CTG GGT AAA ATC ATT GAT GAA AAA AGC ATT GTG AAC GCC ATT GTT GGT CTG CTG GCA ACC   897
Y   R   P   L   G   K   I   I   D   E   K   S   I   V   N   A   I   V   G   L   L   A   T   299

GGT GGT AGC ACC AAT CAT ACC ATG CAT ATT CCA GCA ATT GCG CGT GCA GCC GGT GTT ATT GTT AAT TGG   966
G   G   S   T   N   H   T   M   H   I   P   A   I   A   R   A   A   G   V   I   V   N   W   322

AAT GAT TTT CAC GAT CTG AGC GAA GTT GTT CCG CTG ATT GCA CGT ATT TAT CCG AAT GGT CCG CGT GAT  1035
N   D   F   H   D   L   S   E   V   V   P   L   I   A   R   I   Y   P   N   G   P   R   D   345

ATT AAC GAA TTT CAG AAT GCA GGC GGT ATG GCC TAT GTT ATT AAA GAG CTG CTG TCA GCA AAT CTG CTG  1104
I   N   E   F   Q   N   A   G   G   M   A   Y   V   I   K   E   L   L   S   A   N   L   L   368

AAT CGT GAT GTG ACC ACC ATT GCA AAA GGT GGC ATT GAA GAA TAT GCA AAA GCT CCG GCA CTG AAT GAT  1173
N   R   D   V   T   T   I   A   K   G   G   I   E   E   Y   A   K   A   P   A   L   N   D   391

GCC GGT GAA CTG GTT TGG AAA CCG GCA GGC GAA CCG GGT GAT GAT ACC ATT CTG CGT CCG GTT AGC AAT  1242
A   G   E   L   V   W   K   P   A   G   E   P   G   D   D   T   I   L   R   P   V   S   N   414

CCG TTT GCA AAA GAT GGT GGT CTG CGT CTG CTG GAA GGT AAT CTG GGT CGT GCA ATG TAT AAA GCA AGC  1311
P   F   A   K   D   G   G   L   R   L   L   E   G   N   L   G   R   A   M   Y   K   A   S   437

GCA GTT GAT CCG AAA TTT TGG ACC ATT GAA GCA CCG GTT CGT GTT TTT AGC GAT CAG GAT GAT GTT CAG  1380
A   V   D   P   K   F   W   T   I   E   A   P   V   R   V   F   S   D   Q   D   D   V   Q   460

AAA GCA TTT AAA GCG GGT GAG CTG AAC AAA GAT GTG ATT GTT GTT GTT CGT TTT CAG GGT CCT CGT GCA  1449
K   A   F   K   A   G   E   L   N   K   D   V   I   V   V   V   R   F   Q   G   P   R   A   483

AAT GGT ATG CCG GAA CTG CAT AAA CTG ACC CCT GCA CTG GGT GTT CTG CAG GAT AAT GGT TAT AAA GTT  1518
N   G   M   P   E   L   H   K   L   T   P   A   L   G   V   L   Q   D   N   G   Y   K   V   506

GCA CTG GTT ACC GAT GGT CGT ATG AGC GGT GCC ACC GGT AAA GTT CCG GTT GCA CTG CAT GTT AGT CCG  1587
A   L   V   T   D   G   R   M   S   G   A   T   G   K   V   P   V   A   L   H   V   S   P   529

GAA GCA TTA GGT GGT GGT GCA ATT GGT AAA CTG CGT GAC GGT GAT ATT GTT CGT ATT AGC GTT GAA GAA  1656
E   A   L   G   G   G   A   I   G   K   L   R   D   G   D   I   V   R   I   S   V   E   E   552

GGT AAA CTG GAA GCA CTG GTT CCA GCC GAT GAA TGG AAT GCA CGT CCG CAT GCA GAA AAA CCG GCA TTT  1725
G   K   L   E   A   L   V   P   A   D   E   W   N   A   R   P   H   A   E   K   P   A   F   575

CGT CCT GGC ACC GGT CGT GAA CTG TTT GAT ATT TTT CGT CAG AAT GCC GCA AAA GCC GAA GAT GGT GCA  1794
R   P   G   T   G   R   E   L   F   D   I   F   R   Q   N   A   A   K   A   E   D   G   A   598

GTT GCA ATT TAT GCC GGT GCA GGT ATT TAA                                                     1824
V   A   I   Y   A   G   A   G   I   *                                                      607
```

Abbildung 78: DNA- und Aminosäuresequenz des synthetischen Gens der EDD aus *Z. mobilis* codonoptimiert für *E. coli*

```
ATG AAA AAC TGG AAA ACA AGT GCA GAA TCA ATC CTG ACC ACC GGC CCG GTT GTA CCG GTT ATC GTG GTA   69
M   K   N   W   K   T   S   A   E   S   I   L   T   T   G   P   V   V   P   V   I   V   V    23

AAA AAA CTG GAA CAC GCA GTG CCG ATG GCA AAA GCG TTG GTT GCT GGT GGG GTG CGC GTT CTG GAA GTG  138
K   K   L   E   H   A   V   P   M   A   K   A   L   V   A   G   G   V   R   V   L   E   V    46

ACT CTG CGT ACC GAG TGT GCA GTT GAC GCT ATC CGT GCT ATC GCC AAA GAA GTG CCT GAA GCG ATT GTG  207
T   L   R   T   E   C   A   V   D   A   I   R   A   I   A   K   E   V   P   E   A   I   V    69

GGT GCC GGT ACG GTG CTG AAT CCA CAG CAG CTG GCA GAA GTC ACT GAA GCG GGT GCA CAG TTC ACA ATT  276
G   A   G   T   V   L   N   P   Q   Q   L   A   E   V   T   E   A   G   A   Q   F   A   I    92

AGC CCG GGT CTG ACC GAG CCG CTG CTG AAA GCT GCT ACC GAA GGG ACT ATT CCT CTA ATT CCG GGG ATC  345
S   P   G   L   T   E   P   L   L   K   A   A   T   E   G   T   I   P   L   I   P   G   I   115

AGC ACT GTT TCC GAA CTG ATG CTG GGT ATG GAC TAC GGT TTG AAA GAG TTC AAA TTC TTC CCG GCT GAA  414
S   T   V   S   E   L   M   L   G   M   D   Y   G   L   K   E   F   K   F   F   P   A   E   138

GCT AAC GGC GGC GTG AAA GCC CTG CAG GCG ATC GCG GGT CCG TTC TCC CAG GTC CGT TTC TGC CCG ACG  483
A   N   G   G   V   K   A   L   Q   A   I   A   G   P   F   S   Q   V   R   F   C   P   T   161

GGT GGT ATT TCT CCG GCT AAC TAC CGT GAC TAC CTG GCG CTG AAA AGC GTG CTG TGC ATC GGT GGT TCC  552
G   G   I   S   P   A   N   Y   R   D   Y   L   A   L   K   S   V   L   C   I   G   G   S   184

TGG CTG GTT CCG GCA GAT GCG CTG GAA GCG GGC GAT TAC GAC CGC ATT ACT AAG CTG GCG CGT GAA GCT  621
W   L   V   P   A   D   A   L   E   A   G   D   Y   D   R   I   T   K   L   A   R   E   A   207

GTA GAA GGC GCT AAG CTG TAA                                                               642
V   E   G   A   K   L   *                                                                 213
```

Abbildung 79: DNA- und Aminosäuresequenz EDA aus *E. coli*

7.9 Säulen und Säulenmaterialien

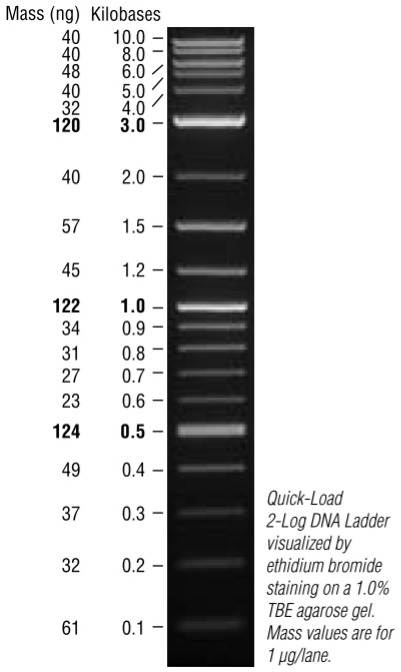
Tabelle 50: Säulenmaterial

Säulenmaterial	**Hersteller**
Ni-NTA-Agarose	Cube Biotech
Sephadex G-25 M PD10 Columns	GE Healthcare
Strep-Tactin Superflow high capacity	IBA
Sephadex™ G-25 Superfine	GE Healthcare
HiPrep™26/60 Sephacryl® S-200 HR	GE Healthcare
HiTrap Heparin HP 5 ml	GE Healthcare

7.10 Größenstandards

Tabelle 51: Größenstandards

Marker	**Firma**	**Abbildung**
2-log DNA Ladder (0,1-10,0 kb)	New England Biolabs Inc	80
Protein Marker III (6,5 - 212 kDa)	AppliChem	81



Fragment	Base Pairs	DNA Mass
1	10,002	40 ng
2	8,001	40 ng
3	6,001	48 ng
4	5,001	40 ng
5	4,001	32 ng
6	**3,001**	**120 ng**
7	2,017	40 ng
8	1,517	57 ng
9	1,200	45 ng
10	**1,000**	**122 ng**
11	900	34 ng
12	800	31 ng
13	700	27 ng
14	600	23 ng
15a	**517**	**124 ng**
15b	**500**	
16	400	49 ng
17	300	37 ng
18	200	32 ng
19	100	61 ng

Abbildung 80: Der 2-log DNA ladder Marker (88)

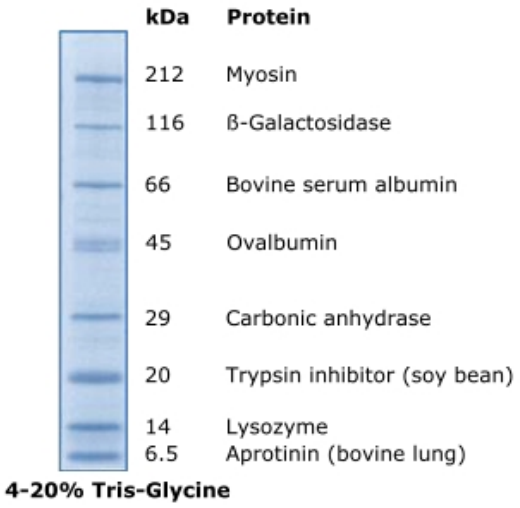


Abbildung 81: Der Proteinmarker für SDS-PAGE (9)

7.11 Proteine und Enzyme

Protein	Hersteller
Carboanhydrase (Rindererythrozyten)	Sigma Aldrich
Cytochrome *c* (Rinderherz)	Sigma Aldrich
DNase I (Rinderpankreas)	AppliChem
Lactat-Dehydrogenase (LDH) (Kaninchenmuskel)	Sigma Aldrich
Lysozym	Roche Roth
Ovalbumin (Hühnereiweiß)	Sigma Aldrich
Phusion®-Polymerase (High Fidelity)	New England Biolabs Inc
Restriktionsenzyme	New England Biolabs Inc
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma Aldrich
T4-DNA-Ligase und Puffer	New England Biolabs Inc
TEV Protease (32 mg/ml)	Labor AG Pierik

7.12 Software

Software	Anwendung	Firma
Biovia Discovery Studio 2017R2	Visualisierung von Protein 3D Daten	Dassault Systemes Biovia Corp
Chromas	DNA-Sequenz-Analyse	Technelysium
GIMP	Bildbearbeitung	GIMP Development Team
JabRef	Literaturverzeichnis	MIT
LabSolution UV-Vis	UV/Vis-Spektrometer	Shimadzu Corporation
UNICORN start 1.0	Steuern der Äkta und Auswerten der Chromatogramme	General Electric Company
VisionCapt	Geldokumentationssystem	Vilber Lourmat
VisionLite	UV/Vis Spektrometer	Thermo Fischer Scientific
Xepr	ESR-Spektrometer	Bruker

7.13 Sonstige Materialien

Tabelle 52: Aufreinigungskits

Kit	Hersteller
NucleoSpin®Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel
NucleoSpin®Plasmid (No Lid)	Macherey-Nagel

Tabelle 53: Firmen und Collaborationen

Projekt	Firma oder Collaborationspartner
DNA Sequenzieren	Seq-It
Kristallisieren	Prof. Dr. Holger Dobbek (Humboldt-Universität zu Berlin); Dr. Berta Martins
Mößbauerspektroskopie	Prof. Dr. Volker Schünemann (TU Kaiserslautern); Dr. Christina Sophia Müller
Primer	Metabion
Resonanz-Raman-Spektroskopie	Dr. Ingo Zebger (Humboldt-Universität zu Berlin); Konstantin Laun; Charlotte Wiemann
Synthese von Genen	Eurofins Gen Script
MS-Spektrometrie	Dr. Markus Räschle (TU Kaiserslautern)

Tabelle 54: Kristallisationsscreens

Screen	Firma
JCSG-*plus*™ HT-96	Molecular Dimensions
ProPlex HT-92	Molecular Dimensions
PACT *permier*™ HT-96	Molecular Dimensions
PEG/Ion HT™ HR2-139	Hampton Research
SaltRx HT™ HR2-139	Hampton Research
Pi-minimal	Jena Bioscience
MemGold™	Molecular Dimensions
MemGold2™	Molecular Dimensions
Wizard Cryo	Molecular Dimensions
Morpheus ®	Molecular Dimensions
Structure Screen 1+2 HT-96	Molecular Dimensions
The Stura Footprint Screen™+ MacroSol™ HT-96	Molecular Dimensions

Literatur

[1] Strep-tag®: The leading affinity tag in recombinant protein technology, Dec. 2019. URL https://www.iba-lifesciences.com/strep-tactin-system-technology.html.

[2] Cholera: The Forgotten Pandemic, Aug. 2020. URL https://www.who.int/cholera/the-forgotten-pandemic/en/.

[3] Data Sheet pPR-IBA 101; www.iba-lifescience.com, Jan. 2020. URL www.iba-lifescience.com.

[4] National Center of biotechnology Information - Protein Blast, Feb. 2020. URL https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins&PROGRAM=blastp&BLAST_PROGRAMS=blastp&QUERY=VWQ02816.1&LINK_LOC=protein&PAGE_TYPE=BlastSearch.

[5] New England BioLabs®, Feb. 2020. URL https://international.neb.com/products/p8112-tev-protease#Product%20Information.

[6] pETDuet-1 DNA Novagen, Jan. 2020. URL https://www.merckmillipore.com/DE/de/product/pETDuet-1-DNA-Novagen,EMD_BIO-71146#anchor_VMAP.

[7] Presseabteilung der basf, Aug. 2020. URL https://www.basf.com/global/de/media/news-releases/2015/01/p-15-119.html.

[8] Product finder der basf, Aug. 2020. URL http://product-finder.basf.com/group/corporate/product-finder/de/brand/RENEWABLE_BDO.

[9] Protein Marker III (6.5-200) Product No. A4402, Jan. 2020. URL https://www.applichem.com/en/shop/product-detail/as/protein-marker-iii-65-200.

[10] Thermofisher, Jan. 2020. URL https://www.thermofisher.com/de/de/home/brands/thermo-scientific.html.

[11] Thieme Römpp; Heparin, Feb. 2020. URL https://roempp.thieme.de/lexicon/RD-08-00886.

[12] Vektorkarte pET28a TSTS, Jan. 2020.

[13] H. Ahmed, T. J. G. Ettema, B. Tjaden, A. C. M. Geerling, J. van der Oost, and B. Siebers. The semi-phosphorylative Entner-Doudoroff pathway in hyperthermophilic archaea: a re-evaluation. *Biochemical Journal*, 390(2):529–540, 2005. doi:10.1042/bj20041711.

[14] H. Ahmed, B. Tjaden, R. Hensel, and B. Siebers. Embden–Meyerhof–Parnas and Entner–Doudoroff pathways in *Thermoproteus tenax*: metabolic parallelism or specific adaptation? *Biochemical Society Transactions*, 32(2):303–304, 2004. doi:10.1042/bst0320303.

[15] T. Albert. Untersuchung der spektroskopischen und kinetischen Eigenschaften von Dihydroxysäure-Dehydratasen. PhD thesis, 2018. Technische Universität Kaiserslautern.

[16] S. T. Allen, G. R. Heintzelman, and E. J. Toone. Pyruvate aldolases as reagents for stereospecific aldol condensation. *The Journal of Organic Chemistry*, 57(2):426–427, 1992. doi:10.1021/jo00028a005.

[17] M. Andberg, N. Aro-Kärkkäinen, P. Carlson, M. Oja, S. Bozonnet, M. Toivari, N. Hakulinen, M. O'Donohue, M. Penttilä, and A. Koivula. Characterization and mutagenesis of two novel iron–sulphur cluster pentonate dehydratases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(17):7549–7563, 2016. doi:10.1007/s00253-016-7530-8.

[18] I. Anderson, C. Scheuner, M. Göker, K. Mavromatis, S. D. Hooper, I. Porat, H.-P. Klenk, N. Ivanova, and N. Kyrpides. Novel Insights into the Diversity of Catabolic Metabolism from Ten Haloarchaeal Genomes. *PLoS ONE*, 6(5):e20237, 2011. doi:10.1371/journal.pone.0020237.

[19] S. M. Arfin. Evidence for an enol intermediate in the enzymatic conversion of alpha,beta-dihydroxyisovalerate to alpha-ketoisovalerate. *The Journal of Biological Chemistry*, 244:2250–2251, 1969.

[20] E. A. Auger and G. N. Bennett. Temperature optimization of *in vivo* expression from the *E. coli* trp and trp::lac promoters. *Biotechnology Letters*, 9(3):157–162, 1987. doi:10.1007/bf01024556.

[21] P. C. Babbitt, M. S. Hasson, J. E. Wedekind, D. R. J. Palmer, W. C. Barrett, G. H. Reed, I. Rayment, D. Ringe, G. L. Kenyon, and J. A. Gerlt. The Enolase Superfamily: A General Strategy for Enzyme-Catalyzed Abstraction of the α-Protons of Carboxylic Acids. *Biochemistry*, 35(51):16489–16501, 1996. doi:10.1021/bi9616413.

[22] S. Bandyopadhyay, K. Chandramouli, and M. K. Johnson. Iron–sulfur cluster biosynthesis. *Biochemical Society Transactions*, 36(6):1112–1119, 2008. doi:10.1042/bst0361112.

[23] W. O. Barnell, K. C. Yi, and T. Conway. Sequence and genetic organization of a *Zymomonas mobilis* gene cluster that encodes several enzymes of glucose metabolism. *Journal of Bacteriology*, 172(12):7227–7240, 1990. doi:10.1128/jb.172.12.7227-7240.1990.

[24] G. Bashiri, T. L. Grove, S. S. Hegde, T. Lagautriere, G. J. Gerfen, S. C. Almo, C. J. Squire, J. S. Blanchard, and E. N. Baker. The active site of the *Mycobacterium tuberculosis* branched-chain amino acid biosynthesis enzyme dihydroxyacid dehydratase contains a 2Fe–2S cluster. *Journal of Biological Chemistry*, 294(35):13158–13170, 2019. doi:10.1074/jbc.ra119.009498.

[25] H. Beinert. Iron-sulfur proteins: ancient structures, still full of surprises. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 5(1):2–15, 2000. doi:10.1007/s007750050002.

[26] H. Beinert and M. C. Kennedy. Engineering of protein bound iron-sulfur clusters. In *EJB Reviews 1989*, pages 163–173. Springer Berlin Heidelberg, 1989. doi:10.1007/978-3-642-75189-9_11.

[27] H. Beinert, M. C. Kennedy, and C. D. Stout. Aconitase as Iron-Sulfur Protein, Enzyme, and Iron-Regulatory Protein. *Chemical Reviews*, 96(7):2335–2374, 1996. doi:10.1021/cr950040z.

[28] F. P. Belitz. Synthesis and isolation of ^{13}C-enriched 6-phosphogluconate by an optimized phophorylation with the aid of recent non-specific acid phosphatase. Master's thesis, Technische Universität Kaiserslautern, 2018.

[29] R. Bender. Anreicherung und Charakterisierung der D-Gluconat-Dehydratase von *Clostridium pasteurianum*. PhD thesis, Georg-August-Universität zu Göttingen, 1972.

[30] R. Bender, J. R. Andreesen, and G. Gottschalk. 2-Keto-3-deoxygluconate, an intermediate in the fermentation of gluconate by clostridia. *Journal of Bacteriology*, 107:570–573, 1971.

[31] W. E. Bentley, R. H. Davis, and D. S. Kompala. Dynamics of induced CAT expression in *E. coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, 38(7):749–760, 1991. doi:10.1002/bit.260380709.

[32] W. E. Bentley, N. Mirjalili, D. C. Andersen, R. H. Davis, and D. S. Kompala. Plasmid-encoded protein: The principal factor in the "metabolic burden" associated with recombinant bacteria. *Biotechnology and Bioengineering*, 35(7):668–681, 1990. doi:10.1002/bit.260350704.

[33] F. Berkovitch. Crystal structure of biotin synthase, an s-adenosylmethionine-dependent radical enzyme. *Science*, 303(5654):76–79, 2004. doi:10.1126/science.1088493.

[34] H. M. Berman. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, 28(1):235–242, 2000. doi:10.1093/nar/28.1.235.

[35] S. Bian and J. A. Cowan. Protein-bound iron–sulfur centers. Form, function, and assembly. *Coordination Chemistry Reviews*, 190-192:1049–1066, 1999. doi:10.1016/s0010-8545(99)00157-5.

[36] A. S. Bingham, P. R. Smith, and J. R. Swartz. Evolution of an [FeFe] hydrogenase with decreased oxygen sensitivity. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(3):2965–2976, 2012. doi:10.1016/j.ijhydene.2011.02.048.

[37] C. Blinn. persönliche Mitteilung.

[38] E. C. Boyle, J. L. Bishop, G. A. Grassl, and B. B. Finlay. *Salmonella*: from Pathogenesis to Therapeutics. *Journal of Bacteriology*, 189(5):1489–1495, 2006. doi:10.1128/jb.01730-06.

[39] C. Brasen, D. Esser, B. Rauch, and B. Siebers. Carbohydrate Metabolism in *Archaea*: Current Insights into Unusual Enzymes and Pathways and Their Regulation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 78(1):89–175, 2014. doi:10.1128/mmbr.00041-13.

[40] P. S. Brereton, R. E. Duderstadt, C. R. Staples, M. K. Johnson, and M. W. W. Adams. Effect of Serinate Ligation at Each of the Iron Sites of the [Fe4S4] Cluster of *Pyrococcus furiosus* Ferredoxin on the Redox, Spectroscopic, and Biological Properties†. *Biochemistry*, 38(32):10594–10605, 1999. doi:10.1021/bi990671d.

[41] A. M. Bronikowski, A. F. Bennett, and R. E. Lenski. Evolutionary adaptation to temperature VIII. effects of temperature on growth rate in natural isolates of escherichia coli and salmonella enterica from different thermal environments. *Evolution*, 55(1):33, 2001. doi:10.1554/0014-3820(2001)055[0033:eattve]2.0.co;2.

[42] H. Bruggemann, A. Hagman, M. Jules, O. Sismeiro, M.-A. Dillies, C. Gouyette, F. Kunst, M. Steinert, K. Heuner, J.-Y. Coppee, and C. Buchrieser. Virulence strategies for infecting phagocytes deduced from the *in vivo* transcriptional program of *Legionella pneumophila*. *Cellular Microbiology*, 8(8):1228–1240, 2006. doi:10.1111/j.1462-5822.2006.00703.x.

[43] W. Bubb, H. Berthon, and P. Kuchel. Tris Buffer Reactivity with Low-Molecular-Weight Aldehydes: NMR Characterization of the Reactions of Glyceraldehyde-3-Phosphate. *Bioorganic Chemistry*, 23(2):119–130, 1995. doi:10.1006/bioo.1995.1010.

[44] Y. Cao, W. Niu, J. Guo, M. Xian, and H. Liu. Biotechnological production of 1,2,4-butanetriol: An efficient process to synthesize energetic material precursor from renewable biomass. *Scientific Reports*, 5(1), 2015. doi:10.1038/srep18149.

[45] D.-E. Chang, D. J. Smalley, D. L. Tucker, M. P. Leatham, W. E. Norris, S. J. Stevenson, A. B. Anderson, J. E. Grissom, D. C. Laux, P. S. Cohen, and T. Conway. Carbon nutrition of *Escherichia coli* in the mouse intestine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(19):7427–7432, 2004. doi:10.1073/pnas.0307888101.

[46] K. Charoensuk, T. Sakurada, A. Tokiyama, M. Murata, T. Kosaka, P. Thanonkeo, and M. Yamada. Thermotolerant genes essential for survival at a critical high temperature in thermotolerant ethanologenic *Zymomonas mobilis* TISTR 548. *Biotechnology for Biofuels*, 10(1), 2017. doi:10.1186/s13068-017-0891-0.

[47] I.-M. A. Chen, K. Chu, K. Palaniappan, M. Pillay, A. Ratner, J. Huang, M. Huntemann, N. Varghese, J. R. White, R. Seshadri, T. Smirnova, E. Kirton, S. P. Jungbluth, T. Woyke, E. A. Eloe-Fadrosh, N. N. Ivanova, and N. C. Kyrpides. IMG/M v.5.0: an integrated data management and comparative analysis system for microbial genomes and microbiomes. *Nucleic Acids Research*, 47(D1):D666–D677, 2018. doi:10.1093/nar/gky901.

[48] X. Chen, K. Schreiber, J. Appel, A. Makowka, B. Fähnrich, M. Roettger, M. R. Hajirezaei, F. D. Sönnichsen, P. Schönheit, W. F. Martin, and K. Gutekunst. The Entner–Doudoroff pathway is an overlooked glycolytic route in cyanobacteria and plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(19):5441–5446, 2016. doi:10.1073/pnas.1521916113.

[49] O. Chertkov, J. Sikorski, M. Nolan, A. Lapidus, S. Lucas, T. G. D. Rio, H. Tice, J.-F. Cheng, L. Goodwin, S. Pitluck, K. Liolios, N. Ivanova, K. Mavromatis, N. Mikhailova, G. Ovchinnikova, A. Pati, A. Chen, K. Palaniappan, O. D. N. Djao, M. Land, L. Hauser, Y.-J. Chang, C. D. Jeffries, T. Brettin, C. Han, J. C. Detter, M. Rohde, M. Göker, T. Woyke, J. Bristow, J. A. Eisen, V. Markowitz, P. Hugenholtz, H.-P. Klenk, and N. C. Kyrpides. Complete genome sequence of *Thermomonospora curvata* type strain (B9T). *Standards in Genomic Sciences*, 4(1):13–22, 2011. doi:10.4056/sigs.1453580.

[50] C. D'Cunha, A. N. Morozov, and D. C. Chatfield. Theoretical Study of HOCl-Catalyzed Keto–Enol Tautomerization of β-Cyclopentanedione in an Explicit Water Environment. *The Journal of Physical Chemistry A*, 117(35):8437–8448, 2013. doi:10.1021/jp401409y.

[51] M. A. Dessau and Y. Modis. Protein Crystallization for X-ray Crystallography. *Journal of Visualized Experiments*, (47), 2011. doi:10.3791/2285.

[52] L. Diacovich, L. Lorenzi, M. Tomassetti, S. Méresse, and H. Gramajo. The infectious intracellular lifestyle of *Salmonella enterica* relies on the adaptation to nutritional conditions within the *Salmonella*-containing vacuole. *Virulence*, 8(6):975–992, 2016. doi:10.1080/21505594.2016.1270493.

[53] A. Donald, D. Sibley, D. E. Lyons, and A. S. Dahms. D-galactonate dehydrase. purification and properties. *The Journal of Biological Chemistry*, 254:2132–2137, 1979.

[54] J.-L. Dreyer. The role of iron in the activation of mannonic and altronic acid hydratases, two Fe-requiring hydro-lyases. *European Journal of Biochemistry*, 166(3):623–630, 1987. doi:10.1111/j.1432-1033.1987.tb13559.x.

[55] R. C. Eisenberg and W. J. Dobrogosz. Gluconate metabolism in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 93:941–949, 1967.

[56] M. H. Emptage, T. A. Kent, M. C. Kennedy, H. Beinert, and E. Munck. Mossbauer and EPR studies of activated aconitase: development of a localized valence state at a subsite of the [4Fe-4S] cluster on binding of citrate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80(15):4674–4678, 1983. doi:10.1073/pnas.80.15.4674.

[57] N. Entner and M. Doudoroff. Glucose and gluconic acid oxidation of *Pseudomonas saccharophila*. *The Journal of Biological Chemistry*, 196:853–862, 1952.

[58] S. Eriksson, S. Lucchini, A. Thompson, M. Rhen, and J. C. D. Hinton. Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular *Salmonella enterica*. *Molecular Microbiology*, 47(1):103–118, 2002. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03313.x.

[59] M. Fabris, M. Matthijs, S. Rombauts, W. Vyverman, A. Goossens, and G. J. Baart. The metabolic blueprint of *Phaeodactylum tricornutum* reveals a eukaryotic Entner-Doudoroff glycolytic pathway. *The Plant Journal*, 70(6):1004–1014, 2012. doi:10.1111/j.1365-313x.2012.04941.x.

[60] P. R. Feliciano and C. L. Drennan. Structural and Biochemical Investigations of the [4Fe-4S] Cluster-Containing Fumarate Hydratase from *Leishmania major*. *Biochemistry*, 58(49):5011–5021, 2019. doi:10.1021/acs.biochem.9b00923.

[61] P. R. Feliciano, C. L. Drennan, and M. C. Nonato. Crystal structure of an Fe-S cluster-containing fumarate hydratase enzyme from *Leishmania major* reveals a unique protein fold. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(35):9804–9809, 2016. doi:10.1073/pnas.1605031113.

[62] A.-K. Felux, D. Spiteller, J. Klebensberger, and D. Schleheck. Entner–Doudoroff pathway for sulfoquinovose degradation in *Pseudomonas putida* SQ1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(31):E4298–E4305, 2015. doi:10.1073/pnas.1507049112.

[63] A. S. Figueiredo, T. Kouril, D. Esser, P. Haferkamp, P. Wieloch, D. Schomburg, P. Ruoff, B. Siebers, and J. Schaber. Systems biology of the modified branched Entner-Doudoroff pathway in *Sulfolobus solfataricus*. *PLOS ONE*, 12(7):e0180331, 2017. doi:10.1371/journal.pone.0180331.

[64] A. Flamholz, E. Noor, A. Bar-Even, W. Liebermeister, and R. Milo. Glycolytic strategy as a tradeoff between energy yield and protein cost. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(24):10039–10044, 2013. doi:10.1073/pnas.1215283110.

[65] D. Flint, S. C. Rothman, W. Suh, J.-F. Tomb, and R. W. Ye. Identification and use of bacterial [2Fe-2S] Dihydroxy-acid dehydratases, 2010.

[66] D. H. Flint and R. M. Allen. Iron-Sulfur Proteins with Nonredox Functions. *Chemical Reviews*, 96(7):2315–2334, 1996. doi:10.1021/cr950041r.

[67] D. H. Flint and M. H. Emptage. Dihydroxy acid dehydratase from spinach contains a [2Fe-2S] cluster. *The Journal of Biological Chemistry*, 263:3558–3564, 1988.

[68] D. H. Flint, M. H. Emptage, M. G. Finnegan, W. Fu, and M. K. Johnson. The role and properties of the iron-sulfur cluster in *Escherichia coli* dihydroxy-acid dehydratase. *The Journal of Biological Chemistry*, 268:14732–14742, 1993.

[69] D. G. Fraenkel and B. L. Horecker. Pathways of D-Glucose Metabolism in *Salmonella typhimurium*. A study of a mutant lacking phosphogluconse isomerase. *The Journal of Biological Chemistry*, 239:2765–2771, 1964.

[70] D. G. Fraenkel and S. R. Levisohn. Glucose and gluconate metabolism in an *Escherichia coli* mutant lacking phosphoglucose isomerase. *Journal of Bacteriology*, 93:1571–1578, 1967.

[71] J. Frazzon, J. R. Fick, and D. R. Dean. Biosynthesis of iron-sulphur clusters is a complex and highly conserved process. *Biochemical Society Transactions*, 30(4):680–685, 2002. doi:10.1042/bst0300680.

[72] W. Fu, T. Morgan, L. E. Mortenson, and M. K. Johnson. Resonance Raman studies of the [4Fe-4S] to [2Fe-2S] cluster conversion in the iron protein of nitrogenase. *FEBS Letters*, 284(2):165–168, 1991. doi:10.1016/0014-5793(91)80676-t.

[73] M. G. G. Fuchs, F. Meyer, and U. Ryde. A combined computational and experimental investigation of the [2Fe–2S] cluster in biotin synthase. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 15(2):203–212, 2009. doi:10.1007/s00775-009-0585-6.

[74] H. Gao, T. Azam, S. Randeniya, J. Couturier, N. Rouhier, and M. K. Johnson. Function and maturation of the Fe–S center in dihydroxyacid dehydratase from *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, 293(12):4422–4433, 2018. doi:10.1074/jbc.ra117.001592.

[75] P. R. Gardner and I. Fridovich. Superoxide sensitivity of the *Escherichia coli* 6-phosphogluconate dehydratase. *The Journal of Biological Chemistry*, 266:1478–1483, 1991.

[76] E. Gasteiger, C. Hoogland, A. Gattiker, S. Duvaud, M. R. Wilkins, R. D. Appel, and A. Bairoch. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In *The Proteomics Protocols Handbook*, pages 571–607. Humana Press, 2005. doi:10.1385/1-59259-890-0:571.

[77] B. R. Glick. Metabolic load and heterologous gene expression. *Biotechnology Advances*, 13(2):247–261, 1995. doi:10.1016/0734-9750(95)00004-a.

[78] A. Gonzalez-Mula, J. Lachat, L. Mathias, D. Naquin, F. Lamouche, P. Mergaert, and D. Faure. The biotroph *Agrobacterium tumefaciens* thrives in tumors by exploiting a wide spectrum of plant host metabolites. *New Phytologist*, 222(1):455–467, 2019. doi:10.1111/nph.15598.

[79] F. P. Groninger-Poe, J. T. Bouvier, M. W. Vetting, C. Kalyanaraman, R. Kumar, S. C. Almo, M. P. Jacobson, and J. A. Gerlt. Evolution of Enzymatic Activities in the Enolase Superfamily: Galactarate Dehydratase III from *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Biochemistry*, 53(25):4192–4203, 2014. doi:10.1021/bi5005377.

[80] A. M. Gulick, B. K. Hubbard, J. A. Gerlt, and I. Rayment. Evolution of Enzymatic Activities in the Enolase Superfamily: Identification of the General Acid Catalyst in the Active Site of D-Glucarate Dehydratase from *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 40(34):10054–10062, 2001. doi:10.1021/bi010733b.

[81] Harald Günther. *NMR-Spektroskopie*. Georg Thieme Verlag Stuttgart - New York, 1992.

[82] M. W. Hentze and L. C. Kuhn. Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide, and oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(16):8175–8182, 1996. doi:10.1073/pnas.93.16.8175.

[83] M. Hilberg, A. J. Pierik, E. Bill, T. Friedrich, M.-L. Lippert, and J. Heider. Identification of FeS clusters in the glycyl-radical enzyme benzylsuccinate synthase via EPR and mössbauer spectroscopy. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 17(1):49–56, 2011. doi:10.1007/s00775-011-0828-1.

[84] R. H. Holm, P. Kennepohl, and E. I. Solomon. Structural and Functional Aspects of Metal Sites in Biology. *Chemical Reviews*, 96(7):2239–2314, 1996. doi:10.1021/cr9500390.

[85] F. Z. Hu, J. E. Król, C. H. S. Tsai, R. A. Eutsey, L. N. Hiller, B. Sen, A. Ahmed, T. Hillman, F. J. Buchinsky, L. Nistico, B. Dice, M. Longwell, E. Horsey, and G. D. Ehrlich. Deletion of genes involved in the ketogluconate metabolism, Entner-Doudoroff pathway, and glucose dehydrogenase increase local and invasive virulence phenotypes in *Streptococcus pneumoniae*. *PLOS ONE*, 14(1):e0209688, 2019. doi:10.1371/journal.pone.0209688.

[86] B. K. Hubbard, M. Koch, D. R. J. Palmer, P. C. Babbitt, and J. A. Gerlt. Evolution of Enzymatic Activities in the Enolase Superfamily: Characterization of the (D)-Glucarate/Galactarate Catabolic Pathway in *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 37(41):14369–14375, 1998. doi:10.1021/bi981124f.

[87] S. Iwata, M. Saynovits, T. A. Link, and H. Michel. Structure of a water soluble fragment of the 'Rieske' iron–sulfur protein of the bovine heart mitochondrial cytochrome bc1 complex determined by MAD phasing at 1.5 Å resolution. *Structure*, 4(5):567–579, 1996. doi:10.1016/s0969-2126(96)00062-7.

[88] E. F. F. J. Sambrook and T. Maniatis. *Molecular cloning: A laboratory manual*, pages 1051–1067. Number 1. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd edition, jan 1989. doi:10.1016/0167-7799(91)90068-s.

[89] T. B. Jacobson, P. A. Adamczyk, D. M. Stevenson, M. Regner, J. Ralph, J. L. Reed, and D. Amador-Noguez. ^{2}H and 1^{13}C metabolic flux analysis elucidates in vivo thermodynamics of the ED pathway in *Zymomonas mobilis*. *Metabolic Engineering*, 54:301–316, 2019. doi:10.1016/j.ymben.2019.05.006.

[90] F. S. Jacques Pouysssegur. Etude du rameau dégradatif commun des hexuronates che *Escherichia coli* K12. *Eur. J. Biochem. 21*, 1971.

[91] K. Jana and B. Ganguly. DFT Study To Explore the Importance of Ring Size and Effect of Solvents on the Keto–Enol Tautomerization Process of α- and β-Cyclodiones. *ACS Omega*, 3(7):8429–8439, 2018. doi:10.1021/acsomega.8b01008.

[92] Y. Jiang, W. Liu, T. Cheng, Y. Cao, R. Zhang, and M. Xian. Characterization of D-xylonate dehydratase YjhG from *Escherichia coli*. *Bioengineered*, 6(4):227–232, 2015. doi:10.1080/21655979.2015.1040208.

[93] D. C. Johnson, D. R. Dean, A. D. Smith, and M. K. Johnson. Structure, Function, and Formation of Biological Iron-Sulfur Clusters. *Annual Review of Biochemistry*, 74(1):247–281, 2005. doi:10.1146/annurev.biochem.74.082803.133518.

[94] M. K. Johnson. Iron-sulfur proteins: new roles for old clusters. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2(2):173–181, 1998. doi:10.1016/s1367-5931(98)80058-6.

[95] M. K. Johnson, R. S. Czernuszewicz, T. G. Spiro, R. S. Ramsay, and T. P. Singer. Resonance raman studies of beef heart aconitase and a bacterial hydrogenase. *The Journal of Biological Chemistry*, 258:12771–12774, 1983.

[96] A. Juarez, J. A. Villa, V. F. Lanza, B. Lázaro, F. de la Cruz, H. M. Alvarez, and G. Moncalián. Nutrient starvation leading to triglyceride accumulation activates the Entner Doudoroff pathway in *Rhodococcus jostii* RHA1. *Microbial Cell Factories*, 16(1), 2017. doi:10.1186/s12934-017-0651-7.

[97] F. Kennedy, A. Martin, J. P. Bowman, R. Wilson, and A. McMinn. Dark metabolism: a molecular insight into how the Antarctic sea-ice diatom *Fragilariopsis cylindrus* survives long-term darkness. *New Phytologist*, 223(2):675–691, 2019. doi:10.1111/nph.15843.

[98] M.-C. Kennedy, M. H. Emptage, J.-L. Dreyer, and H. Beinert. The Role of Iron in the Activation-Inactivation of Aconitase. *The Journal Of Biological Chemistry*, 258(18):11098–11105, 1983.

[99] M. C. Kennedy, L. Mende-Mueller, G. A. Blondin, and H. Beinert. Purification and characterization of cytosolic aconitase from beef liver and its relationship to the iron-responsive element binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(24):11730–11734, 1992. doi:10.1073/pnas.89.24.11730.

[100] T. A. Kent, J. L. Dreyer, M. C. Kennedy, B. H. Huynh, M. H. Emptage, H. Beinert, and E. Munck. Mossbauer studies of beef heart aconitase: evidence for facile interconversions of iron-sulfur clusters. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(4):1096–1100, 1982. doi:10.1073/pnas.79.4.1096.

[101] P. J. Kiley and H. Beinert. The role of Fe–S proteins in sensing and regulation in bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 6(2):181–185, 2003. doi:10.1016/s1369-5274(03)00039-0.

[102] L. K. Kilpatrick, M. C. Kennedy, H. Beinert, R. S. Czernuszewicz, T. G. Spiro, and D. Qiu. Cluster Structure and H-Bonding in Native, Substrate-Bound, and 3Fe Forms of Aconitase as Determined by Resonance Raman Spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*, 116(9):4053–4061, 1994. doi:10.1021/ja00088a046.

[103] S. Kim and S. B. Lee. Identification and characterization of *Sulfolobus solfataricus* D-gluconate dehydratase: a key enzyme in the non-phosphorylated Entner–Doudoroff pathway. *Biochemical Journal*, 387(1):271–280, 2005. doi:10.1042/bj20041053.

[104] S. Kim and S. B. Lee. Identification and Characterization of the Bacterial D-Gluconate Dehydratase in *Achromobacter xylosoxidans*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 13(4):436–444, 2008. doi:10.1007/s12257-008-0152-y.

[105] A. Klingner, A. Bartsch, M. Dogs, I. Wagner-Döbler, D. Jahn, M. Simon, T. Brinkhoff, J. Becker, and C. Wittmann. Large-Scale ^{13}C Flux Profiling Reveals Conservation of the Entner-Doudoroff Pathway as a Glycolytic Strategy among Marine Bacteria That Use Glucose. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(7):2408–2422, 2015. doi:10.1128/aem.03157-14.

[106] B. R. Knappmann, M. A. El-Nawawy, H. G. Schlegel, and M.-R. Kula. Microbial synthesis of 3-deoxy-d-erythro-hex-2-ulosonic acid 6-phosphate. *Carbohydrate Research*, 242:153–160, 1993. doi:10.1016/0008-6215(93)80029-e.

[107] K. Kobayashi, M. Fujikawa, and T. Kozawa. Oxidative stress sensing by the iron–sulfur cluster in the transcription factor, SoxR. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 133:87–91, 2014. doi:10.1016/j.jinorgbio.2013.11.008.

[108] L. Koduru, H. Y. Kim, M. Lakshmanan, B. Mohanty, Y. Q. Lee, C. H. Lee, and D.-Y. Lee. Genome-scale metabolic reconstruction and in silico analysis of the rice leaf blight pathogen, *Xanthomonas oryzae*. *Molecular Plant Pathology*, 21(4):527–540, 2020. doi:10.1111/mpp.12914.

[109] F. Korn-Wendisch, A. Kempf, E. Grund, R. M. Kroppenstedt, and H. J. Kutzner. Transfer of *Faenia rectivirgula* Kurup and Agre 1983 to the Genus *Saccharopolyspora* Lacey and Goodfellow 1975, Elevation of *Saccharopolyspora hirsuta* subsp. *taberi* Labeda 1987 to Species Level, and Emended Description of the Genus *Saccharopolyspora*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 39(4):430–441, 1989. doi:10.1099/00207713-39-4-430.

[110] R. Kovachevich and W. A. Wood. Carbohydrate metabolism by *Pseudomonas fluorescens*. III. Purification and properties of a 6-phosphogluconate dehydrase. *The Journal of Biological Chemistry*, 213:745–756, 1955.

[111] R. Kovachevich and W. A. Wood. Carbohydrate metabolism by *Pseudomonas fluorescens*. IV. Purification and properties of 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate aldolase. *The Journal of Biological Chemistry*, 213:757–767, 1955.

[112] S. Krevet, L. Shen, T. Bohnen, B. Schoenenberger, R. Meier, M. Obkircher, K. Bangert, R. Koehling, E. Allenspach, R. Wohlgemuth, B. Siebers, and C. Bräsen. Enzymatic Synthesis of 2-Keto-3-Deoxy-6-Phosphogluconate by the 6-Phosphogluconate-Dehydratase From *Caulobacter crescentus*. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 2020. doi:10.3389/fbioe.2020.00185.

[113] M. Kuznecov. Determination of spontaneous deuteriumexchange of 2-ketoacids and the enzymatic reaction of dhad with 2-ketoacids. 2020.

[114] H. Lauble, M. Kennedy, H. Beinert, and C. D. Stout. Crystal Structures of Aconitase with *Trans*-aconitate and Nitrocitrate Bound. *Journal of Molecular Biology*, 237(4):437–451, 1994. doi:10.1006/jmbi.1994.1246.

[115] G. Layer, K. Grage, T. Teschner, V. Schünemann, D. Breckau, A. Masoumi, M. Jahn, P. Heathcote, A. X. Trautwein, and D. Jahn. Radical s-adenosylmethionine enzyme coproporphyrinogen III oxidase HemN. *Journal of Biological Chemistry*, 280(32):29038–29046, 2005. doi:10.1074/jbc.m501275200.

[116] S. C. Lee, W. Lo, and R. H. Holm. Developments in the Biomimetic Chemistry of Cubane-Type and Higher Nuclearity Iron–Sulfur Clusters. *Chemical Reviews*, 114(7):3579–3600, 2014. doi:10.1021/cr4004067.

[117] T. G. Lessie and P. V. Phibbs. Alternative Pathways of Carbohydrate Utilization in Pseudomonads. *Annual Review of Microbiology*, 38(1):359–388, 1984. doi:10.1146/annurev.mi.38.100184.002043.

[118] I. Letunic and P. Bork. Interactive Tree Of Life (iTOL)v4: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Research*, 47(W1):W256–W259, 2019. doi:10.1093/nar/gkz239.

[119] B. J. Levin, Y. Y. Huang, S. C. Peck, Y. Wei, A. M. del Campo, J. A. Marks, E. A. Franzosa, C. Huttenhower, and E. P. Balskus. A prominent glycyl radical enzyme in human gut microbiomes metabolizes *trans*-4-hydroxy-L-proline. *Science*, 355(6325):eaai8386, 2017. doi:10.1126/science.aai8386.

[120] J. Li, R. Epa, N. E. Scott, D. Skoneczny, M. Sharma, A. J. D. Snow, J. P. Lingford, E. D. Goddard-Borger, G. J. Davies, M. J. McConville, and S. J. Williams. A Sulfoglycolytic Entner-Doudoroff Pathway in *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii SRDI565. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(15), 2020. doi:10.1128/aem.00750-20.

[121] W.-J. Li. Five novel species of the genus *Nocardiopsis* isolated from hypersaline soils and emended description of *Nocardiopsis salina*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(5):1089–1096, 2006. doi:10.1099/ijs.0.64033-0.

[122] S. Liang, H. Chen, J. Liu, and J. Wen. Rational design of a synthetic Entner–Doudoroff pathway for enhancing glucose transformation to isobutanol in *Escherichia coli*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 45(3):187–199, 2018. doi:10.1007/s10295-018-2017-5.

[123] R. Lill. Function and biogenesis of iron–sulphur proteins. *Nature*, 460(7257):831–838, 2009. doi:10.1038/nature08301.

[124] P. A. Lindahl, N. J. Gorelick, E. Münck, and W. H. Orme-Johnson. EPR and Mössbauer studies of nucleotide-bound nitrogenase iron protein from *Azotobacter vinelandii*. *The Journal of biological chemistry*, 262:14945–14953, 1987.

[125] H. Liu, K. R. M. Ramos, K. N. G. Valdehuesa, G. M. Nisola, W.-K. Lee, and W.-J. Chung. Biosynthesis of ethylene glycol in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(8):3409–3417, 2012. doi:10.1007/s00253-012-4618-7.

[126] J. Liu, X. Xie, and S.-M. Li. Guanitrypmycin Biosynthetic Pathways Imply Cytochrome P450 Mediated Regio- and Stereospecific Guaninyl-Transfer Reactions. *Angewandte Chemie International Edition*, 58(33):11534–11540, 2019. doi:10.1002/anie.201906891.

[127] J. MacGee and M. Doudoroff. A new phosphorylated intermediate in glucose oxidation. *The Journal of Biological Chemistry*, 210:617–626, 1954.

[128] F. Madeira, Y. mi Park, J. Lee, N. Buso, T. Gur, N. Madhusoodanan, P. Basutkar, A. R. N. Tivey, S. C. Potter, R. D. Finn, and R. Lopez. The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Research*, 47(W1):W636–W641, 2019. doi:10.1093/nar/gkz268.

[129] S. G. Mayhew. The Redox Potential of Dithionite and $SO^{-}{}_{2}$ from Equilibrium Reactions with Flavodoxins, Methyl Viologen and Hydrogen plus Hydrogenase. *European Journal of Biochemistry*, 85(2):535–547, 1978. doi:10.1111/j.1432-1033.1978.tb12269.x.

[130] H. P. Meloche and W. A. Wood. The Mechanism of 2-Keto-3-deoxy-6-phosphogluconic Aldolase. *The Journal of Biological Chemistry*, 239:3511–3514, 1964.

[131] H. P. Meloche and W. A. Wood. The Mechanism of 6-Phosphogluconic Dehydrase. *The Journal of Biological Chemistry*, 239:3505–3510, 1964.

[132] E. L. Mettert and P. J. Kiley. Fe–S proteins that regulate gene expression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1853(6):1284–1293, 2015. doi:10.1016/j.bbamcr.2014.11.018.

[133] C. F. Midelfort, R. K. Gupta, and H. P. Meloche. Specificity of 2-Keto-3-deoxygluconate-6-P aldolase for Open Chain Form of 2-keto-3-deoxygluconate-6-P. *The Journal of Biological Chemistry*, 252:3486–3492, 1977.

[134] K. Morita, Y. Nomura, J. Ishii, F. Matsuda, A. Kondo, and H. Shimizu. Heterologous expression of bacterial phosphoenol pyruvate carboxylase and Entner–Doudoroff pathway in *Saccharomyces cerevisiae* for improvement of isobutanol production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 124(3):263–270, 2017. doi:10.1016/j.jbiosc.2017.04.005.

[135] S. A. Morse, S. Stein, and J. Hines. Glucose metabolism in *Neisseria gonorrhoeae*. *Journal of Bacteriology*, 120:702–714, 1974.

[136] S. N. Schormann, J. Symersky. Structure of [FeS]cluster-free Apo Form of 6-Phosphogluconate Dehydratase from *Shewanella oneidensis*, 5 2006. doi:10.2210/pdb2gp4/pdb.

[137] M. Nakamura, K. Saeki, and Y. Takahashi. Hyperproduction of Recombinant Ferredoxins in *Escherichia coli* by Coexpression of the ORF1-ORF2-iscS-iscU-iscA-hscB-hscA-fdx-ORF3 Gene Cluster. *Journal of Biochemistry*, 126(1):10–18, 1999. doi:10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022409.

[138] C. Y. Ng, I. Farasat, C. D. Maranas, and H. M. Salis. Rational design of a synthetic Entner–Doudoroff pathway for improved and controllable NADPH regeneration. *Metabolic Engineering*, 29:86–96, 2015. doi:10.1016/j.ymben.2015.03.001.

[139] E. L. O´Connell and H. P. Meloche. Enzymic Synthesis of 2-Keto-3-Deoxygluconate 6-Phosphate Using 6-Phosphogluconate Dehydratase. *Methods in Enzymology*, 89:98 – 101, 1982.

[140] C. N. Pace, F. Vajdos, L. Fee, G. Grimsley, and T. Gray. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Science*, 4(11):2411–2423, 1995. doi:10.1002/pro.5560041120.

[141] D. Padovani, F. Thomas, A. X. Trautwein, E. Mulliez, and M. Fontecave. Activation of Class III Ribonucleotide Reductase from *E. coli*. The Electron Transfer from the Iron-Sulfur Center to *S*-Adenosylmethionine. *Biochemistry*, 40(23):6713–6719, 2001. doi:10.1021/bi002936q.

[142] D. R. J. Palmer, B. K. Hubbard, and J. A. Gerlt. Evolution of Enzymatic Activities in the Enolase Superfamily: Partitioning of Reactive Intermediates by (D)-Glucarate Dehydratase from *Pseudomonas putida*. *Biochemistry*, 37(41):14350–14357, 1998. doi:10.1021/bi981122v.

[143] D. R. J. Palmer, S. J. Wieczorek, B. K. Hubbard, G. T. Mrachko, and J. A. Gerlt. Importance of Mechanistic Imperatives in Enzyme-Catalyzed β-Elimination Reactions: Stereochemical Consequences of the Dehydration Reactions Catalyzed by D-Galactonate Dehydratase from *Escherichia coli* and D-Glucarate Dehydratase from *Pseudomonas putida*. *Journal of the American Chemical Society*, 119(40):9580–9581, 1997. doi:10.1021/ja970977c.

[144] M.-E. Pandelia, N. D. Lanz, S. J. Booker, and C. Krebs. Mössbauer spectroscopy of Fe/S proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1853(6):1395–1405, 2015. doi:10.1016/j.bbamcr.2014.12.005.

[145] T. Patra, H. Koley, T. Ramamurthy, A. C. Ghose, and R. K. Nandy. The Entner-Doudoroff Pathway Is Obligatory for Gluconate Utilization and Contributes to the Pathogenicity of *Vibrio cholerae*. *Journal of Bacteriology*, 194(13):3377–3385, 2012. doi:10.1128/jb.06379-11.

[146] J. W. Peters. Structure and mechanism of iron-only hydrogenases. *Current Opinion in Structural Biology*, 9(6):670–676, 1999. doi:10.1016/s0959-440x(99)00028-7.

[147] J. W. Peters, M. H. B. Stowell, S. M. Soltis, M. G. Finnegan, M. K. Johnson, and D. C. Rees. Redox-Dependent Structural Changes in the Nitrogenase P-Cluster. *Biochemistry*, 36(6):1181–1187, 1997. doi:10.1021/bi9626665.

[148] S. G. Pur. Mining the enolase superfamily for new functions: Investigations of d-glucarate dehydratase related proteins (glucdrp) and l-lyxonate dehydratase proteins (lyxd). PhD thesis, 2014.

[149] R. S. Donovan and C. W. Robinson and B. R. Glick. Review: Optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the lac promoter. *Journal of Industrial Microbiology*, 16(3):145–154, 1996. doi:10.1007/bf01569997.

[150] M. M. Rahman, M. Andberg, A. Koivula, J. Rouvinen, and N. Hakulinen. Crystallization and X-ray diffraction analysis of an L-arabinonate dehydratase from *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and a D-xylonate dehydratase from *Caulobacter crescentus*. *Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications*, 72(8):604–608, 2016. doi:10.1107/s2053230x16010311.

[151] M. M. Rahman, M. Andberg, A. Koivula, J. Rouvinen, and N. Hakulinen. The crystal structure of D-xylonate dehydratase reveals functional features of

enzymes from the Ilv/ED dehydratase family. *Scientific Reports*, 8(1), 2018. doi:10.1038/s41598-018-19192-6.

[152] M. M. Rahman, M. Andberg, S. K. Thangaraj, T. Parkkinen, M. Penttilä, J. Jänis, A. Koivula, J. Rouvinen, and N. Hakulinen. The Crystal Structure of a Bacterial L-Arabinonate Dehydratase Contains a [2Fe-2S] Cluster. *ACS Chemical Biology*, 12(7):1919–1927, 2017. doi:10.1021/acschembio.7b00304.

[153] J. F. Rakus, A. A. Fedorov, E. V. Fedorov, M. E. Glasner, B. K. Hubbard, J. D. Delli, P. C. Babbitt, S. C. Almo, and J. A. Gerlt. Evolution of Enzymatic Activities in the Enolase Superfamily: L-Rhamnonate Dehydratase. *Biochemistry*, 47(38):9944–9954, 2008. doi:10.1021/bi800914r.

[154] J. F. Rakus, A. A. Fedorov, E. V. Fedorov, M. E. Glasner, J. E. Vick, P. C. Babbitt, S. C. Almo, and J. A. Gerlt. Evolution of Enzymatic Activities in the Enolase Superfamily: D-Mannonate Dehydratase from *Novosphingobium aromaticivorans*. *Biochemistry*, 46(45):12896–12908, 2007. doi:10.1021/bi701703w.

[155] L. Ramos and V. M. Gil. Multinuclear NMR study of the complexes of 6-phospho-d-gluconic acid with W(VI) and Mo(VI). *Carbohydrate Research*, 339(13):2225–2232, 2004. doi:10.1016/j.carres.2004.06.014.

[156] A. Regmi and E. F. Boyd. Carbohydrate metabolic systems present on genomic islands are lost and gained in *Vibrio parahaemolyticus*. *BMC Microbiology*, 19(1), 2019. doi:10.1186/s12866-019-1487-6.

[157] M. Rodriguez, A. G. Wedd, and R. K. Scopes. 6-phosphogluconate dehydratase from *Zymomonas mobilis*: an iron-sulfur-manganese enzyme. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 38:783–789, 1996.

[158] M. D. Rosa, A. Gambacorta, B. Nicolaus, P. Giardina, E. Poerio, and V. Buonocore. Glucose metabolism in the extreme thermoacidophilic archaebacterium *Sulfolobus solfataricus*. *Biochemical Journal*, 224(2):407–414, 1984. doi:10.1042/bj2240407.

[159] M. Rosas-Lemus, G. Minasov, L. Shuvalova, Z. Wawrzak, O. Kiryukhina, N. Mih, L. Jaroszewski, B. Palsson, A. Godzik, and K. J. F. Satchell. Structure of galactarate dehydratase, a new fold in an enolase involved in bacterial fitness after antibiotic treatment. *Protein Science*, 29(3):711–722, 2019. doi:10.1002/pro.3796.

[160] A. B. Roy, M. J. E. Hewlins, A. J. Ellis, J. L. Harwood, and G. F. White. Glycolytic Breakdown of Sulfoquinovose in Bacteria: a Missing Link in the Sulfur Cycle. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(11):6434–6441, 2003. doi:10.1128/aem.69.11.6434-6441.2003.

[161] S. Roy, T. Patra, T. Golder, S. Chatterjee, H. Koley, and R. K. Nandy. Characterization of the gluconate utilization system of *Vibrio cholerae* with special reference to virulence modulation. *Pathogens and Disease*, 74(8):ftw085, 2016. doi:10.1093/femspd/ftw085.

[162] R. Rutkis, I. Strazdina, E. Balodite, Z. Lasa, N. Galinina, and U. Kalnenieks. The Low Energy-Coupling Respiration in *Zymomonas mobilis* Accelerates Flux in the Entner-Doudoroff Pathway. *PLOS ONE*, 11(4):e0153866, 2016. doi:10.1371/journal.pone.0153866.

[163] F. J. Ruzicka and H. Beinert. The soluble "high potential"type iron-sulfur protein from mitochondria is aconitase. *The Journal of Biological Chemistry*, 253:2514–2517, 1978.

[164] M. K. Schneider. Die Entner-Doudoroff-Dehydratase aus *E. coli*. Diplomarbeit, Technische Universität Kaiserslautern, 2016.

[165] V. Schünemann and H. Winkler. Structure and dynamics of biomolecules studied by Mössbauer spectroscopy. *Reports on Progress in Physics*, 63(3):263–353, 2000. doi:10.1088/0034-4885/63/3/202.

[166] R. Scopes. Use of differential dye-ligand chromatography with affinity elution for enzyme purification: 2-Keto-3-deoxy-6-phosphogluconate aldolase from *Zymomonas mobilis*. *Analytical Biochemistry*, 136(2):525–529, 1984. doi:10.1016/0003-2697(84)90256-2.

[167] R. Scopes and K. Griffiths-Smith. Use of differential dye-ligand chromatography with affinity elution for enzyme purification: 6-Phosphogluconate dehydratase from Zymomonas mobilis. *Analytical Biochemistry*, 136(2):530–534, 1984. doi:10.1016/0003-2697(84)90257-4.

[168] L. C. Seefeldt, B. M. Hoffman, and D. R. Dean. Mechanism of Mo-Dependent Nitrogenase. *Annual Review of Biochemistry*, 78(1):701–722, 2009. doi:10.1146/annurev.biochem.78.070907.103812.

[169] J. E. Seegmiller and B. L. Horecker. The synthesis of glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconate. *The Journal of Biological Chemistry*, 192:175–180, 1951.

[170] B. Selvaraj, A. J. Pierik, E. Bill, and B. M. Martins. The ferredoxin-like domain of the activating enzyme is required for generating a lasting glycyl radical in 4-hydroxyphenylacetate decarboxylase. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 19(8):1317–1326, 2014. doi:10.1007/s00775-014-1189-3.

[171] M. C. Shelton, I. C. Cotterill, S. T. A. Novak, R. M. Poonawala, S. Sudarshan, and E. J. Toone. 2-Keto-3-deoxy-6-phosphogluconate Aldolases as Catalysts for Stereocontrolled CarbonCarbon Bond Formation. *Journal of the American Chemical Society*, 118(9):2117–2125, 1996, https://doi.org/10.1021/ja952596+. doi:10.1021/ja952596+.

[172] S.-K. Shin, Y.-J. Cho, and H. Yi. Synonymy of *Micropolyspora internatus* and *Saccharomonospora viridis* and Emended Description of *Saccharomonospora viridis*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(1):149–154, 2017. doi:10.4014/jmb.1610.10033.

[173] C. V. Stappen, L. Decamps, G. E. Cutsail, R. Bjornsson, J. T. Henthorn, J. A. Birrell, and S. DeBeer. The Spectroscopy of Nitrogenases. *Chemical Reviews*, 120(12):5005–5081, 2020. doi:10.1021/acs.chemrev.9b00650.

[174] C. Stephens, B. Christen, T. Fuchs, V. Sundaram, K. Watanabe, and U. Jenal. Genetic Analysis of a Novel Pathway for D-Xylose Metabolism in *Caulobacter crescentus*. *Journal of Bacteriology*, 189(5):2181–2185, 2006. doi:10.1128/jb.01438-06.

[175] A. Stincone, A. Prigione, T. Cramer, M. M. C. Wamelink, K. Campbell, E. Cheung, V. Olin-Sandoval, N.-M. Grüning, A. Krüger, M. T. Alam, M. A. Keller, M. Breitenbach, K. M. Brindle, J. D. Rabinowitz, and M. Ralser. The return of metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway. *Biological Reviews*, 90(3):927–963, 2014. doi:10.1111/brv.12140.

[176] B. Surek, M. Wilhelm, and W. Hillen. Optimizing the promoter and ribosome binding sequence for expression of human single chain urokinase-like plasminogen activator in *Escherichia coli* and stabilization of the product by avoiding heat shock response. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 34(4), 1991. doi:10.1007/bf00180576.

[177] N. Suzuki and W. A. Wood. Complete primary structure of 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate aldolase. *The Journal of Biological Chemistry*, 255:3427–3435, 1980.

[178] J. Swings and J. De Ley. The biology of *Zymomonas*. *Bacteriological Reviews*, 41:1–46, 1977.

[179] T. Taha and T. Deits. Detection of Metabolites of the Entner-Doudoroff Pathway by HPLC with Pulsed Amperometry: Application to Assays for Pathway Enzymes. *Analytical Biochemistry*, 219(1):115–120, 1994. doi:10.1006/abio.1994.1239.

[180] Y.-S. Tai, M. Xiong, P. Jambunathan, J. Wang, J. Wang, C. Stapleton, and K. Zhang. Engineering nonphosphorylative metabolism to generate lignocellulose-derived products. *Nature Chemical Biology*, 12(4):247–253, 2016. doi:10.1038/nchembio.2020.

[181] H. Takagi, Y. Morinaga, M. Tsuchiya, H. Ikemura, and M. Inouyea. Control of Folding of Proteins Secreted by a High Expression Secretion Vector, pIN-III-ompA: 16-Fold Increase in Production of Active Subtilisin E in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology*, 6(8):948–950, 1988. doi:10.1038/nbt0888-948.

[182] N. Tanaka, Z. Hasan, A. F. Hartog, T. van Herk, and R. Wever. Phosphorylation and dephosphorylation of polyhydroxy compounds by class A bacterial acid phosphatases. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 1(16):2833, 2003. doi:10.1039/b304012g.

[183] J. B. Thoden, H. M. Holden, and G. A. Grant. Structure of L-Serine Dehydratase from *Legionella pneumophila*: Novel Use of the C-Terminal Cysteine as an Intrinsic Competitive Inhibitor. *Biochemistry*, 53(48):7615–7624, 2014. doi:10.1021/bi501253w.

[184] S. Todorovic and M. Teixeira. Resonance Raman spectroscopy of Fe–S proteins and their redox properties. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 23(4):647–661, 2018. doi:10.1007/s00775-018-1533-0.

[185] K. I. Uchiya, M. Tohsuji, T. Nikai, H. Sugihara, and C. Sasakawa. Identification and Characterization of *phoN-Sf*, a Gene on the Large Plasmid of *Shigella flexneri* 2a encoding a Nonspecific Phosphatase. *Journal of Bacteriology*, 178(15):4548–4554, 1996. doi:10.1128/jb.178.15.4548-4554.1996.

[186] T. van Herk, A. F. Hartog, A. M. van der Burg, and R. Wever. Regioselective Phosphorylation of Carbohydrates and Various Alcohols by Bacterial Acid Phosphatases Probing the Substrate Specificity of the Enzyme from *Shigella flexneri*. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 347(7-8):1155–1162, 2005. doi:10.1002/adsc.200505072.

[187] R. L. Vandlen, D. L. Ersfeld, A. Tulinsky, and W. A. Wood. Confirmation of a trimeric subunit arrangement for 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconic aldolase using x-ray crystallographic methods. *The Journal of Biological Chemistry*, 248:2251–2253, 1973.

[188] L. P. Wackett. Mechanism and applications of Rieske non-heme iron dioxygenases. *Enzyme and Microbial Technology*, 31(5):577–587, 2002. doi:10.1016/s0141-0229(02)00129-1.

[189] E. M. Walters and M. K. Johnson. Ferredoxin:thioredoxin Reductase: Disulfide Reduction Catalyzed via Novel Site-specific [4Fe–4S] Cluster Chemistry. *Photosynthesis Research*, 79(3):249–264, 2004. doi:10.1023/b:pres.0000017195.05870.61.

[190] M. Wang, Y. Zhou, and T. Tan. Cofactor Engineering for Enhanced Production of Diols by *Klebsiella pneumoniae* From Co-Substrate. *Biotechnology Journal*, 12(11):1700176, 2017. doi:10.1002/biot.201700176.

[191] S. Watanabe, F. Fukumori, H. Nishiwaki, Y. Sakurai, K. Tajima, and Y. Watanabe. Novel non-phosphorylative pathway of pentose metabolism from bacteria. *Scientific Reports*, 9(1), 2019. doi:10.1038/s41598-018-36774-6.

[192] S. Watanabe, N. Shimada, K. Tajima, T. Kodaki, and K. Makino. Identification and Characterization of L-Arabonate Dehydratase, L-2-Keto-3-deoxyarabonate Dehydratase, and L-Arabinolactonase Involved in an Alternative Pathway of L-Arabinose Metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, 281(44):33521–33536, 2006. doi:10.1074/jbc.m606727200.

[193] S. Watanabe, Y. Shimomura, K. Ubukata, T. Kirikae, and T. Miyoshi-Akiyama. Concomitant Regulation of Host Tissue-Destroying Virulence Factors and Carbohydrate Metabolism During Invasive Diseases Induced by Group G Streptococci. *The Journal of Infectious Diseases*, 208(9):1482–1493, 2013. doi:10.1093/infdis/jit353.

[194] M. M. Werst, M. C. Kennedy, A. L. P. Houseman, H. Beinert, and B. M. Hoffman. Characterization of the iron-sulfur $[4Fe\text{-}4S]^{+}$ Cluster at the Active Site of Aconitase by ^{57}Fe, ^{33}S, and ^{14}N Electron Nuclear Double Resonance Spectroscopy. *Biochemistry*, 29(46):10533–10540, 1990. doi:10.1021/bi00498a016.

[195] W. A. Wood. 2-Keto-3-deoxy-6-phosphogluconic and Related Aldolases. In *The Enzymes*. Academic Press New York and London, 1972.

[196] Y. Yan, Q. Liu, X. Zang, S. Yuan, U. Bat-Erdene, C. Nguyen, J. Gan, J. Zhou, S. E. Jacobsen, and Y. Tang. Resistance-gene-directed discovery of a natural-product herbicide with a new mode of action. *Nature*, 559(7714):415–418, 2018. doi:10.1038/s41586-018-0319-4.

[197] S. Yang, Q. Fei, Y. Zhang, L. M. Contreras, S. M. Utturkar, S. D. Brown, M. E. Himmel, and M. Zhang. *Zymomonas mobilis* as a model system for production of biofuels and biochemicals. *Microbial Biotechnology*, 9(6):699–717, 2016. doi:10.1111/1751-7915.12408.

[198] W. S. Yew, A. A. Fedorov, E. V. Fedorov, J. F. Rakus, R. W. Pierce, S. C. Almo, and J. A. Gerlt. Evolution of Enzymatic Activities in the Enolase Superfamily: L-Fuconate Dehydratase from *Xanthomonas campestris*. *Biochemistry*, 45(49):14582–14597, 2006. doi:10.1021/bi061687o.

[199] R. Zablotny and D. G. Fraenkel. Glucose and Gluconate Metabolism in a Mutant of *Escherichia coli* Lacking Gluconate-6-phosphate Dehydrase. *Journal of Bacteriology*, 93:1579–1581, 1967.

[200] Q. Zhang, F. Gao, H. Peng, H. Cheng, Y. Liu, J. Tang, J. Thompson, G. Wei, J. Zhang, Y. Du, J. Yan, and G. F. Gao. Crystal Structures of *Streptococcus suis* Mannonate Dehydratase (ManD) and Its Complex with Substrate: Genetic and Biochemical Evidence for a Catalytic Mechanism. *Journal of Bacteriology*, 191(18):5832–5837, 2009. doi:10.1128/jb.00599-09.

[201] X. Zhang, Y. Liu, L. Liu, M. Wang, J. Li, G. Du, and J. Chen. Modular pathway engineering of key carbon-precursor supply-pathways for improved N-acetylneuraminic acid production in *Bacillus subtilis*. *Biotechnology and Bioengineering*, 115(9):2217–2231, 2018. doi:10.1002/bit.26743.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich beim Anfertigen meiner Dissertation unterstützt haben und ohne die diese Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen wäre.

Als erstes möchte ich Herrn Prof. Antonio J. Pierik danken, für die Möglichkeit die Arbeit zu diesem spannenden Thema in seinem Labor durchführen zu können. Ich bedanke mich für das mir entgegengebrachte Vertrauen in meine Person und meine Arbeit und den fachlichen Rat der mich in meiner Arbeit voran gebracht hat.

Herrn Prof. Dr. Volker Schünemann danke ich für die Übernahme der Zweitkorrektur dieser Arbeit sowie die angenehme Kooperation im Rahmen meines Projektes.

Für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes danke ich Herrn Prof. Dr. Jörg Fahrer.

Ich danke der Konrad-Adenauer-Stiftung für die finanzielle Unterstüzung durch ein Promotionsstipendium sowie die damit zusammen hängenden Weiterbildungs- und Networkingmöglichkeiten.

Der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Volker Schünemann, im Besonderen Frau Dr. Christina Müller, danke ich für die Messungen und anschließenden Simulationen der Mössbauerspektroskopie sowie für eine unkomplizierte Zusammenarbeit und die interessanten Diskussionen.

Der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Holger Dobbek danke ich für die freundliche Aufnahme in ihrem Labor während meiner Zeit in Berlin. Vielen Dank Frau Dr. Berta Martins für ihre Unterstützung bei allen Kristallisationsexperimenten.

Für die Messungen der 600 MHz NMR-Spektren danke ich Frau Christiane Müller.

Herrn Dr. Ingo Zebger, Herrn Konstantin Laun und insbesondere Frau Charlotte Wiemann möchte ich für die Messung sowie die anschließende Diskussion der Resonanz-Raman-Spektren danken.

Herrn Dr. Markus Räschle danke ich für die Einführung in die Massenspektrometrie und die Messungen meiner Proben.

Für die Messungen der ESR-Spektren an vielen kalten Terminen danke ich Herrn Dominique Bechtel sowie Herrn Prof. Dr. Antonio J. Pierik.

Ich danke Frau Thrérès Albert für die Betreuung meiner Diplomarbeit und das damit zusammenhängende Beibringen der Grundlagen der Laborarbeit.

Bei allen meinen Praktikanten und Praktikantinnen, Master- und Bacheloranden und -randinnen, die mich manchmal zur Verzweiflung gebracht haben, aber mir auch durch ihre Arbeit die Möglichkeit gegeben haben, interessante Seitenthemen dieser Arbeit zu betrachten, danke ich für interessante Diskussionen.

Für das Korrekturlesen danke ich Frau Dr. Christina Müller und Herrn Dr. Tobias Schick.

Frau Fluck möchte ich für ihre Hilfe bei allen bürokratischen Problemen und für zahlreiche freundliche Gespräche danken.

Vor allem für die Durchführung vieler Mutagenesen, was mir viel Arbeit abgenommen hat, aber auch für das produktive Miteinander bei der Betreuung von Praktika möchte ich Frau Doreen Knochenhauer danken.

Allen Kollegen des Arbeitskreises danke ich für das kollegiale und angenehme Arbeitsklima im Labor. Besonders Herrn Lukas Hewener danke ich für das unkomplizierte Zusammenarbeiten im gemeinsamen Labor.

Für die Hilfe bei zahlreichen Problemen, zahlreiche lustige Pausen und viele produktive fachliche Gespräche und die Freundschaft, die über die Zeit im Labor hinaus geht, möchte ich mich bei Frau Dr. Kathrin Stegmaier, Frau Dr. Carina Greth, Frau Catharina Blinn und Herrn Dominique Bechtel bedanken.

Mein größter Dank gilt meiner Familie. Meinem Vater, der mich in meinem Weg unterstützt hat und mir während dieser Arbeit mehr als einmal meinen Laptop in kürzester Zeit gerettet hat. Und meinem Freund Hans-Christian Reeh für die Unterstützung während dieser Arbeit, das Korrekturlesen, Diskutieren über Formulierungen, Rückenfreihalten und die Motivation. Ohne all das wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Vielen Dank!

Lebenslauf

Monika Kerstin Schneider

08/2001 - 03/2010	Maria-Ward-Schule, Landau in der Pfalz Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
10/2010 - 06/2016	Technische Universität Kaiserslautern Studiengang: Chemie Vertiefung: Biochemie Abschluss: Diplom Auslandsaufenthalt im Rahmen des Erasmusprogramms für ein Forschungspraktikum an der *Universidad de Murcia*, Spanien
01/2017 - 06/2021	Technische Universität Kaiserslautern Promotion in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Antonio Pierik

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

„Die Entner-Doudoroff Dehydratase“

selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe Dritter angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel genutzt habe.

Ich versichere außerdem, dass ich die beigefügte Dissertation nur in diesem und keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht habe und dass die Abhandlung in dieser oder ähnlicher Form noch nicht anderweitig als Promotionsleistung vorgelegt und bewertet wurde.

Aufgrund der versäumten Frist zur Veröffentlichung der Dissertation wurde das Promotionsverfahren gemäß § 15 der geltenden Promotionsordnung abgebrochen. Nach Beschluss des Fachbereichsrats Chemie der RPTU vom 30.10.2023 wurde die vorliegende Dissertation im Hinblick auf das Deckblatt/formale Angaben aktualisiert. Darüber hinaus gibt es keine weiteren Auflagen.

Altleiningen, 04.07.2024

Monika Kerstin Reeh (geb. Schneider)