

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Phosphonate</b>	<b>1</b>
1.1.1 Biosynthese von Phosphonaten	3
1.1.2 Biologischer Abbau von Phosphonaten	7
<b>1.2 Thiamindiphosphat-abhängige Enzyme</b>	<b>10</b>
1.2.1 Pyruvat-Decarboxylase	14
<b>1.3 Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>17</b>
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>19</b>
<b>2.1 Chemikalien und Enzyme</b>	<b>19</b>
<b>2.2 Bakterienstämme, Phagen und Plasmide</b>	<b>20</b>
<b>2.3 Kultivierung von Bakterien</b>	<b>23</b>
2.3.1 Nährmedien	23
2.3.2 Medienzusätze	23
2.3.3 Kultivierungsbedingungen	24
<b>2.4 Transformation von <i>E. coli</i></b>	<b>25</b>
<b>2.5 Molekularbiologische Methoden</b>	<b>25</b>
2.5.1 DNA-Präparation	25
2.5.2 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen	26
2.5.3 DNA-Fällung mittels Ethanol	26
2.5.4 Agarose-Gelelektrophorese	26
2.5.5 Behandlung mit alkalischer Phosphatase	27
2.5.6 Ligation von DNA-Fragmenten	27
2.5.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)	27
2.5.8 DNA-Sequenzierung	28
2.5.9 Ortsgerichtete Mutagenese	29
2.5.10 $\lambda$ DE3 Lysogenization Kit	31
<b>2.6 Proteinbiochemische Methoden</b>	<b>31</b>
2.6.1 Bestimmung der Proteinkonzentration	31
2.6.2 Protein-Fällung mittels Trichloressigsäure	32
2.6.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	32

2.6.4	Aufschluss von <i>E. coli</i> -Zellen	33
2.6.4.1	Zellaufschluss von <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS	33
2.6.4.2	Ultraschallaufschluss	33
2.6.5	Chromatographische Proteinreinigung	34
2.6.5.1	Ni <sup>2+</sup> -Affinitätschromatographie	34
2.6.5.2	Gelpermeationschromatographie (Gelfiltration)	35
2.6.6	Ultrafiltration von Proteinen	36
2.6.7	Dialyse von Proteinen	36
<b>2.7</b>	<b>Enzymaktivitätsbestimmungen</b>	<b>37</b>
2.7.1	Photometrische Enzymtests	37
2.7.1.1	Enzymatische Bestimmung der Phosphonopyruvat-Konzentration	37
2.7.1.2	Phtase/ADH- und Aept/LDH-Enzymtest	37
2.7.1.3	Ppd/ADH-Enzymtest	38
2.7.2	HPLC (High Performance Liquid Chromatography)	38
2.7.2.1	Synthese und Nachweis von Phosphonoacetaldehyd	39
2.7.2.2	Untersuchung alternativer Ppd-Substrate	40
2.7.2.3	Synthese von 2-Aminoethylphosphonat	40
2.7.2.4	Acyloin-Kondensation	41
2.7.3	MS (Massenspektroskopie)	42
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>43</b>
<b>3.1</b>	<b>Enzyme</b>	<b>45</b>
3.1.1	Phosphonopyruvat-Decarboxylase	45
3.1.1.1	Expression und Aufreinigung	45
3.1.1.2	Nachweis der enzymatischen Aktivität	48
3.1.2	2-Aminoethylphosphonat-Transaminase und Phosphonoacetaldehyd-Hydrolase	50
3.1.2.1	Expression und Aufreinigung	50
3.1.2.2	Nachweis der enzymatischen Aktivität	52
3.1.2.3	Aept- und Phtase-abhängiger Nachweis der Ppd-Aktivität	54
3.1.3	Phospho <i>enol</i> pyruvat-Phosphomutase	55
3.1.3.1	Expression und Aufreinigung	55
3.1.3.2	Nachweis der enzymatischen Aktivität	56
3.1.3.3	Ppm-abhängige Bestimmung der Phosphonopyruvat-Konzentration	57
3.1.4	Synthese von 2-Aminoethylphosphonat	57
3.1.4.1	<i>In vitro</i> -Synthese mit gereinigten Enzymen	57
3.1.4.2	<i>In vivo</i> -Synthese in <i>E. coli</i>	58
3.1.5	Zusammenfassung	61

<b>3.2</b>	<b>Biochemische Charakterisierung der Ppd</b>	<b>62</b>
3.2.1	Einfluss von pH-Wert und Temperatur auf die Enzymaktivität und die Enzymstabilität	62
3.2.2	Enzymkinetik in Abhängigkeit von dem physiologischen Substrat Phosphonopyruvat	65
3.2.3	Affinität zu den Cofaktoren Thiamindiphosphat und zweiwertigen Metall-Ionen	66
3.2.4	Untersuchungen zum Substratspektrum	67
3.2.5	Untersuchungen zur Synthese von Phosphonoacyloinen	67
3.2.6	Zusammenfassung	71
<b>3.3</b>	<b>Struktur-Funktionsbeziehungen der Ppd</b>	<b>71</b>
3.3.1	Identifizierung des Oligomerisierungszustands	71
3.3.2	Ortsgerichtete Mutagenese	72
3.3.2.1	Funktion der Aminosäure Glutamat-48	78
3.3.2.2	Funktion der Aminosäuren Serin-25 und Aspartat-297	78
3.3.2.3	Funktion der Aminosäuren Histidin-110 und Histidin-111	81
3.3.2.4	Funktion der Aminosäuren Aspartat-265, Asparagin-293 und Glycin-294	83
3.3.2.5	Funktion der Aminosäuren Glutamat-224 und Aspartat-263	85
3.3.3	Zusammenfassung	86
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>88</b>
<b>4.1</b>	<b>Enzyme</b>	<b>89</b>
4.1.1	Genexpression und Proteinaufreinigung	89
4.1.2	Enzymatische Aktivität der Histidin-Fusionsproteine	92
<b>4.2</b>	<b>Biochemische Charakterisierung der Ppd</b>	<b>95</b>
<b>4.3</b>	<b>Struktur-Funktionsbeziehungen der Ppd</b>	<b>101</b>
4.3.1	Aktivierung des Cofaktors Thiamindiphosphat	105
4.3.2	Konsensussequenz der ThDP-abhängigen Enzyme	105
4.3.3	Substratbindung und katalytische Aktivität	107
4.3.4	Konservierte Aminosäuren der Phosphonopyruvat- und Sulfopyruvat-Decarboxylasen	111
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>113</b>
<b>6.</b>	<b>Literatur</b>	<b>115</b>