

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

DEPARTMENT CHEMIE

LEHRSTUHL FÜR BIOCHEMIE

# Strukturelle und funktionelle Charakterisierung des Eisen-Schwefel-Proteins IspH in Komplex mit Liganden

Ingrid Span

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof Dr. Lukas Hintermann

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Michael Groll
2. Univ.-Prof. Dr. Klaus Köhler
3. Univ.-Prof. Dr. Aymelt Itzen

Die Dissertation wurde am 03.05.2012 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 11.07.2012 angenommen.







Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Februar 2009 bis März 2012 unter der Leitung von Prof. Dr. Michael Groll am Lehrstuhl für Biochemie der Technischen Universität München angefertigt.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

The iron-sulfur protein IspH: a drug target with unexpected catalytic properties

I. Span\*, K. Wang\*, W. Wang, Y. Zhang, A. Bacher, W. Eisenreich, K. Li, C. Schulz, E. Oldfield, M. Groll, zur Publikation eingereicht.

Are Free Radicals Involved in IspH Catalysis? An EPR and Crystallographic Investigation

W. Wang, K. Wang, I. Span, J. Jauch, A. Bacher, M. Groll, E. Oldfield, zur Publikation eingereicht.

Crystal Structures of Mutant IspH Proteins Reveal a Rotation of the Substrate's Hydroxymethyl Group during Catalysis

I. Span, T. Gräwert, A. Bacher, W. Eisenreich, M. Groll, *Journal of Molecular Biology* **2012**, *416*, 1-9.

Probing the reaction mechanism of IspH protein by x-ray structure analysis

T. Gräwert\*, I. Span\*, W. Eisenreich, F. Rohdich, J. Eppinger, A. Bacher, M. Groll, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107* (3), 1077-1081.

Structure of Active IspH Enzyme from Escherichia coli Provides Mechanistic Insights into Substrate Reduction

T. Gräwert, F. Rohdich, I. Span, A. Bacher, W. Eisenreich, J. Eppinger, M. Groll, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 5756-5759.

\* Autoren haben gleichermaßen beigetragen.



*MEINER FAMILIE*



*Mein besonderer Dank gilt:*

Prof. Dr. Michael Groll für die Aufnahme an seinem Lehrstuhl, die interessante Themenstellung, das uneingeschränkte Vertrauen und das große Interesse, das er meiner Arbeit entgegengebracht hat.

Prof. Dr. Adelbert Bacher für die vielen wertvollen Anregungen und das große Interesse an meiner Arbeit.

Prof. Dr. Eric Oldfield für die zahlreichen chemischen Verbindungen, die in seiner Arbeitsgruppe synthetisiert wurden, und die fruchtbare Kooperation. Weiterhin möchte ich mich bei seinem Mitarbeiter Weixue Wang bedanken für die angenehme Zusammenarbeit und den wissenschaftlichen Austausch.

PD Dr. Wolfgang Eisenreich für die zahlreichen NMR-Messzeiten, die Unterstützung bei der Auswertung und die wertvollen wissenschaftlichen Diskussionen.

Dr. Jörg Eppinger für die Einführung in Bioanorganik und seinen wissenschaftlichen Beitrag.

Dr. Tobias Gräwert für die Einführung in das Projekt.

Prof. Dr. Johann Jauch für die Synthese des (*E*)-4-Fluoro-3-methylbut-2-enediphosphats.

Prof. Dr. Lukas Hintermann für sein Interesse an meiner Arbeit und den wertvollen wissenschaftlichen Gesprächen.

Dr. Sabine Schneider für die sehr hilfreichen Anregungen im Bereich Kristallographie und die erfolgreichen und entspannten SLS-Fahrten.

Meinen Kollegen am Lehrstuhl für Biochemie. Insbesondere möchte ich meinen langjährigen Kollegen Anja, Nerea, Ferdi, und Vroni sowie meinen Laborkollegen Andrea und Felix für die Unterstützung und die schöne Zeit danken. Dem technischen Personal K. Gärtner, C. Grasberger, R. Feicht, B. Keil, A. König, C. Schwarz und F. Wendling sowie unserer Sekretärin U. Kashoa danke ich für Hilfestellungen und die Organisation des Lehrstuhls.

Meinen Studenten Andreas, Christian D., Christian R., Christoph, Ina, Joscha, Kathi, Marco, Simon, Sebastian, Stephanie und Susi, die im Rahmen eines Forschungspraktikums oder einer Bachelorarbeit einen wertvollen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet haben. Weiterhin möchte ich unseren ehemaligen Auszubildenden Nicole und Nadine danken, die sowohl fachlich als auch menschlich eine Bereicherung für unser Labor waren.

Mein herzlichster Dank gilt meinen Eltern und Tobias für ihre uneingeschränkte Unterstützung und Motivation während meiner Promotion.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Biologische Eisen-Schwefel-Cluster .....</b>	<b>1</b>
1.1.1	Historische Entwicklung .....	1
1.1.2	Vielfalt von Fe-S-Cluster .....	2
1.1.3	Biosynthese von Fe-S-Cluster .....	4
1.1.4	Funktionen von Fe-S-Cluster .....	6
<b>1.2</b>	<b>Isoprenoid Biosynthese .....</b>	<b>9</b>
1.2.1	Der Mevalonsäure-Biosyntheseweg .....	10
1.2.2	Der Desoxyxylulose-5-phosphat-Biosyntheseweg.....	11
1.2.3	Reaktivität und Struktur des Proteins IspH .....	12
1.2.4	Isoprenoid-Biosynthese als Target für Antibiotika .....	17
<b>2</b>	<b>Aufgabenstellung .....</b>	<b>19</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>21</b>
<b>3.1</b>	<b>Material .....</b>	<b>21</b>
<b>3.2</b>	<b>Molekularbiologische Methoden.....</b>	<b>31</b>
3.2.1	Polymerase Kettenreaktion.....	31
3.2.2	Restriktionsverdau .....	32
3.2.3	Ligation.....	32
3.2.4	Transformation .....	33
3.2.5	Plasmidisolierung .....	33
3.2.6	Sequenzierung .....	33
<b>3.3</b>	<b>Proteinchemische Methoden.....</b>	<b>34</b>
3.3.1	Stammhaltung.....	34
3.3.2	Expressionstests.....	34
3.3.3	Anzucht von Expressionsklonen .....	34
3.3.4	Zellaufschluss .....	35
3.3.5	Proteinreinigung .....	35

---

3.3.6	Konzentrationsbestimmung .....	36
3.3.7	Rekonstitution des Eisen-Schwefel-Clusters .....	36
3.3.8	Sauerstoff-Sensitivitätsassay .....	37
<b>3.4</b>	<b>Physikalische Methoden .....</b>	<b>38</b>
3.4.1	Agarose-Gelelektrophorese .....	38
3.4.2	SDS-PAGE .....	38
3.4.3	UV/VIS-Spektroskopie .....	38
<b>3.5</b>	<b>NMR-basierte Enzymaktivitätsbestimmung .....</b>	<b>39</b>
3.5.1	Assay mit [1,2,4- <sup>13</sup> C <sub>3</sub> ]-HMBPP .....	39
3.5.2	Assay mit FMBPP .....	40
<b>3.6</b>	<b>Röntgenstrukturanalytische Methoden .....</b>	<b>41</b>
3.6.1	Kristallisation .....	41
3.6.2	Datensammlung und Auswertung .....	41
3.6.3	Modellbau und Verfeinerung .....	42
3.6.4	Einbau von Liganden .....	43
3.6.5	Graphische Darstellung .....	43
<b>4</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>45</b>
4.1	Klonierung und Expression von <i>ispH</i> aus <i>A. aeolicus</i> , <i>E. coli</i> sowie <i>ispH1</i> und <i>ispH2</i> aus <i>M. tuberculosis</i> .....	45
4.2	Reinigung und Charakterisierung der IspH-Proteine .....	47
4.3	Kristallisation und Datensammlung .....	52
4.4	Strukturanalyse von IspH in Komplex mit natürlichen Liganden .....	55
4.5	Strukturelle Charakterisierung der IspH-Mutantenproteine .....	61
4.6	Mechanistische Untersuchungen mit Substratanaloga .....	64
4.7	Strukturbestimmung von <i>E. coli</i> IspH in Komplex mit Inhibitoren .....	70
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>85</b>

<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>89</b>
<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>97</b>
7.1	Alignment der IspH-Proteinsequenzen .....	97
7.2	Datensammlungs- und Verfeinerungsstatistiken.....	98
7.3	<sup>19</sup> F-NMR-Spektren mit ( <i>E</i> )-4-Fluoro-3-methylbut-2-endiphosphat.....	104



**Abkürzungsverzeichnis**

A <sub>410</sub>	Absorption bei 410 nm
Ac	Acetyl
Acac	Acetoacetyl
amp <sup>r</sup>	Ampicillinresistenz
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bidest	bidestilliert
Bis-Tris	Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan
Bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
CIA	<i>cytosolic iron sulfur protein assembly</i>
CDP-ME	4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol
CDP-MEP	4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-2-phosphat
cm <sup>r</sup>	Chloramphenicolresistenz
CoA	CoenzymA
Da	Dalton
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DMAPP	Dimethylallyldiphosphat
DTT	Dithiothreitol
DXP	1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat
Dxs	1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphatsynthase
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESR	Elektronenspinresonanz
ESRF	<i>European Synchrotron Radiation Facility</i>
EXAFS	<i>extended X-ray absorption fine structure</i>
Fdx	Ferredoxin
Fe-Mo-Co	Eisen-Molybdän-Kofaktor
Fe-S	Eisen-Schwefel
G3P	D-Glycerinaldehyd-3-phosphat
(G/V)	Gewichtsprozent
HiPIP	High-potential Eisen-Schwefel-Proteine
HMBPP	( <i>E</i> )-4-Hydroxy-3-methylbut-2-enyldiphosphat

HMG	3-Hydroxy-3-methylglutaryl
ISC	<i>iron sulfur cluster</i>
Idi	Isopentenylidiphosphatisomerase
IPP	Isopentenylidiphosphat
IspC	2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat-Synthase
IspD	4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-Synthase
IspE	4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-Kinase
IspF	2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat-Synthase
IspG	2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat-Reduktase
IspH	( <i>E</i> )-4-Hydroxy-3-methylbut-2-enylidiphosphat-Reduktase
kbar	Kilobar
kBp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertani
MecPP	2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat
MHZ	Megahertz
MV	Methylviologen / Paraquat / 1,1'-Dimethyl-4,4'-bipyridinium
MVA	Mevalonsäure
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NCS	<i>non-crystallographic symmetries</i>
NDT	Natriumdithionit
NIF	<i>nitrogen fixation</i>
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> (Kernspinresonanz)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PDB	Protein Data Bank
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase Kettenreaktion)
PEG	Polyethylenglykol
PLP	Pyridoxalphosphat
R <sub>free</sub>	freier R-Faktor
R <sub>work</sub>	kristallographischer R-Faktor
Rd	Rubredoxin
ppm	<i>parts per million</i> (1:10 <sup>-6</sup> )
Ref	Referenz

RMSD	<i>root-mean-square deviation</i> (mittlere quadratische Standardabweichung)
SAD	<i>single wavelength anomalous dispersion</i>
SAM	S-Adenosylmethionin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SLS	Swiss Light Source
SOC	<i>Super Optimal Broth</i> mit Glucose
SUF	<i>sulfur formation</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TB	<i>Terrific Broth</i>
TE	Tris-EDTA
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin
TLS	Translation, Libration, Schraubenrotation
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tris/HCl	Tris(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
VIS	<i>visible</i> (Sichtbares Licht)
(V/V)	Volumenprozent



# 1 Einleitung

## 1.1 Biologische Eisen-Schwefel-Cluster

### 1.1.1 Historische Entwicklung

Bevor es Sauerstoff auf der Erde gab, waren elementares Eisen und Schwefel im Überfluss vorhanden. Dadurch wurden Eisen-Schwefel-Cluster in der damaligen Zeit als Kofaktoren in Proteinen eingebaut. Es entstand eine strukturelle Vielseitigkeit und chemische Reaktivität von zentraler Bedeutung, was dazu führte, dass sich Fe-S-Cluster nicht nur in der anaeroben Welt durchsetzten, sondern bis heute eine herausragende Rolle unter den anorganischen Kofaktoren einnehmen. Proteine die einen Fe-S-Kofaktor enthalten (Fe-S-Proteine) sind in allen Organismen enthalten und übernehmen wichtige Funktionen in essentiellen zellulären Prozessen, wie Atmung, Zentralstoffwechsel, Genregulation, RNS-Modifikation, DNS-Reparatur und -Replikation.

Bis in den 60er Jahren wurden Fe-S-Proteine nicht als eigenständige Proteinklasse anerkannt und zu den eisenhaltigen Nicht-Häm-Proteinen gezählt. In einer Studie der mitochondrialen Membranen mit neuen Elektronenspinresonanz (ESR)-spektroskopischen Methoden entdeckten der Biochemiker H. Beinert und der Physiker R. Sands ein Signal mit einem g-Wert von 1.94.<sup>[1]</sup> Dieser Wert gilt bis heute als charakteristisches Signal für Fe-S-Cluster. Nachfolgend wurden immer neue Eisen-Schwefel-Proteine in vielen unterschiedlichen Spezies nachgewiesen. Im Jahre 1962 berichteten Mortenson *et al.* von einem Fe-S-Protein aus *Clostridium pasteurianum*, welches für die Stickstofffixierung essentiell war.<sup>[2]</sup> Nach dem lateinischen Begriff für Eisen *ferrum* und aufgrund der Redoxreaktivität, wurde es Ferredoxin (Fdx) getauft. Im Jahre 1965 entdeckten Lovenberg und Sobel beim Versuch Fdx aus *C. pasteurianum* zu isolieren ein rotes Protein mit geringem Molekulargewicht, welches ebenfalls als Elektronenträger in Redoxreaktionen fungieren kann und aufgrund seiner Farbe Rubredoxin (Rd) genannt wurde.<sup>[3]</sup> Nach nur zwei weiteren Jahren waren bereits ein Dutzend Ferredoxine und weitere Eisen-Schwefel-Proteine bekannt.<sup>[4]</sup>

Detaillierte Untersuchungen dieser Proteine mit chemischen und physikalischen Methoden, wie ESR, Mößbauer- und Ramanspektroskopie, *extended X-ray absorption fine structure* (EXAFS), Kernresonanzspektroskopie (*nuclear magnetic resonance*, NMR) und Röntgenkristallographie zeigten, dass Fe-S-Proteine eine eigenständige Proteinklasse darstellen. Des Weiteren konnte eine große Vielfalt molekularer Architekturen von Fe-S-Clustern beobachtet werden. Allen gemein, dass sie mindestens ein Eisenatom pro Molekül enthalten sowie, bis auf wenige Ausnahmen, ein oder mehrere anorganische Schwefelatome,

die nicht Teil einer Aminosäure sind. Die stete Verbesserung spektroskopischer Methoden ermöglicht mittlerweile die Charakterisierung der Fe-S-Kofaktoren in ihrer biologischen Umgebung. Somit werden ständig neue Fe-S-Proteine und neuartige Clustertypen entdeckt.

### 1.1.2 Vielfalt von Fe-S-Cluster

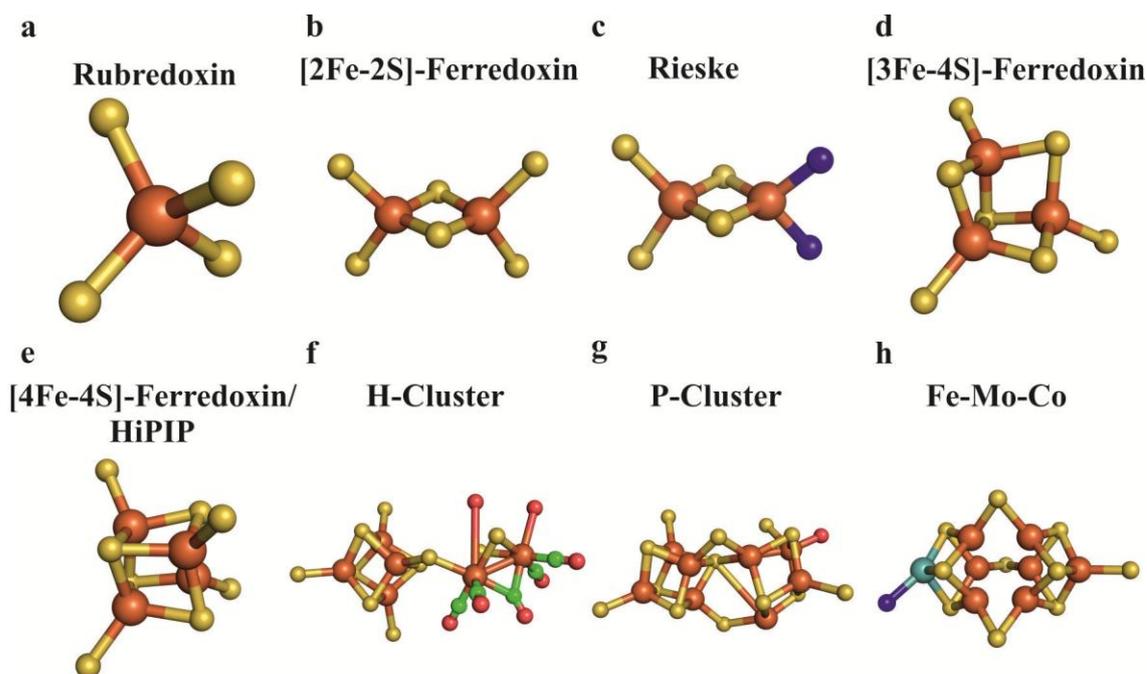
In biologischen Systemen kommen Fe-S-Cluster ubiquitär vor und sind prinzipiell aus rhombischen [2Fe-2S]- sowie kubischen [4Fe-4S]-Einheiten aufgebaut. Da immer mehr komplexe Fe-S-Cluster-Formen identifiziert werden, wird die Klassifizierung der Cluster zunehmend schwieriger. Die Fe-S-Cluster werden in Abhängigkeit von Zusammensetzung, Ladung und koordinierenden Liganden in verschiedene Klassen aufgeteilt. Tabelle 1 liefert einen Überblick über die gängigsten Klassen von Fe-S-Clustern, sowie der Proteine, in denen sie hauptsächlich vorkommen, ihr Reduktionspotential und den charakteristischen Liganden, durch die der Cluster an das Proteinerückgrat gebunden oder freie Koordinationsstellen besetzt werden.

**Tabelle 1** Klassifizierung von Fe-S-Cluster in Proteinen.

Cluster	Protein	Reduktionspotential [mV]	Liganden	Ref.
[Fe] <sup>3+/2+</sup>	Rubredoxine	+20 bis -60	4 Cys	[5]
[2Fe-2S] <sup>2+/1+</sup>	Ferredoxine	-240 bis -460	4 Cys	[6]
[2Fe-2S] <sup>2+/1+</sup>	Rieske-Proteine	300 bis -155	2 Cys, 2 His	[7]
[3Fe-4S] <sup>1+/0</sup>	Ferredoxine	-50 bis -420	3 Cys	[8]
[4Fe-4S] <sup>2+/1+</sup>	Ferredoxine	0 bis -645	4 Cys	[9]
[4Fe-4S] <sup>3+/2+</sup>	HiPIP	50 bis 450	4 Cys	[10]
H-Cluster	Hydrogenase	<sup>1</sup>	4 Cys, CO <sub>x</sub> /(CN) <sub>y</sub>	[11]
P-Cluster [8Fe-7S]	Nitrogenase	<sup>1</sup>	6 Cys, 1 Ser	[12]
Fe-Mo-Kofaktor	Mo-Nitrogenase	<sup>1</sup>	1 Cys, 1 His, Homocitrat	[13]
Fe-V-Kofaktor	V-Nitrogenase	<sup>1</sup>	<sup>2</sup>	[14]

<sup>1</sup> Diese Potentiale wurden nicht genau bestimmt.

<sup>2</sup> Die Liganden sind nicht genau bekannt, aber es wird angenommen, dass sie analog zu dem Fe-Mo-Kofaktor koordiniert werden.



**Abbildung 1** Struktur verschiedener Fe-S-Clustertypen. (a) Rubredoxin (PDB-Code 4RXN)<sup>[15]</sup> (b) [2Fe-2S]-Ferredoxin (PDB-Code 3AV8)<sup>[16]</sup> (c) Rieske (PDB-Code 2NUK)<sup>[17]</sup> (d) [3Fe-4S]-Ferredoxin (PDB-Code 1FDX)<sup>[8]</sup> (e) [4Fe-4S]-Ferredoxin/HiPIP (PDB-Code 1IQZ)<sup>[18]</sup> (f) H-Cluster (PDB-Code 1FEH)<sup>[11]</sup> (g) P-Cluster (PDB-Code 2MIN)<sup>[12]</sup> (h) Fe-Mo-Cluster (PDB-Code 1MIO)<sup>[13]</sup>.

Die Strukturen der entsprechenden Fe-S-Kofaktoren sind in Abbildung 1 dargestellt. Der Rubredoxin-Typ (Abbildung 1a) weist nur ein zentrales Eisen auf, welches von vier Cysteinylliganden koordiniert wird. Obwohl dieser Typ keine anorganischen Schwefelliganden aufweist, wird er zu den Fe-S-Clustern gezählt, da die charakteristische tetraedrische Koordination durch vier Cysteinreste vorliegt. Der [2Fe-2S]-Cluster in Ferredoxinen (Abbildung 1b) ist der einfachste Fe-S-Cluster im klassischen Sinne. Er wird durch vier Cysteine an das Proteinrückgrat gebunden und weist zwei verbrückende, anorganische Schwefel auf. Ersetzt man bei einem der Eisen im [2Fe-2S]-Cluster die Cysteinylliganden durch Histidine erhält man einen Rieske-Cluster (Abbildung 1c), benannt nach seinem Entdecker Prof. Dr. J. S. Rieske.<sup>[19]</sup> In einigen Bakterienstämmen wurden [3Fe-4S]-Ferredoxine (Abbildung 1d) entdeckt, die eine ähnliche Architektur wie die kubischen [4Fe-4S]-Cluster besitzen, wobei ein Eisen fehlt.<sup>[8, 20]</sup> Die Aconitase enthält in ihrer inaktiven Form den ungewöhnlichen [3Fe-4S]-Cluster und kann bei ausreichender Eisenkonzentration durch Einbau eines Eisens den Kofaktor in die aktive Form überführen.<sup>[21]</sup> [4Fe-4S]-Clustern (Abbildung 1e) treten am häufigsten auf und werden in zwei Klassen unterteilt, die jedoch die gleiche Struktur aufweisen. Den [4Fe-4S]-Ferredoxin-Typ<sup>[9]</sup> zeichnet ein niedriges Potential mit einem negativen  $E_m$ -Wert aus, wohingegen der High-potential Eisen-Schwefel-Proteine (HiPIP)-Typ<sup>[10]</sup> über ein hohes Potential mit positivem  $E_m$ -Wert

verfügt. Die Unterschiede in den Redoxpotentialen sind hierbei auf die H-Brückenbildung und elektrostatische Effekte verursacht durch das umgebende Protein sowie dem Lösungsmittel zurückzuführen.<sup>[22]</sup>

Durch Kombination der bisher beschriebenen einfachen Strukturen können komplexere Cluster aufgebaut werden. Der H-Cluster in Fe-Hydrogenasen (Abbildung 1f) basieren auf einem [4Fe-4S]-Cluster, der über ein Schwefel mit einem weiteren [2Fe-2S]-Cluster verbrückt ist. Letzterer wird wiederum von CO und (CN<sup>-</sup>)-Liganden koordiniert.<sup>[11]</sup> Der P-Cluster in Nitrogenasen (Abbildung 1g) verfügt über einen [8Fe-7S]-Cluster, der sich aus zwei [4Fe-4S]-Kuben zusammensetzt, die über eine Schwefelecke miteinander verbunden sind. Dieser Fe-S-Cluster-Typ wird von sechs Cysteinylliganden, die zum Teil zwei Eisen verbrücken, und einem Serinrest koordiniert.<sup>[12]</sup> Um die Komplexität weiter zu erhöhen existieren Mischtypen, die einen P-Cluster und ein weiteres Metall umfassen. Der prominenteste Vertreter hierbei ist die Mo-Nitrogenase (Abbildung 1e), die einen Eisen-Molybdän-Kofaktor (Fe-Mo-Co) im aktiven Zentrum enthält.<sup>[13]</sup> Weiterhin sind Vanadium-Eisen-Nitrogenasen<sup>[14]</sup>, reine Eisen-Nitrogenasen<sup>[23]</sup> sowie Ni-Fe-Nitrogenasen<sup>[24]</sup> mit Hetero-Eisen-Schwefel-Kofaktoren bekannt.

### 1.1.3 Biosynthese von Fe-S-Cluster

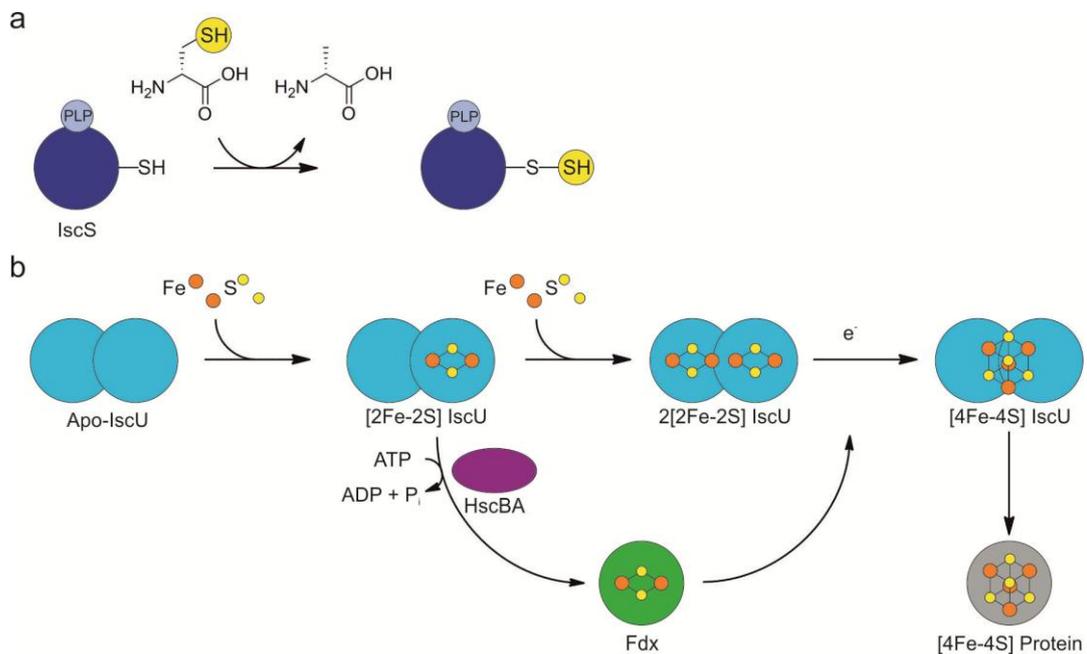
In den letzten 15 Jahren waren die Mechanismen der Biosynthese von Fe-S-Cluster und deren Übertragung auf Apoproteine Gegenstand intensiver Studien.<sup>[25]</sup> Die Biosynthese von Fe-S-Clustern ist ein genau kontrollierter und koordinierter Prozess, da beide beteiligten Elemente in ihrer freien Form in der Zelle toxisch wirken. So katalysieren freie Fe<sup>2+</sup>-Ionen die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies analog zur Fenton-Reaktion.<sup>[26]</sup>

Die Biosynthese der einfachsten Fe-S-Cluster-Typen *in vivo* erfolgt über den *iron sulfur cluster* (ISC) und *sulfur formation* (SUF) Weg.<sup>[25]</sup> In manchen Organismen kommen beide Wege vor, wohingegen andere nur einen der beiden Systeme nutzen. Die Komponenten des SUF-Operons werden bei oxidativem Stress oder limitierter Eisenzugänglichkeit für die Maturation der Fe-S-Proteine bevorzugt.<sup>[27]</sup>

In diazotrophen Bakterien existiert zudem der *nitrogen fixation* (NIF)-Weg, der speziell für den Aufbau der Fe-Mo-Co in Mo-Nitrogenasen ausgelegt ist.<sup>[28]</sup> In Eukaryonten kommt neben dem mitochondrialen ISC-Biosyntheseweg der erst vor kurzem entdeckte *cytosolic iron-sulfur protein assembly* (CIA)-Weg vor.<sup>[29]</sup>

Alle Biosynthesewege verlaufen über unterschiedliche Enzyme, jedoch erfüllen diese ähnliche Funktionen: Eisen-Lagerung, Schwefelabstraktion von Cystein, Elektronentransfer und Gerüstproteine.<sup>[30]</sup> Aus diesem Grund wird im Rahmen dieser Arbeit nur einer der

Biosynthesewege näher erläutert. Das ISC-System ist zudem auch der am weitesten verbreitete und am detailliertesten untersuchte Weg.



**Abbildung 2** Modell für den ISC-Biosyntheseweg zu Fe-S-Proteinen.<sup>[25]</sup> (a) Schwefelfixierung durch die Pyridoxalphosphat (PLP)-abhängige Cysteinendesulfurase IscS, die Cystein zu Alanin umsetzt. (b) Aufbau von [2Fe-2S]- und [4Fe-4S]-Cluster durch das Gerüstprotein IscU unter Beteiligung von HscB, HscA und Fdx.

Das Modell des ISC-Biosynthesewegs von Fe-S-Proteinen ist in Abbildung 2 dargestellt. Die Schwefelquelle L-Cystein wird zunächst durch ein Pyridoxalphosphat (PLP)-abhängiges Enzym zu L-Alanin umgesetzt. Dabei wird das Schwefelatom in Form eines Disulfids an das Enzym gebunden und kann auf ein weiteres Protein übertragen werden ohne dass es als freies Ion in der Lösung vorliegt. Die Reaktion wird in diesem Syntheseweg durch IscS katalysiert. Im Gegensatz dazu ist die Herkunft des Eisenions immer noch unbekannt und Gegenstand intensiver Forschung. Fest steht, dass das Eisen, analog zum Schwefel, in gebundener Form unter strenger Regulierung auf das Gerüstprotein IscU übertragen wird. Es gibt Hinweise darauf, dass die Proteine CyaY<sup>[31]</sup>, ein Frataxinhomolog, oder IscA<sup>[32]</sup> eine Rolle spielen könnten, jedoch gibt es keine eindeutige Belege und andere Eisenüberträger können nicht ausgeschlossen werden.

Das dimere Protein IscU fungiert als Gerüstprotein und kann nacheinander je einen rhombischen [2Fe-2S]-Cluster in jedes Molekül einbauen.<sup>[33]</sup> Für die Maturation von [2Fe-2S]-Proteinen wird hier in einer ATP-verbrauchenden Reaktion, katalysiert durch das Co-Chaperon HscB und das Chaperon HscA, der Kofaktor auf ein Apoprotein wie beispielsweise Ferredoxin übertragen. Um [4Fe-4S]-Proteine zu generieren werden zunächst

aus den zwei [2Fe-2S]-Einheiten durch reduktive Kupplung ein [4Fe-4S]-Cluster synthetisiert, wobei Fdx als Elektronendonator benötigt wird.<sup>[34]</sup> Dieser Cluster kann dann durch Transportenzyme auf das Apoprotein übertragen werden, um dessen aktive Form auszubilden.

#### 1.1.4 Funktionen von Fe-S-Cluster

Aufgrund der strukturellen Vielfalt von Fe-S-Cluster in Kombination mit verschiedenen Proteinumgebungen zeigen Fe-S-Proteine sehr unterschiedliche biologische Funktionen. Die Fähigkeit Ladungen über alle Atome des Fe-S-Clusters zu delokalisieren führt dazu, dass Fe-S-Proteine vor allem für Elektronentransport geeignet sind. Darüber hinaus besitzen sie weitere außergewöhnliche Charakteristika, die zu einem breiten Spektrum an Reaktivitäten führt. Somit können sie diverse Aufgaben in der Zelle übernehmen, die im Folgenden näher erläutert werden.

##### Elektronentransfer

Da Fe-S-Cluster verschiedene Redoxzustände einnehmen können, sind Proteine die über einen [2Fe-2S]-, [3Fe-4S]-, [4Fe-4S]- oder [8Fe-7S]-Kofaktor verfügen als Elektronenüberträger geeignet. Die große Mehrheit der Fe-S-Proteine überträgt ein Elektron auf den Akzeptor. Nitrogenasen bilden hierbei die Ausnahme, da ihr [8Fe-7S]-Cluster eine Zweielektronentransfer ermöglicht.<sup>[35]</sup> Wie schon erwähnt sind Cysteinreste die klassischen Liganden der Eisenatome im Cluster. In Ausnahmefällen wird eines der Eisenatome durch ein Aspartat, Histidin, Serin oder Proteinerückgratamid koordiniert, wodurch das Redoxpotential speziell auf eine Reaktion abgestimmt werden kann.<sup>[36]</sup> Darauf ist zurückzuführen dass Fe-S-Cluster das redoxaktive Zentrum der Ferredoxine bilden, die eine der größten Klassen von mobilen biologischen Elektronenüberträgern darstellt. [2Fe-2S]-Ferredoxine kommen in den Chloroplasten von Pflanzen als ein Teil der Photosynthese-Elektronentransportkette vor. Weiterhin fungieren sie in verschiedenen tierischen Geweben wie Niere und Nebenniere als Elektronendonator für Cytochrom P-450.<sup>[37]</sup> In violetten Photosynthesebakterien wurde eine außergewöhnliche Klasse von Ferredoxinen mit kubischen [4Fe-4S]-Cluster identifiziert. Die HiPIP zeichnen sich durch ein hohes Redoxpotential aus und sind ein Teil der Elektronentransportkette in photosynthetischen Prozessen, wobei die genaue biologische Funktion nicht bekannt ist.<sup>[38]</sup>

##### Protonengekoppelter Elektronentransfer

Im Gegensatz zu Ferredoxinen, in deren aktivem Zentrum der Fe-S-Kofaktor von vier Cysteinresten ans Proteingerüst gebunden wird, erfolgt die Bindung des [2Fe-2S]-Clusters

beim Rieske-Typ durch zwei Cysteine und zwei Histidine. Aufgrund des Säure-Base-Gleichgewichts an der Imidazol-Seitenkette der Histidine wird ein gekoppelter Protonen- und Elektronentransfer ermöglicht.<sup>[39]</sup> Die bereits erwähnte Nitrogenase mit einem P-Cluster ([8Fe-7S]-Cluster) erfährt bei einer Oxidation strukturelle Veränderungen. Diese Umorganisation der Liganden ermöglicht ebenfalls den gekoppelten Elektronen- und Protonentransfer.<sup>[40]</sup>

### **Substratbindung und -aktivierung**

Fe-S-Cluster sind darüber hinaus auch Teil von der Substratbindungsstelle vieler Redox- und Nichtredoxenzyme. Hierbei kann die Substratbindung auf drei verschiedenen Wegen erfolgen. In Hydratasen und Dehydratasen ist ein Eisen des [4Fe-4S]-Clusters nicht durch einen Cysteinylliganden koordiniert und ermöglicht somit die Substratkoordination.<sup>[41]</sup> Das beste Beispiel hierfür ist die Aconitase, in dessen aktivem Zentrum ein Wassermolekül die tetraedrische Koordinationssphäre des apikalen Eisens vervollständigt. Bei Bindung von Homocitrat erfolgt eine Änderung der Koordinationssphäre von tetraedrisch zu oktaedrisch, um das Substrat über zwei Sauerstoffatome an das Eisen zu binden. Das Eisen ist nun von drei S- und drei O-Liganden umgeben, da das Wassermolekül weiterhin am Eisen bleibt und an der Katalyse beteiligt ist.<sup>[42]</sup> Ein ähnliches Prinzip findet sich bei Bindung von S-Adenosylmethionin (SAM) in der SAM-Proteinklasse.<sup>[43]</sup> Dabei wird das SAM über eine Amino- und eine Carboxylatgruppe an das Eisen gebunden, um die reduktive homolytische Spaltung der C-S-Bindung zu erleichtern.<sup>[44]</sup> Dies liefert das 5'-Desoxyadenosylradikal, welches als Ausgangsmaterial zahlreicher radikalischer Reaktionen dient. So katalysieren SAM-Enzyme eine Vielzahl von Reaktionen in der Biosynthese und dem Abbau von Desoxyribonukleinsäure (DNS)-Vorläufern, Vitaminen, Kofaktoren, Antibiotika und Herbiziden.

Andere Enzyme verknüpfen zusätzliche Metalle oder Kofaktoren über Schwefelbrücken an den Fe-S-Cluster, wodurch weitere Bindungsstellen zur Substrataktivierung entstehen. Der [Ni-4Fe-5S]-Cluster in der CO-Dehydrogenase kann durch das eingebaute Nickel die Reaktion von CO zu CO<sub>2</sub> katalysieren.<sup>[45]</sup> Im aktiven Zentrum des Enzyms befindet sich der ungewöhnliche Cluster mit einem Nickel, welches von vier Schwefelatomen quadratisch planar koordiniert wird. Die Sulfit- und Nitritreduktase verfügt im aktiven Zentrum über ein Sirohäm, welches an den Fe-S-Cluster gebunden ist.<sup>[46]</sup> Sie katalysiert eine konzertierte Sechselektronenreduktion von Sulfit zu Sulfid und Nitrit zu Ammoniak. In der Acetyl-CoenzymA (CoA)-Synthase<sup>[47]</sup> sind ein Kupfer und ein Nickel über Schwefelbrücken an den

Fe-S-Cluster gebunden, der Fe-S-Cluster im aktiven Zentrum der Fe-Hydrogenase<sup>[11]</sup> hingegen ist um zwei Eisen erweitert.

### **Speicherung von Eisen- oder Eisen-Schwefel-Cluster**

Eine Rolle als Fe-Speicher wurden Ferredoxinen mit acht Eisen (zwei [4Fe-4S]-Cluster) und Polyferredoxinen mit bis zu zwölf [4Fe-4S]-Clustern zugeteilt. Ein Hinweis darauf lieferte die Sequenzanalyse von Polyferredoxin-kodierenden Genen in anaeroben Bakterien und Archaeen. Sie zeigte, dass Gene auf dem gleichen Operon Hydrogenasen kodieren, die über mehrere Fe-S-Cluster verfügen. Aufgrund dessen können Polyferredoxine als Eisenspeicher oder Fe-S-Cluster-Überträger für Hydrogenasen in Betracht gezogen werden.<sup>[48]</sup>

### **Strukturstabilisierung**

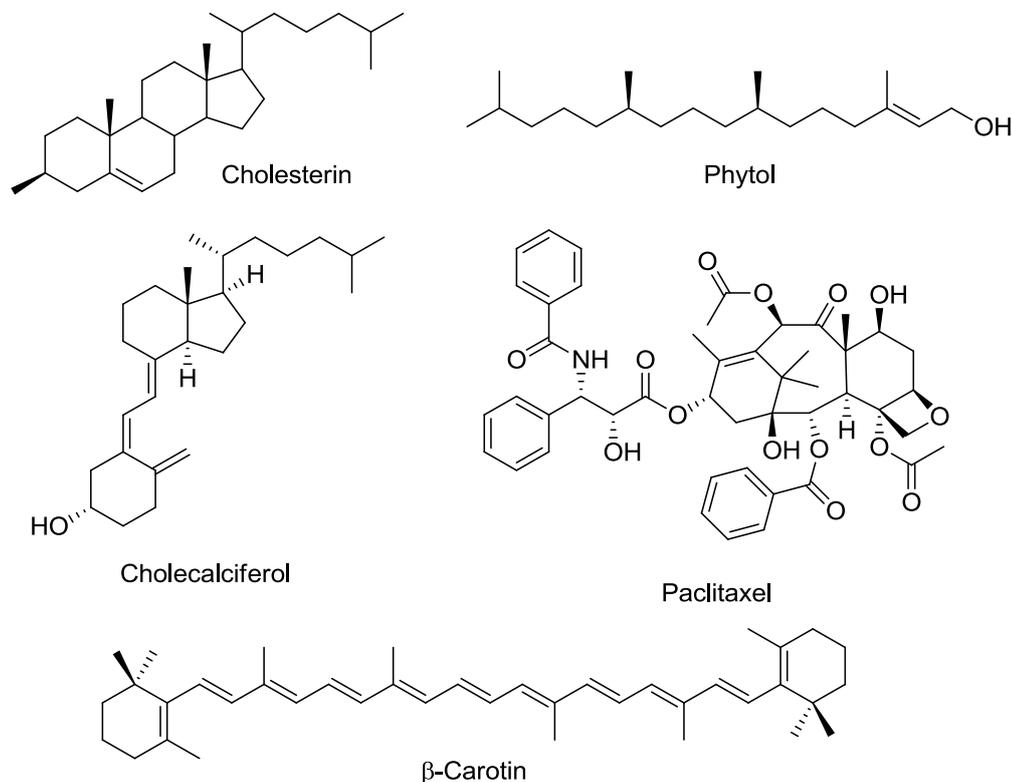
Metallionen sorgen in Proteinen durch Komplexbildung mit geeigneten Seitenketten für die Stabilisierung bestimmter Regionen. Besonders ausgeprägt ist dieses Phänomen in Zinkfingerproteinen.<sup>[49]</sup> Auch in Fe-S-Proteinen finden sich redoxinaktive Cluster, die ausschließlich zur Stabilisierung dienen. In DNS-Reparaturenzymen, wie Endonuklease III<sup>[50]</sup> und MutY<sup>[51]</sup> bringen die vorhandenen Cluster vermutlich eine Loopregion für die DNS-Erkennung und -Reparatur in die gewünschte Konformation. Weitere Beispiele von Fe-S-Clustern, die eine Reorganisation als Reaktion auf Lösungsmittelleffekte<sup>[52]</sup> oder Cysteinsubstitution<sup>[53]</sup> einleiten, bestätigen die Annahme, dass der Kofaktor die Struktur in seiner Umgebung verändern kann.

### **Regulation der Genexpression**

Die Fähigkeit des Fe-S-Cluster in unterschiedlichen Redoxzuständen vorzuliegen und seine Empfindlichkeit gegenüber Oxidation wurden von der Natur für die Entwicklung von Sensor- und Regulationsmechanismen genutzt. Als Reaktion auf umweltbedingte Stimuli können Fe-S-Proteine regulatorisch in die Gentranslation und -transkription eingreifen.<sup>[54]</sup> In diesem Zusammenhang sei das SoxR/SoxS-System erwähnt, bei dem die Aktivität des Fe-S-Proteins vom Oxidationszustand des Kofaktors abhängt.<sup>[55]</sup> SoxR enthält einen [2Fe-2S]-Cluster der unter normalen Bedingungen die Oxidationsstufe +1 einnimmt und inaktiv ist. In Anwesenheit des Radikalanions  $O_2^-$  wird der Cluster auf einen Oxidationszustand von +2 oxidiert, wodurch SoxR aktiviert wird und seine Funktion als Transkriptionsaktivator für *soxS* ausführt. SoxS wiederum löst eine komplexe Reaktion auf diesen oxidativen Stress aus, die zur Synthese von schützenden Proteinen und DNS-Reparaturenzymen führt. Somit können diverse Stressfaktoren detektiert und eine Reaktion des Organismus eingeleitet werden.

## 1.2 Isoprenoid Biosynthese

Die strukturell und stereochemisch wohl vielfältigste Naturstoffklasse stellen die Isoprenoide mit über 55000 bislang bekannten Vertretern dar.<sup>[56]</sup> Sie umfasst unter anderem zahlreiche biologisch und pharmakologisch bedeutsame Verbindungen, von denen einige in Abbildung 3 dargestellt sind.<sup>[57]</sup>

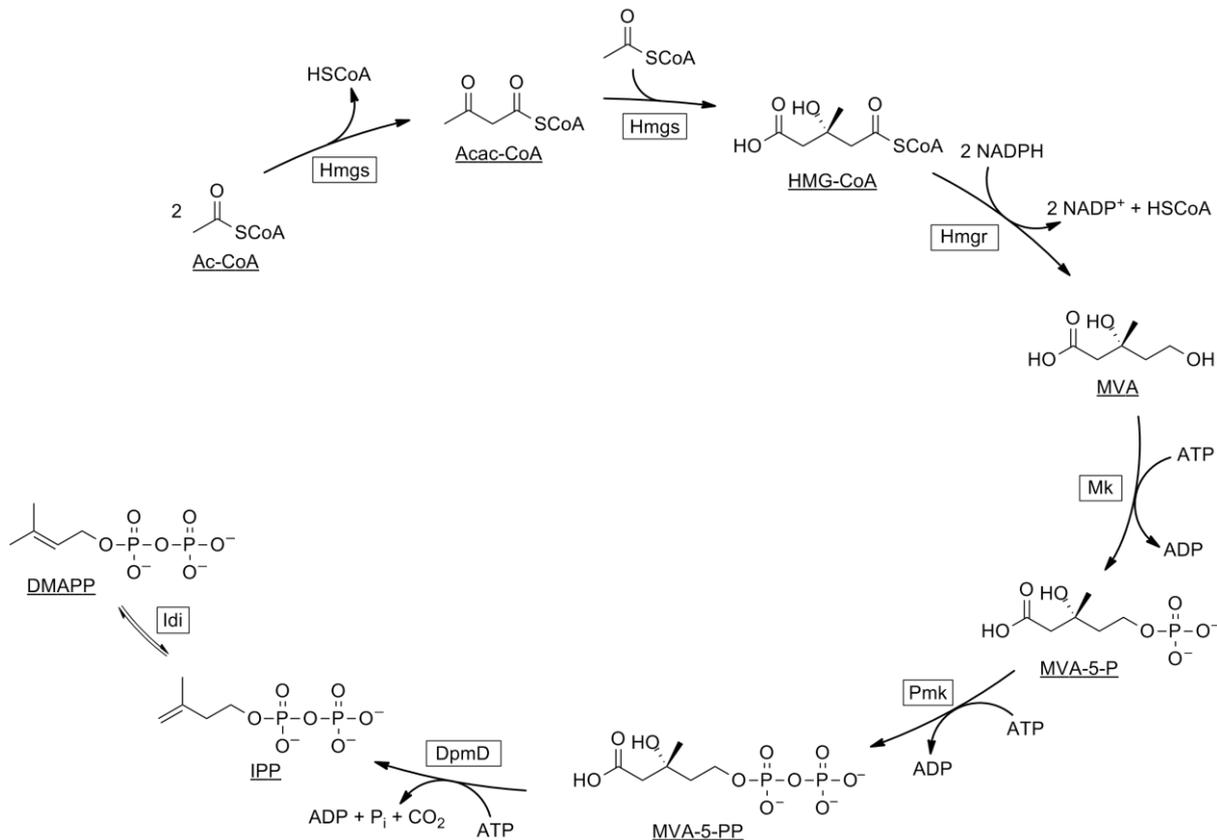


**Abbildung 3** Übersicht über biologisch und pharmakologisch relevante Vertreter der Isoprenoidstoffklasse.<sup>[58]</sup>

Ein prominenter Vertreter ist das Steroidhormon Cholesterin, welches als Bestandteil der Plasmamembran zur Stabilität beiträgt und beim Transport von Signalmolekülen zwischen intra- und extrazellulärem Raum beteiligt ist. Weiterhin stellt Cholesterin einen Vorläufer für andere Steroidhormone und Gallensäuren dar. Bemerkenswert ist auch Phytol, welches mit seiner langen Seitenkette lipophile Wechselwirkungen ausbilden kann. Als Bestandteil von Chlorophyll kann es das Pigment an die Thylakoidmembran verankern. Zu den Isoprenoiden zählen auch Vitamine wie Cholecalciferol (Vitamins D<sub>3</sub>) sowie Naturfarbstoffe wie β-Carotin. Eine herausragende Bedeutung erlangte der Naturstoff Paclitaxel der aus der pazifischen Eibe gewonnen wird und als Chemotherapeutika unter dem Handelsnamen Taxol<sup>®</sup> in der Krebsbehandlung eingesetzt wird.<sup>[58]</sup> In allen Organismen geht die Biosynthese der Isoprenoide von IPP und dem strukturisomeren DMAPP aus. Diese beiden Vorstufen können in zwei unabhängigen Biosynthesewegen erzeugt werden, die in den beiden folgenden Unterkapitel näher erläutert werden.

### 1.2.1 Der Mevalonsäure-Biosyntheseweg

Der Mevalonsäure (MVA)-Weg<sup>[59]</sup> wurde schon in den 1950er Jahren entdeckt und kommt in allen Säugetieren, Archaeen, wenigen Eubakterien, Zytosol und Mitochondrien von Pflanzen, Pilzen, Trypanosoma und Leishmania vor.<sup>[60]</sup> Ein Überblick über den Biosyntheseweg gibt Abbildung 4.

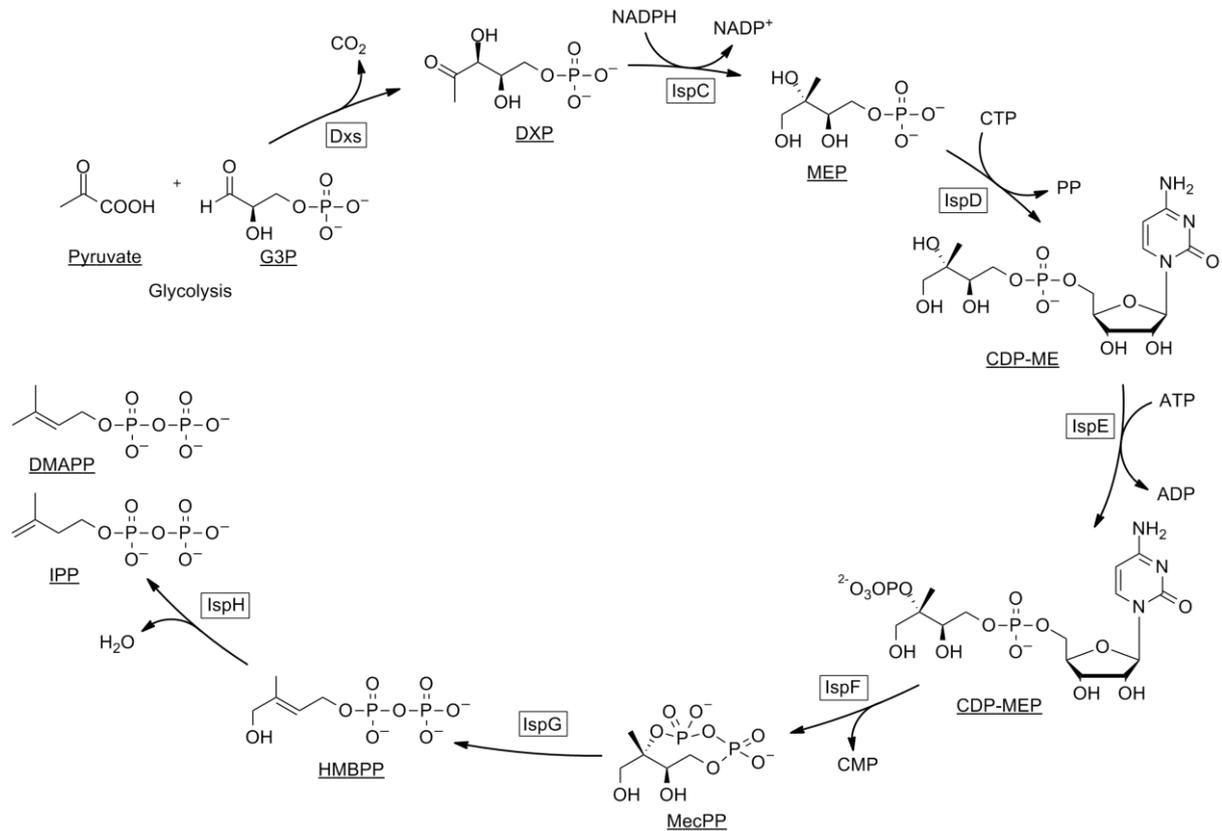


**Abbildung 4** Biosynthese von IPP und DMAPP über den Mevalonsäure-Biosyntheseweg.

Der MVA-Weg beginnt mit der Claisen-artigen Kondensation zweier Acetyl (Ac)-CoA zu Acetoacetyl (Acac)-CoA.<sup>[61]</sup> Die Aldolreaktion mit einem dritten Ac-CoA-Molekül resultiert in 3-Hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA. Anschließend erfolgt die Umsetzung zu (R)-MVA durch die Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH)-abhängige HMG-CoA-Reduktase. Dieses Enzym stellt auch den Angriffspunkt für Statine dar, durch die man regulatorisch in die Cholesterinbiosynthese eingreifen kann und dadurch den Bluthochdruck senken sowie Herz-Kreislaufferkrankungen und Entzündungen behandeln kann.<sup>[62]</sup> MVA wird in zwei ATP-abhängigen Reaktionen zweifach zu MVA-5-diphosphat phosphoryliert. Im folgenden Schritt wird das Diphosphat zu IPP decarboxyliert. Abhängig von den Bedingungen und dem Bedarf in der Zelle wird ein Teil des IPPs durch eine Isomerase in DMAPP umgewandelt.

### 1.2.2 Der Desoxyxylulose-5-phosphat-Biosyntheseweg

Der viele Jahre später entdeckte Desoxy-D-xylulose-5-phosphat (DXP)-Weg<sup>[63]</sup> wird von Algen, Chloroplasten der Pflanzen, Cyanobakterien, Eubakterien und Apikomplexa-Parasiten verwendet. Hierbei erfolgt die Synthese in einer siebenstufigen Reaktionssequenz, die in Abbildung 5 dargestellt ist.



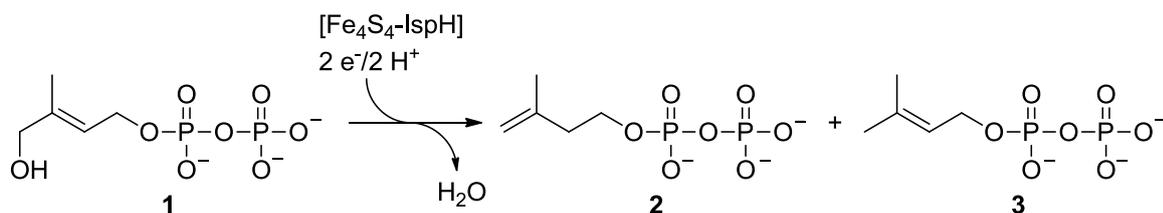
**Abbildung 5** Der alternative Biosyntheseweg zu IPP und DMAPP.

Der DXP-Weg beginnt mit einer Kondensation von Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-phosphat (G3P) katalysiert durch die 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat-Synthase (Dxs). Das gebildete DXP wird durch die 2C-Methyl-D-erythrityl-4-phosphat-Synthase (IspC, Dxr) zu 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat (MEP) umgesetzt. Nachfolgend überträgt die 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritolcytidyl-Transferase (IspD) ein Nucleotid auf die Phosphatgruppe von MEP unter Bildung von 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol (CDP-ME). Anschließend erfolgt ein nukleophiler Angriff des tertiären Alkohols von CDP-ME an ein Adenosintriphosphat (ATP), wodurch 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-2-phosphat (CDP-MEP) entsteht. Die Hydrolyse von ATP wird hierbei von dem Enzym 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-Kinase (IspE) katalysiert. Im nächsten Schritt erfolgt die Zyklisierung des Substrats durch die 2C-methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat-Synthase (IspF). Die Reaktion wird durch einen nukleophilen Angriff des terminalen

Phosphats von CDP-MEP an das  $\beta$ -Phosphat, wodurch ein fünffach koordinierter Übergangszustand entsteht, der durch  $\text{Zn}^{2+}$  stabilisiert wird. Das Intermediat zerfällt unter CMP-Abgabe und produziert 2C-methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat (MecPP). In einer Zweielektronenreduktion erfolgt die Ringöffnung zu (*E*)-4-Hydroxy-3-methylbut-2-enyldiphosphat (HMBPP). Diese Reaktion wird durch das Fe-S-Enzym 2C-methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat-Reduktase (IspG, GcpE) katalysiert und die mechanistischen Details sind aufgrund der komplexen Handhabung des anaeroben Proteins immer noch nicht verstanden. Im letzten Schritt des DXP-Wegs wird HMBPP durch die (*E*)-4-Hydroxy-3-methylbut-2-enyldiphosphat-Reduktase (IspH, LytB) zu IPP und DMAPP umgesetzt. Da die Charakterisierung dieses Proteins Teil dieser Arbeit ist, wird der Stand der Forschung im folgenden Kapitel ausführlich dargestellt.

### 1.2.3 Reaktivität und Struktur des Proteins IspH

Wie bereits erwähnt katalysiert das Protein IspH die Umsetzung von HMBPP zu einem Gemisch aus IPP und DMAPP (Abbildung 6). Die Reduktion des Allylalkohols erfordert zwei Elektronen sowie zwei Protonen, die vom Enzym auf das Substrat übertragen werden.<sup>[64]</sup> Unter Wasserabspaltung werden beide Produkte im Verhältnis 6:1 (IPP:DMAPP) gebildet.<sup>[65]</sup> Das Produktverhältnis unterscheidet sich signifikant vom thermodynamischen Gleichgewicht bei welchem IPP und DMAPP im Verhältnis von 1:3 vorliegen. Durch die Isopentenylidiphosphatisomerase (Idi) kann das Produkt der kinetisch kontrollierten Reaktion in das thermodynamische Gleichgewicht überführt werden, wohingegen IspH keine Isomeraseaktivität aufweist.

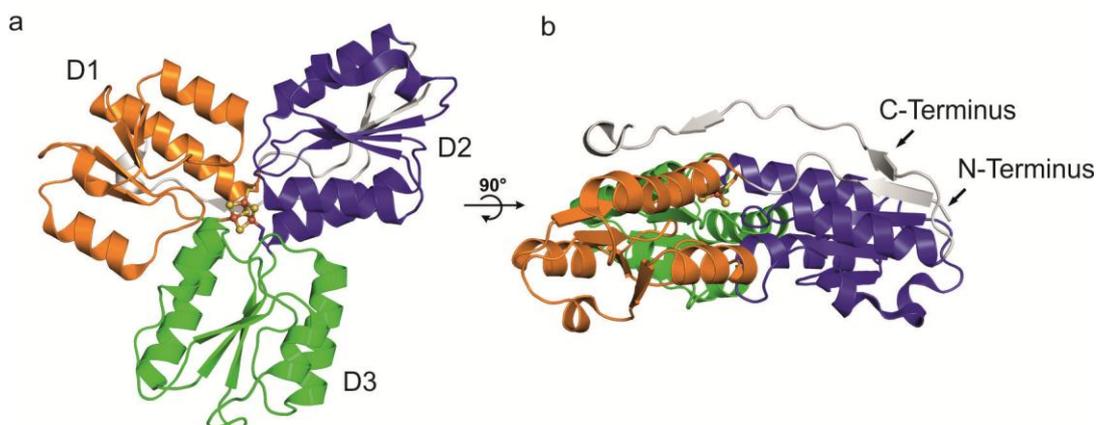


**Abbildung 6** Reduktive Dehydrierung von HMBPP zu IPP und DMAPP katalysiert durch das Enzym IspH.

Zu dem damaligen Zeitpunkt war die Form des aktiven Clusters im Zentrum von IspH Thema kontroverser Diskussionen. In jedem Fall muss die Übertragung von zwei Elektronen auf das Substrat erfolgen. Als Elektronendonator für IspH dienen in Eubakterien Flavodoxinreduktase und Flavodoxin.<sup>[66]</sup> In Algen und Pflanzen steht der Nachweis des Elektronendonors noch aus.

Erste ESR-Daten mit gereinigtem IspH von Rohdich *et al.* deuteten auf einen  $[3\text{Fe-4S}]^+$  Cluster im aktiven Protein hin.<sup>[67]</sup> Andere ESR-Studien mit rekonstituiertem *E. coli* IspH zeigten einen  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Cluster, der sich auch durch *in vivo* Mößbauerspektroskopie nachweisen ließ.<sup>[68]</sup> Anhand der Mößbauerdaten konnte nicht nur der Kofaktor von IspH identifiziert, sondern auch dessen elektronische und geometrische Parameter charakterisiert werden. Der Fe-S-Cluster von IspH enthält ein delokalisiertes Elektron zwischen zwei Eisen ( $\text{Fe}^{2.5+}$ - $\text{Fe}^{2.5+}$ ) und ein Eisenpaar mit lokalisierten Valenzen ( $\text{Fe}^{3+}$ - $\text{Fe}^{2+}$ ). Drei Eisenatome sind über Cysteinylliganden an das Proteinrückgrat gebunden. In ungebundenem Zustand wird das vierte Eisen von einem Wassermolekül koordiniert, so dass zusammen mit den drei Schwefelatomen des Clusters eine tetraedrische Koordinationssphäre erzeugt wird. Die Bindung des Substrats wird durch eine Änderung der Koordinationsgeometrie ermöglicht, die vergleichbar mit der Aconitase zu sein scheint. Aufgrund der Analogie zur Aconitase wurde für den IspH-Substrat-Komplex eine ungewöhnliche hexagonale Koordination des vierten Eisens mit drei S- und drei O/N-Liganden vorhergesagt.<sup>[68b]</sup>

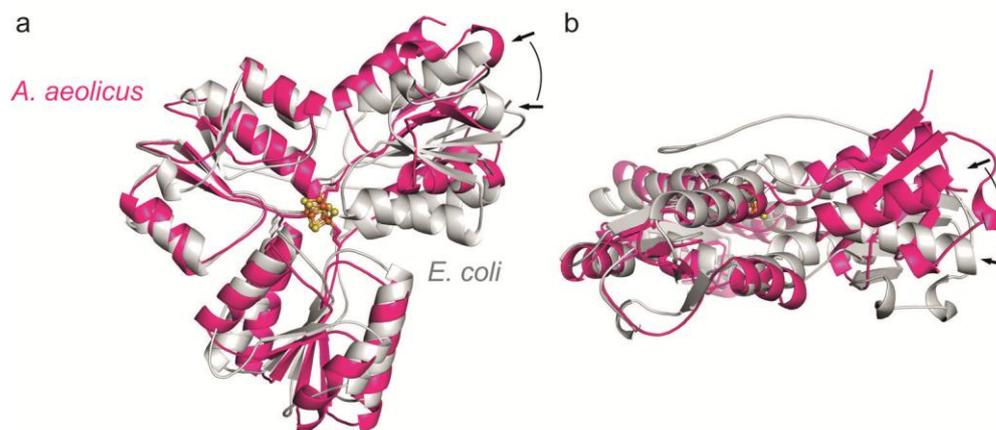
Im Jahre 2008 wurden in unabhängigen Studien die ersten Röntgenkristallstrukturen von IspH aus *Aquifex aeolicus*<sup>[69]</sup> und *Escherichia coli*<sup>[70]</sup> aufgeklärt. In Abbildung 7 ist die Kristallstruktur von *E. coli* IspH dargestellt, welches als Monomer vorliegt und eine kleeblattförmige Struktur aufweist.



**Abbildung 7** Kristallstruktur von *E. coli* IspH. (a) Die Struktur von IspH ist in der Cartoon-Darstellung gezeigt. Die drei unterschiedlich gefärbten Domänen D1-D3 zeichnen sich durch strukturelle Ähnlichkeiten trotz fehlender Sequenzidentität aus. Mittig befindet sich ein  $[3\text{Fe-4S}]$ -Cluster, der als Ball-and-Stick-Modell dargestellt ist. (b) Bei der Seitenansicht von IspH kann man die stabilisierende Wechselwirkung zwischen N- und C-Terminus erkennen. Das zusätzliche  $\beta$ -Faltblatt am C-Terminus ermöglicht die Kristallkontakte zwischen zwei Monomeren. Diese Orientierung verdeutlicht die Abgeschlossenheit des aktiven Zentrums gegenüber des Solvens.

Das außergewöhnliche Faltungsmuster zeichnet sich durch eine markante pseudo- $C_3$ -Symmetrie aus (Abbildung 7a), wobei die drei Domänen D1-D3 nur strukturelle Ähnlichkeit und keine signifikante Sequenzhomologie besitzen. Jede Domäne setzt sich aus einem viersträngigen  $\beta$ -Faltblatt umgeben von drei Helices zusammen. In Abbildung 7b ist die gleiche Struktur aus einer anderen Perspektive dargestellt, wobei die Enden der Aminosäurekette sichtbar werden. Beide Termini sind in der gleichen Region lokalisiert und wechselwirken über ein  $\beta$ -Faltblatt miteinander. Die Deletion von 11 N-terminalen oder 30 C-terminalen Aminosäuren resultiert in unlöslichem Protein und zeigt somit, dass diese Wechselwirkung für die strukturelle Integrität des Proteins verantwortlich ist.<sup>[70]</sup>

Ein Vergleich der IspH-Strukturen aus beiden Organismen zeigt, dass das Protein aus *E. coli* in einer geschlossenen Konformation im Komplex mit einem Diphosphat vorliegt, wohingegen die Struktur aus dem hyperthermophilen Eubakterium *A. aeolicus* eine offene Konformation aufweist. Zum Tragen kommt dieser Unterschied hauptsächlich im Bereich der Domäne D3 sowie an beiden Termini. Die Überlagerung der Kristallstrukturen in Abbildung 8 zeigt eine Verkippung der Domäne D3 um etwa  $30^\circ$ . Das IspH-Protein aus *A. aeolicus* verfügt über verkürzte Termini, die keine Wechselwirkung miteinander eingehen. Aufgrund seiner Herkunft aus dem hyperthermophilen Organismus weist das Protein eine höhere Stabilität auf und ist demzufolge nicht auf die Interaktion der beiden Termini angewiesen.



**Abbildung 8** Vergleich der Kristallstrukturen von IspH aus *A. aeolicus* (Magenta) und *E. coli* (Grau). (a) Die strukturelle Überlagerung beider Strukturen zeigt, dass zwei der Domänen fast identisch sind und die rechts oben gezeigte Domäne um etwa  $30^\circ$  verkippt vorliegt. (b) Die zwei unterschiedlichen Konformationen der D3-Domäne sind in der Seitenansicht noch deutlicher erkennbar. Die Pfeile markieren die sich entsprechenden Helices.

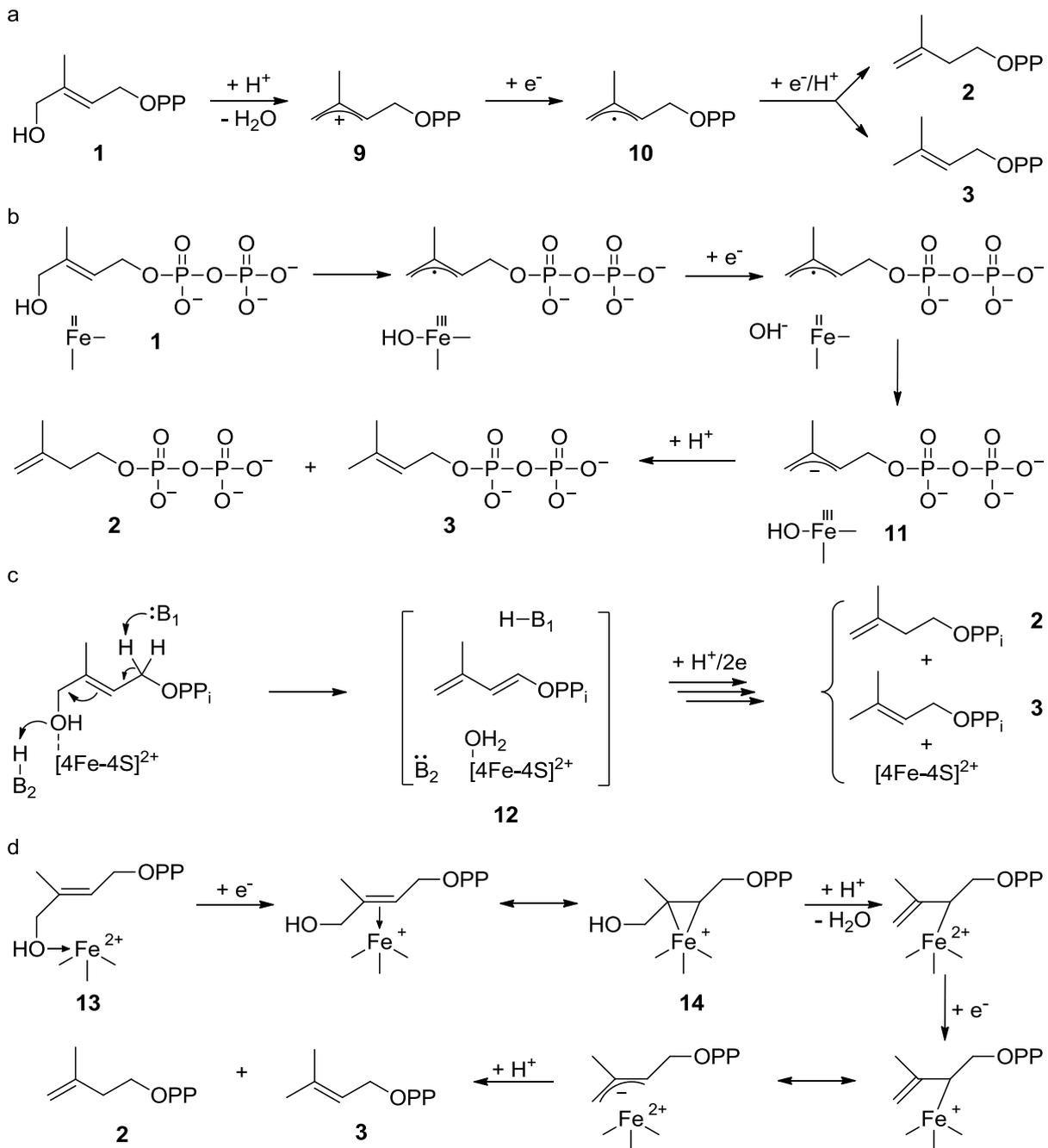
Beide Strukturen weisen im aktiven Zentrum einen [3Fe-4S]-Cluster auf, der durch drei Cysteinreste an das Proteinrückgrat gebunden wird. Diese Cysteine befinden sich jeweils am Anfang einer Domäne. Die Eisenatome des Clusters sind tetraedrisch durch drei verbrückende, anorganische Schwefel und der Cystein-Seitenkette koordiniert. Das vierte Eisen, welches den aktiven Cluster komplettiert, wird nicht durch einen Aminosäurerest stabilisiert und fehlt somit in beiden Kristallstrukturen. Die Deletion eines der eisenbindenden Cysteine führt zum Verlust der Enzymaktivität.<sup>[67]</sup>

Erste Beiträge zur Untersuchung des Reaktionsmechanismus wurden durch die Synthese von Substratanaloga geleistet.<sup>[71]</sup> Tabelle 2 zeigt eine Übersicht über alle natürlichen und synthetischen Substrate, die vom Enzym IspH umgesetzt werden. Die Substrattoleranz von IspH ist vergleichsweise hoch. Eine Voraussetzung scheint jedoch ein stark negativ geladenes Molekülende wie die Diphosphatgruppe zu sein.

**Tabelle 2** Übersicht über alle bislang bekannten Substrate, die von IspH umgesetzt werden.

Substrat	Produkte	$k_{\text{cat}}$ [ $\text{min}^{-1}$ ]	$K_M$ [ $\mu\text{M}$ ]	Ref.
 1	 2	(6:1) 11.6	<15	[71a]
 3	 2			
 4	 3			
 5	 6	0.44	<15	[71a]
 7	 8	0.02	n.b.	[71b]

In der Zelle wird HMBPP (**1**) unter kinetischer Reaktionskontrolle zu IPP (**2**) und DMAPP (**3**) im Verhältnis 6:1 umgesetzt. Die Produkte werden in einem ähnlichen Verhältnis aus der analogen Fluorverbindung **4** erzeugt, wobei die Reaktionsgeschwindigkeit signifikant herabgesetzt ist. Auch die Phosphonate **5** und **7** können zu den entsprechenden Verbindungen **6** und **8** reduziert werden, wobei Fluorsubstituenten am C1-Atom die Reaktionsrate deutlich verringert.



**Abbildung 9** Vorgeschlagene Mechanismen für die IspH-Reaktion, die zu Beginn dieser Arbeit veröffentlicht waren. (a) In dem von Jomaa *et al.* vorgeschlagenen Mechanismus wird zunächst die C-O-Bindung von **1** heterolytisch gespalten, wodurch ein delokalisiertes Carbokation (**9**) entsteht, welches zu einem Radikal (**10**) reduziert wird. Protonierung an C2 oder C4 führt dann zu den Produkten **2** und **3**.<sup>[72]</sup> (b) Der kurze Zeit später von Bacher und Arigoni *et al.* vorgeschlagene Mechanismus verläuft analog zur Birch-Reduktion von Allylalkoholen mit einem delokalisierten Carbanion (**11**) als Intermediat.<sup>[65]</sup> (c) Der hypothetische Reaktionsmechanismus von Liu *et al.* geht ebenfalls von heterolytischer Bindungsspaltung aus, involviert jedoch das gänzliche neue Dienolatintermediat **12**.<sup>[71a]</sup> (d) Basierend auf EPR- und ENDOR-Studien, schlugen Oldfield *et al.* einen Metallazyklus (**14**) als Intermediat vor.<sup>[73]</sup>

Zu Beginn dieser Arbeit war die Struktur von IspH im Komplex mit einem freien Diphosphatanion bekannt. Außerdem waren einige IspH-Mutantenproteine hergestellt und teilweise auf ihre Aktivität überprüft worden. Dennoch waren Vorschläge für den Mechanismus der IspH-Reaktion ebenso spekulativ wie vielfältig. Ein Überblick über bislang vorgeschlagene Reaktionsintermediate und -mechanismen ist in Abbildung 9 dargestellt.

Viele humanpathogene Bakterien sowie Apikomplexa-Protozoen nutzen ausschließlich den DXP-Weg zur Biosynthese der essentiellen Isoprenoidvorstufen **2** und **3**. IspH und die anderen Enzyme des alternativen Biosynthesewegs sind daher potentielle Ziele für die Therapie sowie die Prävention von Erkrankungen wie Tuberkulose und Malaria.

#### **1.2.4 Isoprenoid-Biosynthese als Target für Antibiotika**

Tuberkulose ist eine der weitverbreitetsten Infektionskrankheiten weltweit und betrifft jedes Jahr fast zehn Millionen Menschen.<sup>[74]</sup> Der Krankheitserreger ist das Bakterium *Mycobacterium tuberculosis*, welches eine lebensbedrohliche Atmungserkrankung auslöst. In Kombination mit dem Humanen Immundefizienzvirus (HIV) und sozioökonomische Faktoren stellt es in Afrika ein sehr ernstes Problem dar. Die Entwicklung von Resistenzen gegen gängige Antibiotika destabilisiert die Lage auch in anderen Regionen.

Über ein Drittel der Weltbevölkerung lebt in Malariagebieten.<sup>[75]</sup> Jährlich erkranken über 250 Millionen Menschen daran vor allem in Afrika südlich der Saharawüste und in Asien. Malaria ist eine Infektionskrankheit, die von Apikomplexa-Protozoen der Spezies *Plasmodium* ausgelöst wird, die wiederum durch die Anopheles-Mücke übertragen werden. Die Malariaparasiten befallen die Leberzellen und roten Blutzellen des Wirtes. Sie verursachen strukturelle und biochemische Modifikationen in den Wirtszellen. Mit der Entwicklung von Antibiotika galt diese Krankheit in vielen Teilen der Welt allerdings als ausgerottet.<sup>[76]</sup> Bis Mitte des zwanzigsten Jahrhunderts war Malaria in Teilen Europas und Nordamerikas endemisch und war die am intensivsten erforschte Krankheit der westlichen Medizin. Schon 1820 wurde der Naturstoff Chinin aus der Rinde des Cinchonabaums isoliert und zur gezielten Therapie eingesetzt.<sup>[77]</sup> Den ersten erfolgreichen synthetischen Wirkstoff stellt Chloroquin dar, welcher 1934 hergestellt wurde. Exzessiver Umgang mit diesem Antibiotikum, welches in Teilen Südamerikas, Afrikas und Asiens sogar dem Speisesalz zugesetzt wurde, führte jedoch schnell zur Bildung von Resistenzen. Diese können unter anderem auf genetische Modifikationen des Antibiotikaziels, enzymatische Degradation des Wirkstoffs und aktiven Export der Antibiotika aus der Parasitenzelle zurückgeführt werden.

Da die Isoprenoidbiosynthese eine Vielzahl für die Zelle essentieller Verbindungen erzeugt, stellt sie ein gutes Ziel für die Entwicklung von Antiinfektiva dar. Im Gegensatz zu Säugetieren wird in Bakterien und Protozoen ausschließlich der DXP-Weg zur Synthese der essentiellen Isoprenoidvorstufen **2** und **3** genutzt. Daher sind alle Enzyme dieses Biosynthesewegs ein potentielles Ziel für Antiinfektiva. Ein Beispiel hierfür ist das natürliche Antibiotikum Fosmidomycin, welches aus *Streptomyces lavendulae* isoliert wurde und das IspC-Enzym aus dem DXP-Weg inhibiert. Es wurde bereits in den 1970er Jahren für die Behandlung von Malaria entdeckt, jedoch nach Abschluss einer frühen Phase-II-Studie nicht weiter untersucht.<sup>[78]</sup>

IspH, welches den letzten Schritt der Biosynthese katalysiert und einen außergewöhnlichen Fe-S-Cluster im aktiven Zentrum enthält ist ebenfalls ein intensiv untersuchtes Ziel der Wirkstoffforschung.<sup>[79]</sup> Die Gruppe um Eric Oldfield synthetisierte eine Reihe von Diphosphaten und Bisphosphonaten, die als potentielle IspH-Inhibitoren spektroskopisch untersucht wurden.<sup>[73, 80]</sup> Dabei stellte sich heraus, dass einige Verbindungen eine Inhibition im niedrigen mikromolaren Bereich aufweisen und einen guten Ausgangspunkt für die Entwicklung von Leitstrukturen darstellen.

## 2 Aufgabenstellung

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen die Aufklärung des Reaktionsmechanismus von IspH und die Analyse von potentiellen Inhibitoren in Bezug auf Bindungsmodus und Wirkungsweise.

Da vor Beginn dieser Arbeit zwei Kristallstrukturen von IspH aus den Organismen *A. aeolicus* und *E. coli* bekannt waren, die jedoch nur Wasser oder ein Diphosphat im aktiven Zentrum enthielten, konnte man daraus wenig Hinweise für den Reaktionsmechanismus ableiten. Die Informationen, die man aus diesen Strukturen ziehen konnte sind beispielsweise die Aminosäuren, die am Aufbau des aktiven Zentrums beteiligt sind und die bei der Katalyse der IspH-Reaktion eine Rolle spielen könnten. Weiterhin konnten theoretische Berechnungen einen Bindungsmodus voraussagen, der auf der Reaktionstrajektorie liegen könnte. Die Natur des Fe-S-Clusters war immer noch ungeklärt da die kristallographischen Befunde im Widerspruch zu den ESR- und Mößbauerexperimenten standen. Diese offenen Fragen sollten in dieser Arbeit adressiert werden.

Zunächst wurde die Analyse der Strukturen von *E. coli* IspH in Komplex mit dem Substrat HMBPP und den beiden Produkten IPP und DMAPP angestrebt. Dabei ist sowohl die Art der Substratbindung als auch die Konstitution des aktiven Clusters von großem Interesse für den Reaktionsmechanismus. Hierzu ging man von mehreren Organismen aus um die Chancen der Kristallisation zu erhöhen. Aus *A. aeolicus* und *E. coli* waren bereits Kristallstrukturen bekannt. Ein weiterer interessanter Organismus stellt *Mycobacterium tuberculosis* dar, da es ein humanpathogenes Bakterium ist und zwei unterschiedlich lange IspH-Homologe aufweist. Somit wurde die Klonierung und Expression von *ispH* aus *A. aeolicus* und *E. coli* sowie *ispH1* und *ispH2* aus *M. tuberculosis* angestrebt. Anschließend sollte für jedes Protein Bedingungen gesucht werden, bei denen es in Komplex mit Liganden kristallisiert. Die Strukturanalyse der IspH-Komplexe sollte Aufschluss über die angestrebte Problemstellung bringen und die Planung weiterer Experimente ermöglichen.

Zudem sollten bereits hergestellte IspH-Mutantenproteine biochemisch und strukturell untersucht werden. Bei den Mutantenproteinen wurden Punktmutationen eingeführt, die im Bereich des aktiven Zentrums (E126Q, E126D, T167C, N227Q, N227D, S225C) liegen.

Für weitere Untersuchungen des Reaktionsmechanismus wurde von dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Johann Jauch und der Universität des Saarlandes in Saarbrücken ein fluorsubstituiertes Substratanalogon synthetisiert, bei dem die Hydroxyfunktion durch ein Fluor ersetzt wurde. Diese Verbindung in Komplex mit IspH sollte durch Röntgenstrukturanalyse charakterisiert werden und ein  $^{19}\text{F}$ -basierter NMR-Assay entwickelt werden um die Aktivität spezifisch und hochsensitiv bestimmen zu können.

Der zweite Schwerpunkt ist die strukturelle und mechanistische Charakterisierung potentieller IspH-Inhibitoren in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Eric Oldfield. Die Synthese und spektroskopische Charakterisierung unterschiedlicher Inhibitorklassen sollte in seiner Arbeitsgruppe erfolgen, um anschließend vielversprechende Kandidaten strukturell zu analysieren. Hierbei ging man von einer Reihe von Diphosphaten mit Acetylen-, Allen-, Alkohol-, Aldehyd- und Pyridinfunktionen aus. Durch die spektroskopische und strukturelle Charakterisierung potentieller Inhibitoren erhoffte man sich Einblicke in den Mechanismus der Inhibition. Dies könnte die Grundlage zur Optimierung der Verbindungen oder Entdeckung neuer Substanzklassen darstellen mit dem langfristigen Ziel Leitstrukturen für die Entwicklung von Wirkstoffen gegen Tuberkulose und Malaria zu erhalten.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden wenn nicht anders angegeben von den kommerziellen Anbietern AppliChem (Darmstadt, DE), Biomol (Hamburg, DE), Fluka (Neu-Ulm, DE), Merck (Darmstadt, DE), Sigma-Aldrich (Steinheim, DE), Serva (Heidelberg, DE), Roth (Karlsruhe, DE) und VWR (Darmstadt, DE) bezogen und wie erhalten eingesetzt.

##### Enzyme

Phusion DNS-Polymerase	Finnzymes (Vantaa, Finnland)
Restriktionsendonuklease BamHI	New England Biolabs (Ipswich, USA)
Restriktionsendonuklease PstI	New England Biolabs (Ipswich, USA)
Restriktionsendonuklease SphI	New England Biolabs (Ipswich, USA)
Restriktionsendonuklease HindIII	New England Biolabs (Ipswich, USA)
T4-DNS-Ligase	Invitrogen (Carlsbad, USA)
DNase I	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

##### Medien

Luria Bertani (LB)	10 g	Caseinhydrolysat
	5 g	Hefeextrakt
	5 g	NaCl
<i>Terrific Broth</i> (TB)	12 g	Caseinhydrolysat
	24 g	Hefeextrakt
	12.5 g	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	2.3 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	4 mL	Glycerin
<i>Super Optimal Broth</i> mit	20 g	Caseinhydrolysat
Glucose (SOC)	5 g	Hefeextrakt
	20 mM	Glucose
	10 mM	MgSO <sub>4</sub>
	10 mM	NaCl
	10 mM	MgCl <sub>2</sub>
	2.5 mM	KCl

**Puffer und Lösungen***Molekularbiologie*

NEB 3	100 mM	NaCl
New England Biolabs (Ipswich, USA)	50 mM 1 mM	Tris/HCl, pH 7.9 Dithiothreitol (DTT)
T4-DNS-Ligase-Puffer	250 mM	Tris/HCl, pH 7.6
Invitrogen (Carlsbad, USA)	50 mM 50 mM 5 mM 25 mg/L	MgCl <sub>2</sub> DTT Adenosintriphosphat (ATP) Rinderserumalbumin (BSA) pH 7.5 bei 25 °C

*Proteinkonzentrationsbestimmung*

Bradford-Reagenz	25 mg	Serva Blue G
	11.7 mL	Ethanol
	25 mL	85% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>
	250 mL	H <sub>2</sub> O
		über Nacht rühren, filtrieren und bei 4 °C lagern

*Agarose-Gelelektrophorese*

Tris-Acetat-EDTA (TAE)- Puffer (50x)	2 M 100 mM	Tris/Ac, pH 8.2 Ethylendiamintetraacetat (EDTA)
Agarosegel (1%)	0.5 g 50 mL	Agarose TAE-Puffer (1x)
Ethidiumbromid-Lösung	1 mg/L	Ethidiumbromid
Tris-EDTA (TE)-Puffer (10x)	100 mM 10 mM	Tris/HCl, pH 8.2 Na <sub>2</sub> EDTA
Probenauftragspuffer	50% (V/V) 0.25% (G/V) 0.25% (G/V)	Glycerin Xylencyanol Bromphenolblau in TE-Puffer (1x)

*SDS-Gelelektrophorese*

Acrylamid-Lösung	39% (G/V)	Acrylamid
	1.2% (G/V)	Bisacrylamid
Trenngelpuffer (15%)	1.5 M	Tris/HCl, pH 8.9
	0.4% (G/V)	Natriumdodecylsulfat (SDS)
Sammelgelpuffer (4%)	0.5 M	Tris/HCl, pH 6.9
	0.4% (G/V)	SDS
APS-Lösung	10%	Ammoniumperoxodisulfat
TEMED-Lösung	1%	Tetramethylethylendiamin
Probenauftragspuffer	30% (V/V)	Glycerin
	10% (G/V)	Saccharose
	5% (G/V)	SDS
	3% (V/V)	$\beta$ -Mercaptoethanol
	0.02% (G/V)	Bromphenolblau
	60 mM	Tris/HCl, pH 6.8
Elektrophoresepuffer	25 mM	Tris/HCl, pH 8.3
	192 mM	Glycerin
	0.1% (G/V)	SDS
Coomassie Färbelösung	0.05% (G/V)	Coomassie Brillantblau R250
	25% (V/V)	Isopropanol
	10% (V/V)	Eisessig
Entfärbelösung	10% (V/V)	Eisessig

*Puffer für Proteinreinigung mit Ni-Affinitätschromatographie*

Saline	0.9% (G/V)	NaCl
Puffer A	100 mM	Tris/HCl, pH 8.0
	500 mM	NaCl
	20 mM	Imidazol
Puffer B	100 mM	Tris/HCl, pH 8.0
	500 mM	NaCl
	500 mM	Imidazol
Dialysepuffer	50 mM	Tris/HCl, pH 8.0

*Puffer für Kristallisation*

Puffer 1	100 mM	Bis-Tris/HCl, pH 6.5
	200 mM	Ammoniumsulfat
	20%	PEG3350
Puffer 2	100 mM	Bis-Tris/HCl, pH 6.5
	200 mM	Ammoniumsulfat
	22%	PEG3350
Puffer 3	100 mM	Bis-Tris/HCl, pH 6.5
	200 mM	Ammoniumsulfat
	24%	PEG3350
Puffer 4	100 mM	Bis-Tris/HCl, pH 6.5
	200 mM	Ammoniumsulfat
	26%	PEG3350
Puffer 5	100 mM	Bis-Tris/HCl, pH 6.5
	200 mM	Ammoniumsulfat
	28%	PEG3350
Puffer 6	100 mM	Bis-Tris/HCl, pH 6.5
	200 mM	Ammoniumsulfat
	30%	PEG3350

**DNS- und Proteinmarker****Tabelle 3** DNS-Marker, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Markerbanden [kbp]	Hersteller
10.0; 8.0; 6.0; 5.0; 4.0; 3.5; 3.0; 2.5; 2.0; 1.5; 1.2; 1.0; 0.9; 0.8; 0.7; 0.6; 0.5; 0.4; 0.3; 0.2; 0.1	Carl Roth, Deutschland

**Tabelle 4** Protein-Marker, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Markerbanden [kDa]	Hersteller
200; 119; 66; 43; 29; 20; 14	Carl Roth, Deutschland

## Stämme

**Tabelle 5** In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme mit Genotyp und Referenz.

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac, [F', proAB, lacI<sup>q</sup>ZΔM15, Tn10 (tet<sup>r</sup>)]</i>	Bullock <i>et al.</i> <sup>[81]</sup>

## Primer

**Tabelle 6** Primer, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Primer	Schnittstelle	Sequenz (5' → 3')
lytBvo	BamHI	TGG AGG GGA TCC ATG CAG ATC CTG TTG GCC
lytBhi	PstI	AAA GGA TCC TCA TTA ATC GAC TTC ACG
ispHAquiBamHIvo	BamHI	TTA ATA GGA TCC ATG GTT GAC ATA ATA ATC GCA
ispHAQUIhi	PstI	GGA GTT CTG CAG TCA GGA GGA AAC CAA TTG CCC
ispH1MtSphI	SphI	GGA GCT GCA TGC ATG GTT CCG ACG GTC GAC ATG G
ispH1MtHindIII	HindIII	GCC GAC AAG CTT TCA GCG AGG TGA GCG GAG CTC C
ispH2MtBamHI	BamHI	ACG GAT GGA TCC ATG GCT GAG GTG TTC GTG GG
ispH2MtHindIII	HindIII	GGC TAG AAG CTT TCA TTG CGC GCG AAC CTG TTT GGG

## Plasmide

**Tabelle 7** In dieser Arbeit verwendete Plasmide und Vektoren mit ihren Charakteristika sowie Referenzen beziehungsweise Hersteller.

Plasmid	Charakteristika	Ref./Hersteller
pACYC184iscSfdx	Expression des ISC-Operons, cm <sup>r</sup>	Gräwert <i>et al.</i> <sup>[67]</sup>
pQE30	high copy Expressionsvektor, amp <sup>r</sup>	Qiagen (Hilden, DE)
pQE30ispH	Expression von <i>ispH</i> aus <i>E. coli</i> als N-terminales (His) <sub>6</sub> -Fusionsprotein	In dieser Arbeit hergestellt.
pQE30ispHAa	Expression von <i>ispH</i> aus <i>A. aeolicus</i> als N-terminales (His) <sub>6</sub> -Fusionsprotein	In dieser Arbeit hergestellt.
pQE30ispH1Mt	Expression von <i>ispH1</i> aus <i>M. tuberculosis</i> als N-terminales (His) <sub>6</sub> -Fusionsprotein	In dieser Arbeit hergestellt.
pQE30ispH2Mt	Expression von <i>ispH2</i> aus <i>M. tuberculosis</i> als N-terminales (His) <sub>6</sub> -Fusionsprotein	In dieser Arbeit hergestellt.
pQE30ispHT167C	Proteinmutante mit AS-Austausch	Gräwert <i>et al.</i> <sup>[70]</sup>
pQE30ispHE126Q	Proteinmutante mit AS-Austausch	Gräwert <i>et al.</i> <sup>[70]</sup>
pQE30ispHE126D	Proteinmutante mit AS-Austausch	Gräwert <i>et al.</i> <sup>[70]</sup>
pQE30ispHN227Q	Proteinmutante mit AS-Austausch	Gräwert <i>et al.</i> <sup>[70]</sup>
pQE30ispHN227D	Proteinmutante mit AS-Austausch	Gräwert <i>et al.</i> <sup>[70]</sup>
pQE30ispHS225C	Proteinmutante mit AS-Austausch	Gräwert <i>et al.</i> <sup>[70]</sup>

## Geräte

### *Anaerobe Kammer*

Anaerobe Kammer Modell B                      Coy Laboratory (Grass Lake, USA)

### *Autoklav*

Laboklav 25/195                                      SHP Steriltechnik (Magdeburg, DE)

### *Chromatographie*

ÄKTA prime plus                                      GE Healthcare  
(Chalfont St. Giles, GB)

Chelating Sepharose Fast Flow                      GE Healthcare  
(Chalfont St. Giles, GB)

### *Elektrophorese*

Kammern und Gelträger für                              Appligene (Watford, UK)  
Agarosegele

Glasplatten und Halterungen                              BioRad (Hercules, USA)

Mini PROTEAN<sup>®</sup> Zelle                                      BioRad (Hercules, USA)

PowerPac Basic Stromquelle                              BioRad (Hercules, USA)

G:Box für Gelphotographie                              Syngene (Cambridge, UK)

Digitaler Graphikdrucker UP-D897                              Sony (Minato, JP)

### *Elektroporation*

2 mm-Elektroporationsküvette                              PeqLab (Erlangen, DE)

Gene Pulser mit Pulse Controller                              BioRad (Hercules, USA)

*Kristallographie*

MRC Sitting Drop 96-Well	SWISSCI (Neuheim, CH)
Crystal Clear Sealing Tape	Hampton (Aliso Viejo, USA)
X8 PROTEUM in-house beamline	Bruker (Karlsruhe, DE)
Zoom Stereomikroskop	Olympus (Tokio, JP)
SZX10/KL1500LCD	
Gekühlte Inkubatoren Serie 3000	RUMED <sup>®</sup> Rubarth Apparate (Laatzen, DE)
CryoLoop <sup>™</sup>	Hampton (Aliso Viejo, USA)
CrystalCap HT <sup>™</sup> für CryoLoop <sup>™</sup>	Hampton (Aliso Viejo, USA)
CrystalCap HT <sup>™</sup> Vial	Hampton (Aliso Viejo, USA)
CrystalWand Magnetic <sup>™</sup>	Hampton (Aliso Viejo, USA)
Magnetische Caps, Pins und Vials	Molecular Dimensions (Newmarket, UK)
Zange	Molecular Dimensions (Newmarket, UK)
Mikro-Werkzeugkiste	Molecular Dimensions (Newmarket, UK)
Schaumstoffdewar	Spearlab (San Francisco, USA)
Taylor-Wharton CX100/HC20	tec-lab (Idstein, DE)
Transport Dewar	

*NMR-Spektrometer*

DRX 500	Bruker (Karlsruhe, DE)
AVANCE 500CR	Bruker (Karlsruhe, DE)

*pH-Meter*

inoLab <sup>®</sup> pH 720 pH-Meter	WTW (Weilheim, DE)
SenTix <sup>®</sup> 81 pH-Elektrode	WTW (Weilheim, DE)

*Photometer*

NanoPhotometer™ Pearl	Implen (München, DE)
Ultraspec 2000 UV/Visible Spectrophotometer	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg, DE)
Cary 50 Scan UV-Visible Spectrophotometer	Varian (Palo Alto, USA)

*Thermocycler*

MyCycler™	BioRad (Hercules, USA)
-----------	------------------------

*Waagen*

Präzisionswaage BP 3100 P	Sartorius (Göttingen, DE)
Analytische Waage TE 124S	Sartorius (Göttingen, DE)

*Zellaufschluss*

Branson Digital Sonifier 250	G. Heinemann (Schwäbisch Gmünd, DE)
Constant Cell Disruption System E1061	Constant Systems (Northants, UK)

*Zentrifugen*

MIKRO 120	Hettich Instruments (Beverly, USA)
SIGMA 4K15 (Rotor 11150)	SIGMA Laborzentrifugen (Osterode am Harz, DE)
SIGMA 6-16K (Rotor 12500)	SIGMA Laborzentrifugen (Osterode am Harz, DE)
SIGMA 8K (Rotor 11805)	SIGMA Laborzentrifugen (Osterode am Harz, DE)

**Software**

Adobe Acrobat 9 Pro	Adobe (San Jose, USA)
ARP/wARP	EMBL (Hamburg, DE) <sup>[82]</sup>
CCP4 Software Suite	<a href="http://www.ccp4.ac.uk">www.ccp4.ac.uk</a> <sup>[83]</sup>
ChemDraw	Perkin Elmer (Cambridge, USA)
CorelDRAW X5	Corel (Ottawa, KAN)
COOT	Emsley <sup>[84]</sup>
EndNote X4	Adept Scientific (Frankfurt, DE)
Gimp 2.0	<a href="http://www.gimp.org">www.gimp.org</a>
Microsoft Office 2007, 2010	Microsoft (Redmond, USA)
PHASER	<a href="http://www.ccp4.ac.uk">www.ccp4.ac.uk</a> <sup>[85]</sup>
PROCHECK	<a href="http://www.ccp4.ac.uk">www.ccp4.ac.uk</a> <sup>[86]</sup>
PyMOL Molecular Graphics System	Schrödinger, LLC <sup>[87]</sup>
REFMAC	<a href="http://www.ccp4.ac.uk">www.ccp4.ac.uk</a> <sup>[88]</sup>
SKETCHER	<a href="http://www.ccp4.ac.uk">www.ccp4.ac.uk</a> <sup>[88]</sup>
SYBYL	Tripos (St. Luis, USA)
XDS Program Package	MPI (Heidelberg, DE) <sup>[89]</sup>

## 3.2 Molekularbiologische Methoden

### 3.2.1 Polymerase Kettenreaktion

In dieser Arbeit erfolgte die Vervielfältigung der Gene mittels Polymerase Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) nach der Methode von Mullis *et al.*<sup>[90]</sup> Der Reaktionsansatz für die PCR mit einem Gesamtvolumen von 100  $\mu\text{L}$  wurde wie folgt gewählt:

20 $\mu\text{L}$	Phusion HF-Puffer (5x)
2 $\mu\text{L}$	dNTPs
0.5 $\mu\text{L}$	Primer 1 (100 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$ )
0.5 $\mu\text{L}$	Primer 2 (100 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$ )
1 $\mu\text{L}$	genomische DNS
1 $\mu\text{L}$	Phusion-DNS-Polymerase
75 $\mu\text{L}$	H <sub>2</sub> O bidest. und steril

Die PCR wurde im Thermocycler mit dem folgenden Programm durchgeführt, wobei die Schritte 2 - 5 35-mal ausgeführt wurden:

1	4:00 min	95° C
2	0:30 min	95° C
3	0:30 min	55 °C
4	0:45 min	72 °C
5	7:00 min	72 °C
6	$\infty$	4 °C

Um den Erfolg der PCR zu überprüfen, wurden die PCR-Produkte auf ein Agarosegel (3.4.1) aufgetragen. Anschließend wurden die Fragmente mit Hilfe des *peqGOLD cycle pure kit* (PeqLab, DE) nach dem Herstellerprotokoll gereinigt. Bei mehreren DNS-Banden auf dem Agarosegel wurde die entsprechende Bande ausgeschnitten und mittels *peqGOLD gel extraction kit* (PeqLab, DE) gereinigt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

### 3.2.2 Restriktionsverdau

In dieser Arbeit wurde der Verdau mit den Restriktionsendonukleasen BamHI, PstI, SphI und HindIII (3.1) durchgeführt. Der Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 70  $\mu\text{L}$  setzte sich wie folgt zusammen:

20 $\mu\text{L}$	H <sub>2</sub> O bidest. und steril
7 $\mu\text{L}$	NEB3 Puffer (10x)
7 $\mu\text{L}$	BSA (10x)
3 $\mu\text{L}$	Restriktionsendonuklease BamHI
3 $\mu\text{L}$	Restriktionsendonuklease PstI
30 $\mu\text{L}$	DNS

Der Doppelverdau der DNS wurde 3 h bei 37 °C inkubiert und mit dem *peqGOLD cycle pure kit* (PeqLab, DE) nach dem Herstellerprotokoll gereinigt.

### 3.2.3 Ligation

Zur Ligation wurden Vektor und Insert in einem molaren Verhältnis von 1:1 bis 1:3 eingesetzt. Dabei waren die Längen der DNS-Fragmente ausschlaggebend. Bei ähnlicher Größe wurden Vektor und Insert im Verhältnis 1:1 verwendet. Für die Ligation wurde folgender Ansatz mit einem Volumen von 7.5  $\mu\text{L}$  erstellt:

3.5 $\mu\text{L}$	H <sub>2</sub> O bidest. und steril
3.0 $\mu\text{L}$	DNS
1.0 $\mu\text{L}$	Vektor
2.0 $\mu\text{L}$	T4-Ligationspuffer
0.5 $\mu\text{L}$	T4-Ligase

Nach Zugabe von Wasser, DNS und Vektor wurde der Reaktionsansatz für 10 min bei einer Temperatur von 55 °C inkubiert, dann für 5 min auf 0 °C abgekühlt und anschließend mit Ligationspuffer und T4-Ligase versetzt. Die Ligation wurde 3 h bei Raumtemperatur durchgeführt.

### 3.2.4 Transformation

Die Transformation von Vektoren in elektrokompetente Zellen wurde mittels Elektroporation nach Dower *et al.* durchgeführt.<sup>[91]</sup> Die Transformation wurden mit 40 µL XL1-Zellen und 1 µL Vektor in einer 2 mm-Elektroporationsküvette durchgeführt. Anschließend werden die Zellen in 1 mL SOC-Medium aufgenommen und in ein steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen werden 1 h bei 37° C unter Schütteln inkubiert. Um zwei Plasmide gleichzeitig in eine Zelle zu transformieren wurden 40 µL XL1-Zellen, 1 µL des einen Plasmids und 1 µL des anderen Plasmids unter den gleichen Bedingungen transformiert.

### 3.2.5 Plasmidisolierung

Zur Isolierung von Plasmiden wurde das peqGOLD *plasmid miniprep kit 1* (PeqLab, DE) verwendet. Bakterien mit den gewünschten Plasmiden wurden in 15 mL Medium mit entsprechendem Antibiotikum angezogen und über Nacht inkubiert. Die Zellkultur wurde geerntet und mit dem Pellet nach Herstellerprotokoll weiter verfahren. Die Methode beruht auf der alkalischen Lyse der Bakterienzellen und führte zu 25 µg isolierter Plasmid-DNS in 30 µL Wasser.

### 3.2.6 Sequenzierung

Die Sequenzierung der neuen Konstrukte erfolgte durch die Firma GATC Biotech AG nach der Methode von Sanger *et al.* im Didesoxy-Verfahren.<sup>[92]</sup> Hierzu wurden 15 µL der entsprechenden Plasmid-DNS mit dem gleichen Volumen an sterilem, bidestilliertem Wasser vermischt und in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß verschickt. Die Ergebnisse der Sequenzierung wurden mit den entsprechenden Einträgen in der Datenbank (<http://www.uniprot.org>) verglichen.

### 3.3 Proteinchemische Methoden

#### 3.3.1 Stammhaltung

Stämme von *Escherichia coli* mit den gewünschten Plasmiden wurden als Dauerkultur in flüssigem Stickstoff gelagert. Nach der Transformation (3.2.4) wurden die Zellen auf LB-Agarplatten mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die über Nacht gewachsenen Bakterien sollten im Normalfall ein bzw. zwei Plasmide enthalten, da eine Selektion mittels der im Medium zugesetzten Antibiotika erfolgt. Jeweils eine Zellkolonie wurde anschließend zur Überimpfung von 3 mL Medium mit entsprechenden Antibiotika verwendet und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Aus dieser Kultur wurden 2 mL entnommen, durch fünfminütige Zentrifugation bei 4 000 Umdrehungen pro Minute (U/min) pelletiert und in 1 mL LB-Medium mit 30% Glycerinanteil resuspendiert. In diesem Medium wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren.

#### 3.3.2 Expressionstests

Die Ermittlung des Klons mit dem höchsten Anteil an löslichem Zielprotein und die Optimierung der Zellkultivierungsparameter erfolgten mit Hilfe von Expressionstests. Hierfür wurden 20 mL Medium mit den entsprechenden Antibiotika versetzt. Diese wurde entweder mit einer Dauerkultur oder einer Zellkolonie von der Agarplatte angeimpft und 12 h bei 37 °C inkubiert. Bei ausreichendem Wachstum wurden 50 mL Medium mit der Vorkultur im Verhältnis 1:50 angeimpft und 12 h bei 30 °C kultiviert. Anschließend wurde die Zellsuspension 30 min bei 5000 U/min zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Pellet wurde in 1 mL 50 mM resuspendiert. Hiervon wurden 900 µL mittels Ultraschall bei einer Amplitude von 20% und einer Gesamtpulsdauer von 40 s (20 s Puls, 20 s Pause, 20 s Puls) aufgeschlossen. Nach zehnminütiger Zentrifugation des Zellysats bei 14 000 U/min wurde der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Der Rohextrakt und die verbleibenden 100 µL Zellsuspension wurden mittels Natriumdodecylsulfat (SDS)- Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) analysiert. Durch Vergleich der entsprechenden Proteinbanden in den ganzen Zellen und im Rohextrakt konnte der Anteil der löslich exprimierten Proteine ermittelt werden.

#### 3.3.3 Anzucht von Expressionsklonen

Für die Vorkulturen wurden *E. coli* Zellen aus einer Dauerkultur mit Hilfe einer Impföse in LB-Medium mit 180 mg/L Ampicillindihydrat und 25 mg/L Chloramphenicol angeimpft und über Nacht im Schüttelinkubator bei 37 °C kultiviert. Bei ausreichender Zelldichte erfolgte eine 1:50 (V/V)-Verdünnung der Vorkultur in TB-Medium mit 180 mg/L Ampicillindihydrat

und 25 mg/L Chloramphenicol. Um vollständigen Aufbau des Eisen-Schwefel-Zentrums zu gewährleisten, wurden zusätzlich 32 mg/L Eisenammoniumcitrat und 167 mg/L L-Cystein steril filtriert und der Zellkultur zugesetzt. Die Anzucht der Kultur mit einem Volumen von 6 L erfolgte im Schüttelinkubator über einen Zeitraum von 16 h bei 30 °C. Die Zellen wurden mittels Zentrifugation (5 000 U/min, 30 min, 4 °C) geerntet, in dem fünffachen Volumen an anaerober Saline resuspendiert, erneut zentrifugiert und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### 3.3.4 Zellaufschluss

Das Zellpellet wurde vor dem Aufschluss unter anaeroben Bedingungen im Verhältnis 1:1 (V/V) mit Puffer A für Ni-Affinitätschromatographie resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension mit 5 mM Natriumdithionit (NDT) versetzt, um den molekularen Sauerstoff abzufangen. Für die Hydrolyse der DNS, die die Viskosität des Lysats erheblich erhöht, wurde eine Spatelspitze DNase I zugegeben. Die Zellen wurden anschließend mittels French Press bei 1.9 kbar aufgeschlossen. Über die Öffnungen der French Press wurde ein Argonstrom geleitet, um den Kontakt des Proteins mit Sauerstoff zu minimieren. Das Lysat wurde schließlich durch Zentrifugation (9600 U/min, 45 min, 4 °C) in Rohextrakt und feste Zellbestandteile getrennt.

### 3.3.5 Proteinreinigung

Auf dem verwendeten pQE30-Plasmid befindet sich eine für sechs Histidine kodierende Region zwischen Startcodon und *multiple cloning site*. Diese wird als His<sub>6</sub>-Tag bezeichnet und verfügt über eine höhere Affinität zu Ni<sup>2+</sup>-Ionen als andere Proteine. Bei der Expression der Konstrukte entstanden Proteine mit einem N-terminalen His<sub>6</sub>-Tag, die mittels Ni-Affinitätschromatographie von anderen Zellproteinen getrennt werden konnten. Die Elution des gewünschten Proteins erfolgte über einen Puffer mit hoher Imidazol-Konzentration, da Imidazol eine höhere Affinität zur Nickelmatrix hat als der His-Tag. Zum Auftragen des Rohextrakts aus *E. coli* wurde Puffer A verwendet, der 20 mM Imidazol enthielt um die unspezifische Anlagerung von Proteinen ohne His<sub>6</sub>-Tag zu verringern. Das Protein His<sub>6</sub>-IspH wurde mit Hilfe einer ÄKTA prime plus Anlage unter Verwendung von Ni<sup>2+</sup>-Chelating-Sepharose-Fast-Flow-Material gereinigt und angereichert. Die Chromatographiesäule wurde vor Beginn der Reinigung mit dem zehnfachen Säulenvolumen an Puffer A äquilibriert um Sauerstoff zu entfernen. Der Rohextrakt wurde nach der Zellernte (3.3.4) auf die Säule aufgetragen und mit Puffer A so lange gespült bis der UV-Detektor keine Proteinelution mehr anzeigt. Die Elution des Zielproteins erfolgte mit einem Gemisch aus

Puffer A (70%) und Puffer B (30%) mit einer Imidazol-Konzentration von 160 mM. Während der Elution wurden 5 mL Fraktionen gesammelt und anschließend mit SDS-PAGE (3.4.2) analysiert. Die reinen und hochkonzentrierten Fraktionen wurden vereinigt und über Nacht gegen 50 mM Tris/HCl (pH 8.0) dialysiert.

### 3.3.6 Konzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde nach der Methode von Bradford *et al.* bestimmt.<sup>[93]</sup> Nach geeigneter Verdünnung mit H<sub>2</sub>O werden die Proteinproben einer Dreifachbestimmung unterzogen. Hierbei wurden 50 µL der Probe mit 950 µL Bradford-Reagenz in einer 1 cm-Küvette vermischt und die Extinktion bei 595 nm gemessen. Als Referenz wurden 50 µL bidest. H<sub>2</sub>O mit 950 µL Bradford-Reagenz eingesetzt. Die Umrechnung der gemessenen Extinktion in die Konzentration wurde anhand einer Kalibriergeraden durchgeführt, die mit Hilfe von BSA zuvor erstellt wurde.

Darüber hinaus wurde eine photometrische Konzentrationsbestimmung mittels NanoPhotometer durchgeführt. Der molare Extinktionskoeffizient wurde zuvor gravimetrisch bestimmt, indem ein bestimmtes Volumen der Proteinlösung bekannter Konzentration gefriergetrocknet wurde. Nach Berücksichtigung der Puffersubstanz erhält man auf diese Weise die Masse des Proteins. Durch Lösen des Proteins in einem definierten Volumen an Wasser konnte eine Eichlösung für das NanoPhotometer erstellt und nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz ( $E_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d$ ) der molaren Extinktionskoeffizient experimentell ermittelt werden. Die Konzentrationsbestimmung der Proteine erfolgte bei einer Wellenlänge von 280 nm.

### 3.3.7 Rekonstitution des Eisen-Schwefel-Clusters

In der Zelle sind Biosynthesewege, wie beispielsweise das ISC-System, für den korrekten Einbau des Eisen-Schwefel-Clusters in Apoproteine verantwortlich. Die für die Anzucht von IspH (3.3.3) verwendeten Expressionsklone enthalten jeweils zwei Plasmide. Neben dem Zielprotein-kodierenden Plasmid ein Zusätzliches, welches das ISC-Operon kodiert. Bei Überexpression des rekombinanten Proteins kann so die Ausbeute an aktivem Protein maximiert werden. Um den Anteil von Fe-S-Protein bzw. Eisen-Schwefel-Clusterenthaltendes Protein weiter zu erhöhen, wurde vereinzelt eine Rekonstitution mit einer Eisen- und Schwefelquelle unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt.

Hierzu wurde folgender Ansatz für vier Stunden gerührt:

350 $\mu$ M	IspH
5 mM	Dithiothreitol
1.75 $\mu$ M	Natriumsulfid
1.75 $\mu$ M	Eisen(III)-chlorid

Die Reagenzien können anschließend durch Zentrifugation und Dialyse vom Protein getrennt werden. Der Erfolg der Rekonstitution kann mit UV/VIS-Spektroskopie (3.4.3) ermittelt werden.

### **3.3.8 Sauerstoff-Sensitivitätsassay**

In vorhergehenden Experimenten wurde eine O<sub>2</sub>-Sensitivität bei IspH beobachtet, die bei Zugabe unterschiedlicher Liganden variierte. Um diese genauer zu untersuchen, wurde ein O<sub>2</sub>-Sensitivitätsassay entwickelt. Mit diesem Assay wurden das Substrat HMBPP, die beiden Produkte IPP und DMAPP im Vergleich zu dem reinen Protein analysiert. Der Assay wurde in 50 mM Tris/HCl-Puffer bei einem pH-Wert von 8.0 durchgeführt und das Gesamtvolumen der Proben belief sich auf 500  $\mu$ L. Die Proteinkonzentration wurde bei 7 mg/mL gewählt und der entsprechende Ligand im 140-fachen Überschuss eingesetzt. Nach der Herstellung der Proben wurden diese sorgfältig homogenisiert und das Referenzspektrum mittels UV/VIS-Spektroskopie im Bereich 300-500 nm aufgenommen. Anschließend wurde die Probe mit Luftsauerstoff gesättigt und alle 30 min ein UV/VIS-Spektrum gemessen. Als zweites Indiz wurde die Proteinlösung nach 24 h Inkubationszeit fotografiert um die unterschiedlichen optischen Eigenschaften festzuhalten.

## 3.4 Physikalische Methoden

### 3.4.1 Agarose-Gelelektrophorese

Zur präparativen und analytischen Trennung von DNS-Fragmenten wurde Agarose-Gelelektrophorese mit einer Matrix aus 1%igem Agarose-Gel in TAE-Puffer bei pH 8.2 verwendet. 0.5 g Agarose wurden in 50 mL TAE-Puffer gegeben, auf 100 °C erhitzt um die Agarose vollständig zu lösen, anschließend auf 60 °C abgekühlt und in eine dafür vorgesehene Form gegossen. Nach der vollständigen Polymerisation wurde das Gel in eine Elektrophoresekammer mit TAE-Puffer gegeben und eine Spannung von 120 V angelegt. Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Kontrolle der PCR-Ergebnisse und der Plasmidisolierung durchgeführt. Die Proben mit einem Gesamtvolumen von 10 µL wurden aus 2 µL Auftragspuffer (10x), 5 µL DNS und 4 µL bidest. H<sub>2</sub>O zusammengesetzt. Die Färbung des Gels erfolgte mit dem Phenanthridin-Farbstoff Ethidiumbromid, der die DNS-Banden unter UV-Licht sichtbar macht.

### 3.4.2 SDS-PAGE

Zur Identifizierung und Charakterisierung der Proteinproben wurde SDS-PAGE nach der Methode von Laemmli *et al.* durchgeführt.<sup>[94]</sup> Insbesondere wurde sie zur Auswertung der Expressionstests und Überwachung der Proteinreinigung verwendet. Hierzu wurden die Proben zur Denaturierung mit dem gleichen Volumen Probenauftragspuffer versetzt und anschließend 10 min bei 100 °C erhitzt. Der Probenauftragspuffer enthält sowohl SDS, welches sich an die Proteinoberfläche anlagert und somit die Eigenladung der Proteine überdeckt, als auch β-Mercaptoethanol, welches vorhandene Disulfidbrücken zu freien Thiolen reduziert. Ein Probenvolumen von 10 µL wurde aufgetragen. Anschließend wurde die Elektrophorese mit einer Stromstärke von 25 mA durchgeführt. Zur Färbung wurde das Gel zunächst mit Coomassie-Brillantblau und nachfolgend mit Entfärbelösung behandelt. Die Bestimmung der Größe erfolgte unter Verwendung eines Proteinstandards.

### 3.4.3 UV/VIS-Spektroskopie

Mit Hilfe von UV/VIS-Spektroskopie wurde die Konzentration der Proteine (3.3.6) ermittelt. Des Weiteren wurde das Verhältnis von Holoenzym zu Apoenzym abgeschätzt um beispielsweise die Rekonstitution des Eisen-Schwefel-Clusters (3.3.7) in IspH zu verfolgen. Unter anaeroben Bedingungen wurde 1 mL einer geeigneten Verdünnung des Proteins in eine 1 cm-Quarzküvette gefüllt, mit einem Teflonstopfen verschlossen und mit dem Cary 50 Scan UV/VIS-Spektrometer die Extinktion bei einer Wellenlänge von 280 und 410 nm bestimmt.

Bei 280 nm absorbieren die aromatischen Seitenketten der Aminosäuren des Proteins, während bei 410 nm eine charakteristische Absorption durch den Eisen-Schwefel-Kofaktor erfolgt. Der Quotient aus den beiden Extinktionswerten ( $E_{410}/E_{280}$ ) kann proportional zu dem Anteil an Protein mit integriertem Eisen-Schwefel-Cluster angenommen werden.

### 3.5 NMR-basierte Enzymaktivitätsbestimmung

NMR-Messungen wurden an einem Bruker DRX 500-Spektrometer [ $^{13}\text{C}$  (125 MHz)] oder einem Bruker AVANCE 500-Spektrometer [ $^{19}\text{F}$  (470 MHz)] durchgeführt. Die chemischen Verschiebungen werden als  $\delta$ -Werte in ppm angegeben. Standardmäßig wurden die NMR-Spektren in 500  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  mit 50  $\mu\text{L}$   $\text{D}_2\text{O}$  gemessen. Die Auswertung der Daten erfolgte mit MestReNova 5.2.2.

#### 3.5.1 Assay mit [1,2,4- $^{13}\text{C}_3$ ]-HMBPP

Um die Aktivität des IspH-Proteins oder Proteinmutanten zu untersuchen, wurden Enzymaktivitätsassays mit [1,2,4- $^{13}\text{C}_3$ ]-markiertem Substrat durchgeführt und mittels NMR-Spektroskopie ausgewertet. Für die Bestimmung relativer Aktivitäten verschiedener Proteinchargen oder -mutanten wurde die Proteinkonzentration so gewählt, dass sowohl Produkt als auch Edukt beobachtet werden konnten. Als Reduktionsmittel wurden NDT und Methylviologen (MV) verwendet. MV wird von NDT reduziert und fungiert dann als Einelektronenüberträger. Da NDT lichtempfindlich ist, wurde die Lösung kurz vor Reaktionsbeginn frisch zubereitet und bis zur Verwendung mit Alufolie vor Lichteinstrahlung geschützt. Die Reaktion wurde nach 10 min durch Zugabe von 20  $\mu\text{L}$  3 M Trichloressigsäure abgebrochen. Hierbei ist anzumerken, dass DMAPP unter den sauren Bedingungen nicht stabil war und zersetzt wurde. Somit konnte nur IPP als Hauptprodukt der IspH-Reaktion bei der Auswertung berücksichtigt werden. Anschließend wurden 50  $\mu\text{L}$   $\text{D}_2\text{O}$  zugegeben und die Probe in ein NMR-Röhrchen gefüllt.

Der folgende Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 0.5 mL wurde verwendet:

5 mM	[1,2,4- $^{13}\text{C}_3$ ]-HMBPP
10 mM	NDT
1 mM	MV
200 nM	Protein
50 mM	Tris pH 8.0

### 3.5.2 Assay mit FMBPP

Für mechanistische Studien wurde ein Enzymaktivitätsassay mit einem fluorsubstituierten Substratanalogon etabliert. Hierzu wurde ein ähnlicher Ansatz wie beim  $^{13}\text{C}$ -basierte Assay verwendet. Der Reaktionsansatz setze sich wie folgt zusammen:

5 mM	( <i>E</i> )-4-Fluoro-3-methylbut-2-endiphosphat (FMBPP)
10 mM	NDT
1 mM	MV
200 nM	Protein
50 mM	Tris pH 8.0

Für die Auswertung wurden folgende Referenzspektren gemessen. Das Gesamtvolumen der Probe betrug 500  $\mu\text{L}$ , wobei den Proben ohne  $\text{D}_2\text{O}$  vor der NMR-Messung 10%  $\text{D}_2\text{O}$  zugesetzt wurden.

5 mM	FMBPP
500 $\mu\text{L}$	$\text{D}_2\text{O}$
5 mM	100 mM FMBPP-Lösung
50 mM	50 mM Tris/HCl-Puffer, pH 8
5 mM	100 mM FMBPP-Lösung
50 mM	50 mM Tris/HCl-Puffer, pH 8
200 nM	Protein
1.1 mg	Natriumfluorid
50 mM	Tris/HCl-Puffer, pH 8

## 3.6 Röntgenstrukturanalytische Methoden

### 3.6.1 Kristallisation

Aufgrund der Sauerstoffempfindlichkeit von IspH wurden die Kristallisationsansätze manuell in der Glovebox bei 20° C mit der *sitting drop* Dampfdiffusionsmethode durchgeführt.<sup>[95]</sup> Die 96 Reservoirs auf einer Platte wurden unter anaeroben Bedingungen mit je 40 µL Präzipitanslösung gefüllt, wobei ein Gradient von 20-25% PEG3350 erzeugt wurde. In die Kristallisationsschälchen wird 1 µL Proteinlösung mit einer Konzentration von 18.3 mg/mL gegeben und mit 1 µL Reservoirlösung verdünnt. Um Kristalle von einem Protein:Ligand-Komplex zu erhalten, wurde der Ligand in zwei- bzw. zehnfachen molaren Überschuss zu dem Protein gegeben. Anschließend wurde die Platte sorgfältig mit durchsichtiger Klebefolie verschlossen und in jeder Kammer ein abgeschlossenes System generiert. Die Kristallisationsplatten wurden bei 20 °C unter Schutzgasatmosphäre (N<sub>2</sub>/H<sub>2</sub> oder Argon) in einem Exsikkator gelagert. Innerhalb von ein bis drei Wochen wurden braune Kristalle erhalten.

Die Kristalle wurden mit einem Loop aufgenommen und aufgrund ihrer Sauerstoffempfindlichkeit schnell in flüssigem Stickstoff amorph auf 100 K gekühlt. Um die Kristalle hierbei vor Gefrierschäden zu schützen wurde eine 50%ige PEG400 Lösung als Kryoprotektivum eingesetzt.

### 3.6.2 Datensammlung und Auswertung

Datensätze von IspH in Komplex mit Liganden wurden sowohl an dem Generator des Lehrstuhls als auch an der *Swiss Light Source* (SLS) sowie *European Synchrotron Radiation Facility* (ESRF) aufgenommen. Tabelle 6 gibt einen Überblick über den experimentellen Aufbau der verschiedenen Messstationen an denen die Datensammlung durchgeführt wurde. Alle Messungen erfolgten unter einem Flüssigstickstoffstrom bei einer Temperatur von 100 K.

**Tabelle 8** Übersicht über die Institute und den experimentellen Aufbau an denen die Datensätze aufgenommen wurden.

Institut	Röntgenstrahlen- -quelle	Art der Strahlen- -quelle	Detektor
Lehrstuhl für Biochemie, TUM	X8 PROTEUM Generator	Cu-K $\alpha$ - Drehanode	PLATINUM CCD
SLS	Beamline PXI	Synchrotron	Pilatus 6M
SLS	Beamline PXIII	Synchrotron	MAR CCD
ESRF	Beamline ID29	Synchrotron	Pilatus 6M

Die am eigenen Generator gemessenen Datensätze wurden bei einer Cu-K $\alpha$ -Wellenlänge von 1.5418 Å gemessen. Für einen Datensatz wurde dabei eine 360 °-Messung mit Winkelinkrementen von 1 ° und einer Belichtungsdauer von 30 s durchgeführt.

Die Messstationen am Synchrotron sind mit einem Flächendetektor ausgestattet, wodurch andere Parameter für die Messung verwendet werden können. Native Datensätze am Synchrotron wurden bei einer Wellenlänge von 1.0 Å gemessen. Die Datensammlung erfolgte mit Winkelinkrementen von 0.25 ° - 0.5 ° und Belichtungszeiten von 0.25 s - 0.5 s. Der insgesamt gemessene Winkel für einen kompletten Datensatz variierte je nach Raumgruppe. Für die Mehrheit der Kristalle, die in der Raumgruppe P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub> kristallisierte, wurden Datensätze mit einem Gesamtwinkel von mindestens 120 ° aufgenommen.

Zur Lokalisierung der Eisenatome des Eisen-Schwefel-Clusters wurden *single wavelength anomalous dispersion* (SAD)-Experimente durchgeführt. Hierzu wurde zunächst ein Röntgen-Fluoreszenz-Energie-Scan durchgeführt und anschließend ein Datensatz bei der Resonanzkante von Eisen, die bei einer Wellenlänge von 1.7368 Å liegt gemessen.

Die Indizierung und Integration der Diffraktionsbilder erfolgte mit dem Programm XDS, die Datenskalierung mit dem Programm XSCALE und die Konvertierung für weitere Anwendungen mit XDSCONV.<sup>[89]</sup> Die Kriterien für die Einschränkung der höchsten Auflösungsschale waren hierbei ein I/ $\sigma$ (I)-Wert von über 2.0, ein R<sub>merge</sub>-Wert unter 50% und die Vollständigkeit bei über 90%.

### 3.6.3 Modellbau und Verfeinerung

Das Phasenproblem wurde mit Hilfe der Molekularer-Ersatz-Methode gelöst, wobei hierfür zunächst die Koordinaten der *E. coli* IspH Proteinstruktur im Phosphatpuffer (*Protein Data Bank* (PDB)-Code 3F7T)<sup>[70]</sup> und für die IspH-Inhibitor-Komplexstrukturen die *E. coli* IspH Proteinstruktur mit gebundenem HMBPP (PDB-Code 3KE8)<sup>[96]</sup> als Ausgangsmodell benutzt

wurden. Alle Phasierungen erfolgten mit dem Programm Phaser<sup>[85]</sup> mittels der *maximum likelihood* Methode und die Verfeinerungen der Atomkoordinaten wurden mit Refmac<sup>[88]</sup> durchgeführt. Um ein chemisch korrektes Modell zu erhalten wurden bereits bekannte Parameter (Bindungslängen, -winkel, Geometrien, Planarität, Chiralität) in die Verfeinerung einbezogen. Weiterhin wurden die *non-crystallographic symmetries* (NCS) der zwei Moleküle in der asymmetrischen Einheit berücksichtigt. Bei der Verfeinerung der Daten besteht immer die Gefahr dass man durch Überverfeinerung systematische Fehler in dem Modell einbezieht. Um dem entgegenzuwirken wurde ein freier R-Faktor ( $R_{\text{free}}$ ) eingeführt. Hierfür wurden 5% der Reflexe willkürlich ausgewählt und als Testsatz von der Verfeinerung ausgeschlossen.<sup>[97]</sup> Die Betrachtung von  $R_{\text{free}}$  im Vergleich zu dem kristallographische R-Faktor ( $R_{\text{work}}$ ) gibt einen Hinweis für die Überanpassung der Daten. Wenn nach einem Verfeinerungsschritt beide Werte,  $R_{\text{free}}$  und  $R_{\text{work}}$ , sinken wurde das Modell weiter verbessert. Steigt jedoch  $R_{\text{free}}$  im Gegensatz zu  $R_{\text{work}}$  hat man einen Bias in sein Modell eingeführt, indem beispielsweise zu viele Wassermoleküle in das Hintergrundrauschen der Elektronendichte eingepasst wurden.<sup>[98]</sup> Der Einbau der Wassermoleküle in das Atommodell erfolgte mit dem Programm ARP/wAPR<sup>[82]</sup> und die anschließende Validierung mit Coot.<sup>[84]</sup> Die Berechnung von Ramachandran-Plots erfolgte mit dem Programm Procheck.<sup>[86]</sup>

### 3.6.4 Einbau von Liganden

Die Koordinaten der Liganden für die IspH-Komplexstrukturen wurden mit Sybyl und die entsprechende Bibliothek mit den geometrischen Topologien und Parameter mit Sketcher<sup>[99]</sup> erstellt. Der Einbau und die Optimierung der Ligandenkoordinaten in das atomare Modell wurden mit dem Programm Coot durchgeführt.<sup>[84]</sup>

### 3.6.5 Graphische Darstellung

Die graphische Darstellung von Molekülmodellen erfolgte mit dem Programm PyMOL.<sup>[87]</sup> Wenn Elektronendichten gezeigt sind wurde eine  $2F_o - F_c$ -Karte gezeigt. Die beschrifteten Abbildungen der Kristallstrukturen wurden mit CorelDRAW erstellt.



## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Klonierung und Expression von *ispH* aus *A. aeolicus*, *E. coli* sowie *ispH1* und *ispH2* aus *M. tuberculosis*

Bei der Planung dieses Projektes waren Konstrukte aus mehreren Organismen vorgesehen. Ausgehend davon sollen das Protein mit der höchsten Kristallisationstendenz weiterverfolgt werden. Für IspH aus den Organismen *A. aeolicus* und *E. coli* waren bereits Kristallstrukturen bekannt. Aufgrund dessen wurden sie als besonders erfolgsversprechend angesehen und in die engere Auswahl aufgenommen. Aus pharmakologischen Gesichtspunkten wurde zudem noch ein humanpathogener Organismus in Betracht gezogen. Vorangegangene Arbeiten beschäftigten sich vergeblich mit der rekombinanten Expression von IspH aus *P. falciparum*. Daher entschied man sich gegen das Protein aus dem Malariaerreger. Interessanterweise, findet man in *M. tuberculosis* zwei unterschiedliche *ispH*-Gene mit 51% Sequenzidentität. Ein Vergleich der unterschiedlichen Gensequenzen in *A. aeolicus*, *E. coli* und *M. tuberculosis* befindet sich im Anhang (Abbildung 40). Das Alignment zeigt, dass alle Proteine vier oder fünf Cysteine aufweisen, von denen drei zur Bindung des Fe-S-Clusters benötigt werden. Die Cysteine sind in allen Organismen konserviert und befinden sich jeweils am Anfang einer der drei Domänen. Auch die umgebenden Regionen sind weitestgehend konserviert und beeinflussen das Redoxpotential, welches für die katalytischen Eigenschaften des Fe-S-Clusters essentiell ist. Im N-terminalen Bereich unterscheiden sich die *M. tuberculosis*-Proteine von den beiden anderen durch etwa 20 zusätzliche Aminosäuren. Der C-Terminus des Proteins aus *A. aeolicus* hingegen ist im Vergleich zu *E. coli* und *M. tuberculosis* signifikant verkürzt, wodurch eine Interaktion zwischen N- und C-Terminus verhindert wird (1.2.3). Da *A. aeolicus* ein thermophiler Organismus ist, verfügen seine Proteine vermutlich über eine höhere Stabilität, die durch stärkere Wasserstoffbrückenbildung hervorgerufen wird. Eine zusätzliche Interaktion der Termini ist daher bei diesem Protein vermutlich nicht notwendig.

Die *ispH*-Gene aus *A. aeolicus* und *E. coli* sowie *ispH1* und *ispH2* aus *M. tuberculosis* wurden von genomischer DNS kloniert (3.2). Anschließend wurde die heterologe Expression in *E. coli* XL1-Blue optimiert.

Bei rekombinanter Überexpression von Fe-S-Proteinen besteht die Gefahr, dass die zelleigene Fe-S-Cluster-Biosynthese deutlich weniger Kofaktor hervorbringt als benötigt wird. Dadurch entsteht hauptsächlich inaktives Protein ohne Fe-S-Cluster. Der Anteil an aktivem Protein kann durch unterschiedliche Methoden gesteigert werden. Eine weit verbreitete

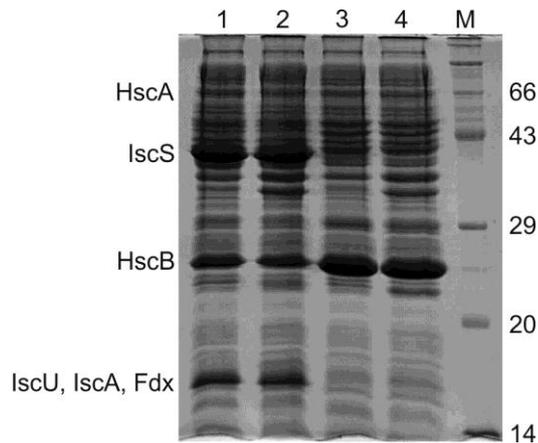
Vorgehensweise ist die nachträgliche Rekonstitution des Fe-S-Kofaktors. Nach Reinigung des Apoproteins wird der Fe-S-Cluster durch Zugabe einer Eisen- sowie Schwefelquelle und DTT als Reduktionsmittel aufgebaut. Unter diesen Bedingungen wird das Eisen durch die Cysteine an das Proteingerüst gebunden und über die  $S^{2-}$ -Ionen verbrückt. Eine weitaus elegantere Lösung für dieses Problem stellt die parallele Überexpression eines Fe-S-Biosynthesystems dar. Führt man ein zusätzliches Plasmid in die Zelle ein, werden sowohl das Zielprotein als auch die ISC-Proteine zum Aufbau des Fe-S-Clusters überexprimiert. Dadurch erhält man weitaus mehr intaktes Protein als nach der üblichen Vorgehensweise. In der Arbeitsgruppe war das ISC-Operon, welches die Proteine IscS, IscU, IscA, HscB, HscA und Fdx codiert, bereits vorhanden. Das ISC-System wurde in einen pACYC184-Vektor mit Chloramphenicolresistenz kloniert. Alle Expressionsklone von *ispH* enthielten zusätzlich das pACYC184iscSfdx-Plasmid für den Aufbau des Fe-S-Clusters *in vivo*. Anfangs wurde mit einem Operon gearbeitet, welches drei Mutationen in den Proteinen IscS und IscU enthielt, die in einem weit fortgeschrittenen Stadium der Arbeit entdeckt und entfernt wurden. Da jedoch die *ispH*-Expression und Aktivität des Proteins nicht negativ durch die Mutationen beeinflusst wurden, veränderte man das Expressionssystem nicht.

Tabelle 9 zeigt die Proteine, die auf dem ISC-Operon kodiert sind. In Abbildung 10 sind Expressionstests des fehlerhaften und korrigierten ISC-Konstrukts dargestellt.

**Tabelle 9** Proteine, die vom ISC-Operon synthetisiert werden und zum Aufbau des intakten Fe-S-Clusters in IspH beitragen.

Protein	Molekulargewicht [kDa]	Isoelektrischer Punkt
IscS	46	6.04
IscU	14	4.82
IscA	12	4.75
HscB	20	5.05
HscA	65	5.05
Fdx	12	4.50

Die Analyse mittels SDS-PAGE zeigte, dass die auf dem Operon codierten Proteine unterschiedlich durch die Korrektur der Mutationen beeinflusst wurden. Nach Entfernung der Punktmutationen sind die Banden der Proteine IscS, IscU, IscA und Fdx kleiner, die Bande des HscB-Proteins hingegen größer als zuvor.



**Abbildung 10** SDS-PAGE der Expressionstests des ISC-Operons. Spur 1 zeigt den Rohextrakt und Spur 2 die ganzen Zellen des fehlerhaften Operons. Im Vergleich dazu sieht man auf Spur 3 den Rohextrakt und Spur 4 die ganzen Zellen des korrigierten Operons.

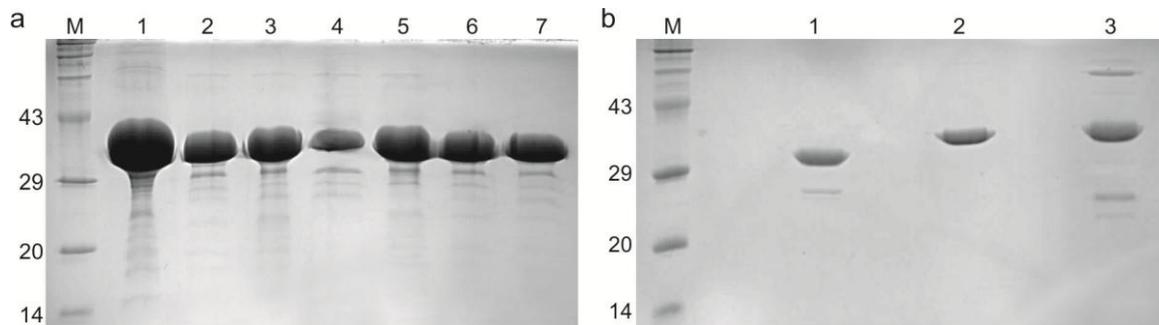
## 4.2 Reinigung und Charakterisierung der IspH-Proteine

Durch die Wahl des Plasmids erhält man bei der Expression einen His<sub>6</sub>-Tag am N-Terminus von IspH. Die Proteinreinigung konnte folglich mittels Ni-Affinitätschromatographie (3.3.5) durchgeführt werden. Zudem wurden folgende *E. coli* IspH-Mutantenproteine charakterisiert: E126Q, E126D, N227Q, N227D, T167C und S225C. Durch die Strukturanalyse dieser Proteine erwartete man sich Einblicke in die Beiträge der einzelnen Aminosäuren zur Substratbindung und Katalyse. Zu Beginn dieser Arbeit lagen die punktmutierten Proteine bereits im pQE30-Vektor vor. 6 L-Zellkultur lieferten etwa 55 g Zellmasse, aus denen 30 bis 870 mg des jeweiligen Proteins gewonnen werden konnte. Tabelle 10 fasst die Ergebnisse der Proteinreinigungen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, zusammen.

**Tabelle 10** Ausbeuten und Konzentrationen der IspH-Lösungen nach der Proteinreinigung.

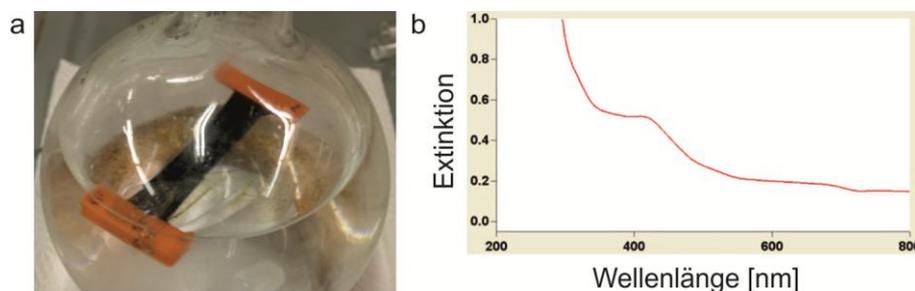
Protein	Ausbeute [mg]	Konzentration [mg/mL]
IspH <i>A. aeolicus</i>	561	40.1
IspH <i>E. coli</i>	512	53.8
IspH1 <i>M. tuberculosis</i>	244	30.8
IspH2 <i>M. tuberculosis</i>	273	19.5
IspHE126Q <i>E. coli</i>	309	22.1
IspHE126D <i>E. coli</i>	480	29.0
IspHN227Q <i>E. coli</i>	32	7.1
IspHN227D <i>E. coli</i>	320	35.5
IspHT167C <i>E. coli</i>	866	54.1
IspHS225C <i>E. coli</i>	260	25.9

Die Qualität der Proben wurde mittels SDS-PAGE analysiert (Abbildung 11). Aufgrund dessen konnte die Reinheit der Proteinlösungen auf 95-99% abgeschätzt werden.



**Abbildung 11** Analyse der gereinigten Proteinproben mit SDS-PAGE. (a) Spur 1: *E. coli* IspH Wildtyp; Spur 2: IspH E126Q; Spur 3: IspH E126D; Spur 4: IspH N227Q; Spur 5: IspH N227D; Spur 6: IspH T167C; Spur 7: IspH S225C. (b) Spur 1: *A. aeolicus* IspH; Spur 2: IspH1 aus *M. tuberculosis*; IspH2 aus *M. tuberculosis*

Die für Fe-S-Cluster charakteristische Absorption bei 410 nm bewirkt eine intensive braune Färbung der Proteine. Diese wurde bei allen IspH-Lösungen beobachtet (Abbildung 12a). Das UV/VIS-Spektrum im Bereich von 200-800 nm zeigte ebenfalls das charakteristische Extinktionsmaximum (Abbildung 12b).

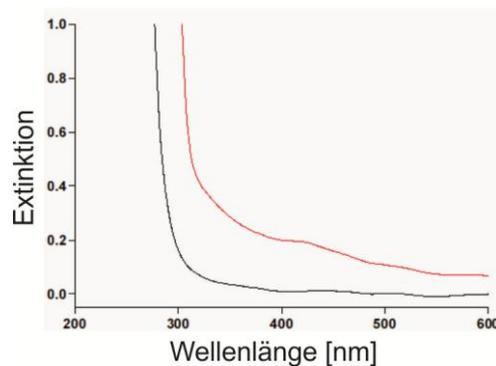


**Abbildung 12** Charakterisierung des Fe-S-Clusters von IspH. (a) Die intensiv gefärbte Proteinlösung nach der Reinigung in der Dialyse. (b) UV/VIS-Spektrum von *E. coli* IspH-Protein zeigt eine für Fe-S-Cluster typische Absorption bei 410 nm.

Des Weiteren wurden Methoden zum Aufbau des zentralen Fe-S-Kofaktors *in vitro* untersucht. Zunächst wurde aktives *E. coli* IspH-Protein mit Hilfe von Harnstoff denaturiert und der Fe-S-Cluster durch EDTA zersetzt. Unter Zugabe von  $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{S}$  sowie DTT wurde das Protein unter anaeroben Bedingungen rekonstituiert (3.3.7). Sowohl die braune Färbung der Proteinlösung als auch das Extinktionsmaximum bei 410 nm im UV/VIS-Spektrum (Abbildung 13) bestätigten den erfolgreichen Aufbau des [4Fe-4S]-Clusters.

Die Rekonstitution wurde ebenso für IspH nach anaerober Reinigung ohne vorherige Denaturierung angewendet und photometrisch verfolgt. Dies sollte zeigen, ob man einen signifikanten Gewinn an Enzymaktivität durch nachträgliche Rekonstitution erreicht. Das

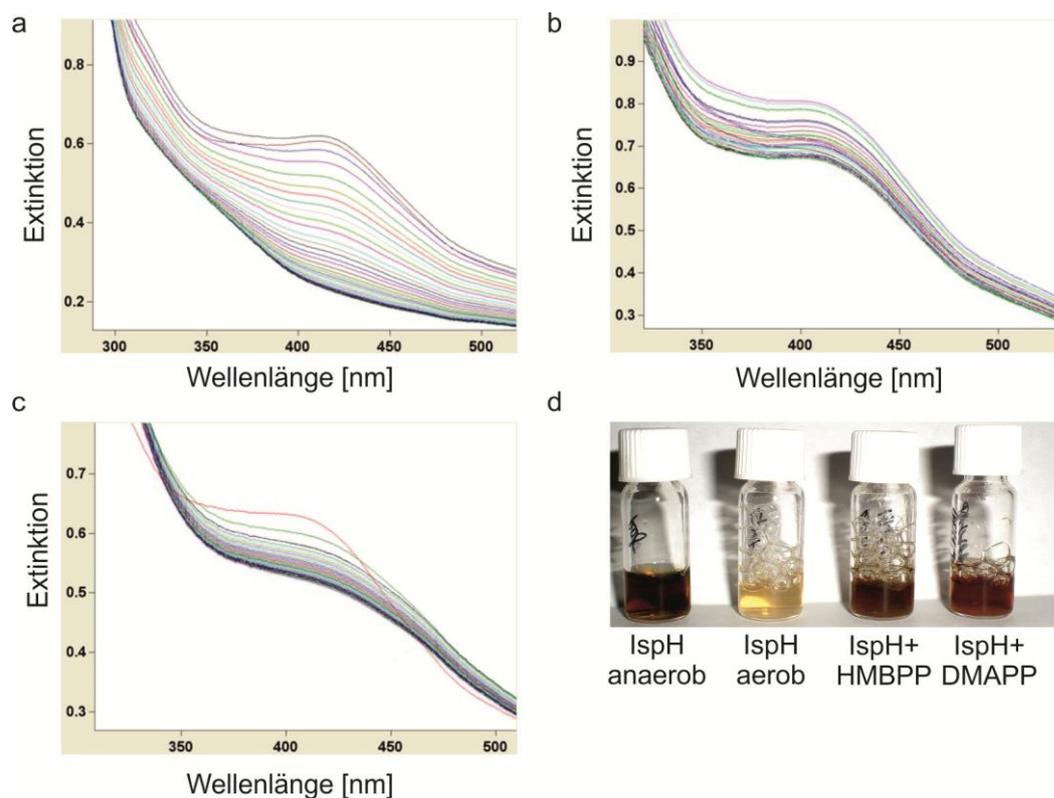
Verhältnis der Extinktionswerte bei 410 nm und 280 nm ( $E_{410}/E_{280}$ ) erlaubte Rückschlüsse auf den Anteil des Proteins mit [4Fe-4S]-Cluster (3.4.3). Anhand dessen wurde eine moderate Zunahme des Proteins mit Fe-S-Cluster beobachtet. Da jedoch bei der Charakterisierung und Kristallisation das auf natürlichem Wege synthetisierte IspH-Protein möglichst nicht verändert werden sollte, wurde auf die Rekonstitution des Fe-S-Clusters im Folgenden verzichtet.



**Abbildung 13** Rekonstitution des Fe-S-Clusters in IspH. Das Spektrum in Schwarz wurde mit Protein nach Denaturierung mit Harnstoff und EDTA aufgenommen. Nach Rekonstitution unter Zugabe von Eisen, Schwefel und Reduktionsmittel wurde das in Rot gezeigte Spektrum aufgenommen.

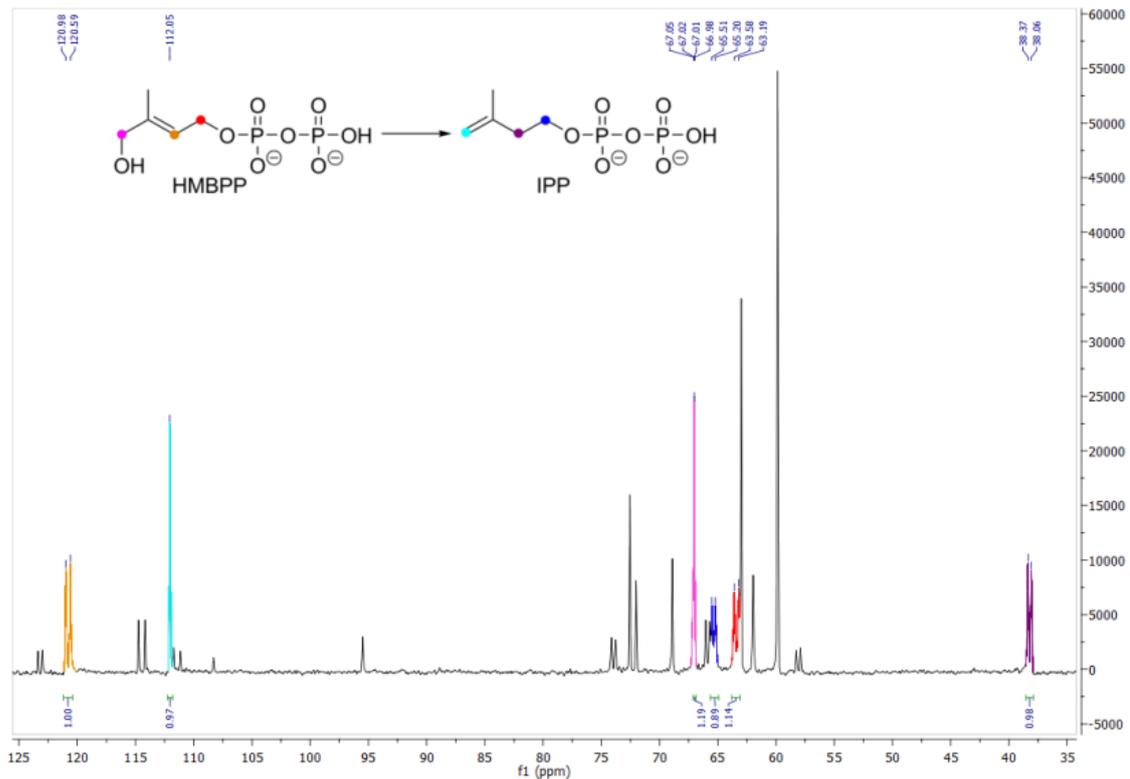
Im Folgenden wurde die  $O_2$ -Sensitivität in Abhängigkeit der zugegebenen Liganden untersucht. Für die systematische Analyse wurde ein neuer Assay etabliert (3.3.8). Die in Abbildung 14 dargestellten Ergebnisse zeigen eine signifikante Veränderung der  $O_2$ -Sensitivität von IspH in Abhängigkeit der im Protein gebundenen Liganden. Liegt das IspH-Protein ohne Ligand vor (Abbildung 14a) beobachtete man eine Abnahme des für den Fe-S-Cluster charakteristischen Signals. Nach etwa 16 h wurde keine Veränderung mehr beobachtet. Bei Zugabe von HMBPP zu IspH (Abbildung 14b) stellte man keine signifikante Veränderung des Spektrums fest. Die Variation der Intensität der Absorption bei 410 nm ist auf Messungenauigkeiten zurückzuführen. Das in Rot eingefärbte Spektrum entspricht immer der anaeroben Messung. Bei Zugabe von DMAPP zu IspH (Abbildung 14c) beobachtete man eine deutliche Abweichung zwischen anaeroben und aeroben Messungen. Dies deutet darauf hin, dass der Cluster durch Bindung dieses Liganden eine Veränderung erfährt, anschließend jedoch nicht weiter durch  $O_2$  beeinflusst wird. Zusammenfassend kann aus diesem Experiment abgeleitet werden, dass der freie Fe-S-Cluster in IspH unter aeroben Bedingungen labil ist. Bei Zugabe von Substrat wird die freie Koordinationsstelle und somit das Protein stabilisiert. Die Zugabe eines der Produkte führt zu einer Veränderung aber nicht Zersetzung des Clusters. Diese Beobachtungen wurden im Verlauf dieser Arbeit durch kristallographische Studien weiter untermauert.

Ein weniger akkurates, jedoch sehr anschauliches Experiment ist in Abbildung 14d dargestellt. Hierbei wurden vier identische IspH-Proben unterschiedlichen Bedingungen ausgesetzt. Unter anaeroben Bedingungen hatte die Lösung eine intensive Färbung, die durch Exposition gegenüber Sauerstoff nahezu vollständig verschwand. Nach Inkubation mit HMBPP blieb die Lösung auch unter aeroben Bedingungen braun und bei Zugabe von DMAPP änderte sich der Farbton nur wenig. Diese makroskopischen Beobachtungen spiegeln die Ergebnisse der UV/VIS-spektroskopischen Studie wieder.



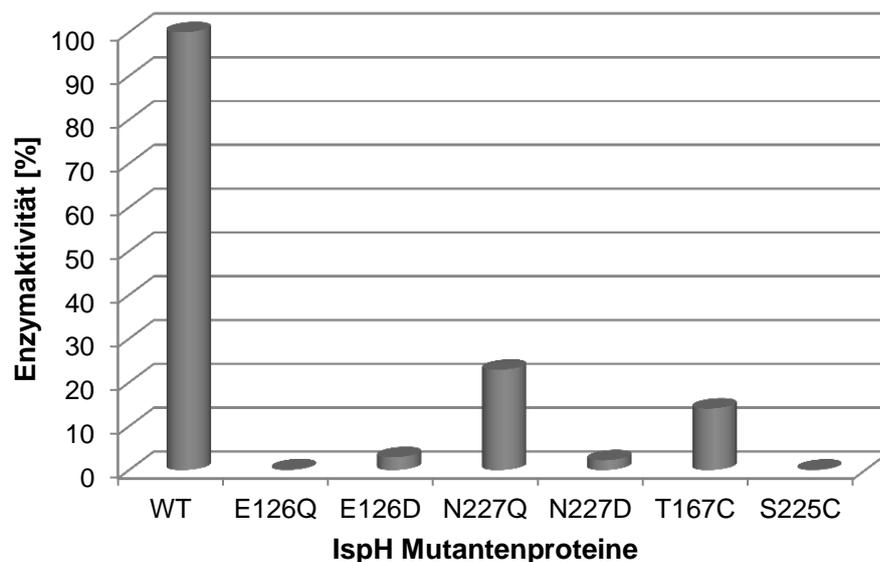
**Abbildung 14** O<sub>2</sub>-Sensitivitätsassay von IspH in Komplex mit verschiedenen Liganden. Die unterschiedlich gefärbten Kurven entsprechen Messungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten, wobei die rote Kurve immer die Angangsmessung darstellt. (a) *E. coli* IspH in freier Form (b) IspH in Komplex mit HMBPP (c) IspH in Komplex mit DMAPP (d) Optische Analyse nach 24 h Inkubationszeit von links: IspH anaerob, IspH in freier Form, IspH in Komplex mit HMBPP, IspH in Komplex mit DMAPP.

Die Aktivität des Proteins wurde mittels NMR-basierten Enzymassays (3.5.1) bestimmt. Hierfür wurde der Umsatz von [1,2,4-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>]-markiertem HMBPP anhand <sup>13</sup>C-NMR-spektroskopischer Messungen in einem definierten Zeitraum ermittelt (Abbildung 15). Die Bedingungen für den Assay wurden zunächst optimiert, um einen Umsatz zwischen 20% und 80% zu erhalten, da in diesem Bereich präzise Integration der Signale sowohl des Edukts als auch des Produkts möglich ist.



**Abbildung 15** NMR-basierter Enzymaktivitätstest von *E. coli* IspH. Die  $^{13}\text{C}$ -markierten Atome wurden mit farbigen Punkten versehen und die zugehörigen Signale im Spektrum in der gleichen Farbe dargestellt.

Die Aktivität des *E. coli* IspH-Proteins konnte mit diesem Assay auf  $11.1 \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$  bestimmt werden. Die Aktivität von IspH aus den Organismen *A. aeolicus* und *M. tuberculosis* konnte mit diesem Assay nicht bestimmt werden, da dessen Parameter an die physiologischen Bedingungen von *E. coli* angepasst wurden. Die IspH-Mutantenproteine wurden mit dem gleichen Assay hinsichtlich ihrer Aktivität untersucht (Abbildung 16).



**Abbildung 16** Relative Enzymaktivität der IspH-Mutantenproteine.

Diese Experimente zeigten, dass die Aminosäure E126 im aktiven Zentrum essentiell für die katalytische Reaktion ist, da die Änderung der Funktionalität (E126Q) oder der Kohlenstoffkettenlänge (E126D) zum nahezu vollständigen Verlust der Aktivität führt. Die Aminosäure N227 liegt im Bereich der polaren Region, an der die Diphosphatfunktion des IspH-Substrats bindet. Der Austausch von Asparagin durch das längere Glutamin (N227Q) beeinflusst die Aktivität nicht so stark wie die Einführung einer Säuregruppe (N227D). Die Veränderung der Polarität wirkt sich sowohl auf die Wasserstoffbrückenbildung als auch auf die ionischen Wechselwirkungen aus, die bei der Substratbindung eine entscheidende Rolle spielen. Die T167C-Mutation, die das aktive Zentrum von IspH betrifft, verursacht einen starken Verlust der Aktivität auf etwa 32% im Vergleich zum Wildtyp. Dies deutet darauf hin, dass T167 wahrscheinlich nicht direkt an der Umsetzung beteiligt ist. Der Austausch der Hydroxyfunktion durch eine Thiolgruppe an der Position 225, die ebenfalls in der Diphosphatbindungsregion des Proteins liegt, führte zum vollständigen Verlust der Aktivität. Da die Polarität der X-H-Bindung vom Alkohol zum Thiol abnimmt und keine Wasserstoffbrückenbindungen mehr ausgebildet werden, entfällt der Beitrag dieser Aminosäure zur Substratstabilisierung. Der drastische Aktivitätsverlust deutet jedoch darauf hin, dass die Struktur der gesamten Diphosphatbindetasche verändert wurde, da der Verlust einer H-Brücke nicht allein verantwortlich für die schlechte Substratkoordination sein kann.

### 4.3 Kristallisation und Datensammlung

Aufgrund der Sauerstoffsensitivität wurden alle Kristallisationsexperimente unter anaeroben Bedingungen durchgeführt. Die initiale Suche nach geeigneten Kristallisationsbedingungen für IspH aus *E. coli* begann mit den Standardkristallisationskits 1-6 von Qiagen, mit denen 576 verschiedene Bedingungen getestet wurden. In einigen Tropfen wurden braune Kristallbüschel umgeben von viel Präzipitat beobachtet. Durch Optimierung des Kristallwachstums konnten mit folgendem Puffersystem vielversprechende Kristalle erhalten werden.

0.1 M Bis-Tris/HCl, pH 6.5; 0.2 M Ammoniumsulfat; 20-25% PEG3350

Alternativ kann auch Lithiumsulfat in der gleichen Konzentration als Präzipitans eingesetzt werden.

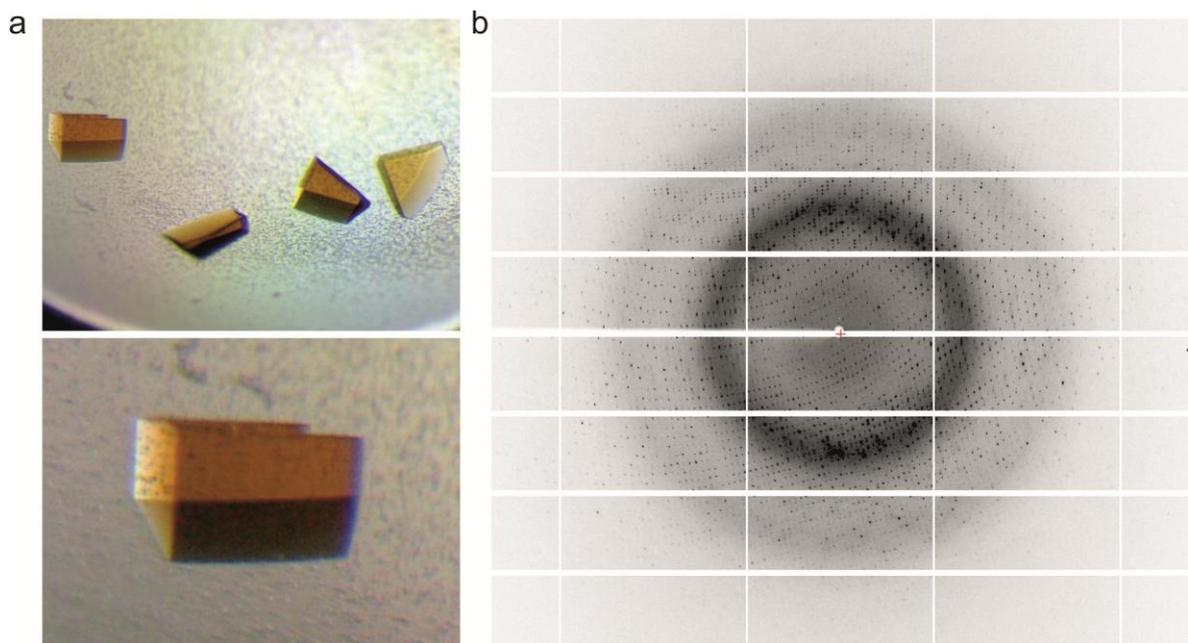
Für *A. aeolicus* IspH-Protein waren bereits Kristallisationsbedingungen literaturbekannt<sup>[69]</sup>, die als Ausgangspunkt für eine verfeinerte Suche nach optimalen Puffern verwendet wurden.

0.1 M Tris/HCl, pH 8.0; 0.2 M Ammoniumsulfat; 8-20% PEG8000

Mit der gereinigten Proteinprobe konnten weder unter den veröffentlichten Bedingungen noch mit den Standardkristallisationskits 1-6 von Qiagen Kristalle erhalten werden. Bei den initialen Screens für IspH2 aus *M. tuberculosis* wurden leicht bräunliche Kristalle bei folgender Bedingung gefunden:

0.1 M Bis-Tris/HCl, pH 8.5; 0.2 M Lithiumsulfat; 20-25% PEG3350

Intensive Bemühungen die Qualität der Kristalle von *A. aeolicus* IspH und IspH2 aus *M. tuberculosis* zu steigern führten nicht zum gewünschten Erfolg und wurden somit nicht weiter verfolgt. Die Kristallisation von *E. coli* IspH im Komplex mit Substrat hingegen lieferte in kurzer Zeit viele braune Kristalle (Abbildung 17a) mit vielversprechender Morphologie und Größe. An der Cu-K $\alpha$ -Drehanode konnten erste Datensätze hiervon aufgenommen werden. Die Messungen zeigten ein gutes Beugungsmuster (Abbildung 17b) und lieferten Daten mit Auflösungen unter 2 Å. Die Statistik der Datensammlungen und Verfeinerungen von allen Kristallstrukturen sind in 7.2 zusammengefasst.



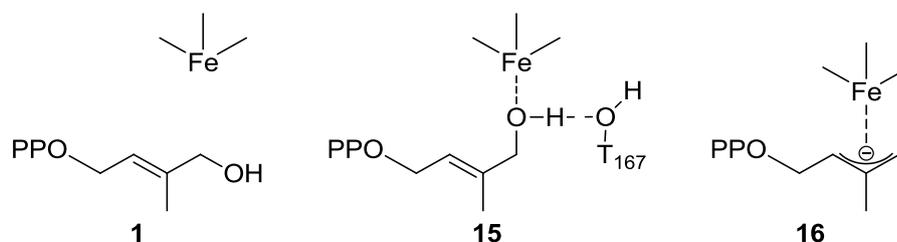
**Abbildung 17** Kristalle und Beugungsmuster von *E. coli* IspH. (a) Die IspH-Kristalle weisen die charakteristische braune Färbung von Fe-S-Proteinen auf. (b) Beugungsmuster von einem IspH-Kristall aufgenommen am SLS.

Bei der Proteinkristallographie wird anhand der gemessenen Daten eine Elektronendichte erhalten, in die ein Modell des Proteins eingepasst wird. Hierfür werden die aus der Datenprozessierung erhaltenen Strukturfaktoramplituden  $F_{hkl}$  sowie die zugehörigen Phasen  $\alpha_{hkl}$  benötigt. Das Phasenproblem kann auf drei Arten gelöst werden: Multipler Isomorpher Ersatz, Multiple Anomale Dispersion und Molekularer Ersatz. Liegen Koordinaten für eine geeignete Modellstruktur vor, so ist der Molekulare Ersatz die einfachste und effizienteste

Methode zur Strukturbestimmung. Hierfür müssen Position und Orientierung des Suchmodells in der Elementarzelle über die Patterson-Methode anhand von Rotations- und Translationsfunktionen bestimmt werden. Als Startmodell wurden die IspH-Kristallstrukturen mit den PDB-Codes 3F7T<sup>[70]</sup> und 3KE8<sup>[100]</sup> eingesetzt. Mit einer Ausnahme wiesen alle IspH-Komplexstrukturen die Raumgruppe  $P2_12_12_1$  auf. Die Zellachsen der Elementarzelle beliefen sich auf ca.  $a = 70 \text{ \AA}$ ,  $b = 80 \text{ \AA}$  und  $c = 112 \text{ \AA}$ . In jeder asymmetrischen Einheit befinden sich zwei IspH-Moleküle, die über ein C-terminales Faltblatt interagieren. Im nächsten Schritt erfolgte die Anpassung des Modells an die experimentellen Daten. Nach iterativen Verfeinerungsschritten mit den Programmen Refmac<sup>[88]</sup> und Coot<sup>[84]</sup> sowie Einbau von Cluster, Liganden und Wassermolekülen wurde eine abschließende Translation-Libration-Schraubenrotation (TLS)-Verfeinerung<sup>[101]</sup> durchgeführt. Als Qualitätsmerkmal wurde der freie R-Faktor ( $R_{\text{free}}$ ) verwendet, der bei allen Kristallstrukturen unter 28% liegt. Die Gesamtstruktur der IspH-Komplexe ist analog zu den bereits bekannten Strukturen, die in Abschnitt 1.2.3 ausführlich beschrieben sind.

#### 4.4 Strukturanalyse von IspH in Komplex mit natürlichen Liganden

Basierend auf Kristallstrukturanalyse sollten detaillierte mechanistische Untersuchungen der IspH-Reaktion erfolgen. Ausgehend von den natürlichen Liganden sollten sowohl Bindungsmodus als auch Interaktionen mit den Proteinresten charakterisiert werden. Hierbei wurden zunächst IspH-Komplexstrukturen mit dem Substrat HMBPP (**1**) und anschließend mit den Produkten IPP (**2**) und DMAPP (**3**) sowie einem Diphosphatanion (**17**) betrachtet.



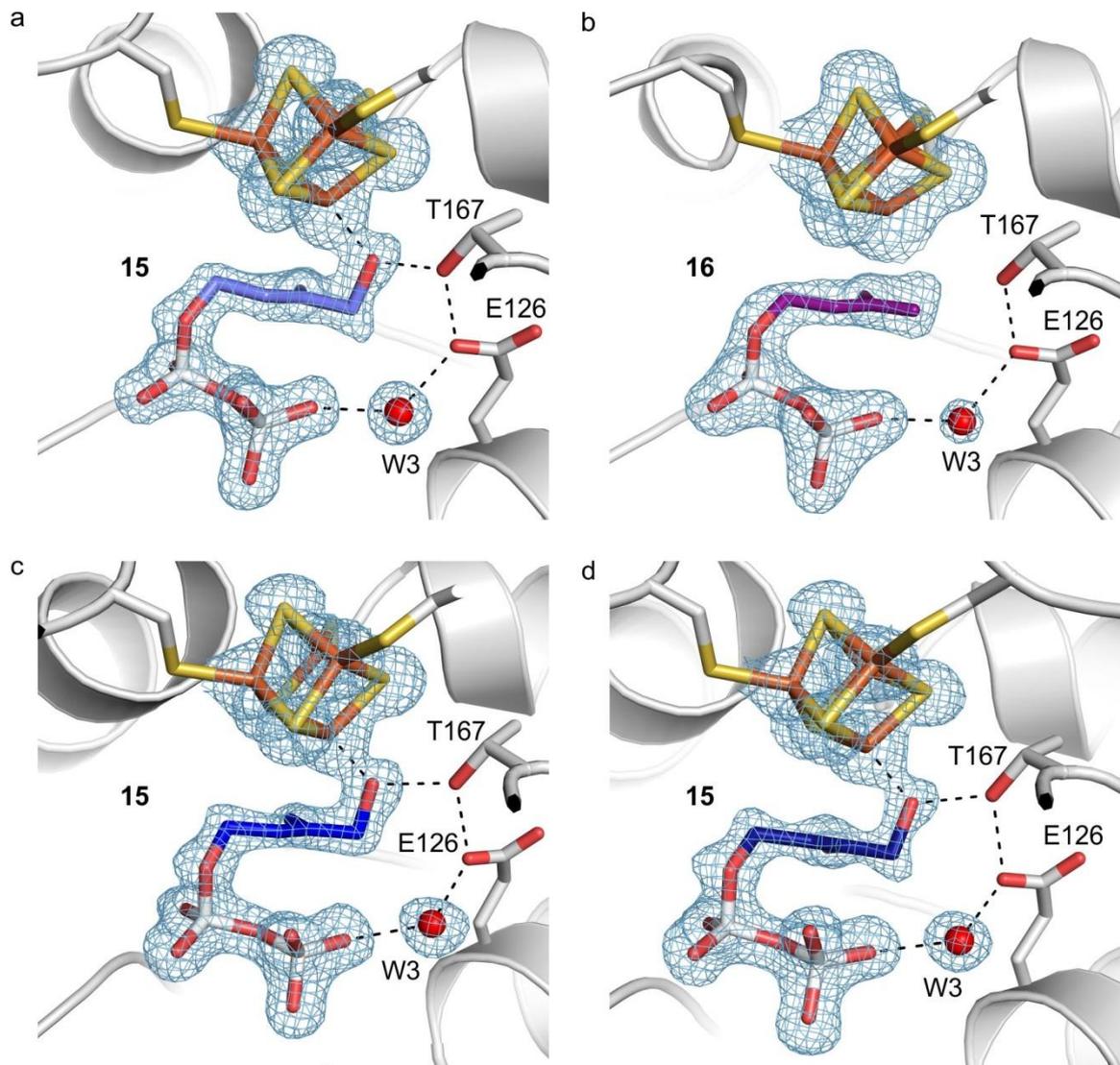
**Abbildung 18** Substrat (**1**), Alkoxidkomplex (**15**) und delokalisiertes Carbanion (**16**) in Koordination mit einem Eisen des Fe-S-Clusters von IspH.

Die IspH:**1**-Kristallstruktur mit einer Auflösung von 1.7 Å und einem  $R_{\text{free}}$  von 26.9% (Tabelle 12) zeigt das Protein in der geschlossenen Konformation. Das Proteinrückgrat ist nahezu identisch zu der ersten berichteten *E. coli* IspH Struktur in Phosphatpuffer, wobei die mittlere quadratische Abweichung (RMSD) 0.3 Å beträgt. Im aktiven Zentrum der erhaltenen Proteinkristallstruktur erkennt man zum ersten Mal zweifelsfrei einen [4Fe-4S]-Cluster mit einer gut definierten Elektronendichte. Für diese Kristallansätze wurde das Protein nicht rekonstituiert, sodass man davon ausgehen kann, dass der [4Fe-4S]-Cluster die aktive Form des Kofaktors darstellt. Ob der [3Fe-4S]-Cluster ein Artefakt ist, der bei Überexpression des Proteins auftritt oder analog zur Aconitase eine inaktive Form darstellt<sup>[21]</sup>, wurde bislang nicht aufgeklärt.

Die Elektronendichte im aktiven Zentrum der IspH:**1**-Kristallstruktur zeigt das Substrat mit seiner Diphosphatgruppe in der gleichen Position wie das anorganische Diphosphat.<sup>[70]</sup> Das mehrfach negativ geladene Diphosphat besetzt eine polare Tasche, die von den Aminosäureresten H41, H74, H124, S225 und S269, T168, N227 und Q166 gebildet wird. Insgesamt betrachtet weist **1** eine U-förmige Konformation auf, wobei die Hydroxygruppe in die Richtung des Fe-S-Clusters gedreht ist und einen Alkoxidkomplex (**15**) mit dem Eisen an der Spitze des Clusters bildet. Dies lässt vermuten, dass Fe in der Oxidationsstufe +III vorliegt und eine hohe Lewis-Azidität aufweist, die zur Bildung des Alkoxidkomplexes notwendig ist. Dieses Intermediat wird durch Wasserstoffbrückenbildung mit der Hydroxygruppe von T167 (2.7 Å) stabilisiert. In der relativ kleinen zentralen Kammer von IspH ist neben Substrat und Kofaktor nur noch Platz für ein Wassermolekül, welches eine

tetraedrische Koordinationssphäre mit H-Brücken zu E126O<sup>ε</sup>, Q166O<sup>ε</sup>, T168O<sup>γ</sup> und einem Diphosphatsauerstoff aufweist. Die Nomenklatur der Wasserpositionen ist in einer fortgeschrittenen Phase dieser Arbeit entstanden und für alle Strukturen einheitlich. Da drei bevorzugte Positionen für Wasser in den verschiedenen IspH Komplexstrukturen beobachtet wurden, erfolgte die Nummerierung anhand des Abstandes vom Fe-S-Cluster. An der Stabilisierung des Wassermoleküls in Position W3 sind die Aminosäurereste von T167 und E126 beteiligt. Die gezielte Mutagenese und Enzymaktivitätsbestimmung zeigten bereits die wichtige Rolle dieser Seitenketten, die durch Kristallstrukturanalyse noch einmal bestätigt wurde. Aus der Struktur wird deutlich, dass die OH-Gruppe von T167 bei der Stabilisierung eines frühen Reaktionsintermediates beteiligt ist.

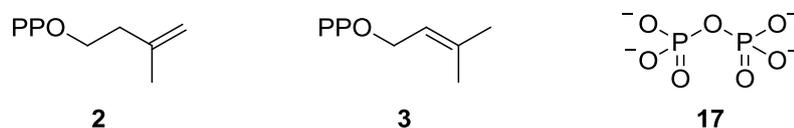
Ein anderer Kristall, der unter den gleichen Bedingungen gewachsen war, wurde zunächst 12 h mit der Cu-K<sub>α</sub>-Röntgenquelle vorbelichtet. Derselbe Kristall wurde nach einiger Zeit am SLS erneut gemessen. Die so erhaltene Struktur (Abbildung 19b) mit einer Auflösung von 1.9 Å und einem R<sub>free</sub> von 24.8% (Tabelle 12) unterschied sich signifikant von der vorhergehenden. Trotz der Anwesenheit eines [4Fe-4S]-Clusters im aktiven Zentrum ist keine Elektronendichte zwischen dem apikalem Eisen und dem Liganden zu erkennen, weshalb die Bildung eines Alkoxidkomplexes ausgeschlossen werden kann. Weiterhin ist die Hydroxygruppe des Substrats nicht definiert. Aufgrund des geringen Raums im aktiven Zentrum und der vielen Möglichkeiten der Stabilisierung durch H-Brückenbildung ist eine freie Rotation der Hydroxyfunktion, die eine Fehlordnung in der Struktur nach sich ziehen würde, unmöglich. Hierbei handelt es sich also um ein spätes Intermediat der IspH-Reaktion. Da eine radikalische Spezies bislang nicht nachgewiesen wurde, interpretiere man die in der Struktur beobachtete Spezies als delokalisiertes Carbanion (**16**).



**Abbildung 19** Kristallstrukturen von *E. coli* IspH in Komplex mit seinem Substrat HMBPP und Intermediaten. In der Abbildung ist das Protein in der Cartoon-Darstellung, wohingegen Fe-S-Kofaktor und Ligand als Stick-Modell und Wassermoleküle als Sphären gezeigt werden. Alle Strukturen weisen einen [4Fe-4S]-Cluster auf. (a) In der ersten IspH:Substrat-Komplexstruktur bildet HMBPP einen Alkoxidkomplex mit dem Eisen des Clusters, wobei eine alternative Ligandenkonformation zu beobachten ist. (b) Mit einem vorbelichteten Kristall wurde ein bereits dehydratisiertes Intermediat in der Struktur entdeckt. (c) Die hier gezeigte Kristallstruktur wurde bei sehr kurzen Belichtungszeiten gemessen und zeigt ausschließlich einen Alkoxidkomplex. (d) Bei kurzer Vorbelichtungszeit wird die Alternativkonformation des Liganden sichtbar, bei der sich die Hydroxymethylgruppe in die Richtung von E126 dreht.

Die zwei beobachteten intermediären Zustände in den Kristallstrukturen lieferten die Motivation zu einer Reihe weiterer Messungen mit unterschiedlichen Parametern. Hierfür wurde zunächst die in Abbildung 19a gezeigte Struktur genauer betrachtet, wobei eine alternative Konformation von **1** entdeckt wurde. Nach Verfeinerung mit dem Liganden ist nur noch ein kleiner Rest der unbesetzten Elektronendichte erkennbar. Auch wenn die dargestellte Substratkonformation eindeutig die Hauptspezies darstellt, bleibt die Frage, ob der

Alkoxidkomplex das erste Intermediat der katalytischen Reaktion darstellt. Dieses Problem konnte mit den in Abbildung 19c und 21d gezeigten Strukturen abschließend geklärt werden. Bei einer kurzen Datensammlung innerhalb von 70 s (Abbildung 19c) konnte eine Kristallstruktur mit einer Auflösung von 1.6 Å und einem  $R_{\text{free}}$  von 24.2% (Tabelle 12) erhalten werden. In dieser Struktur verschwindet die überschüssige Elektronendichte im Vergleich zu (a). Für einen Vergleich wurde eine Messung mit 180 s Belichtungszeit durchgeführt und die Struktur mit 1.6 Å Auflösung und einem  $R_{\text{free}}$  von 23.9% (Tabelle 12) bestimmt. In dieser Kristallstruktur gewinnt die Elektronendichte der alternativen Konformation an Bedeutung. Da Röntgenstrahlen eine der stärksten Reduktionsquellen darstellen, werden bei Belichtung der Kristalle freie Elektronen auf den Fe-S-Cluster übertragen. Die beiden unterschiedlichen Kristallstrukturen deuten darauf hin, dass eine Reduktion des [4Fe-4S]-Clusters den Konformationswechsel des Substrats initiiert. Diese Daten zeigen eindeutig in welcher Reihenfolge die in Abbildung 19 gezeigten Intermediate im Verlauf der Reaktion auftreten. Bei Bindung von **1** in das aktive Zentrum von IspH wird ein Alkoxidkomplex gebildet. Durch Reduktion wird eine Konformationsänderung eingeleitet, wobei die Hydroxygruppe von **1** in die entgegengesetzte Richtung gedreht wird. Anschließend erfolgt die Dehydratisierung des Substrats zu einem Carbanion.

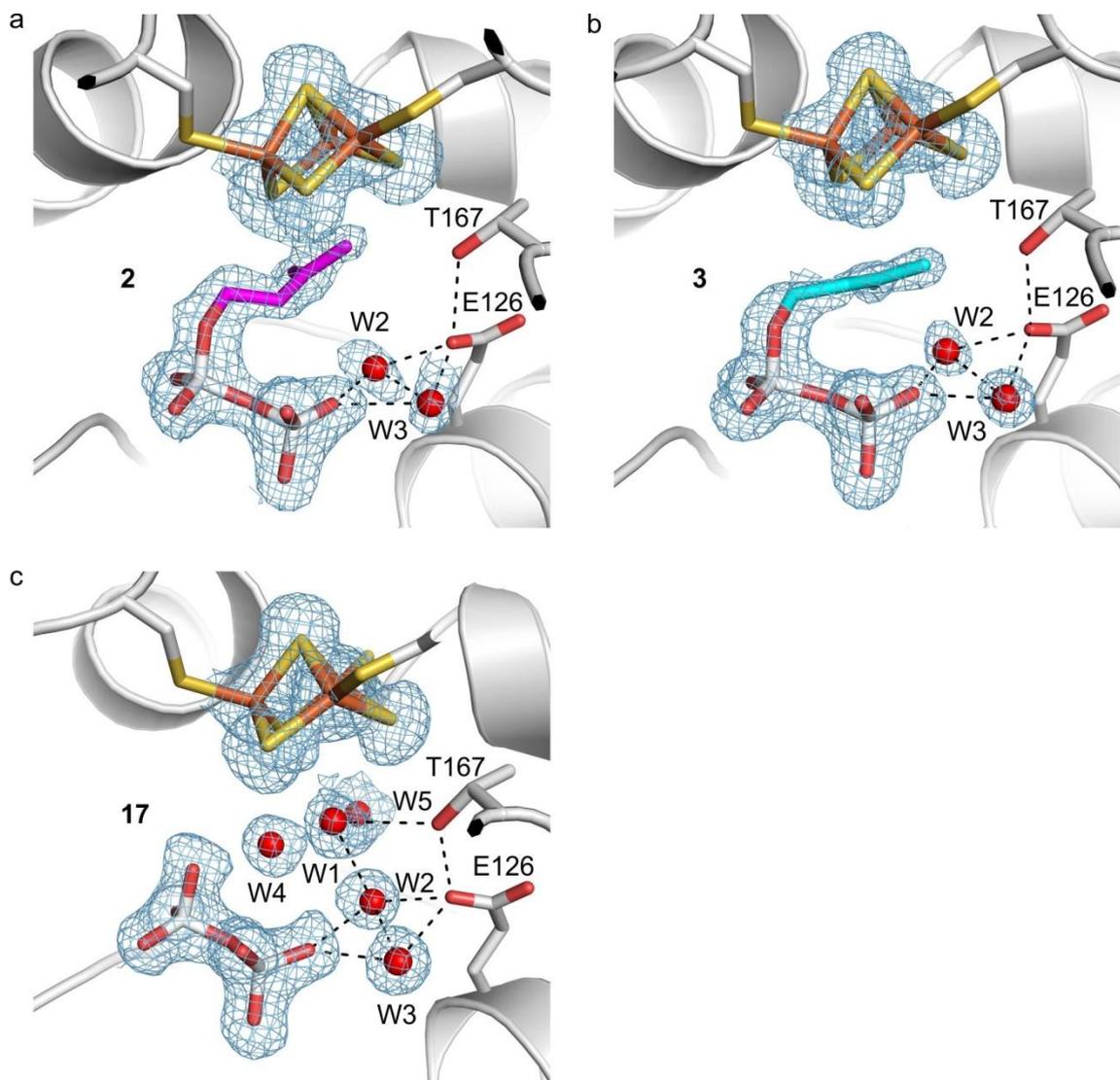


**Abbildung 20** Struktur der IspH Produkte IPP (**2**) und DMAPP (**3**) sowie des Diphosphatanions (**17**).

Nach ausführlicher Analyse verschiedener IspH-Substratkomplexe wurden die beiden Produkte charakterisiert. Hierzu wurden **2** und **3** (Abbildung 20) mit IspH kokristallisiert und die erhaltene Röntgenkristallstruktur analysiert.

Der IspH:IPP-Komplex kristallisierte in der Raumgruppe C2 mit den Zellparametern  $a = 112.5$ ,  $b = 80.6$  und  $c = 70.2$ , die bislang noch bei keinem IspH-Kristall beobachtet wurde. Die Struktur konnte mit 2.0 Å Auflösung und  $R_{\text{free}} = 27.2\%$  (Tabelle 13) gelöst werden. Interessanterweise kristallisierte der IspH:DMAPP-Komplex in der unter diesen Bedingungen gängigen  $P2_12_12_1$ -Raumgruppe aus. Diese Struktur wurde mit einer Auflösung von 1.7 Å und einem  $R_{\text{free}}$  von 23.7% (Tabelle 13) ermittelt. Trotz der unterschiedlichen Raumgruppen sind die Kristallstrukturen in Komplex mit **2** (Abbildung 21a) sowie mit **3** (Abbildung 21b) nahezu identisch. Überraschenderweise weisen beide Strukturen einen [3Fe-4S]-Cluster im aktiven Zentrum auf. Die Diphosphatgruppe beider Produkte liegt in der zuvor beschriebenen polaren Tasche. Durch die unterschiedlichen strukturellen Einschränkungen nehmen die Liganden

eine leicht abweichende Konformation ein, die jedoch in beiden Fällen wohl definiert ist. Der durch Abwesenheit des vierten Eisens erweiterte Raum in der zentralen Kavität ermöglicht die Anwesenheit von zwei Wassermolekülen, die Positionen W2 und W3 besetzen.



**Abbildung 21** Kristallstrukturen der Komplexe (a) IspH:IPP, (b) IspH:DMAPP und (c) IspH:Diphosphatanion. In allen Kristallstrukturen wurde ein [3Fe-4S]-Cluster beobachtet. Das Protein ist in der Cartoon-Darstellung gezeigt, der Fe-S-Kofaktor und der Ligand sind als Stick-Modell und Wassermoleküle als Sphären.

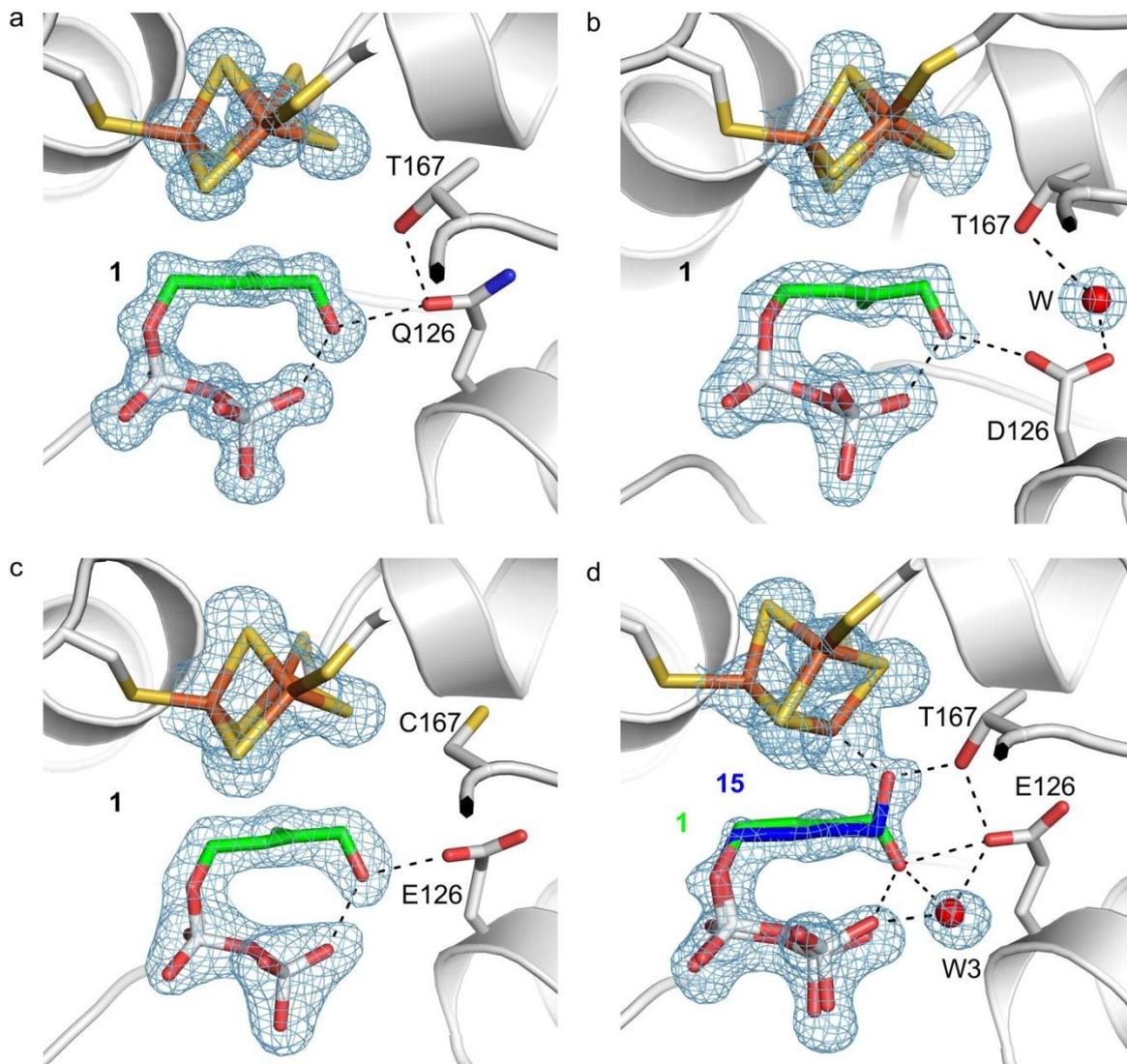
Der signifikante Unterschied zwischen den Produkt- und den Substratstrukturen ist die Konstitution des Kofaktors. Hierbei gibt es mehrere Möglichkeiten als Erklärung für das Vorkommen des [4Fe-4S]-Clusters in den IspH:1-Komplexstrukturen und des [3Fe-4S]-Clusters bei IspH:2- sowie IspH:3-Strukturen. Beiden Produkten fehlt im Gegensatz zu **1** eine Hydroxyfunktion, die einen Komplex mit dem Fe des Clusters eingehen kann und somit die tetraedrische, stabilere Koordinationssphäre des Eisens herstellt. In diesem Zusammenhang sind erneut die Ergebnisse des Sauerstoff-Sensitivitätsassays erwähnenswert. Diese zeigten

bereits, dass die Anwesenheit des Substrats die Oxidationsempfindlichkeit des Fe-S-Proteins durch Sauerstoff herabsetzt. Die Kristallstrukturanalyse kann nun die Erklärung für diese Beobachtung liefern: Durch die Koordination wird der Fe-S-Cluster von IspH stabilisiert und dadurch die Sensitivität des Proteins gegenüber Sauerstoff herabgesetzt. Die Inkubation von IspH mit **3** hingegen führt zu einer Veränderung der Extinktion bei 410 nm, jedoch zu keiner nennenswerten Veränderung bei Kontakt mit Sauerstoff. Kombiniert man diese Ergebnisse mit der Strukturanalyse, lässt sich daraus schließen, dass im IspH-Komplex mit **3** der aktive [4Fe-4S]-Cluster in die inaktive Form [3Fe-4S] überführt wird, der eine geringere Oxidationsempfindlichkeit aufweist. Somit könnte ein negativer Feedback-Mechanismus in Betracht gezogen werden, der bei hoher Produktkonzentration das Protein in eine inaktive Form überführt. Eine pragmatischere Erklärung für die verschiedenen Clusterformen wäre die selektive Kristallisation der hydrophoberen Produkte mit dem hydrophoberen [3Fe-4S]-Cluster. Die Kohlenstoffkette von **2** oder **3** kann durch hydrophobe Van-der-Waals-Wechselwirkungen mit den verbrückenden Schwefeln des Clusters besser stabilisiert werden als mit dem Lewis-aziden Eisen.

Die erste veröffentlichte *E. coli* IspH-Kristallstruktur wurden in Phosphatpuffer mit einer Konzentration von 1.8 M erhalten.<sup>[70]</sup> Diese Struktur zeigte ein Diphosphatanion im aktiven Zentrum von IspH. Zur Überprüfung, ob unter den veränderten Bedingungen bei Zugabe von Diphosphat die Struktur reproduziert werden kann, wurde IspH-Proteinlösung mit 50 mM Tetranatriumdiphosphat inkubiert und Kristallisationsansätze unter den Bis-Tris-Bedingungen durchgeführt. Tatsächlich konnten mit diesem Ansatz Kristalle mit der neuen Raumgruppe  $P2_12_12_1$  erhalten werden. Im Gegensatz dazu wiesen die Kristalle unter den Phosphatbedingungen die Raumgruppe  $P3_221$  auf. Die Röntgenkristallstruktur von IspH:**17** konnte mit 1.8 Å Auflösung und  $R_{\text{free}} = 27.8\%$  (Tabelle 13, Abbildung 21c) gelöst werden. Das Diphosphat besetzt erwartungsgemäß die gleiche Position wie in der vorhergehenden Struktur und der Cluster befindet sich in der [3Fe-4S]-Form. Zudem sind fünf Wassermoleküle im aktiven Zentrum zu finden. Dies lässt darauf schließen, dass die Konstitution des Kofaktors nicht von den Kristallisationsbedingungen abhängig ist. In diesem Fall scheint ein Wassermolekül allein nicht in der Lage zu sein, das apikale Eisen des Fe-S-Clusters ausreichend zu stabilisieren.

## 4.5 Strukturelle Charakterisierung der IspH-Mutantenproteine

Von den IspH-Mutantenproteinen E126Q, E126D und T167C wurde nach der Reinigung mittels Affinitätschromatographie ausreichend Protein in hoher Konzentration erhalten. Die Aktivitäten dieser Punktmutanten weichen stark voneinander ab und sind signifikant unterhalb der Aktivität des IspH-Wildtyps. Aufgrund dessen wurden Kristallisationsansätze der drei Mutanten in Anwesenheit des Substrats (**1**) durchgeführt.



**Abbildung 22** Kristallstrukturen der Proteinmutanten in Komplex mit HMBPP. Alle IspH-Mutanten weisen einen [3Fe-4S]-Cluster sowie das Substrat in einer zyklichen Konformation auf, stabilisiert durch E126. Das Protein ist als Cartoon, Fe-S-Kofaktor sowie Substrat als Stick-Modell dargestellt. (a) IspH E126Q-Mutante. (b) IspH E126D-Mutante. (c) IspH T167C-Mutante. (d) Strukturelle Überlagerung des Alkoxidkomplexes (15) mit der IspH E126Q-Mutante mit der zyklichen Substratkonformation

Die Struktur von IspH E126Q:**1** konnte mit 1.4 Å Auflösung und  $R_{\text{free}} = 21.5\%$  (Tabelle 14), IspH E126D:**1** mit 1.9 Å Auflösung und  $R_{\text{free}} = 24.2\%$  (Tabelle 14) und IspH T167C:**1** mit 2.1 Å  $R_{\text{free}} = 27.7\%$  (Tabelle 13) bestimmt werden.<sup>[102]</sup> Das Proteinrückgrat in den Kristallstrukturen aller IspH-Mutantenproteine stimmt mit dem in der Wildtyp-Struktur überein. Die RMSD-Abweichung zwischen Mutanten und Wildtyp liegt in einem Bereich von 0.3 bis 0.6 Å. Im aktiven Zentrum der Röntgenstrukturen (Abbildung 22) ist ein [3Fe-4S]-Cluster erkennbar und das Substrat (**1**) liegt in einer zyklischen Konformation vor. Diese Orientierung wurde in den Wildtyp-Substrat-Kristallstrukturen als unterbesetzte Alternativkonformation vermutet, konnte jedoch nur in Kombination mit inaktiven Mutanten kristallographisch visualisiert werden. Im Gegensatz zu den bislang berichteten IspH-Strukturen ist die W3-Position in allen Mutantenstrukturen unbesetzt. Mit Ausnahme von IspH E126D befindet sich in der zentralen Kammer kein zusätzliches Wassermolekül.

Auf den ersten Blick scheinen die Kristallstrukturen der IspH Mutanten E126Q, E126D und T167C in Komplex mit **1** fast identisch zu sein. Dennoch unterscheiden sich die Enzymaktivitäten der punktmutierten Proteine stark voneinander. Dieser scheinbare Widerspruch kann durch detaillierte Strukturanalyse der verschiedenen IspH:**1**-Komplexe und einer Studie mit <sup>2</sup>H-markierten Intermediaten<sup>[103]</sup> geklärt werden. Bei der IspH-Reaktion erfolgt die Protonierung der Hydroxyfunktion des Substrats in der zyklischen Konformation und nicht im Fe-Alkoxidkomplex. Die Übertragung eines Protons von E126O<sup>ε</sup>H auf das Substrat verbessert die Eigenschaften der Abgangsgruppe und ermöglicht erst die Dehydratisierung und Bildung des Intermediats **16**. Durch den Austausch der Carboxylgruppe gegen eine Aminfunktion in der E126Q-Mutante steigt der pK<sub>s</sub>-Wert, wodurch die Protonierung der Hydroxyfunktion sowie die Dehydratisierung verhindert werden. Deshalb verursacht die E126Q-Mutation einen Aktivitätsverlust von 99.7% im Vergleich zum Wildtyp. Es bleibt jedoch noch die Frage warum die zyklische Konformation gegenüber dem Alkoxidkomplex im Wildtyp bevorzugt wird. Die plausibelste Erklärung scheint das Fehlen eines vierten Eisens im Cluster zu sein. Da jedoch für jede Proteinreinigung das Verhältnis der Extinktionswerte  $E_{410}/E_{280}$  bestimmt wurde kann man davon ausgehen, dass alle für Kristallisation verwendeten Proteinlösungen einen ähnlichen Anteil an [4Fe-4S]-Cluster enthalten. Die bereits bei den Produkten **2** und **3** erwähnte Theorie der selektiven Kokristallisation wurde aufgrund der geringen Abweichung der E126Q-Mutante und des Wildtyps von vorneherein ausgeschlossen. Eine Erklärung könnte die Veränderung des H-Brückennetzwerks durch Einführung der Mutation sein. Durch das Fehlen der Säurefunktion kann weder das Wassermolekül in W3-Position noch die Seitenkette von T167

stabilisiert werden, wodurch wiederum der Alkoxidkomplex mit dem freien Eisen nicht durch T167 koordiniert werden kann. Weiterhin hat das Eisen ohne die Stabilisierung durch Alkoxidkomplexbildung mit dem Liganden eine ungünstige Koordinationssphäre und dissoziiert vom Cluster.

Da nun die Rolle der funktionellen Gruppe geklärt wurde, betrachtete man die IspH-Mutante mit einer kürzeren Kohlenstoffkette. Die E126D-Mutante (Abbildung 22b) weist im Gegensatz zu den anderen beiden Strukturen ein Wassermolekül im aktiven Zentrum auf. Aus der Struktur wird deutlich, dass dieses Molekül eine rein strukturelle Aufgabe erfüllt. Durch die kürzere Kohlenstoffkette in D126 wird die direkte H-Brückenbildung mit T167 erschwert. Wie bereits erklärt spielt diese Polarisierung von T167 durch E126 eine entscheidende Rolle bei der Substratbindung. Um dennoch eine stabile Konformation dieser beiden Aminosäurereste zu erhalten wird in der Kristallstruktur ein Wassermolekül so positioniert, dass ein neues H-Brückennetzwerk entsteht. Die strukturelle Stabilisierung scheint nicht ausreichend für die Bildung des Alkoxidkomplexes zu sein, der in dieser Kristallstruktur ebenfalls nicht vorliegt. Der vergrößerte Abstand der Säurefunktion in D126 führt zu einer relativen Aktivität von 3.2% im Vergleich zum Wildtyp.

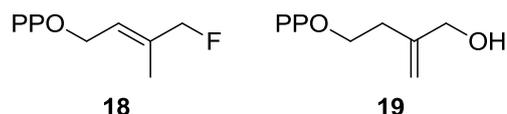
Mit einer Restaktivität von 32% ist die IspH T167C-Mutante (Abbildung 22c) die aktivste unter den hier charakterisierten Mutantenproteinen. Die erste Beobachtung bei der Strukturanalyse war die die strukturelle Reorganisation der C167-Gruppe, die stabilisierende Van-der-Waals-Wechselwirkungen (3.9 Å) mit den Schwefelatomen des Clusters und mit V99 (4.0 Å) eingeht. Somit entfällt die Möglichkeit der Alkoxidkomplexbildung aufgrund mangelnder struktureller Integrität und das Substrat liegt analog zu den beiden anderen Strukturen vor. Trotz der Verfügbarkeit des Protonendonors E126O<sup>ε</sup>H ist die Aktivität dieser Punktmutante deutlich geringer als beim IspH-Wildtyp. Die Bildung des Alkoxidkomplexes hat offenbar einen signifikanten Einfluss auf die IspH-Reaktion.

Neben der Entdeckung einer neuen Substratkonformation und dem Verständnis der Beiträge der Aminosäurereste E126 O<sup>ε</sup>H und T167 O<sup>ν</sup>H ist der signifikante Beitrag dieser Strukturen zur Aufklärung des IspH-Reaktionsmechanismus die Identifizierung eines weiteren Intermediats. Eine strukturelle Überlagerung (Abbildung 22) der vorbelichteten Wildtypstruktur in Abbildung 19d mit der E126Q-Struktur aus Abbildung 22a verdeutlicht, dass man die in den IspH-Mutantenstrukturen beobachtete Konformation von **1** nahezu perfekt in die zusätzlich beobachtete Elektronendichte einbauen kann. So konnten bislang drei frühe Reaktionsintermediate durch Röntgenstrukturanalyse visualisiert und charakterisiert werden. Zusammenfassend erfolgt im ersten Schritt der IspH-Reaktion die Bildung des

Alkoxidkomplexes **15** (Abbildung 19a) zwischen der Hydroxygruppe des Substrats **1** und dem Eisen des Clusters, gefolgt von der Rotation der Hydroxymethylgruppe um etwa  $160^\circ$  (Abbildung 22a) und schließlich die Dehydratisierung zum Intermediat **16** (Abbildung 19b).

#### 4.6 Mechanistische Untersuchungen mit Substratanaloga

Für weitere mechanistische Untersuchungen der IspH-Reaktion wurden die in Abbildung 23 gezeigten Substratanaloga verwendet.

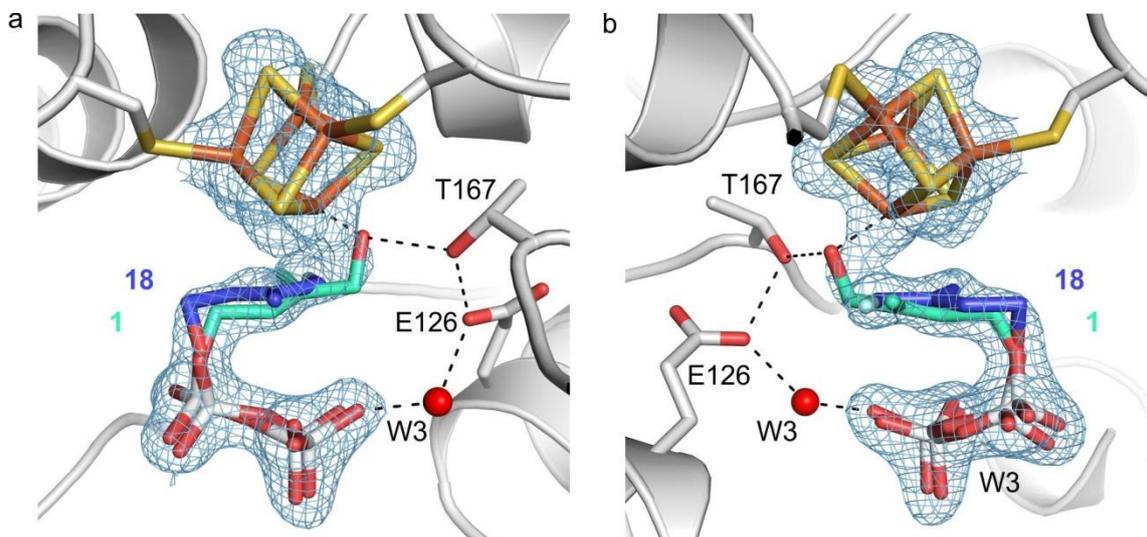


**Abbildung 23** Analoge Verbindungen zu dem IspH-Substrat HMBPP. (*E*)-4-Fluoro-3-methylbut-2-enediphosphat (**18**) sowie 3-(Hydroxymethyl)but-3-enyl diphosphat (**19**) binden an das aktive Zentrum von IspH.

(*E*)-4-Fluoro-3-methylbut-2-enediphosphat (**18**) wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. J. Jauch (Universität des Saarlandes in Saarbrücken) synthetisiert. Dieses Substrat zeigt wenige Abweichungen in Größe und Polarität von **1**, direkte Wechselwirkungen des Fluorids mit dem Eisen des Fe-S-Clusters sind jedoch nicht zu erwarten.<sup>[104]</sup> Verbindung **18** wurde bereits zuvor in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. P. Liu (Boston University) spektroskopisch charakterisiert.<sup>[71, 105]</sup> Die Studien zeigten, dass dieses Substrat von IspH umgesetzt wird mit einer Reaktionsgeschwindigkeit, die um den Faktor 20 kleiner ist als beim natürlichen Substrat **1**. Liu und Mitarbeiter wiesen in diesen Arbeiten ebenfalls nach, dass die Bildung des Alkoxidkomplexes essentiell für die Katalyse ist. Daraufhin wurden in der Gruppe von Prof. Dr. E. Oldfield (University of Illinois at Urbana-Champaign) ESR-spektroskopische Untersuchungen mit  $^2\text{H}$ ,  $^{17}\text{O}$  und  $^{57}\text{Fe}$ -isotopenmarkierten Verbindungen durchgeführt.<sup>[73, 80a]</sup> Sie wiesen ein frühes IspH-Reaktionsintermediat nach, welches einem  $\pi$ -Komplex zwischen dem Substrat und dem Fe-S-Cluster entspricht. Diese Spezies wurde nach Einelektronenreduktion des Fe-S-Clusters beobachtet und stimmt mit der Substratkonformation in den Kristallstrukturen der IspH-Mutanten (Abbildung 22a-c) überein. Die Bestimmung der entsprechenden Fe-C-Abstände würde die Bildung eines solchen  $\pi$ -Komplexes am Eisen untermauern. Da bislang aber keine Struktur mit einem intakten Fe-S-Cluster berichtet wurde, ist dies vorerst nicht möglich.

Die Kristallstrukturanalyse des IspH:**18**-Komplexes (Abbildung 24a) mit einer Auflösung von  $1.8 \text{ \AA}$  und einem  $R_{\text{free}}$  von 23.4% (Tabelle 14) zeigte einen [4Fe-4S]-Cluster sowie zwei unterschiedliche Alternativkonformationen für den eingebauten Liganden. Da Eisenkomplexe mit Organofluorverbindungen in der Literatur als

äußerst fragwürdig gelten<sup>[104]</sup>, wurde ein Fe-F-Komplex zwischen IspH und **18** ausgeschlossen. Eine Elektronendichte zwischen dem Eisen und dem Ligand ist jedoch eindeutig vorhanden.

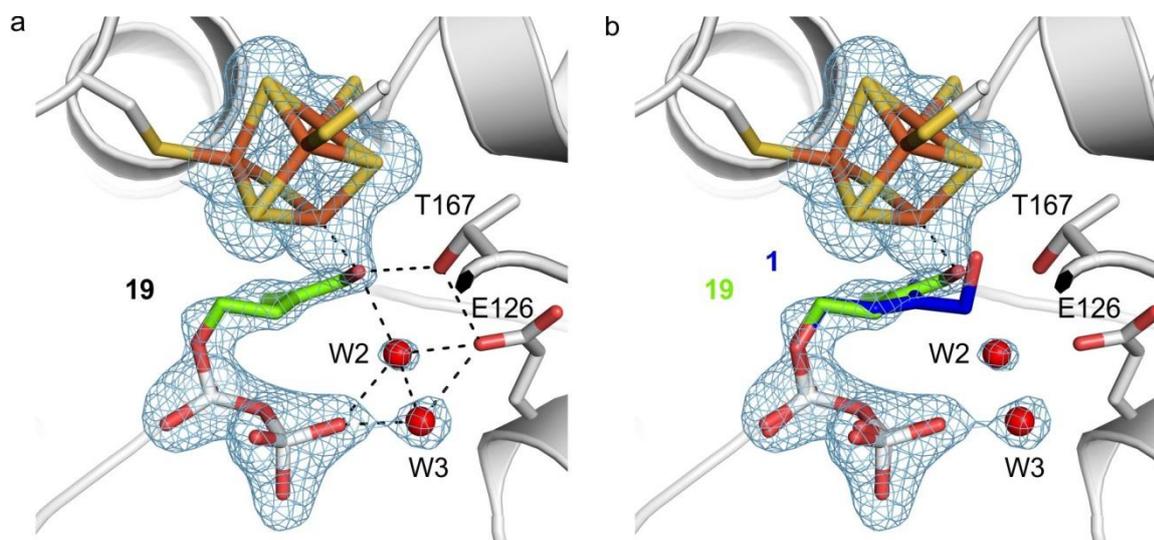


**Abbildung 24** Kristallstruktur von IspH in Komplex mit (*E*)-4-Fluoro-3-methylbut-2-endiphosphat (**18**) aus zwei unterschiedlichen Perspektiven (a) und (b).

Diese Kontroversen erschwerten zunächst die Interpretation der Struktur, sodass die Aktivität von **18** mittels Spektroskopie untersucht wurde. Der hierfür neu entwickelte <sup>19</sup>F-basierter NMR-Assay (3.5.2) ist besonders sensitiv, da die natürliche Häufigkeit der NMR-aktive Spezies 100% entspricht. Die Spektren (7.3) zeigten eine Umsetzung des Substrats, die indirekt über die Entstehung von freiem Fluorid beobachtet wurde. Interessanter war dabei jedoch der Befund, dass **18** in Wasser gelöst über einen Zeitraum von mehreren Tagen hydrolysiert wird (Abbildung 43).

Dementsprechend wurde ein neuer IspH:**18**-Datensatz mit der über sechs Monaten alten wässrigen **18**-Stammlösung aufgenommen. In dieser Struktur ist ausschließlich der Alkoxidkomplex zu sehen. Betrachtet man nun alle Ergebnisse im Zusammenhang mit dem fluorsubstituierten Substrat, stellt man fest, dass die in Türkis dargestellte Konformation in Abbildung 24a das Hydrolyseprodukt **1** darstellt. Die wässrige Lösung von **18** wurde für diese Kristallisation frisch hergestellt. Während der Kristallisationsdauer von etwa sieben Tagen wurde ein geringer Teil schon zu **1** hydrolysiert. In der Kristallstruktur sieht man eine Mittelung über etwa 10<sup>14</sup> Moleküle, so dass in einem Teil der Moleküle das Hydrolyseprodukt **1** gebunden ist. Die Verbindung **18** kann auch in der Kristallstruktur beobachtet werden und nimmt eine bislang nicht beobachtete Konformation ein. Das Fluor geht dabei Wechselwirkungen mit A73O (3.4 Å) und A73C<sup>β</sup> (4.0 Å) ein und dreht sich somit vom Eisen

des Clusters weg. Da eine Fe-F-Bindung nicht beobachtet wurde sind die Ergebnisse im Einklang mit der ESR-Studie, die keine Hyperfeinkopplung von  $^{19}\text{F}$  mit Fe erkennen ließ.



**Abbildung 25** Strukturanalyse von IspH in Komplex mit iso-HMBPP (**19**). (a) Die Kristallstruktur zeigt einen Alkoxidkomplex, der von iso-HMBPP und dem apikalen Eisen gebildet wird. (b) Die Strukturüberlagerung von iso-HMBPP mit dem Substrat (**1**) verdeutlicht die unterschiedlichen Konformationen des natürlichen und synthetischen Ligands.

Das Substratanalogon **19** unterscheidet sich von **1** durch die Lage der Doppelbindung. Die Umsetzung von **19** durch IspH bringt jedoch nur das Produkt IPP (**2**) hervor.<sup>[106]</sup> Daraus leiteten Liu *et al.* folgende Schlussfolgerungen ab: (I) Bei der Bildung des Alkoxidkomplexes **15** liegt das C5 zu weit entfernt von der Protonenquelle vor, sodass die Bildung von DMAPP (**3**) verhindert wird. (II) Die Doppelbindung von **19** ist nicht in die Katalyse involviert. (III) Die Reaktion verläuft über radikalische Intermediate, wodurch der Mechanismus analog zur Birch-Reduktion favorisiert wurde. Um diese Hypothesen zu untersuchen, wurden in einer Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. E. Oldfield kristallographische und ESR-spektroskopische Studien durchgeführt. Die Struktur von IspH in Komplex mit **19** wurde bei 1.9 Å Auflösung und  $R_{\text{free}} = 22.1\%$  (Tabelle 14) gelöst und ist in

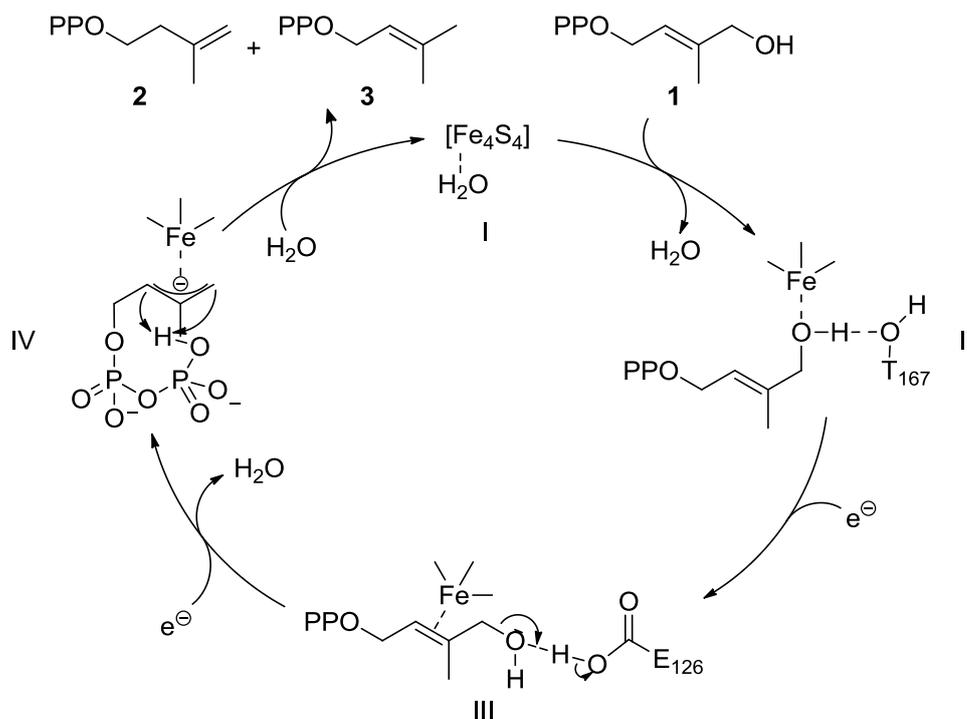
Abbildung 24a dargestellt. Im aktiven Zentrum von IspH sind ein [4Fe-4S]-Cluster, der Ligand sowie zwei Wassermoleküle zu sehen. Die Hydroxygruppe von **19** bildet mit dem Fe-S-Cluster einen Alkoxidkomplex mit einem Fe-O-Abstand von 1.9 Å. Da die Kohlenstoffkette im Vergleich zum Substrat **1** sterisch weniger eingeschränkt ist, kann die Hydroxygruppe die freie Koordinationsstelle am Eisen so besetzen dass der Tetraederwinkel optimal ist. Der Vergleich der aktiven Zentren beider Kristallstrukturen (Abbildung 25b) zeigt, dass durch die neue Position der  $\pi$ -Bindung die Ligandenkonformationen signifikant beeinflusst wird. Betrachtet man die Wassermoleküle in den Positionen W2 und W3 stellt

man fest, dass die entsprechende Elektronendichte in beiden Fällen unterbesetzt ist. Dies deutet darauf hin, dass in der IspH:**19**-Komplexstruktur bereits die Umsetzung von **19** zu **2** erfolgte. Das Wasser in W2-Position resultiert also aus der Dehydratisierung von **19** durch IspH. In allen IspH:Substrat-Strukturen ist diese Position nicht besetzt. Die Hydroxygruppe in der zyklischen Substratkonformation, welche in den IspH-Mutantenstrukturen beobachtet wurde, besetzt ebenfalls die W2-Position. Vermutlich kann man hier die Positionsänderungen der Hydroxygruppe von **1** während der IspH-Reaktion verfolgen. Zunächst befindet sie sich in Position W1 als Alkoxidkomplex am Eisen koordiniert. Dann erfolgt eine Rotation der Hydroxymethylgruppe, die sie in die W2-Position bringt. Nach der Abspaltung wandert das Wasser vermutlich in die W3-Position. Insgesamt zeigt die Struktur von IspH:**19**, dass die Alkoxidkomplexbildung nicht von der Doppelbindung beeinflusst wird und eine wichtige Rolle in der initialen Phase der IspH-Reaktion spielt. Weiterhin bestärkt sie die Annahme, dass das Wassermolekül nach der Abspaltung in W3 lokalisiert ist.

Fasst man die bisher gewonnenen Erkenntnisse zusammen, bekommt man einen Einblick in den Mechanismus der IspH-Reaktion (Abbildung 26). Im aktiven IspH-Protein liegt der Cluster in der [4Fe-4S]-Form vor und ein Wassermolekül besetzt die freie Koordinationsstelle des apikalen Eisens. Wie das Intermediat I (Abbildung 26) aussehen könnte zeigt die IspH-Diphosphat-Struktur in Abbildung 21c. Aufgrund von *Molecular Dynamics*-Berechnungen ist bekannt, dass das Substrat (**1**) in wässriger Lösung eine zyklische Konformation einnimmt, die durch eine H-Brücke von der Hydroxygruppe zu einem Diphosphatsauerstoff stabilisiert wird.<sup>[70]</sup> Bei der Bindung von **1** in das aktive Zentrum von IspH erfolgt eine Rotation der Hydroxymethylgruppe, um den Alkoxidkomplex mit dem Lewis-aziden Eisen des Fe-S-Clusters zu bilden. Das Intermediat II (Abbildung 26) wird durch Koordination mit der Hydroxyfunktion von T167 stabilisiert. Die ionischen Wechselwirkungen der Diphosphatgruppe mit der polaren Region gebildet durch die Aminosäurereste H41, H74, H124, S225 und S269, T168, N227 und Q166 induzieren das Schließen der zentralen Kavität. Die Reduktion des [4Fe-4S]<sup>2+</sup>-Clusters durch Einelektronenübertragung verringert die Lewis-Azidität des apikalen Eisens und führt zur Dissoziation des Alkoxidkomplexes. Hierbei rotiert die Hydroxymethylgruppe um etwa 160 ° und bildet eine H-Brücke mit E126O<sup>6</sup>H. Zusätzliche Stabilität verleiht eine H-Brücke zu der Diphosphatgruppe. Der intermediäre Zustand III (Abbildung 26) wurde bislang nicht direkt in einer IspH:**1**-Kristallstruktur beobachtet, jedoch konnte diese Konformation in allen IspH-Mutantenstrukturen (Abbildung 22) identifiziert werden. Die Bildung eines  $\pi$ -Komplexes zwischen dem Eisen und der Doppelbindung im Substrat wurde sowohl durch die Ergebnisse der

ESR-Spektroskopie als auch der Kristallographie mit dem IspH:**19**-Komplex (Abbildung 26) bekräftigt.

Jüngste ESR-Ergebnisse offenbarten ein neues Intermediat (IV, Abbildung 26) der IspH-Reaktion, welches starke Ähnlichkeit zu den HiPIP-Proteinen<sup>[107]</sup> aufweist. HiPIP-Proteinen verfügen nach der Übertragung von zwei Elektronen über einen  $[4\text{Fe-4S}]^{3+}$ -Cluster. Die Identifizierung einer HiPIP-ähnlichen Spezies, lässt darauf schließen, dass bei der IspH-Reaktion eine Zweielektronenübertragung auf das Substrat stattfindet, wodurch der Cluster die Oxidationsstufe 3+ einnimmt. Dadurch kann eine Beteiligung von radikalischen Spezies ausgeschlossen und der Mechanismus analog der Birch-Reduktion<sup>[71b]</sup> widerlegt werden. Die Protonierung der Hydroxyfunktion durch E126 ermöglicht anschließend eine Wasserabspaltung, wodurch dann ein Carbanion entsteht. Das Intermediat IV entspricht wahrscheinlich der Spezies in der IspH:**16**-Kristallstruktur (Abbildung 19b).



**Abbildung 26** Postulierter Reaktionsmechanismus der IspH-Reaktion. Die reduktive Dehydratisierung des Allylalkohols **1** verläuft über vier Intermediate.

Das delokalisierte Carbanion wird vom apikalen Eisen stabilisiert. Hierbei findet ein Wechsel der Fe-Koordinationssphäre von tetraedrisch zu oktaedrisch statt. Diese Eigenschaft zeichnet Proteine mit einem  $[4\text{Fe-4S}]$ -Cluster aus und liefert eine mögliche Erklärung warum sich dieser Kofaktor in der Evolution für IspH durchgesetzt hat. Aus der IspH:**16**-Kristallstruktur wurde ermittelt, dass die am nächsten gelegene Protonenquelle die Diphosphatgruppe ist. Diese sollte unter physiologischen Bedingungen mindestens über ein protoniertes

Sauerstoffatom verfügen. Hierbei ist die Distanz vom nächstgelegenen protonierten Diphosphatsauerstoff zu C2 deutlich kürzer (3.2 Å) als zu C4 (3.6 Å) und steht im Einklang mit dem Produktverhältnis von 6:1 (2:3). Somit wurden bei der IspH-Reaktion zwei Elektronen von dem [4Fe-4S]-Cluster auf das Substrat übertragen, sowie zwei Protonen von E126 und der Diphosphatfunktion. Die Erzeugung von zwei negativen Ladungen im aktiven Zentrum führt zu einer Abstoßung zwischen E126 und Substrat und induziert das Öffnen der zentralen Kavität, um die Dissoziation des gebildeten Produkts zu ermöglichen. Zusammengefasst ermöglichen diese Ergebnisse einen detaillierten Einblick in den Mechanismus der IspH-Reaktion, der in Abbildung 26 dargestellt ist.

## 4.7 Strukturbestimmung von *E. coli* IspH in Komplex mit Inhibitoren

Während dieser Arbeit wurden neuartige und wirksame Inhibitoren von IspH veröffentlicht.<sup>[80a]</sup> In einer ESR-spektroskopischen Studie unterstützt durch *Computational Docking* und quantenchemischen Berechnungen wurden zunächst viele kleine Moleküle mit unterschiedlichen Strukturmerkmalen und funktionellen Gruppen untersucht. In den anfänglichen Experimenten zeigte sich bei Nitrilen, Alkinen und Pyridinen eine starke Veränderung im ESR-Spektrum. Diese Verbindungen wurden nun mit einem Diphosphatrest synthetisiert und erneut untersucht. Sowohl ESR- und Mößbauer-Spektroskopie als auch Aktivitätstests mit *A. aeolicus* IspH zeigten eine Inhibition des Proteins, wobei Nitrile das geringste Potential aufwiesen. Auf dieser Basis wurde ein Bindungsmodell mit einem  $\pi$ -Komplex oder einem Metallazyklus ( $\sigma$ -Komplex) für die Alkinverbindungen vorgeschlagen (vgl. Dewar-Chatt-Duncanson).<sup>[108]</sup> Für die Pyridine wurde die Interaktion des Stickstoffs mit E126O<sup>E</sup> als dominierende Wechselwirkung postuliert.<sup>[73, 80a]</sup>

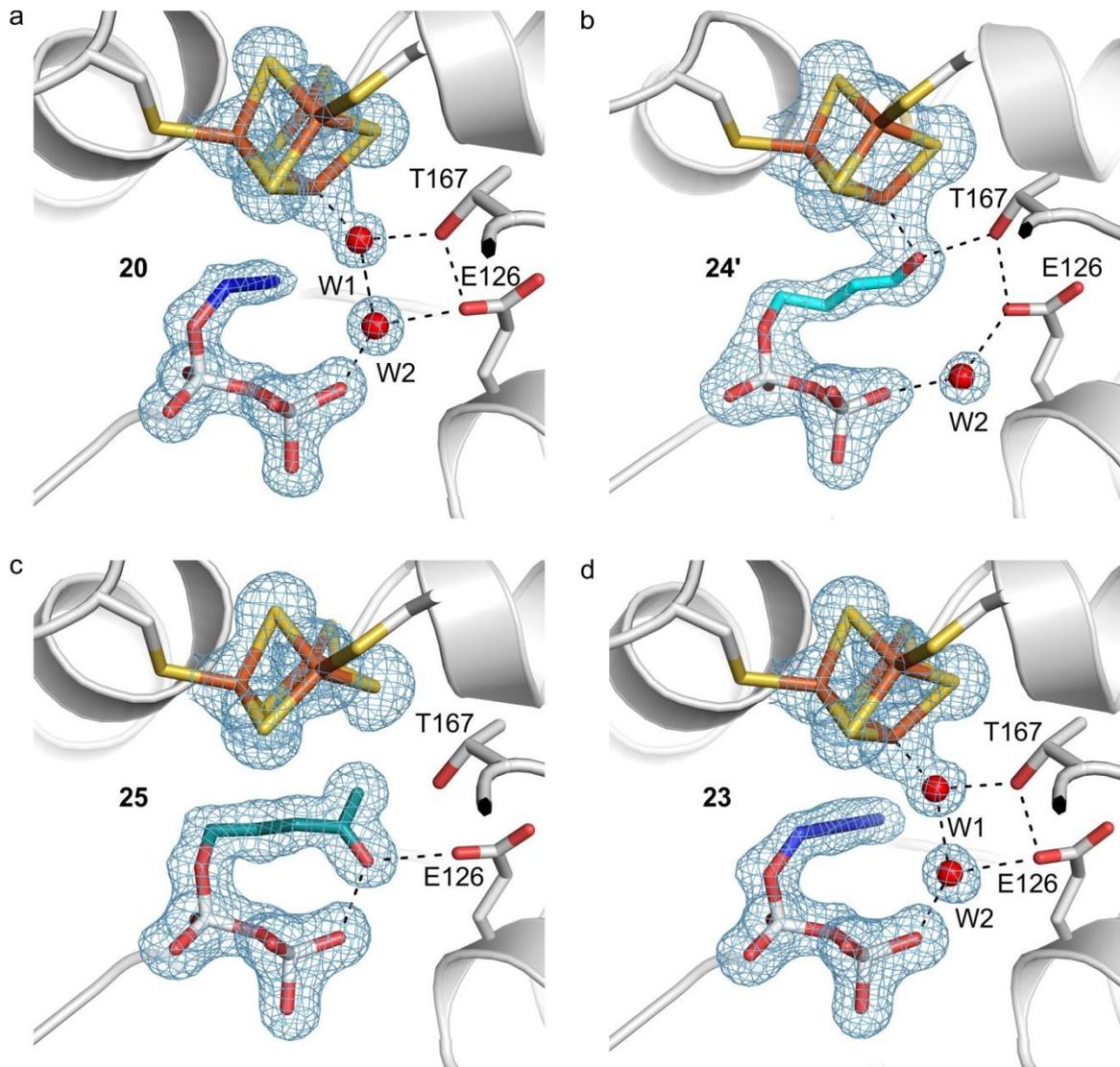
**Tabelle 11** IspH-Inhibitoren, die im Rahmen dieser Arbeit charakterisiert wurden.<sup>[73, 80a]</sup>

Verbindung	IC <sub>50</sub> [ $\mu$ M] für <i>E.c.</i> IspH	IC <sub>50</sub> [ $\mu$ M] für <i>A.a.</i> IspH
<b>20</b>	15.7	6.7
<b>21</b>	0.34	0.45
<b>22</b>	116	6.7
<b>23</b>	166	
<b>24</b>	537	
<b>26</b>	466	
<b>27</b>	166	
<b>28</b>		
<b>29</b>		26
<b>30</b>	378	
<b>31</b>		149
<b>32</b>		1200

Diese Ergebnisse waren ausschlaggebend für eine Zusammenarbeit mit Prof. Dr. E. Oldfield mit dem Fokus auf die strukturelle Charakterisierung und Ermittlung der Struktur-Funktions-Beziehung der Inhibitoren. Die in Tabelle 11 gezeigten Substanzen wurden von seiner Arbeitsgruppe hierfür zur Verfügung gestellt. Die Alkine beinhalteten die effektivsten Verbindungen und wurden zuerst für Kristallisationsansätze verwendet.

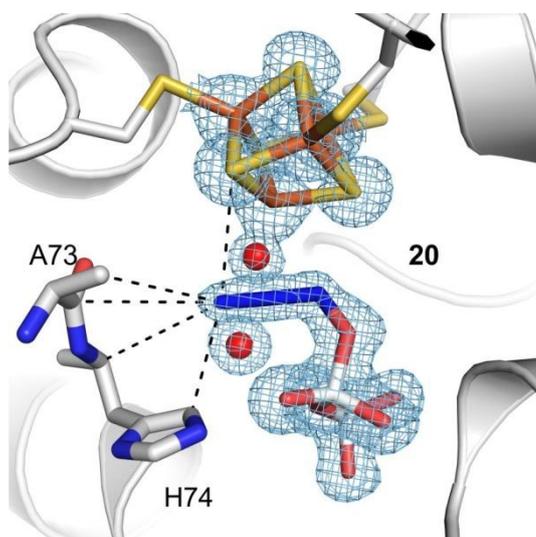


**Abbildung 27** Acetylenverbindungen, die mit IspH kokristallisiert wurden.



**Abbildung 28** Kristallstrukturen von IspH in Komplex mit Acetyleninhibitoren. (a) In der Komplexstruktur von IspH mit dem kürzesten Alkin **20** wird der [4Fe-4S]-Cluster durch ein Wassermolekül stabilisiert. Die Kohlenstoffkette des Inhibitors orientiert sich in eine hydrophobe Gegend. (b) Die Struktur von IspH mit dem C4-Alkin **24** weist den Alkoxidkomplex **24'** im aktiven Zentrum von IspH auf. Die Länge des terminalen Kohlenstoffs ist ideal für eine Wechselwirkung mit dem Fe-S-Cluster. (c) Die IspH-Struktur in Komplex mit dem längsten Alkin **22** zeigt das Hydratisierungsprodukt **25** in der zentralen Kammer von IspH. (d) Im aktiven Zentrum der IspH:**23**-Kristallstruktur liegt der Ligand analog zu Verbindung **20** vor.

Die Kristallstruktur von IspH in Komplex mit **20** (Abbildung 28a) wurde bei 1.5 Å Auflösung und  $R_{\text{free}} = 21.2\%$  (Tabelle 15) erhalten. Das Protein liegt in der geschlossenen Konformation vor und das Proteinrückgrat ist nahezu identisch mit der IspH:**1**-Struktur. Die Diphosphatgruppe des gut definierten Liganden ist in der gleichen Bindungstasche lokalisiert wie im IspH:**1**-Komplex. Überraschenderweise interagiert die Alkinfunktion nicht mit dem Fe-S-Cluster, sondern dreht sich in eine hydrophobe Region (Abbildung 29) und wechselwirkt mit H74C<sup>δ</sup> (3.3 Å), A73C<sup>β</sup> (3.6 Å), dem nächstgelegenen Schwefel des Fe-S-Clusters (3.6 Å), A73C(=O) (4.1 Å) sowie H74C<sup>α</sup> (4.4 Å).



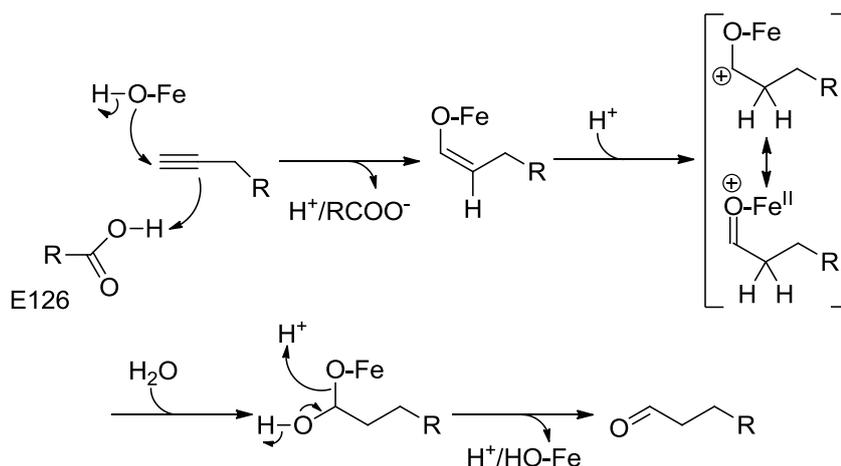
**Abbildung 29** Detaillierte Ansicht des aktiven Zentrums von IspH in Komplex mit **20**. Aus dieser Perspektive erkennt man die hydrophoben Wechselwirkungen mit den Aminosäureresten von A73 und H74. Bei den Liganden **23** und **27** sind die Interaktionen sehr ähnlich.

Eine der postulierten  $\pi$ - oder  $\pi/\sigma$ -Spezies wurden in dieser Kristallstruktur nicht beobachtet. Die tetraedrische Koordinationssphäre des [4Fe-4S]-Clusters wird hier durch ein Wassermolekül (W1-Position) vervollständigt. Zudem befindet sich ein zweites definiertes Wassermolekül in der W2-Position. Die Koordination des H<sub>2</sub>O in W1-Position an das apikale Eisen erklärt die Veränderung des ESR-Spektrums bei Zugabe von **20** zu IspH. In dieser Komplexstruktur wurde zum ersten Mal ein intakter [4Fe-4S]-Cluster beobachtet, der nicht durch einen sauerstoffhaltigen Liganden stabilisiert wurde. Warum kann in diesem Fall ein Wassermolekül das apikale Eisen stabilisieren und in den IspH-Komplexen mit IPP, DMAPP oder dem Diphosphatanion nicht? Möglicherweise verhindert die verzweigte Struktur von **2** und **3** die Orientierung in die gleiche hydrophobe Region wie bei **20**. Im IspH:**17**-Komplex könnte die Hydrathülle des stark negativ geladenen Ions eine Rolle spielen. Durch ihre Größe wird die Kristallisation mit der [3Fe-4S]-Form des Clusters begünstigt. Jedenfalls ist das am

Eisen gebundene Wassermolekül in der IspH:**20**-Struktur entscheidend an der Inhibition beteiligt.

Das um einen Kohlenstoff verlängerte Alkin **21** konnte ebenfalls mit IspH kristallisiert werden (Abbildung 28b). Die Komplexstruktur wurde bei einer Auflösung von 1.9 Å mit einem  $R_{\text{free}}$  von 22.7% (Tabelle 15) gelöst und zeigt einen [4Fe-4S]-Cluster sowie einen Alkoxidkomplex. Dank der hohen Auflösung der Kristallstruktur erkannte man bereits beim Betrachten der unverfeinerten Daten, dass die Konstitution des Liganden **21** nicht mit der Elektronendichte vereinbart werden konnte. Der Verlauf der Kohlenstoffkette zeigte starke Abweichungen von den erwarteten Winkeln. Im Vergleich dazu wurde in der Elektronendichte von IspH:**20** die gerade Alkinfunktionalität erkannt. Die Affinität von Eisen zu Sauerstoffverbindung deutete darauf hin, dass ein Sauerstoffatom durch eine chemische Umwandlung in den Liganden eingeführt wurde. NMR-Spektroskopie bestätigte diese Annahme und identifizierte den Aldehyd **24** als Reaktionsprodukt. Zudem stellte man fest, dass nur oxidiertes IspH-Protein die Hydratisierung der Alkinverbindung katalysiert. Der Oxidationszustand von IspH nach der Proteinreinigung wurde durch ESR-Spektroskopie bestimmt. Der Fe-S-Cluster liegt ausschließlich in der oxidierten [4Fe-4S]<sup>2+</sup>-Form vor, obwohl während der Reinigung geringe Mengen an Reduktionsmittel zugegeben wurden, um das Protein vor O<sub>2</sub> zu schützen. Die Kristallstruktur des Komplexes von IspH mit dem Enolintermediat **24'** erklärt nicht nur die niedrigen IC<sub>50</sub>-Werte in den Aktivitätsassays sondern eröffnet auch eine ganz neue Perspektive der katalytischen Eigenschaften von IspH. Neben der *in vivo* katalysierten Reduktion von Allylalkoholen kommt die neu entdeckte Hydratisierung von Alkinen *in vitro* hinzu.

Vergleiche mit der Literatur über Eigenschaften und Reaktivität von Acetylenen<sup>[109]</sup> ermöglichten den Vorschlag eines Mechanismus für diese IspH-katalysierte Hydratisierung von Alkinen. Wie in Abbildung 30 dargestellt, erfolgt ein nukleophiler Angriff des Hydroxidions oder Wassermoleküls am Lewis-aziden Eisen an den terminalen Kohlenstoff des Liganden. Unter Protonierung des internen Alkinkohlenstoffs durch E126O<sup>6</sup>H entsteht ein Fe-Enolat-Komplex. Dieses Intermediat wurde in der Kristallstruktur von IspH:**24'** (Abbildung 28b) beobachtet. Protonenübertragung auf den gebildeten Komplex führt zur Entstehung eines delokalisierten Carbanions/Oxoniumions, an dem ein Wassermolekül angreifen kann. Da in der IspH:**24'**-Komplexstruktur genau ein Wassermolekül in der W2-Position lokalisiert ist, kommt nur dieses Molekül für den Angriff an das Carbanion in Frage. Das entstandene Halbacetal wird unter Regenerierung des Eisenhydroxidkomplexes in den Aldehyd überführt.



**Abbildung 30** Mechanismus nach dem die IspH-katalysierte Hydratisierung ablaufen könnte.

Auch die Elektronendichte des Liganden im IspH:**22**-Komplex (Abbildung 28c) wich signifikant von den Erwartungen ab. Die Kristallstruktur wurde bei einer Auflösung von 1.7 Å und  $R_{\text{free}}$  von 20.6% (Tabelle 15) bestimmt und zeigte eine verzweigte Spezies im aktiven Zentrum von IspH, die nicht mit dem eingesetzten Inhibitor **22** im Einklang ist. Hier fand erneut eine chemische Reaktion der Substanz statt. Mit Hilfe von NMR-Spektroskopie konnte die Identität des modifizierten Alkins geklärt werden, die durch IspH zum Keton **25** hydratisiert wurde. Das Keton ist in der Struktur so lokalisiert, dass es sowohl mit E126 als auch mit seiner Diphosphatgruppe eine Stabilisierung durch H-Brückenbildung erfährt.

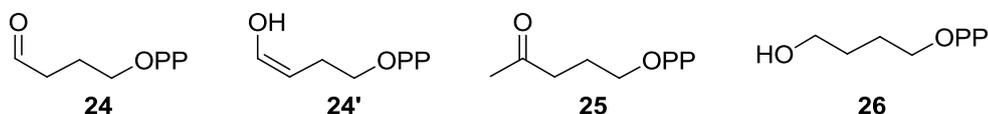
Warum wurde in diesem Fall ein Keton und kein Aldehyd gebildet? Die Erklärung hierfür erhält man aus einem Vergleich der bislang charakterisierten Alkinverbindungen, die sich nur in der Länge der Kohlenstoffkette unterscheiden. Verbindung **20** mit einer C<sub>3</sub>-Kette scheint zu kurz für eine Wechselwirkung mit dem Eisen an der Spitze des Fe-S-Clusters zu sein. Deshalb rotiert es in eine hydrophobe Tasche und ermöglicht die Koordination eines Wassermoleküls an das Fe. Die C<sub>4</sub>-Verbindung **21** hat die gleiche Länge wie das natürliche Substrat, wodurch das terminale C vom Fe-gebundenen Hydroxidion angegriffen werden kann und das Anti-Markovnikov-Produkt gebildet wird. Wird die C-Kette jedoch um ein weiteres Kohlenstoffatom verlängert, ist die interne Position der Alkingruppe besser für den Angriff durch die Hydroxygruppe geeignet. Folglich kann die Hydratisierung des Liganden ausschließlich nach Markovnikov an der C4-Position erfolgen.

Im Gegensatz zu den bislang ausgewerteten Strukturen weist IspH:**22**-Komplexstruktur einen [3Fe-4S]-Cluster im aktiven Zentrum auf. Eine denkbare Möglichkeit ist der Verlauf der Hydratisierung über einen alternativen Mechanismus. Die verbrückenden Schwefelatome des Clusters könnten hierbei an der Katalyse beteiligt sein. Eine weitere Erklärung stellt die Dissoziation des vierten Eisens nach der Hydratisierung dar, da der Ligand keine Stabilität

mehr liefert und somit kein zusätzliches Wassermolekül in der zentralen Kammer diese Aufgabe übernehmen kann. Man könnte auch in Erwägung ziehen, dass eine Umsetzung von **22** durch [4Fe-4S]-IspH stattfindet, gefolgt von dem Austritt des Moleküls aus der zentralen Kammer. Das Keton **25** kann dann erneut mit [3Fe-4S]-IspH auskristallisieren.

Die anschließende Komplexstruktur aus dieser Reihe stellt IspH:**23** (Abbildung 28d) mit 1.6 Å Auflösung und einem  $R_{\text{free}}$  von 22.1% (Tabelle 15) dar. Dieses Alkin entspricht der methylsubstituierten Verbindung **20** und richtet sich im aktiven Zentrum von IspH analog dazu aus. Es besetzt erneut die hydrophobe Region und geht Wechselwirkungen mit den Aminosäuren H74C<sup>δ</sup> (3.3 Å), A73C(=O) (3.3 Å), A73C<sup>β</sup> (3.4 Å), sowie einem Schwefel des Cluster (3.7 Å) ein. Darüber hinaus befindet sich im aktiven Zentrum der [4Fe-4S]-Kofaktor und zwei Wassermoleküle an der gleichen Stelle wie in der IspH:**20**-Struktur. Diese Kristallstrukturanalyse bestätigt erneut die Annahme, dass eine Umsetzung nur bei Anwesenheit einer terminalen Alkinfunktionalitäten in C4-Position möglich ist.

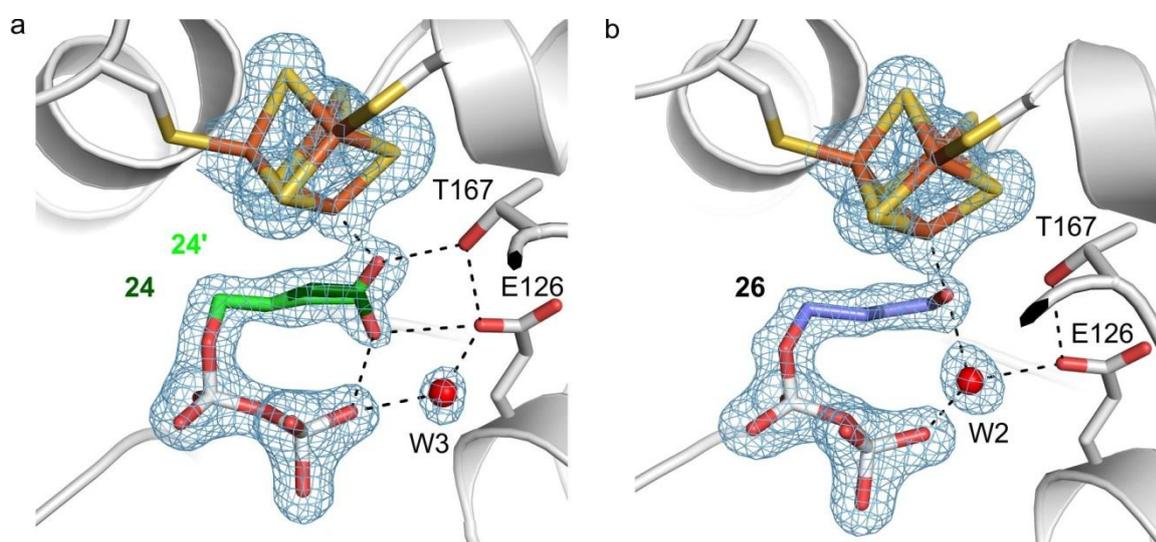
Da die bisherigen Ergebnisse dieser Arbeit gezeigt haben, dass IspH nur mit sauerstoffhaltigen Liganden eine koordinative Bindung eingehen kann, wurden Verbindungen **24** und **26** synthetisiert und strukturell charakterisiert. Der Aldehyd **24** war zudem von großem Interesse, als dass er dem Hydratisierungsprodukt von **21** entspricht.



**Abbildung 31** Liganden, die in der IspH-Struktur beobachtet wurden.

Die IspH:**24**-Kristallstruktur wurde mit einer Auflösung von 1.8 Å und einem  $R_{\text{free}}$  von 26.8% (Tabelle 16) erhalten und zeigt einen [4Fe-4S]-Cluster, ein H<sub>2</sub>O in W3-Position sowie zwei alternative Ligandkonformationen (Abbildung 32a). Die schwache Besetzung der Elektronendichte am verzweigten Ende schließt eine Hydratisierung von **24** zu einem Diol aus. Die Elektronendichte der Diphosphatgruppe ist eindeutig definiert. Eine alternative Konformation ist erst ab dem C2-Atom zu erkennen. Der in Hellgrün dargestellte Ligand bildet einen Alkoxidkomplex mit dem Fe-S-Cluster, der durch die Aminosäureseitenkette von T167 stabilisiert wird. Diese Anordnung entspricht der in Abbildung 28b dargestellten IspH:**24'**-Struktur und hat große Ähnlichkeit mit dem IspH:Substrat-Komplex in Abbildung 19a. Die alternative Konformation ist hier in dunkelgrün dargestellt und entspricht eher der zyklischen Substratanordnung, die in den IspH-Mutanten beobachtet wurde (Abbildung 22).

Basierend auf den kristallographischen Ergebnissen würde man vermuten, dass sowohl das Alkin **21** als auch der Aldehyd **24** ähnliche Inhibition von IspH aufweisen. Erstaunlicherweise ist der  $IC_{50}$ -Wert des Aldehyds um den Faktor 1500 größer als der des Alkins (Tabelle 11). Diese unerwartete Diskrepanz kann auf den Oxidationszustand des Fe-S-Cluster zurückgeführt werden. Die Kristallansätze wurden mit Protein in oxidiertem Zustand durchgeführt. Für Enzymaktivitätsmessungen und  $IC_{50}$ -Bestimmungen wurde das Protein zunächst reduziert bevor es mit dem Liganden inkubiert wird. Folglich kann eine Alkoxidkomplexbildung des Liganden mit Fe nur bei einem oxidierten Fe-S-Cluster erfolgen, woraus die schlechte Inhibition von **24** resultiert. Die gute Inhibition von **21** ist möglicherweise auf eine  $\pi$ -Interaktion des Alkins mit dem Eisen zurückzuführen.



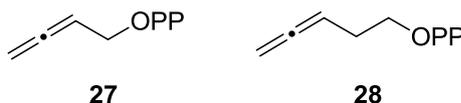
**Abbildung 32** Kristallstrukturen von IspH in Komplex mit (a) 4-Oxobutyldiphosphat (**24**) und (b) 4-Hydroxybutyldiphosphat (**26**).

Die Verbindung **26** ist zwar mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 466 (Tabelle 11) kein vielversprechender Inhibitor, aus mechanistischen Gesichtspunkten jedoch sehr interessant. Der Alkohol **26** entspricht dem natürlichen IspH-Substrat ohne Methylgruppe und Doppelbindung. Die Kristallstruktur des IspH:**26**-Komplexes wurde bei einer Auflösung von 1.7 Å und  $R_{\text{free}}$  von 20.4% (Tabelle 16) ermittelt und zeigt einen Alkoxidkomplex zwischen dem Alkohol und dem Fe des Clusters. Aufgrund der höheren strukturellen Flexibilität befindet sich der Ligand nicht in der identischen Position wie das Substrat **1** im aktiven Zentrum. Der Abstand des Sauerstoffs zum Eisen ist geringfügig kürzer (2.0 Å) als in der IspH:**1**-Struktur (2.1 Å), wodurch ein Wassermolekül in der W2-Position Platz findet.

Aktivitätsstudien zeigten dass **26** von IspH weder in oxidiertem noch in reduzierter Form umgesetzt wird. Dies unterstützt die Annahme, dass die Alkoxidkomplexbildung eine Art Vororientierung des Substrats im aktiven Zentrum bewirkt, die Dehydratisierung jedoch aus

einer anderen Konformation erfolgt. Zudem scheint die  $\pi$ -Bindung eine entscheidende Rolle bei der katalytischen Aktivität zu spielen. Durch eine  $\pi$ -Wechselwirkung zwischen Fe-S-Cluster und Doppelbindung könnte eine Aktivierung erfolgen, die die Abspaltung des Hydroxidions ermöglicht oder die Elektronenübertragung vom Cluster auf das Substrat erleichtert.

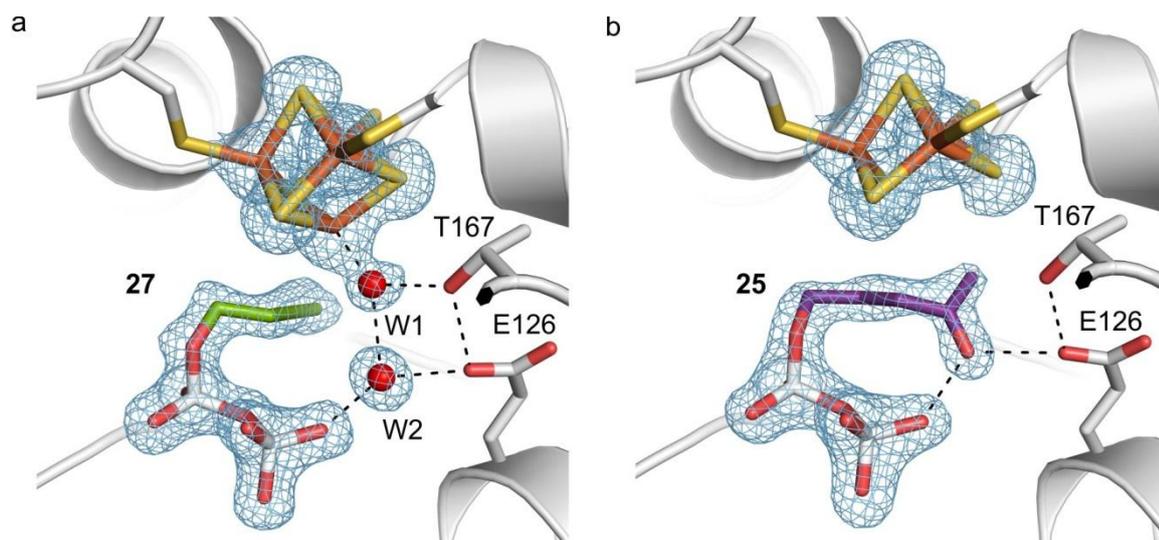
Von den bislang beschriebenen Strukturen wurden nur **21** und **22** durch IspH hydratisiert. Deshalb wurden die entsprechenden Tautomere **27** und **28** untersucht.



**Abbildung 33** Allenverbindungen, die an das aktive Zentrum von IspH binden.

Die Komplexstruktur von IspH:**27** erhielt man mit 1.6 Å Auflösung und  $R_{\text{free}} = 21.0\%$  (Tabelle 16). Im aktiven Zentrum beobachtet man eine zu **23** analoge Ligandenkonformation. Das Allen besetzt die hydrophobe Region mit den folgenden Abständen zu den Aminosäureresten: A73C(=O) (3.1 Å), A73C<sup>β</sup> (3.2 Å), H74C<sup>δ</sup> (3.3 Å), H74C<sup>α</sup> (3.6 Å) sowie S<sub>Cluster</sub> (3.6 Å). Analog zu der IspH:**23**-Struktur sind ein [4Fe-4S]-Cluster und zwei Wassermoleküle im W1- und W2-Position vorhanden. Warum kann IspH das Alkin **21** hydratisieren, die tautomere Verbindung **27** hingegen nicht? Der terminale Allenkohlenstoff könnte aufgrund seiner  $sp^2$ -Hybridisierung zu unreaktiv für einen Angriff durch das Hydroxid/Wasser am Eisen zu sein. Die bislang in die Hydratisierung involvierten Alkinkohlenstoffe weisen eine  $sp$ -Hybridisierung auf, die sich in diesen Fällen besser für den nukleophilen Angriff eignen. Andererseits könnte eine ungünstige Orientierung der beteiligten Orbitale die Inertheit des Allens begründen.

Die IspH:**28**-Kristallstruktur mit einer Auflösung von 1.8 Å und  $R_{\text{free}}$  von 21.4% (Tabelle 16) ist fast identisch zu der Struktur des Tautomers **22**. Hierbei wird das Hydratisierungsprodukt **25** sowie ein [3Fe-4S]-Cluster im aktiven Zentrum von IspH beobachtet. Da der mittlere Kohlenstoff des Allens ebenfalls eine  $sp$ -Hybridisierung aufweist, kann in diesem Fall auch ein nukleophiler Angriff erfolgen und **20** wird von oxidiertem IspH hydratisiert. Folglich scheint die Hybridisierung am C4-Atom das entscheidende Kriterium für die Hydratisierung durch IspH zu sein.



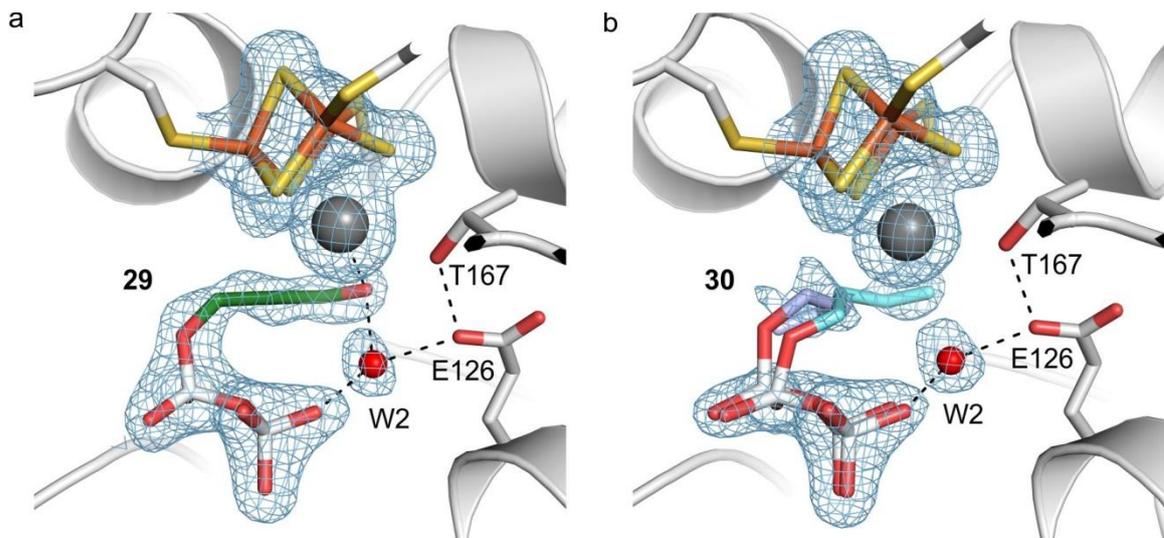
**Abbildung 34** IspH-Komplexstrukturen mit Allenverbindungen. (a) In der IspH:27-Kristallstruktur orientiert sich der Ligand in einer hydrophoben Region und weist keine Interaktion mit dem Fe-S-Cluster auf. (b) Die Kristallstruktur von IspH und dem C5-Allen **28** zeigt ebenfalls das Hydratisierungsprodukt **25** im aktiven Zentrum von IspH.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei weitere Verbindungen charakterisiert, die über strukturelle Ähnlichkeit mit bereits vorgestellten IspH-Liganden verfügen. Im Vergleich zu **1** ist bei Alkohol **29** die Doppelbindung durch eine Dreifachbindung ersetzt und die Methylgruppe am C3 entfernt. Weiterhin ist **29** analog zur Verbindung **23** zu sehen, wobei am terminalen Kohlenstoffatom eine Alkoholfunktion eingeführt wurde. Das Alken **30** entspricht dem Produkt **2** wobei eine Methylgruppe fehlt.



**Abbildung 35** Weitere IspH-Inhibitoren die in Komplex mit dem Protein kristallisiert wurden.

Die Kristallstruktur von IspH in Komplex mit **29** (Abbildung 36a) wurde mit 2.0 Å Auflösung und  $R_{\text{free}} = 25.2\%$  (Tabelle 17), die IspH:30-Struktur bei einer Auflösung von 1.8 Å und einem  $R_{\text{free}}$  von 24.1% (Tabelle 17) erhalten. Beide Strukturen weisen einen unter den IspH-Strukturen einzigartigen Heterometallcluster auf. Die Natur des Heterometalls X im [X-3Fe-4S]-Cluster konnte bislang nicht ermittelt werden. Deshalb kann über die Herkunft des Heterometalls nur spekuliert werden. Da Heterometall-Eisen-Schwefel-Cluster mit Molybdän, Vanadium und Nickel bekannt sind, kommen diese Elemente für die grau dargestellten Atome in die engere Auswahl.<sup>[13-14, 24]</sup>



**Abbildung 36** IspH-Kristallstrukturen mit einem Heterometallcluster. Die IspH:29-Struktur (a) sowie die IspH:30-Struktur (b) weisen eine ungewöhnlich große Elektronendichte an der zugänglichen Seite des Fe-S-Clusters. Die modifizierte Koordinationssphäre ermöglicht die Einlagerung des in Grau dargestellten, bislang unbekanntes Heterometalls.

Aufgrund des starren Kohlenstoffgerüsts bei der IspH:29-Struktur kann die Hydroxyfunktion nicht den optimalen Tetraeder mit dem Eisen des Fe-S-Clusters bilden. Durch die veränderte Koordinationsumgebung entsteht ein vergrößerter Raum, der als Ionenkäfig fungiert. Dies könnte dazu beitragen dass IspH in Komplex mit **29** ein Heterometall anstatt des apikalen Eisens koordiniert. Die X-S-Abstände in der Kristallstruktur sind zwischen 2.45 – 2.54 Å im Vergleich dazu sind die Fe-S-Bindungen deutlich kürzer (2.26 – 2.32 Å). Das Heterometall ist in einer definierten Koordinationssphäre gefangen und wechselwirkt sowohl mit dem Ligand (X-O = 3.0 Å, X-C3 = 3.1 Å, X-C2 = 3.2 Å) als auch mit T167O<sup>γ</sup> (3.2 Å). Die Ligandenkonformation wird zusätzlich durch hydrophobe Interaktionen zwischen der Alkinfunktion und einem verbrückenden Schwefel des Clusters stabilisiert (S-C3 = 3.1 Å, S-C2 = 3.4 Å). Das Wassermolekül befindet sich in einem Abstand von 4.1 Å vom Heterometall. Diese Umgebung lässt kaum Spielraum in der Größe des koordinierten Metalls, deshalb wird vermutet, dass in beiden Strukturen dasselbe Element eingelagert ist.

In der IspH:30-Komplexstruktur (Abbildung 36b) sind zwei alternative Substratkonformationen zu sehen. Die in Violett dargestellte Konformation weist keine Wechselwirkung mit dem Fe-S-Cluster auf und wird vorwiegend durch Interaktion mit einem Diphosphatsauerstoff (2.1 Å) stabilisiert. Die Aminosäurereste S269O<sup>γ</sup> (3.1 Å), V15C<sup>γ</sup> (3.2 Å) und V40C<sup>γ</sup> (3.5 Å) tragen zusätzlich zur Stabilisierung bei. Analog zur IspH:29-Struktur ist das Heterometall durch eine Vielzahl von Interaktionen fest eingebunden. Die X-S-Abstände belaufen sich auf 2.60 – 2.65 Å, die Fe-S-Bindungen hingegen auf 2.27 – 2.29 Å.

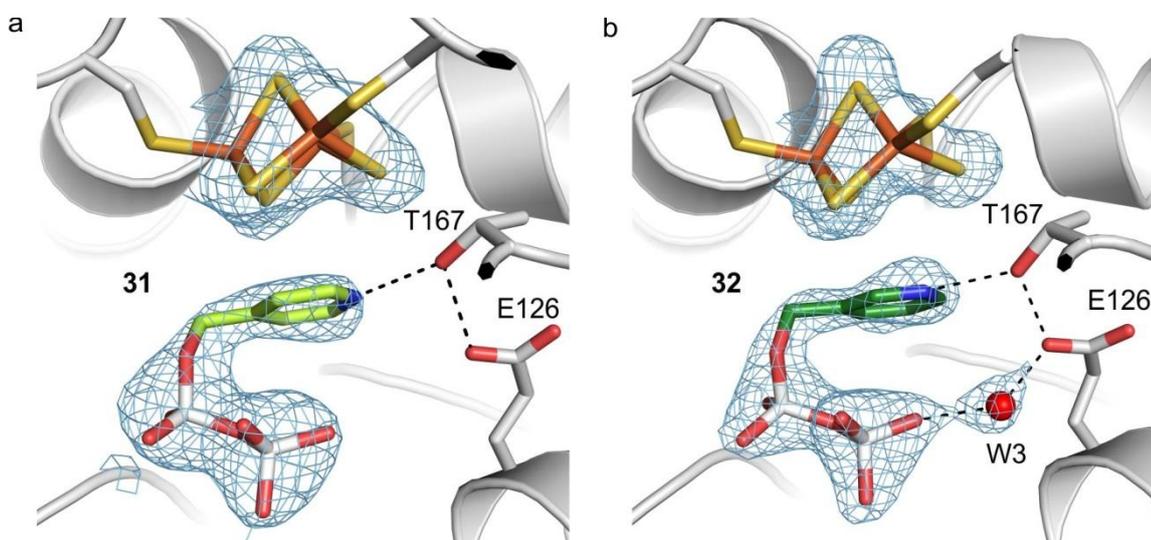
Die Wechselwirkungen mit dem Ligand ( $X-C4 = 2.8 \text{ \AA}$ ,  $X-C3 = 3.2 \text{ \AA}$ ), mit  $T167O^\gamma$  ( $3.1 \text{ \AA}$ ) und mit dem Wassermolekül ( $3.8 \text{ \AA}$ ) komplettieren die Koordinationssphäre.

Die beiden letzten Verbindungen die in diesem Projekt untersucht wurden gehören der Klasse der Pyridine an. Das 4-substituierte Pyridin **31** zeigt eine deutlich höhere Inhibition gegenüber *A. aeolicus* IspH als die 2-substituierte Verbindung **32**.



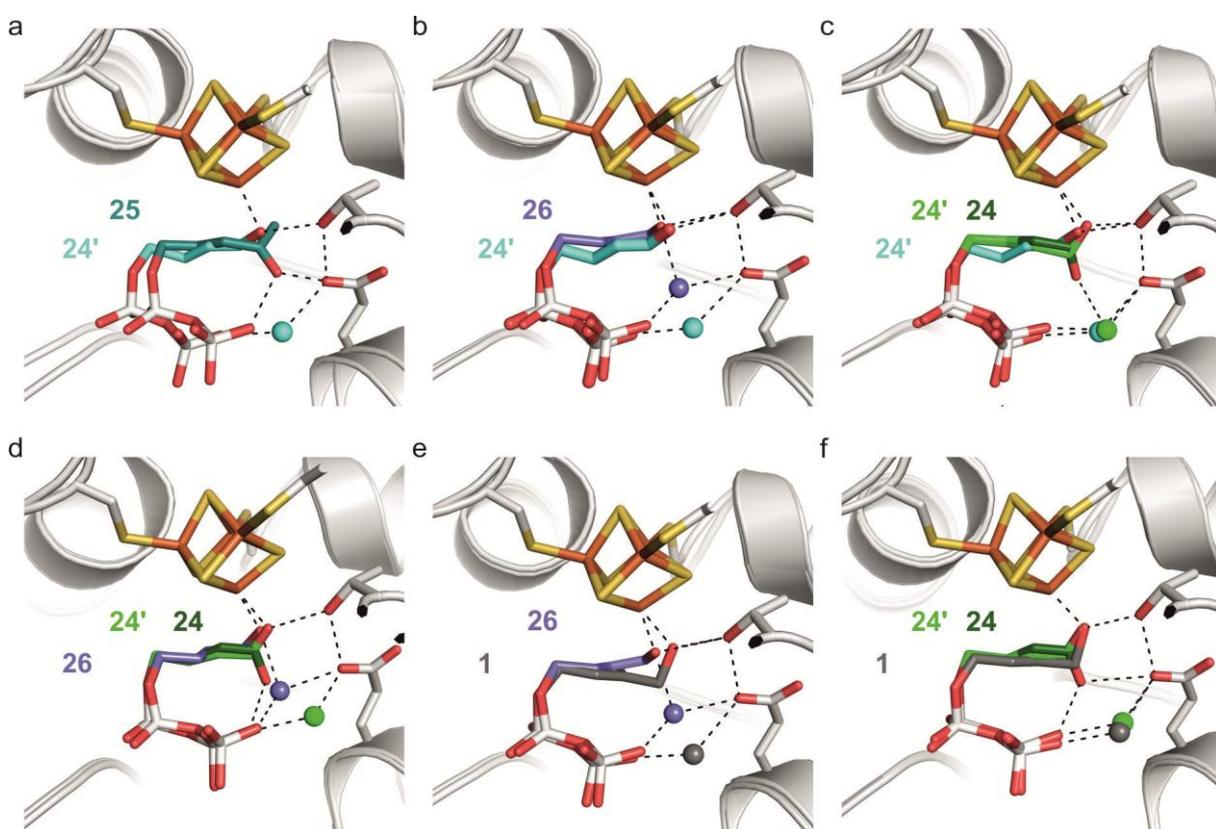
**Abbildung 37** Pyridininhibitoren von IspH.

Der Ligand **31** sowie ein  $[3Fe-4S]$ -Cluster sind im aktiven Zentrum der IspH:**31**-Struktur (Abbildung 38a) mit  $2.7 \text{ \AA}$  Auflösung und einem  $R_{\text{free}}$  von 25.8% (Tabelle 17) lokalisiert. Analog zu den bislang berichteten Kristallstrukturen befindet sich die Diphosphatgruppe in der stark polaren Bindungstasche. Die Konformation des Liganden wird durch hydrophobe Wechselwirkungen mit allen verbrückenden S-Atomen stabilisiert ( $3.2 - 3.7 \text{ \AA}$ ). Der Pyridinstickstoff geht nur schwache Wechselwirkungen mit  $V99C^\gamma$  ( $3.6 \text{ \AA}$ ),  $E126^\epsilon$  ( $3.8 \text{ \AA}$ ),  $A73C=O$  ( $3.9 \text{ \AA}$ ) und  $T167O^\gamma$  ( $4.0 \text{ \AA}$ ) ein. Aufgrund der weniger guten Auflösung im Vergleich zu den bislang beschriebenen Strukturen kann über die Anwesenheit von Wassermolekülen keine klare Aussage getroffen werden.



**Abbildung 38** IspH-Pyridin-Komplexstrukturen. (a) In der Kristallstruktur von IspH mit dem 4-substituierten Pyridin **31** befindet sich ein  $[3Fe-4S]$ -Cluster im aktiven Zentrum. Der Stickstoff wird durch Interaktionen mit  $T167$  stabilisiert. (b) Die Struktur von IspH in Komplex mit dem 2-substituierten Pyridin **32** zeigt ein ähnlich orientierten Liganden wie in (a) und einen  $[3Fe-4S]$ -Cluster im Zentrum.

Die Komplexstruktur von IspH mit **32** konnte bei einer Auflösung von 1.9 Å mit einem  $R_{\text{free}}$  von 24.7% (Tabelle 17) erhalten werden. Sie in Abbildung 38b dargestellte Struktur zeigt, dass die Lage des Pyridinligands nahezu identisch zu derjenigen in der IspH:**31**-Struktur ist. Sie unterscheiden sich einzig durch die Position des Stickstoffs im Pyridinring. Mit dem Substituenten in 2-Position kann der Stickstoff des Pyridins durch Interaktion mit einem verbrückenden Schwefel des Clusters (3.4 Å) sowie H74N<sup>e</sup> (3.7 Å) und einem Diphosphatsauerstoff (3.7 Å) stabilisiert werden. Im aktiven Zentrum von IspH sind zudem noch ein [3Fe-4S]-Cluster und ein Wassermolekül in W3-Position erkennbar. Umfassende spektroskopische Studien und die Kristallstruktur des dritten Pyridins fehlen bislang, sodass noch wenige Aussagen über den Mechanismus der Inhibition und die Unterschiede in den IC<sub>50</sub>-Werten möglich sind.



**Abbildung 39** Strukturelle Überlagerungen unterschiedlicher Liganden in Komplex mit IspH.

Abschließend zu diesem Kapitel sollen anhand der Überlagerungen in Abbildung 39 die wichtigsten Erkenntnisse aus diesem Projekt zusammengefasst werden. Abbildung 39a zeigt eine Überlagerung der aktiven Zentren in den IspH:**24'**- und IspH:**25**-Kristallstrukturen. Obwohl erstere einen [4Fe-4S]-Cluster und letztere einen [3Fe-4S]-Cluster aufweist, können beide Verbindungen gut überlagert werden. Durch den [3Fe-4S]-Cluster hat der Ligand **25** mehr Platz im aktiven Zentrum und liegt etwas höher als **24'**. Man erkennt deutlich, dass sich

das Wassermolekül in W3-Position in der IspH:**24'**-Struktur für einen nukleophilen Angriff am C4-Atom des Liganden eignet. Da hier ein früheres Intermediat in der Kristallstruktur beobachtet wurde ist das Wassermolekül in der IspH:**24'**-Struktur vorhanden. In der IspH:**25**-Struktur hingegen wurde das Hydratisierungsprodukt beobachtet, weshalb sich kein Wassermolekül mehr in W3-Position befindet.

In Abbildung 39b ist eine strukturelle Überlagerung des Alkohols **26** mit dem Alkoxidkomplex in IspH:**24'** dargestellt. Beide Verbindungen kristallisieren mit einem [4Fe-4S]-Cluster im aktiven Zentrum von IspH aus, da der Ligand durch Koordination des vierten Eisens die intakte Form stabilisieren kann. Die Verbindung **24'** weist im Gegensatz zu **26** eine  $\pi$ -Bindung zwischen C3 und C4 auf. Die Fe-O-Bindung im IspH:**26**-Komplex ist durch die höhere strukturelle Flexibilität von **26** um 0.1 Å kürzer als bei IspH:**24'**. Dieser geringfügige Unterschied führt jedoch dazu, dass sich das zusätzlich in das aktive Zentrum eingelagerte Wassermolekül von der W2- in die W3-Position verschiebt. Die Anwesenheit der  $\pi$ -Bindung in **24'** war das entscheidende Kriterium für die Hydratisierung durch IspH, wohingegen **26** keine chemische Umwandlung erfuhr.

Die Überlagerung der Kristallstrukturen, die durch Kokristallisation von IspH mit **21** beziehungsweise **24** erhalten wurden, ist in Abbildung 39c gezeigt. Hierbei sind in der Struktur ein Intermediat der Hydratisierung von **21**, welches dem Alkoxidkomplex mit **24'** entspricht, sowie der Komplex gebildet durch Koordination des Aldehyds **24** an das Eisen dargestellt. Das Gleichgewicht der Keto-Enol-Tautomerie von **24** kann durch die Koordination an den Fe-S-Cluster auf die Seite des Enols verschoben und somit der Alkoxidkomplex mit **24'** gebildet werden. Obwohl die in Blau und Grün dargestellten Liganden chemisch identisch sind, ist die besetzte Konformation geringfügig verschieden. Dies ist vermutlich auf die Stabilisierung des Liganden vor der Komplexbildung zurückzuführen. Beide Strukturen weisen ein Wassermolekül in der W2-Position auf, welches nicht mit der Alternativkonformation von **24** (dunkelgrün) kollidiert.

Der strukturelle Vergleich der IspH:**24'**- und IspH:**26**-Daten in Abbildung 39d zeigen analog zu Abbildung 39b, dass die Alkoxidkomplexe von **24'** und **26** nahezu identisch sind. Selbst die Konformation des Kohlenstoffgerüsts stimmt in beiden Strukturen sehr gut überein. Wie bereits erwähnt weist der Alkohol eine kürzere Fe-O-Bindung auf, wodurch das zweite Wassermolekül in Position W2 ausreichend Platz zur Verfügung hat.

In Abbildung 39e sind Alkohol **26** und Substrat **1** strukturell überlagert. Die Verbindung **26** stellt eine vereinfachte Form von **1** ohne Methylgruppe und ohne  $\pi$ -Bindung dar, wodurch dieser Vergleich einen Einblick in den Mechanismus der IspH-Reaktion erlaubt. Die

strukturellen Einschränkungen von **1** unterbinden die optimalen Wechselwirkungen mit dem Fe-S-Cluster und ermöglichen somit eine stärkere Interaktion mit T167O<sup>ε</sup>. So verdeutlicht dieser Vergleich die grundlegende Bedeutung der Aminosäure T167 bei der Stabilisierung des Alkoxidkomplexes, da die Rigidität des Liganden keine tetraedrische Fe-Koordination zulässt. Durch den größeren Abstand zum Fe-S-Cluster lässt sich auch die Position des Wassermoleküls erklären, welches bei **26** in W2 und bei **1** in W3 vorliegt.

Der letzte Strukturvergleich betrifft die Komplexstrukturen von IspH:**24** und IspH:**1**. Hierbei stellt die Enolform (**24'**) das Substrat **1** ohne Methylgruppe dar. Die Methylgruppe wirkt sich offensichtlich nur geringfügig auf die Ligandenkonformation aus. Lediglich eine minimale Abweichung der Position durch Abstoßung mit Aminosäureresten beeinflusst die Konformation von **1**. Darüber hinaus zeigt die Überlagerung der Liganden keine größeren Abweichungen voneinander. In beiden Strukturen sind die Abstände der Aminosäurereste von E126 zum Liganden sowie die Wassermoleküle in W3-Position identisch.

Zusammenfassend kann man über die Charakterisierung der IspH-Inhibitoren sagen, dass sie nicht nur im Hinblick auf Entwicklung von Wirkstoffen gegen Infektionskrankheiten wie Malaria und Tuberkulose von großem Interesse sind. Des Weiteren ermöglichten die Komplexstrukturen mit IspH ein tiefer Einblick in die Bindungsart des Substrats und den Mechanismus der natürlichen IspH-Reaktion. Darüber hinaus wurde eine neue katalytische Eigenschaft von IspH entdeckt, welches unter bestimmten Voraussetzungen Alkine zu Aldehyden bzw. Ketonen hydratisieren kann. Die Hydratisierung von Acetylen wurde bislang nur durch das Enzym Acetylenhydratase berichtet. Die enzymvermittelte Addition von Wasser an komplexere Alkinverbindungen war bislang gänzlich unbekannt.



## 5 Zusammenfassung

Terpene bilden die größte Klasse an Naturstoffen, die zahlreiche medizinisch bedeutsame Verbindungen umfasst. Die Biosynthese aller Terpene geht von Isopentenylidiphosphat (IPP) und Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) aus. In Säugetieren werden diese universellen Vorstufen über den Mevalonsäure (MVA)-Weg gewonnen. Der später entdeckte Desoxy-D-xylulose-5-phosphat (DXP)-Weg wird von pflanzlichen Chloroplasten, pathogenen Bakterien wie *Mycobacterium tuberculosis* und Parasiten wie dem Malariaerreger *Plasmodium falciparum* zur Synthese von IPP und DMAPP verwendet. Der letzte Schritt des DXP-Wegs ist die reduktive Dehydratisierung von (*E*)-4-Hydroxy-3-methylbut-2-enyldiphosphat (HMBPP) katalysiert durch das Eisen-Schwefel-Enzym IspH. Der Mechanismus der IspH-Reaktion war lange Zeit ein kontrovers diskutiertes Thema.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Mechanismus der IspH-Reaktion mit spektroskopischen und insbesondere kristallographischen Methoden untersucht. Aufbauend erfolgte die Charakterisierung von potentiellen Inhibitoren in Bezug auf ihren Bindungsmodus und ihrer Wirkungsweise. Die praktischen Arbeiten wurden durch die Oxidationsempfindlichkeit des Eisen-Schwefel-Proteins erschwert, weshalb unter anaeroben Bedingungen gearbeitet wurde. Anfangs ging man von drei verschiedenen Organismen aus. Die Klonierung und Expression von *ispH* aus *Aquifex aeolicus* und *Escherichia coli*, sowie *ispH1* und *ispH2* aus *M. tuberculosis* wurden erfolgreich durchgeführt. Zusätzlich standen die IspH-Mutantenproteine E126Q, E126D, N227Q, N227D, T167C sowie S225C aus *E. coli* zur Verfügung. Alle Proteine konnten mit Hilfe von Ni-Affinitätschromatographie gereinigt und für Kristallisationsversuche verwendet werden. Da für das IspH-Protein aus *E. coli* geeignete Parameter gefunden wurden und die gewonnenen Kristalle sehr gute Beugungseigenschaften aufwiesen, entschied man sich diesen Organismus für die mechanistischen Studien zu verwenden.

Die Charakterisierung des Fe-S-Clusters im aktiven Zentrum von IspH erfolgte mittels UV/VIS-Spektroskopie und Kristallographie. UV/VIS-spektroskopisch konnte nachgewiesen werden, dass ein Fe-S-Cluster im aktiven Zentrum des Proteins vorliegt. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Stabilität des Proteins gegenüber O<sub>2</sub> in Anwesenheit des Substrats steigt. Durch Röntgenstrukturanalyse ist der physiologische [4Fe-4S]-Cluster schließlich identifiziert worden.

Einblicke in den Mechanismus der IspH-Reaktion konnten vor allem durch die Kombination von NMR-Spektroskopie sowie Röntgenstrukturanalyse gewonnen werden. In den IspH:Substrat-Kristallstrukturen beobachtete man in Abhängigkeit der Belichtungszeit zwei unterschiedliche Intermediate der Reaktion. Der innerhalb von 70 s aufgenommene Datensatz zeigte ein Alkoxidkomplex, wohingegen ein vorbelichteter Kristall ein bereits dehydratisiertes Zwischenprodukt lieferte. Weiterhin wurden IspH-Kristallstrukturen in Komplex mit den beiden Produkten IPP und DMAPP erhalten, bei denen nur ein [3Fe-4S]-Cluster beobachtet wurde.

Die Aktivität von IspH und seinen Mutantenproteinen wurde durch  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie mit [1,2,4- $^{13}\text{C}_3$ ]-markiertem Substrat bestimmt. In Kombination mit der Strukturanalyse der Mutanten E126Q, E126D und T167C konnte die Struktur-Funktions-Beziehung der Aminosäuren im aktiven Zentrum aufgeklärt werden. Zudem wurde hier erstmals die zyklische Substratkonformation beobachtet. Anschließend wurden die Kristallstrukturen von IspH in Komplex mit den Substratanaloga (*E*)-4-Fluoro-3-methylbut-2-endiphosphat und iso-HMBPP untersucht. Diese Studien zeigten, dass die fluorsubstituierte Verbindung keine F-Fe-Interaktion eingeht und iso-HMBPP ebenfalls einen Alkoxidkomplex bildet.

Zusammengenommen ermöglichen die Ergebnisse der kristallographischen Untersuchungen, einen detaillierten Mechanismus der IspH-Reaktion zu postulieren (Abbildung 26). Diese verläuft über vier Reaktionsintermediate, die alle mit Hilfe von Kristallographie visualisiert wurden. In Kombination mit ESR-Spektroskopie konnte gezeigt werden, dass die Rotation der Hydroxymethylgruppe des Zwischenprodukts II von einer Reduktion des Fe-C-Clusters initiiert wird und im nächsten Schritt eine Zweielektronenübertragung von Cluster auf Substrat erfolgt.

In Kooperation mit Prof. Dr. E. Oldfield wurden IspH-Inhibitoren entwickelt und spektroskopisch sowie strukturell charakterisiert. Unter ihnen befinden sich Alkine, Alkene, Allene, Pyridine sowie einige Verbindungen mit sauerstoffhaltigen funktionellen Gruppen. Bei der Untersuchung der zwölf Verbindungen wurde eine neue katalytische Eigenschaft des IspH-Enzyms entdeckt. In der Zelle reduziert IspH den Allylalkohol HMBPP zu den Alkenen IPP und DMAPP. *In vitro* wurde die Hydratisierung von Alkinen und Allenen zu Aldehyden oder Ketonen beobachtet. Hierbei hängt die Regioselektivität der Hydratisierung von der Länge der Kohlenstoffkette des Liganden ab. Die Umsetzung erfolgt nur wenn die C4-Position des Liganden eine  $sp$ -Hybridisierung aufweist, da die Wechselwirkung mit dem Fe-S-Cluster dort am günstigsten ist. Darüber hinaus stellte man fest, dass  $\eta^1\text{-O}$ -Enolate als intermediäre Spezies auftreten, die an das apikale Eisen binden.

Die Kristallstrukturanalyse von IspH in Komplex mit 4-Oxobutyldiphosphat und 4-Hydroxybutyldiphosphat zeigten, dass Liganden mit einer sauerstoffhaltigen funktionellen Gruppe am C4-Atom eine koordinative Bindung mit dem vierten Eisen des Clusters eingehen können.

Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse, die mittels biochemischen, spektroskopischen und insbesondere kristallographischen Methoden erhalten wurden, ermöglichen einen detaillierten Einblick in den Mechanismus der IspH-Reaktion sowie der Struktur-Funktions-Beziehung der beteiligten Aminosäuren. Zudem konnten Bindungsart und Wirkungsweise der zwölf Inhibitoren charakterisiert werden. Diese Erkenntnisse sind wichtige Voraussetzungen für die Entwicklung präventiver und therapeutischer Wirkstoffe gegen Tuberkulose und Malaria. Aufgrund der Abwesenheit von IspH in Menschen eröffnen sich neue Perspektiven für die selektive Bekämpfung von pathogenen Microorganismen mit verminderten Nebenwirkungen.



## 6 Literaturverzeichnis

- [1] a) H. Beinert, R. H. Sands, *Bioch. Bioph. Res. Co.* **1960**, 3, 41-46; b) R. H. Sands, H. Beinert, *Bioch. Bioph. Res. Co.* **1960**, 3, 47-52.
- [2] L. E. Mortenson, R. C. Valentine, J. E. Carnahan, *Bioch. Bioph. Res. Co.* **1962**, 7, 448-452.
- [3] W. Lovenberg, B. E. Sobel, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1965**, 54, 193-199.
- [4] R. Malkin, J. C. Rabinowitz, *Annu. Rev. Biochem.* **1967**, 36, 113-&.
- [5] R. E. Stenkamp, L. C. Sieker, L. H. Jensen, *Proteins* **1990**, 8, 352-364.
- [6] W. R. Rypniewski, D. R. Breiter, M. M. Benning, G. Wesenberg, B. H. Oh, J. L. Markley, I. Rayment, H. M. Holden, *Biochemistry* **1991**, 30, 4126-4131.
- [7] R. J. Gurbiel, C. J. Batie, M. Sivaraja, A. E. True, J. A. Fee, B. M. Hoffman, D. P. Ballou, *Biochemistry* **1989**, 28, 4861-4871.
- [8] C. R. Kissinger, L. C. Sieker, E. T. Adman, L. H. Jensen, *J. Mol. Biol.* **1991**, 219, 693-715.
- [9] K. Fukuyama, H. Matsubara, T. Tsukihara, Y. Katsube, *J. Mol. Biol.* **1989**, 210, 383-398.
- [10] S. T. Freer, R. A. Alden, C. W. Carter, J. Kraut, *J. Biol. Chem.* **1975**, 250, 46-54.
- [11] J. W. Peters, W. N. Lanzilotta, B. J. Lemon, L. C. Seefeldt, *Science* **1998**, 282, 1853-1858.
- [12] J. W. Peters, M. H. B. Stowell, S. M. Soltis, M. G. Finnegan, M. K. Johnson, D. C. Rees, *Biochemistry* **1997**, 36, 1181-1187.
- [13] J. Kim, D. Woo, D. C. Rees, *Biochemistry* **1993**, 32, 7104-7115.
- [14] B. J. Hales, E. E. Case, J. E. Morningstar, M. F. Dzeda, L. A. Mauterer, *Biochemistry* **1986**, 25, 7251-7255.
- [15] K. D. Watenpaugh, L. C. Sieker, L. H. Jensen, *J. Mol. Biol.* **1980**, 138, 615-633.
- [16] H. Kameda, K. Hirabayashi, K. Wada, K. Fukuyama, *PLoS One* **2011**, 6, e21947.
- [17] D. J. Kolling, J. S. Brunzelle, S. Lhee, A. R. Crofts, S. K. Nair, *Structure* **2007**, 15, 29-38.
- [18] K. Fukuyama, T. Okada, Y. Kakuta, Y. Takahashi, *J. Mol. Biol.* **2002**, 315, 1155-1166.
- [19] J. S. Rieske, R. E. Hansen, W. S. Zaugg, *J. Biol. Chem.* **1964**, 239, 3017-3022.
- [20] D. P. O'Keefe, K. J. Gibson, M. H. Emptage, R. Lenstra, J. A. Romesser, P. J. Litle, C. A. Omer, *Biochemistry* **1991**, 30, 447-455.

- [21] N. M. Brown, M. C. Kennedy, W. E. Antholine, R. S. Eisenstein, W. E. Walden, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 7246-7254.
- [22] S. Niu, T. Ichiye, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 5724-5725.
- [23] J. R. Chisnell, R. Premakumar, P. E. Bishop, *J. Bacteriol.* **1988**, *170*, 27-33.
- [24] a) D. R. Abbanat, J. G. Ferry, *J. Bacteriol.* **1990**, *172*, 7145-7150; b) S. W. Ragsdale, M. Kumar, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 2515-2540.
- [25] B. Py, F. Barras, *Nat. Rev. Micro.* **2010**, *8*, 436-446.
- [26] H. J. H. Fenton, *J. Chem. Soc., Trans.* **1894**, 65.
- [27] M. Zheng, X. Wang, L. J. Templeton, D. R. Smulski, R. A. LaRossa, G. Storz, *J. Bacteriol.* **2001**, *183*, 4562-4570.
- [28] a) M. R. Jacobson, V. L. Cash, M. C. Weiss, N. F. Laird, W. E. Newton, D. R. Dean, *Mol. Gen. Genet.* **1989**, *219*, 49-57; b) J. C. Fontecilla-Camps, P. Amara, C. Cavazza, Y. Nicolet, A. Volbeda, *Nature* **2009**, *460*, 814-822.
- [29] a) R. Lill, U. Muhlenhoff, *Trends Biochem. Sci.* **2005**, *30*, 133-141; b) R. Lill, U. Muhlenhoff, *Annu. Rev. Biochem.* **2008**, *77*, 669-700.
- [30] E. M. Shepard, E. S. Boyd, J. B. Broderick, J. W. Peters, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, *15*, 319-327.
- [31] D. S. Li, K. Ohshima, S. Jiralerspong, M. W. Bojanowski, M. Pandolfo, *FEBS Lett.* **1999**, *456*, 13-16.
- [32] H. Ding, R. J. Clark, *Biochem. J.* **2004**, *379*, 433-440.
- [33] J. N. Agar, C. Krebs, J. Frazzon, B. H. Huynh, D. R. Dean, M. K. Johnson, *Biochemistry* **2000**, *39*, 7856-7862.
- [34] K. Chandramouli, M. C. Unciuleac, S. Naik, D. R. Dean, B. H. Huynh, M. K. Johnson, *Biochemistry* **2007**, *46*, 6804-6811.
- [35] J. W. Peters, M. H. Stowell, S. M. Soltis, M. G. Finnegan, M. K. Johnson, D. C. Rees, *Biochemistry* **1997**, *36*, 1181-1187.
- [36] T. A. Link, in *Adv. Inorg. Chem. Rad., Vol. 47* (Ed.: A. G. Sykes), Academic Press, **1999**, pp. 83-157.
- [37] D. B. Knaff, M. Hirasawa, *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, *1056*, 93-125.
- [38] a) T. E. Meyer, C. T. Przysiecki, J. A. Watkins, A. Bhattacharyya, R. P. Simonsen, M. A. Cusanovich, G. Tollin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1983**, *80*, 6740-6744; b) A. Hochkoeppler, S. Ciurli, G. Venturoli, D. Zannoni, *FEBS Lett.* **1995**, *357*, 70-74.

- [39] L. M. Hunsicker-Wang, A. Heine, Y. Chen, E. P. Luna, T. Todaro, Y. M. Zhang, P. A. Williams, D. E. McRee, J. Hirst, C. D. Stout, J. A. Fee, *Biochemistry* **2003**, *42*, 7303-7317.
- [40] W. N. Lanzilotta, J. Christiansen, D. R. Dean, L. C. Seefeldt, *Biochemistry* **1998**, *37*, 11376-11384.
- [41] D. H. Flint, R. M. Allen, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 2315-2334.
- [42] H. Beinert, M. C. Kennedy, C. D. Stout, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 2335-2374.
- [43] J. Cheek, J. B. Broderick, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2001**, *6*, 209-226.
- [44] J. Joseph T, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 174-182.
- [45] H. Dobbek, V. Svetlitchnyi, L. Gremer, R. Huber, O. Meyer, *Science* **2001**, *293*, 1281-1285.
- [46] B. R. Crane, L. M. Siegel, E. D. Getzoff, *Science* **1995**, *270*, 59-67.
- [47] a) T. I. Doukov, T. M. Iverson, J. Seravalli, S. W. Ragsdale, C. L. Drennan, *Science* **2002**, *298*, 567-572; b) V. Svetlitchnyi, H. Dobbek, W. Meyer-Klaucke, T. Meins, B. Thiele, P. Römer, R. Huber, O. Meyer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 446-451.
- [48] a) J. N. Reeve, G. S. Beckler, D. S. Cram, P. T. Hamilton, J. W. Brown, J. A. Krzycki, A. F. Kolodziej, L. Alex, W. H. Orme-Johnson, C. T. Walsh, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1989**, *86*, 3031-3035; b) R. Hedderich, S. P. J. Albracht, D. Linder, J. Koch, R. K. Thauer, *FEBS Lett.* **1992**, *298*, 65-68.
- [49] A. Klug, in *Annu. Rev. Biochem.*, Vol. 79 (Eds.: R. D. Kornberg, C. R. H. Raetz, J. E. Rothman, J. W. Thorner), Annual Reviews, Palo Alto, **2010**, pp. 213-231.
- [50] C. Kuo, D. McRee, C. Fisher, S. O'Handley, R. Cunningham, J. Tainer, *Science* **1992**, *258*, 434-440.
- [51] S. L. Porello, M. J. Cannon, S. S. David, *Biochemistry* **1998**, *37*, 6465-6475.
- [52] D. W. Plank, M. C. Kennedy, H. Beinert, J. B. Howard, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 20385-20393.
- [53] M. P. Golinelli, C. Chatelet, E. C. Duin, M. K. Johnson, J. Meyer, *Biochemistry* **1998**, *37*, 10429-10437.
- [54] P. J. Kiley, H. Beinert, *Curr. Opin. Microbiol.* **2003**, *6*, 181-185.
- [55] E. Hidalgo, H. Ding, B. Demple, *Trends Biochem. Sci.* **1997**, *22*, 207-210.
- [56] D. W. Christianson, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 141-150.
- [57] F. Bracher, W. J. Eisenreich, J. Muhlbacher, M. Dreyer, G. Bringmann, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 8602-8608.

- [58] W. Eisenreich, M. Schwarz, A. Cartayrade, D. Arigoni, M. H. Zenk, A. Bacher, *Chem. Biol.* **1998**, *5*, R221-233.
- [59] a) K. Bloch, *Steroids*, Vol. 57, **1992**; b) T. Bach, *Lipids* **1995**, *30*, 191-202; c) D. A. Bochar, J. Freisen, C. V. Stauffacher, V. W. Rodwell, in *Comprehensive Natural Products Chemistry*, Pergamon, Oxford, **1999**, pp. 15-44.
- [60] T. Kuzuyama, H. Seto, *Nat. Prod. Rep.* **2003**, *20*, 171-183.
- [61] W. N. Hunter, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 21573-21577.
- [62] B. Schäfer, *Chemie in unserer Zeit* **2010**, *44*, 344-364.
- [63] a) M. Rohmer, *Prog Drug Res* **1998**, *50*, 135-154; b) M. Rohmer, *Nat. Prod. Rep.* **1999**, *16*, 565-574.
- [64] T. Gräwert, I. Span, A. Bacher, M. Groll, *Angew. Chem.* **2010**, *49*, 8802-8809.
- [65] F. Rohdich, F. Zepeck, P. Adam, S. Hecht, J. Kaiser, R. Laupitz, T. Gräwert, S. Amslinger, W. Eisenreich, A. Bacher, D. Arigoni, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 1586-1591.
- [66] K.-J. Puan, H. Wang, T. Dairi, T. Kuzuyama, C. T. Morita, *FEBS Lett.* **2005**, *579*, 3802-3806.
- [67] T. Gräwert, J. Kaiser, F. Zepeck, R. Laupitz, S. Hecht, S. Amslinger, N. Schramek, E. Schleicher, S. Weber, M. Haslbeck, J. Buchner, C. Rieder, D. Arigoni, A. Bacher, W. Eisenreich, F. Rohdich, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12847-12855.
- [68] a) M. Wolff, M. Seemann, B. Tse Sum Bui, Y. Frapart, D. Tritsch, A. Garcia Estrabot, M. Rodriguez-Concepcion, A. Boronat, A. Marquet, M. Rohmer, *FEBS Lett.* **2003**, *541*, 115-120; b) M. Seemann, K. Janthawornpong, J. Schweizer, L. H. Bottger, A. Janoschka, A. Ahrens-Botzong, E. N. Tambou, O. Rotthaus, A. X. Trautwein, M. Rohmer, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 13184-13185.
- [69] I. Rekitke, J. Wiesner, R. Rohrich, U. Demmer, E. Warkentin, W. Xu, K. Troschke, M. Hintz, J. H. No, E. C. Duin, E. Oldfield, H. Jomaa, U. Ermler, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 17206-17207.
- [70] T. Gräwert, F. Rohdich, I. Span, A. Bacher, W. Eisenreich, J. Eppinger, M. Groll, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2009**, *48*, 5756-5759.
- [71] a) Y. Xiao, Z. K. Zhao, P. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 2164-2165; b) Y. Xiao, P. Liu, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2008**, *47*, 9722-9725.
- [72] B. Altincicek, E. C. Duin, A. Reichenberg, R. Hedderich, A. K. Kollas, M. Hintz, S. Wagner, J. Wiesner, E. Beck, H. Jomaa, *FEBS Lett.* **2002**, *532*, 437-440.

- [73] W. Wang, K. Wang, Y. L. Liu, J. H. No, J. Li, M. J. Nilges, E. Oldfield, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 4522-4527.
- [74] K. Dheda, S. K. Schwander, B. Zhu, R. N. van Zyl-Smit, Y. Zhang, *Respirology* **2010**, *15*, 433-450.
- [75] a) A. Enayati, J. Hemingway, *Annu Rev. Entomol.* **2010**, *55*, 569-591; b) B. Greenwood, T. Mutabingwa, *Nature* **2002**, *415*, 670-672.
- [76] J. Wiesner, R. Ortmann, H. Jomaa, M. Schlitzer, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2003**, *42*, 5274-5293.
- [77] S. R. Meshnick, M. J. Dobson, *Antimalarial Chemotherapy*, Humana Press, Totowa, NJ, **2001**.
- [78] H. P. Kuemmerle, T. Murakawa, H. Sakamoto, N. Sato, T. Konishi, F. De Santis, *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.* **1985**, *23*, 521-528.
- [79] a) H. Jomaa, J. Wiesner, S. Sanderbrand, B. Altincicek, C. Weidemeyer, M. Hintz, I. Turbachova, M. Eberl, J. Zeidler, H. K. Lichtenthaler, D. Soldati, E. Beck, *Science* **1999**, *285*, 1573-1576; b) F. Rohdich, A. Bacher, W. Eisenreich, *Biochem. Soc. Trans.* **2005**, *33*, 785-791; c) E. Oldfield, *Acc. Chem. Res.* **2010**, *43*, 1216-1226.
- [80] a) K. Wang, W. Wang, J. H. No, Y. Zhang, E. Oldfield, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 6719-6727; b) W. Wang, J. Li, K. Wang, T. I. Smirnova, E. Oldfield, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 6525-6528.
- [81] W. O. Bullock, J. M. Fernandez, J. M. Short, *BioTechniques* **1987**, *5*, 376.
- [82] G. Langer, S. X. Cohen, V. S. Lamzin, A. Perrakis, *Nat. Protocols* **2008**, *3*, 1171-1179.
- [83] M. D. Winn, C. C. Ballard, K. D. Cowtan, E. J. Dodson, P. Emsley, P. R. Evans, R. M. Keegan, E. B. Krissinel, A. G. Leslie, A. McCoy, S. J. McNicholas, G. N. Murshudov, N. S. Pannu, E. A. Potterton, H. R. Powell, R. J. Read, A. Vagin, K. S. Wilson, *Acta Crystallogr. D: Biol. Crystallogr.* **2011**, *67*, 235-242.
- [84] P. Emsley, K. Cowtan, *Acta Crystallogr. D: Biol. Crystallogr.* **2004**, *60*, 2126-2132.
- [85] A. J. McCoy, R. W. Grosse-Kunstleve, P. D. Adams, M. D. Winn, L. C. Storoni, R. J. Read, *J. Appl. Crystallogr.* **2007**, *40*, 658-674.
- [86] R. A. Laskowski, M. W. MacArthur, D. S. Moss, J. M. Thornton, *J. Appl. Crystallogr.* **1993**, *26*, 283-291.
- [87] V. r. p. The PyMOL Molecular Graphics System, Schrödinger, LLC.
- [88] G. N. Murshudov, A. A. Vagin, E. J. Dodson, *Acta Crystallogr. D: Biol. Crystallogr.* **1997**, *53*, 240-255.

- [89] W. Kabsch, *J. Appl. Crystallogr.* **1993**, *26*, 795-800.
- [90] F. F. K. Mullis, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, H. Ehrlich, *Cold Spring Harbor Symp.* **1986**, *51*, 263-273.
- [91] W.J. Dower, J. F. Miller, C.W. Ragsdale, *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 6127-6145.
- [92] S. N. F. Sanger, A. R. Coulson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1977**, *74*, 5463-5467.
- [93] M. M. Bradford, *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248-254.
- [94] U. K. Laemmli, *Nature* **1970**, *227*, 680-685.
- [95] A. McPherson, *Crystallization of Biological Macromolecules*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, **1999**.
- [96] T. Gräwert, I. Span, W. Eisenreich, F. Rohdich, J. Eppinger, A. Bacher, M. Groll, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 1077-1081.
- [97] A. T. Brünger, *Nature* **1992**, *355*, 472-475.
- [98] a) G. J. Kleywegt, T. A. Jones, *Structure* **1995**, *3*, 535-540; b) G. J. Kleywegt, A. T. Brünger, *Structure* **1996**, *4*, 897-904; c) G. J. Kleywegt, *Acta Crystallogr. D: Biol. Crystallogr.* **2000**, *56*, 249-265.
- [99] M. D. Winn, C. C. Ballard, K. D. Cowtan, E. J. Dodson, P. Emsley, P. R. Evans, R. M. Keegan, E. B. Krissinel, A. G. W. Leslie, A. McCoy, S. J. McNicholas, G. N. Murshudov, N. S. Pannu, E. A. Potterton, H. R. Powell, R. J. Read, A. Vagin, K. S. Wilson, *Acta Crystallogr. D: Biol. Crystallogr.* **2011**, *67*, 235-242.
- [100] T. Gräwert, F. Rohdich, I. Span, A. Bacher, W. Eisenreich, J. Eppinger, M. Groll, *Angew. Chem.* **2009**, *48*, 5756-5759.
- [101] A. T. Brünger, P. D. Adams, G. M. Clore, W. L. DeLano, P. Gros, R. W. Grosse-Kunstleve, J. S. Jiang, J. Kuszewski, M. Nilges, N. S. Pannu, R. J. Read, L. M. Rice, T. Simonson, G. L. Warren, *Acta Crystallogr. D: Biol. Crystallogr.* **1998**, *54*, 905-921.
- [102] I. Span, T. Gräwert, A. Bacher, W. Eisenreich, M. Groll, *J. Mol. Biol.* **2012**, *416*, 1-9.
- [103] C. A. Citron, N. L. Brock, P. Rabe, J. S. Dickschat, *Angew. Chem.* **2012**.
- [104] D. O'Hagan, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 308-319.
- [105] a) Y. Xiao, W. C. Chang, H. W. Liu, P. Liu, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 5912-5915; b) Y. Xiao, P. Liu, *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 309-311.
- [106] W. C. Chang, Y. Xiao, H. W. Liu, P. Liu, *Angew. Chem.* **2011**, *50*, 12304-12307.
- [107] M. Belinskii, *Chem. Phys.* **1993**, *172*, 189-211.

- [108] a) C. Goedecke, P. Hillebrecht, T. Uhlemann, R. Haunschild, G. Frenking, *Can. J. Chemistry* **2009**, *87*, 1470-1479; b) J. Chatt, L. A. Duncanson, *J. Chem. Soc. (Resumed)* **1953**, 2939-2947.
- [109] L. Hintermann, A. Labonne, *Synthesis* **2007**, *2007*, 1121,1150.



## 7 Anhang

### 7.1 Alignment der IspH-Proteinsequenzen

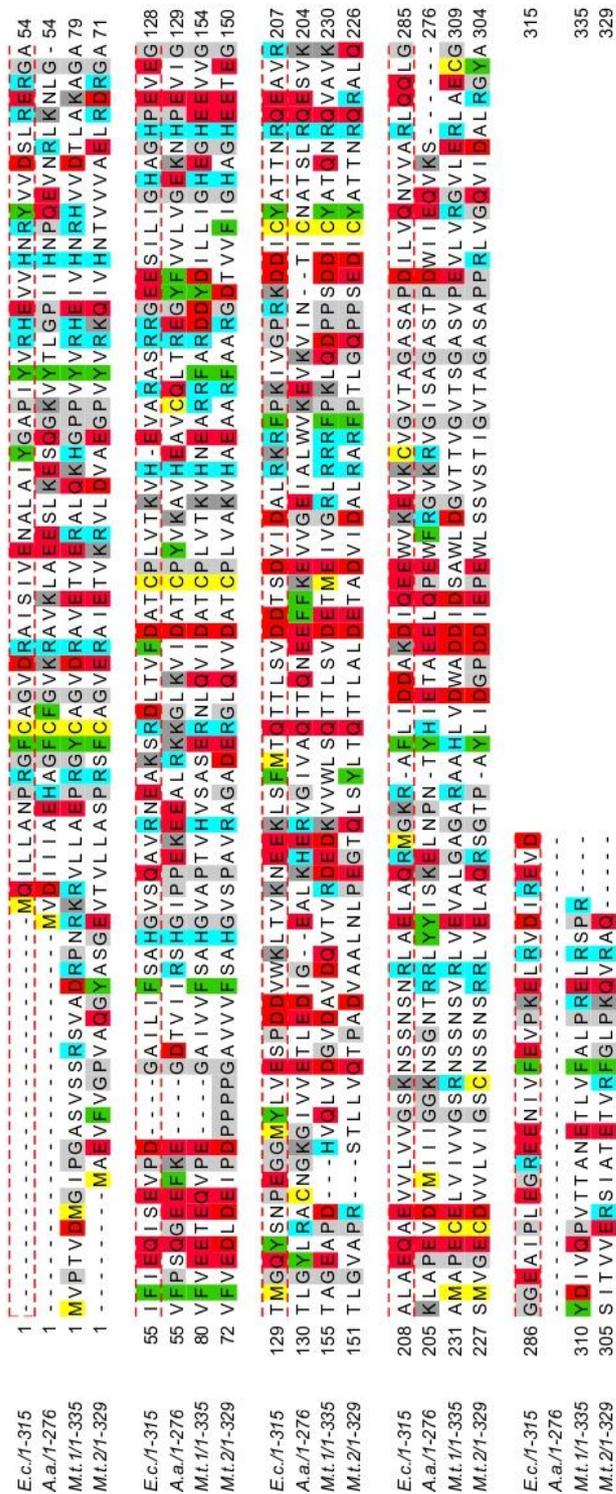


Abbildung 40 Sequenzalignment des *ispH*-Gens aus den Organismen *E. coli* und *A. aeolicus*, sowie *ispH1* und *ispH2* aus *M. tuberculosis*.

## 7.2 Datensammlungs- und Verfeinerungsstatistiken

**Tabelle 12** Statistiken zur Datensammlung und Verfeinerung der Komplexstrukturen von IspH kokristallisiert mit dem Substrat (1) und unterschiedlichen Belichtungszeiten.

	IspH:HMBPP (1)	IspH:INT (16)	IspH:INT_70s	IspH:INT_180s
<b>Kristallparameter</b>				
Raumgruppe	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>			
Zellparameter				
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	70.9; 80.7; 111.2	69.6; 80.8; 112.7	71.0; 80.7; 111.3	70.9; 80.6, 111.0
Moleküle in AE <sup>a</sup>	2	2	2	2
<b>Datensammlung</b>				
Beamline	SLS, X06SA	SLS, X06SA	SLS, X06SA	SLS, X06SA
Wellenlänge (Å)	1.0	1.0	1.0	1.0
Auflösungsbereich (Å) <sup>b</sup>	10-1.7 (1.8-1.7)	10-1.9 (2.0-1.9)	10-1.6 (1.7-1.6)	10-1.6 (1.7-1.6)
Unabhängige Reflexe <sup>c</sup>	70059	50648	79612	77603
Vollständigkeit (%) <sup>b</sup>	99.6 (99.4)	99.9 (99.9)	93.7 (89.8)	91.8 (95.6)
<i>R</i> <sub>merge</sub> (%) <sup>b,d</sup>	6.8 (29.4)	5.2 (40.9)	5.1 (48.9)	6.0 (40.8)
<i>I</i> / $\sigma$ ( <i>I</i> ) <sup>b</sup>	17.1 (5.8)	21.8 (5.4)	11.0 (2.1)	12.5 (3.2)
<b>Verfeinerung</b>				
Auflösungsbereich (Å)	10-1.7	10-1.9	10-1.6	10-1.6
<i>R</i> <sub>work</sub> / <i>R</i> <sub>free</sub> <sup>e</sup>	0.241 / 0.269	0.241 / 0.248	0.213 / 0.242	0.205 / 0.239
Anzahl der Atome				
Protein	4773	4773	4773	4773
Ligand	30	28	30	30
FeS-Cluster	16	16	16	16
Wasser	603	484	603	603
<i>B</i> -Faktoren	22.9	35.8	11.2	12.9
RMS-Abweichung <sup>f</sup>				
Bindungslängen (Å)	0.007	0.007	0.023	0.022
Bindungswinkel (°)	1.2	1.2	1.7	1.6
Ramachandran (%) <sup>g</sup>	98.2 / 1.8 / 0.0	98.7 / 1.3 / 0.0	98.5 / 1.5 / 0.0	98.7 / 1.3 / 0.0
PDB-Code	3KE8	3KE9	3SZL	3SZO

<sup>a</sup> Asymmetrische Einheit

<sup>b</sup> Die Werte in Klammern bei Vollständigkeit, *R*<sub>merge</sub> und *I*/ $\sigma$  (*I*) entsprechen der letzten Auflösungsschale.

<sup>c</sup> Friedel Paare wurden als identische Reflexe behandelt.

<sup>d</sup>  $R_{\text{merge}}(I) = \frac{\sum_{\text{hkl}} \sum_j |I(\text{hkl})_j - I(\text{hkl})|}{[\sum_{\text{hkl}} I_{\text{hkl}}]}$ , wobei *I*(*hkl*)<sub>*j*</sub> die *j*-ste Messung der Intensität der Reflexe *hkl* und  $\langle I(\text{hkl}) \rangle$  die mittleren Intensität ist.

<sup>e</sup>  $R = \frac{\sum_{\text{hkl}} | |F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}| |}{\sum_{\text{hkl}} |F_{\text{obs}}|}$ , wobei *R*<sub>free</sub> ohne Sigma Cutoff für zufällig ausgewählte 5% der Reflexe, die nicht in die Verfeinerung einbezogen wurden. *R*<sub>work</sub> wird von den verbleibenden Reflexen berechnet.

<sup>f</sup> Abweichung von den idealen Bindungslängen und Bindungswinkeln.

<sup>g</sup> Anzahl der Aminosäurereste in bevorzugten Regionen / erlaubten Regionen / verbotene Regionen.

**Tabelle 13** Statistiken zur Datensammlung und Verfeinerung von IspH in Komplex mit den Produkten sowie Diphosphat und dem IspH T167-Mutantenprotein gebunden an **1**.

	IspH:IPP (2)	IspH:DMAPP (3)	IspH:PP <sub>i</sub> (17)	IspH T167C:1
<b>Kristallparameter</b>				
Raumgruppe	C2	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
Zellparameter				
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	112.5; 80.6; 70.2	70.1; 80.4; 110.8	71.2; 80.7; 111.4	69.5; 80.9; 112.6
$\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ (°)		$\beta=94.7$		
Moleküle in AE <sup>a</sup>	2	2	2	2
<b>Datensammlung</b>				
Beamline	Cu-K $\alpha$ , Drehanode	SLS, X06SA	Cu-K $\alpha$ , Drehanode	SLS, X06SA
Wellenlänge (Å)	1.5418	1.0	1.5418	1.0
Auflösungsbereich (Å) <sup>b</sup>	65-2.0 (2.1-2.0)	65-1.7 (1.8-1.7)	71-1.8 (1.9-1.8)	30-2.1 (2.2-2.1)
Unabhängige Reflexe <sup>c</sup>	39891	68998	60002	37485
Vollständigkeit (%) <sup>b</sup>	100 (100)	99.3 (99.3)	100 (100)	99.3 (97.2)
<i>R</i> <sub>merge</sub> (%) <sup>b,d</sup>	4.8 (24.3)	5.5 (27.7)	5.3 (28.2)	12.3 (54.4)
<i>I</i> / $\sigma$ (I) <sup>b</sup>	17.6 (4.0)	21.9 (6.6)	15.6 (3.4)	9.1 (2.8)
<b>Verfeinerung</b>				
Auflösungsbereich (Å)	15-2.0	10-1.7	10-1.8	10-2.1
<i>R</i> <sub>work</sub> / <i>R</i> <sub>free</sub> <sup>e</sup>	0.226 / 0.272	0.216 / 0.237	0.234 / 0.278	0.215 / 0.277
Anzahl der Atome				
Protein	4773	4773	4773	4773
Ligand	28	28	18	30
FeS-Cluster	14	14	14	14
Wasser	456	460	631	141
<i>B</i> -Faktoren	20.1	22.1	15.1	25.5
RMS-Abweichung <sup>f</sup>				
Bindungslängen (Å)	0.006	0.005	0.006	0.021
Bindungswinkel (°)	1.3	1.4	1.3	1.9
Ramachandran (%) <sup>g</sup>	98.5 / 1.5 / 0.0	98.7 / 1.3 / 0.0	98.0 / 2.0 / 0.0	97.2 / 2.8 / 0.0
PDB-Code	3KEM	3KEF	3KEL	3TOG

<sup>a</sup> Asymmetrische Einheit<sup>b</sup> Die Werte in Klammern bei Vollständigkeit, *R*<sub>merge</sub> und *I*/ $\sigma$  (*I*) entsprechen der letzten Auflösungsschale.<sup>c</sup> Friedel Paare wurden als identische Reflexe behandelt.<sup>d</sup>  $R_{\text{merge}}(I) = \frac{\sum_{\text{hkl}} \sum_j |I(\text{hkl})_j - I(\text{hkl})|}{\sum_{\text{hkl}} I(\text{hkl})}$ , wobei *I*(*hkl*)<sub>*j*</sub> die *j*-ste Messung der Intensität der Reflexe *hkl* und  $\langle I(\text{hkl}) \rangle$  die mittleren Intensität ist.<sup>e</sup>  $R = \frac{\sum_{\text{hkl}} (|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|)}{\sum_{\text{hkl}} |F_{\text{obs}}|}$ , wobei *R*<sub>free</sub> ohne Sigma Cutoff für zufällig ausgewählte 5% der Reflexe, die nicht in die Verfeinerung einbezogen wurden. *R*<sub>work</sub> wird von den verbleibenden Reflexen berechnet.<sup>f</sup> Abweichung von den idealen Bindungslängen und Bindungswinkeln.<sup>g</sup> Anzahl der Aminosäurereste in bevorzugten Regionen / erlaubten Regionen / verbotene Regionen.

**Tabelle 14** Statistiken zur Datensammlung und Verfeinerung der Komplexstrukturen der IspH-Mutanten E126Q und E126D mit **1** sowie IspH Wildtyp mit den Substratanaloga **18** und **19**.

	IspH E126Q: <b>1</b>	IspH E126D: <b>1</b>	IspH: <b>18</b>	IspH: <b>19</b>
<b>Kristallparameter</b>				
Raumgruppe	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>			
Zellparameter				
<i>a, b, c</i> (Å)	70.2; 80.4; 112.0	64.9; 80.2; 114.5	70.4; 80.4; 111.1	70.6; 80.8; 113.1
Moleküle in AE <sup>a</sup>	2	2	2	2
<b>Datensammlung</b>				
Beamline	SLS, X06SA	SLS, X06SA	SLS, X06DA	SLS, X06SA
Wellenlänge (Å)	1.0	1.0	1.0	1.0
Auflösungsbereich (Å) <sup>b</sup>	20-1.4 (1.5-1.4)	20-1.9 (2.0-1.9)	10-1.8 (1.9-1.8)	10-1.9 (2.0-1.9)
Unabhängige Reflexe <sup>c</sup>	125027	47419	57685	98052
Vollständigkeit (%) <sup>b</sup>	99.9 (99.9)	99.2 (97.4)	97.6 (96.8)	99.6 (99.1)
<i>R</i> <sub>merge</sub> (%) <sup>b,d</sup>	10.5 (40.6)	14.7 (55.8)	7.1 (48.9)	6.8 (49.0)
<i>I</i> / $\sigma$ ( <i>I</i> ) <sup>b</sup>	12.1 (4.9)	9.3 (2.4)	10.8 (2.3)	11.6 (2.5)
<b>Verfeinerung</b>				
Auflösungsbereich (Å)	10-1.4	10-1.9	10-1.8	15-1.9
<i>R</i> <sub>work</sub> / <i>R</i> <sub>free</sub> <sup>e</sup>	0.175 / 0.215	0.203 / 0.242	0.184 / 0.234	0.179 / 0.221
Anzahl der Atome				
Protein	4773	4769	4773	4773
Ligand	30	30	30	28
FeS-Cluster	14	14	16	16
Wasser	529	184	628	518
<i>B</i> -Faktoren	14.4	10.7	26.4	29.3
RMS-Abweichung <sup>f</sup>				
Bindungslängen (Å)	0.027	0.028	0.023	0.023
Bindungswinkel (°)	2.2	2.2	2.3	2.3
Ramachandran (%) <sup>g</sup>	99.2 / 0.8 / 0.0	97.0 / 3.0 / 0.0	98.2/1.8/0.0	98.2/1.8/0.0
PDB-Code	3SZU	3T0F		4EB3

<sup>a</sup> Asymmetrische Einheit<sup>b</sup> Die Werte in Klammern bei Vollständigkeit, *R*<sub>merge</sub> und *I*/ $\sigma$  (*I*) entsprechen der letzten Auflösungsschale.<sup>c</sup> Friedel Paare wurden als identische Reflexe behandelt.<sup>d</sup>  $R_{\text{merge}}(I) = \frac{\sum_{\text{hkl}} \sum_j |I(\text{hkl})_j - I(\text{hkl})|}{[\sum_{\text{hkl}} I_{\text{hkl}}]}$ , wobei *I*(*hkl*)<sub>*j*</sub> die *j*-ste Messung der Intensität der Reflexe *hkl* und  $\langle I(\text{hkl}) \rangle$  die mittleren Intensität ist.<sup>e</sup>  $R = \frac{\sum_{\text{hkl}} (|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|)}{[\sum_{\text{hkl}} |F_{\text{obs}}|]}$ , wobei *R*<sub>free</sub> ohne Sigma Cutoff für zufällig ausgewählte 5% der Reflexe, die nicht in die Verfeinerung einbezogen wurden. *R*<sub>work</sub> wird von den verbleibenden Reflexen berechnet.<sup>f</sup> Abweichung von den idealen Bindungslängen und Bindungswinkeln.<sup>g</sup> Anzahl der Aminosäurereste in bevorzugten Regionen / erlaubten Regionen / verbotene Regionen.

**Tabelle 15** Datensammlungs- und Verfeinerungsstatistiken von IspH in Komplex mit den Alkinverbindungen **20, 21, 22** und **23**.

	IspH:20	IspH:21	IspH:22	IspH:23
<b>Kristallparameter</b>				
Raumgruppe	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>			
Zellparameter				
<i>a, b, c</i> (Å)	70.6; 80.6; 111.9	70.1; 80.8; 112.6	70.1; 80.4; 111.2	70.2; 80.4; 112.0
Moleküle in AE <sup>a</sup>	2	2	2	2
<b>Datensammlung</b>				
Beamline	SLS, X06SA	SLS, X06SA	SLS, X06SA	SLS, X06SA
Wellenlänge (Å)	1.0	1.0	1.0	1.0
Auflösungsbereich (Å) <sup>b</sup>	10-1.5 (1.6-1.5)	10-1.9 (2.0-1.9)	40-1.7 (1.8-1.7)	40-1.6 (1.7-1.6)
Unabhängige Reflexe <sup>c</sup>	102672	50463	69837	81563
Vollständigkeit (%) <sup>b</sup>	99.0 (97.6)	98.7 (94.2)	99.5 (99.8)	96.9 (91.5)
<i>R</i> <sub>merge</sub> (%) <sup>b,d</sup>	5.9 (42.9)	7.0 (57.2)	5.9 (51.3)	5.3 (55.9)
<i>I</i> / σ ( <i>I</i> ) <sup>b</sup>	13.7 (4.2)	14.8 (3.9)	16.5 (3.4)	14.6 (2.6)
<b>Verfeinerung</b>				
Auflösungsbereich (Å)	10-1.5	24.85-1.9	10-1.7	10-1.6
<i>R</i> <sub>work</sub> / <i>R</i> <sub>free</sub> <sup>e</sup>	0.161 / 0.212	0.147 / 0.227	0.146 / 0.206	0.167 / 0.221
Anzahl der Atome				
Protein	4773	4773	4773	4773
Ligand	24	26	28	26
FeS-Cluster	16	16	14	16
Wasser	567	379	519	401
<i>B</i> -Faktoren	17.6	35.5	26.5	26.1
RMS-Abweichung <sup>f</sup>				
Bindungslängen (Å)	0.026	0.018	0.020	0.021
Bindungswinkel (°)	2.3	2.0	2.0	2.1
Ramachandran (%) <sup>g</sup>	98.7/1.3/0.0	98.8/1.1/0.0	99.0/1.0/0.0	99.0/1.0/0.0
PDB-Code	3URK	3UTC	3UTD	3UV3

<sup>a</sup> Asymmetrische Einheit<sup>b</sup> Die Werte in Klammern bei Vollständigkeit, *R*<sub>merge</sub> und *I*/σ (*I*) entsprechen der letzten Auflösungsschale.<sup>c</sup> Friedel Paare wurden als identische Reflexe behandelt.<sup>d</sup>  $R_{\text{merge}}(I) = \frac{\sum_{\text{hkl}} \sum_j |I(\text{hkl})_j - I(\text{hkl})|}{[\sum_{\text{hkl}} I_{\text{hkl}}]}$ , wobei *I*(*hkl*)<sub>*j*</sub> die *j*-ste Messung der Intensität der Reflexe *hkl* und <*I*(*hkl*)> die mittleren Intensität ist.<sup>e</sup>  $R = \frac{\sum_{\text{hkl}} (|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|)}{\sum_{\text{hkl}} |F_{\text{obs}}|}$ , wobei *R*<sub>free</sub> ohne Sigma Cutoff für zufällig ausgewählte 5% der Reflexe, die nicht in die Verfeinerung einbezogen wurden. *R*<sub>work</sub> wird von den verbleibenden Reflexen berechnet.<sup>f</sup> Abweichung von den idealen Bindungslängen und Bindungswinkeln.<sup>g</sup> Anzahl der Aminosäurereste in bevorzugten Regionen / erlaubten Regionen / verbotene Regionen.

**Tabelle 16** Datensammlungs- und Verfeinerungsstatistiken von IspH in Komplex mit dem Aldehyd **24**, dem Alkohol **26** sowie den Alkenen **27** und **28**..

	IspH: <b>24</b>	IspH: <b>26</b>	IspH: <b>27</b>	IspH: <b>28</b>
<b>Kristallparameter</b>				
Raumgruppe	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>			
Zellparameter				
<i>a, b, c</i> (Å)	70.7; 80.7; 111.8	69.8; 80.5; 111.7	70.4; 80.5; 111.7	70.3; 80.4; 111.0
Moleküle in AE <sup>a</sup>	2		2	2
<b>Datensammlung</b>				
Beamline	SLS, X06SA	SLS, X06SA	ESRF, ID29	SLS, X06SA
Wellenlänge (Å)	1.0	1.0	1.0	1.0
Auflösungsbereich (Å) <sup>b</sup>	10-1.8 (1.9-1.8)	10-1.7 (1.8-1.7)	10-1.6 (1.7-1.6)	10-1.8 (1.9 – 1.8)
Unabhängige Reflexe <sup>c</sup>	59603	69308	84071	58890
Vollständigkeit (%) <sup>b</sup>	99.4 (97.6)	99.3 (98.1)	99.7 (99.9)	99.9 (99.8)
<i>R</i> <sub>merge</sub> (%) <sup>b,d</sup>	9.6 (37.1)	5.5 (49.8)	5.3 (33.9)	10.3 (34.4)
<i>I</i> / $\sigma$ ( <i>I</i> ) <sup>b</sup>	10.9 (4.2)	21.0 (4.6)	16.3 (4.5)	11.6 (5.1)
<b>Verfeinerung</b>				
Auflösungsbereich (Å)	15-1.8	15-1.7	15-1.6	15-1.8
<i>R</i> <sub>work</sub> / <i>R</i> <sub>free</sub> <sup>e</sup>	0.185 / 0.268	0.142 / 0.204	0.160 / 0.210	0.181 / 0.214
Anzahl der Atome				
Protein	4773	4773	4773	4773
Ligand	28	28	26	28
FeS-Cluster	16	16	16	16
Wasser	453	565	477	500
<i>B</i> -Faktoren	27.0	31.4	23.9	16.7
RMS-Abweichung <sup>f</sup>				
Bindungslängen (Å)	0.021	0.018	0.023	0.021
Bindungswinkel (°)	2.1	1.9	2.4	2.1
Ramachandran (%) <sup>g</sup>	98.4/1.6/0.0	99.0/1.0/0.0	98.9/1.1/0.0	98.9/1.1/0.0
PDB-Code	3UWM	3UV6	3UV7	

<sup>a</sup> Asymmetrische Einheit<sup>b</sup> Die Werte in Klammern bei Vollständigkeit, *R*<sub>merge</sub> und *I*/ $\sigma$  (*I*) entsprechen der letzten Auflösungsschale.<sup>c</sup> Friedel Paare wurden als identische Reflexe behandelt.<sup>d</sup>  $R_{\text{merge}}(I) = \frac{\sum_{\text{hkl}} \sum_j |I(\text{hkl})_j - I(\text{hkl})|}{[\sum_{\text{hkl}} I_{\text{hkl}}]}$ , wobei *I*(*hkl*)<sub>*j*</sub> die *j*-ste Messung der Intensität der Reflexe *hkl* und  $\langle I(\text{hkl}) \rangle$  die mittleren Intensität ist.<sup>e</sup>  $R = \frac{\sum_{\text{hkl}} (|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|)}{[\sum_{\text{hkl}} |F_{\text{obs}}|]}$ , wobei *R*<sub>free</sub> ohne Sigma Cutoff für zufällig ausgewählte 5% der Reflexe, die nicht in die Verfeinerung einbezogen wurden. *R*<sub>work</sub> wird von den verbleibenden Reflexen berechnet.<sup>f</sup> Abweichung von den idealen Bindungslängen und Bindungswinkeln.<sup>g</sup> Anzahl der Aminosäurereste in bevorzugten Regionen / erlaubten Regionen / verbotene Regionen.

**Tabelle 17** Datensammlungs- und Verfeinerungsstatistiken der Kristallstrukturen von IspH in Komplex mit dem Alkin **29**, dem Alken **30** sowie den Pyridinen **31** und **32**.

	IspH: <b>29</b>	IspH: <b>30</b>	IspH: <b>31</b>	IspH: <b>32</b>
<b>Kristallparameter</b>				
Raumgruppe	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>			
Zellparameter <i>a, b, c</i> (Å)	70.0; 80.4; 111.3	70.3; 80.4; 111.0	69.3; 80.8; 111.6	69.5; 80.8; 111.5
Moleküle in AE <sup>a</sup>	2	2	2	2
<b>Datensammlung</b>				
Beamline	ESRF, ID29	SLS, X06SA	SLS, X06SA	SLS, X06SA
Wellenlänge (Å)	1.0	1.0	1.0	1.0
Auflösungsbereich (Å) <sup>b</sup>	10-2.0 (2.1-2.0)	10-1.8 (1.9-1.8)	40-2.7 (2.8-2.7)	30-1.9 (2.0-1.9)
Unabhängige Reflexe <sup>c</sup>	43021	59394	17701	49459
Vollständigkeit (%) <sup>b</sup>	99.7 (99.3)	99.7 (99.2)	99.6 (99.9)	98.7 (95.6)
<i>R</i> <sub>merge</sub> (%) <sup>b,d</sup>	7.8 (38.4)	7.5 (43.2)	9.9 (49.0)	9.0 (42.1)
<i>I</i> / σ ( <i>I</i> ) <sup>b</sup>	14.6 (4.3)	13.9 (3.7)	10.0 (3.2)	11.4 (2.8)
<b>Verfeinerung</b>				
Auflösungsbereich (Å)	15-2.0	15-1.8	20-2.7	15-1.9
<i>R</i> <sub>work</sub> / <i>R</i> <sub>free</sub> <sup>e</sup>	0.177 / 0.252	0.195 / 0.241	0.186 / 0.258	0.203 / 0.247
Anzahl der Atome				
Protein	4773	4773	4773	4773
Ligand	28	26	32	32
FeS-Cluster	16	16	14	14
Wasser	327	547	75	367
<i>B</i> -Faktoren	25.5	26.3	55.6	35.9
RMS-Abweichung <sup>f</sup>				
Bindungslängen (Å)	0.020	0.026	0.012	0.021
Bindungswinkel (°)	2.0	2.6	1.6	2.2
Ramachandran (%) <sup>g</sup>	99.2 / 0.8 / 0.0	98.4 / 1.5 / 0.2	96.6 / 3.4 / 0.0	97.7 / 2.3 / 0.0
PDB-Code	3UV8			

<sup>a</sup> Asymmetrische Einheit<sup>b</sup> Die Werte in Klammern bei Vollständigkeit, *R*<sub>merge</sub> und *I*/σ (*I*) entsprechen der letzten Auflösungsschale.<sup>c</sup> Friedel Paare wurden als identische Reflexe behandelt.<sup>d</sup>  $R_{\text{merge}}(I) = \frac{\sum_{\text{hkl}} \sum_j |I(\text{hkl})_j - \langle I(\text{hkl}) \rangle|}{\sum_{\text{hkl}} I(\text{hkl})}$ , wobei *I*(*hkl*)<sub>*j*</sub> die *j*-ste Messung der Intensität der Reflexe *hkl* und  $\langle I(\text{hkl}) \rangle$  die mittlere Intensität ist.<sup>e</sup>  $R = \frac{\sum_{\text{hkl}} (|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|)}{\sum_{\text{hkl}} |F_{\text{obs}}|}$ , wobei *R*<sub>free</sub> ohne Sigma Cutoff für zufällig ausgewählte 5% der Reflexe, die nicht in die Verfeinerung einbezogen wurden. *R*<sub>work</sub> wird von den verbleibenden Reflexen berechnet.<sup>f</sup> Abweichung von den idealen Bindungslängen und Bindungswinkeln.<sup>g</sup> Anzahl der Aminosäurereste in bevorzugten Regionen / erlaubten Regionen / verbotene Regionen.

### 7.3 $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektren mit (*E*)-4-Fluoro-3-methylbut-2-endiphosphat

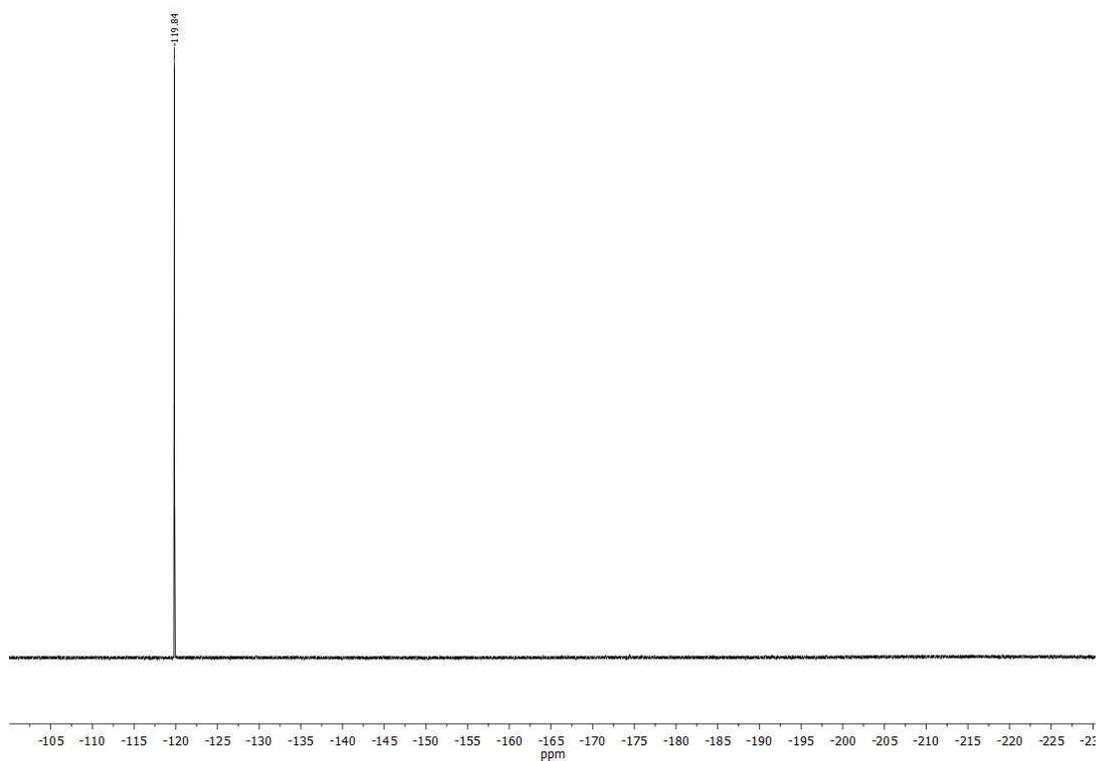


Abbildung 41  $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektrum (235 MHz) von NaF in 50 mM Tris (pH 8) als Referenzspektrum für Fluorid.

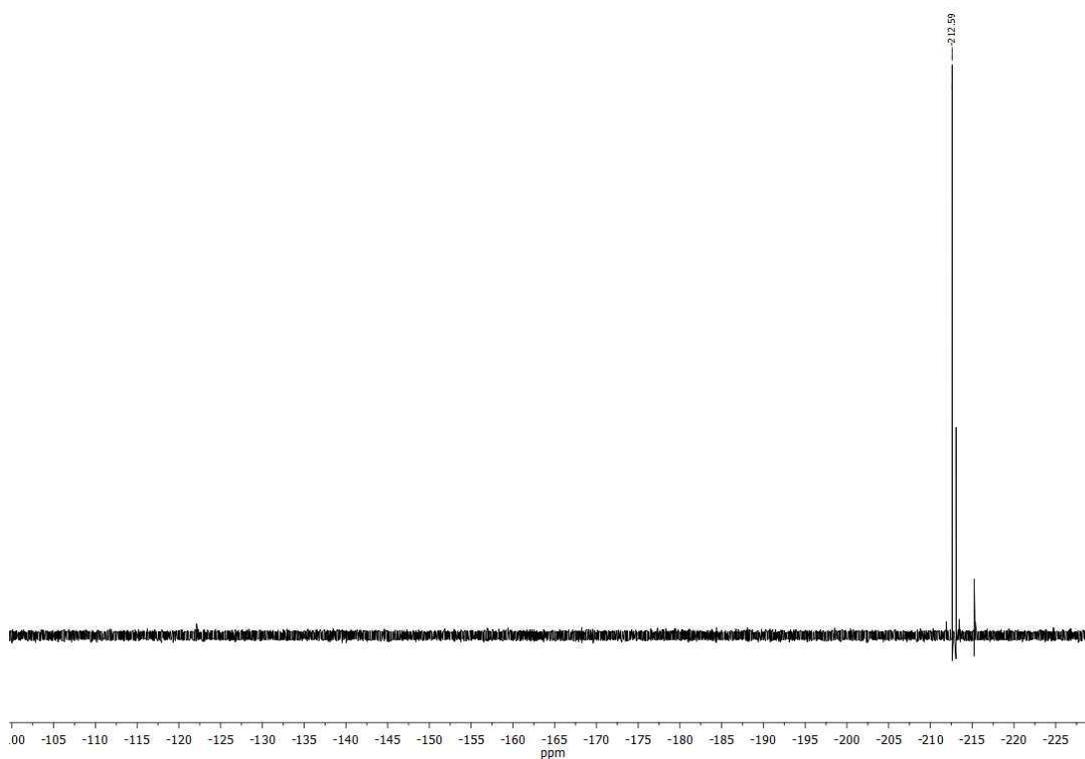
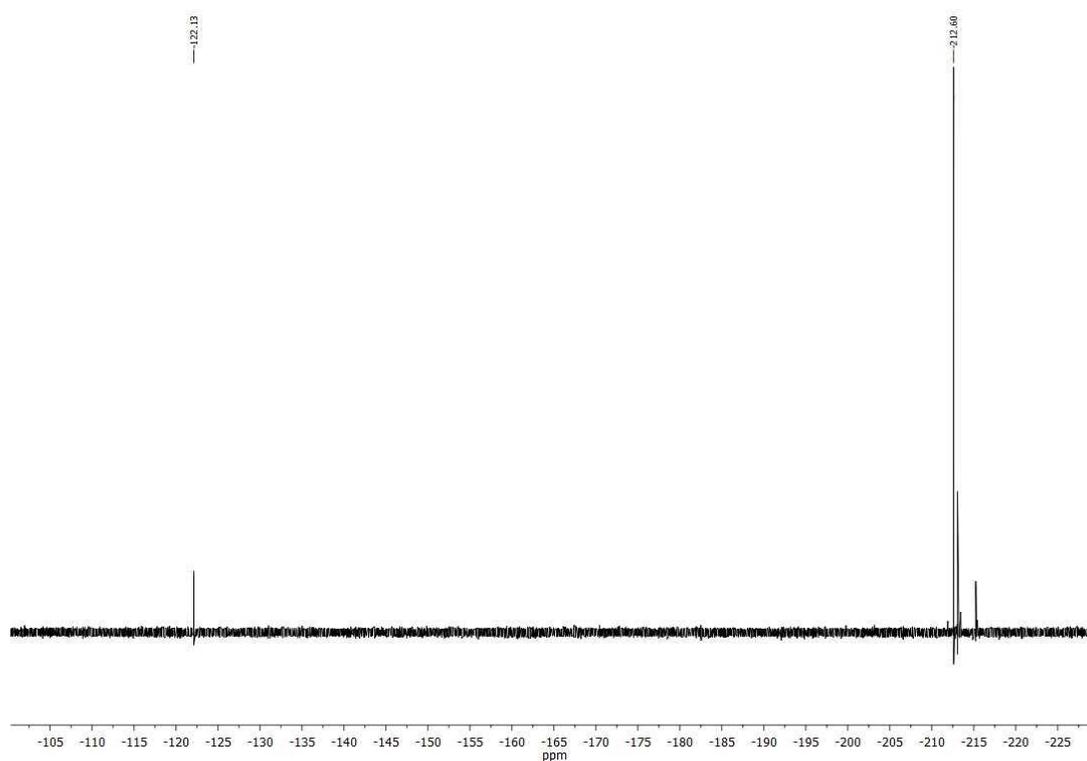
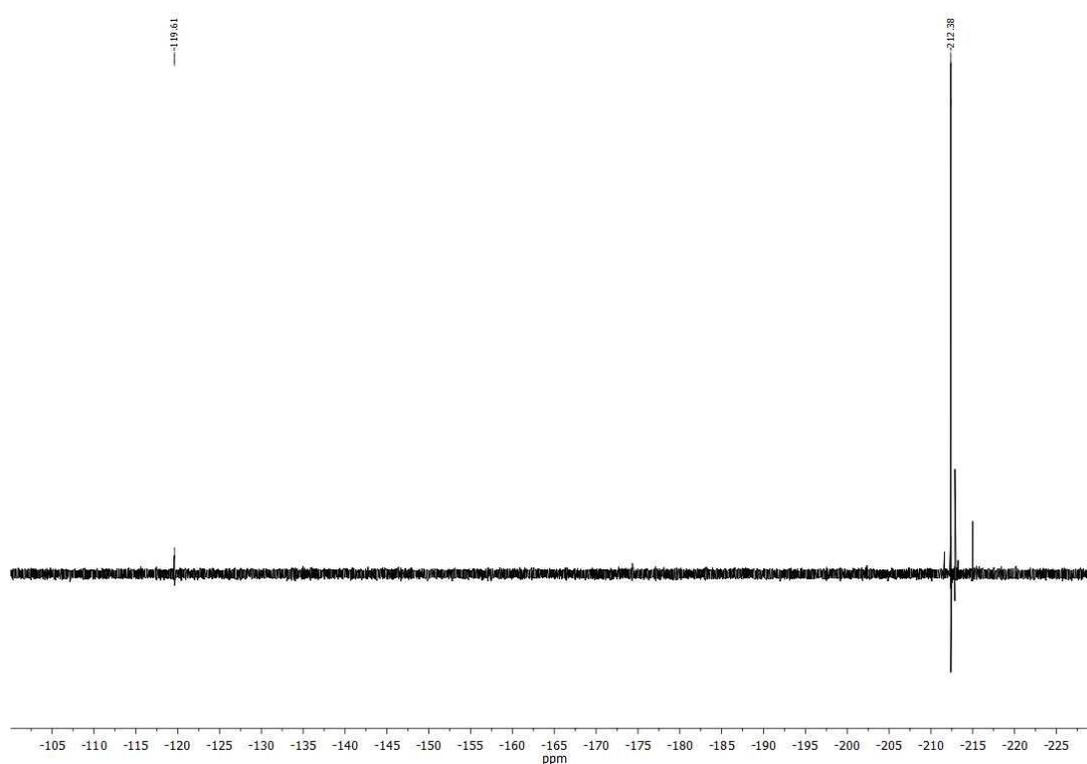


Abbildung 42  $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektrum (235 MHz) von **18** in  $\text{D}_2\text{O}$ . Die Messung erfolgte sofort nachdem die Probe hergestellt wurde.



**Abbildung 43**  $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektrum (235 MHz) von **18** in  $\text{D}_2\text{O}$  nach 7 Tagen Inkubationszeit. Im Vergleich zu dem Spektrum direkt nach Herstellung der Probe ist ein zweites Signal bei -122 ppm erkennbar, welches eine ähnliche Chemische Verschiebung wie das Fluoridion aufweist. Das neu entstandene Signal entspricht dem freien Fluorid, welches bei der Hydratisierung von **18** entsteht.



**Abbildung 44**  $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektrum (235 MHz) von einer wässrigen **18**-Lösung, die für Kristallisationsansätze verwendet wurde. Das Signal bei -119 ppm deutet auf die hydrolytische Spaltung von **18** zu **1** hin.