

Lehrstuhl für Organische Chemie und Biochemie
der Technischen Universität München

Biochemische und strukturelle Charakterisierung von Enzymen
der Riboflavin- und Folsäurebiosynthese

Anne-Kathrin Schott

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der
Technischen Universität München zur Erlangung
des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzende: Univ.-Prof. Dr. Sevil Weinkauf
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Dr. Adelbert Bacher
2. Univ.-Prof. Dr. Alfons Gierl

Die Dissertation wurde am 06.05.2003 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 10.07.2003 angenommen.

meinen Eltern

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 1999 bis April 2003 unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Dr. A. Bacher am Lehrstuhl für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität München durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. Adelbert Bacher für seine wertvollen Anregungen, Ratschläge und Diskussionen, sowie für die mir jederzeit gewährte Unterstützung und das meiner Arbeit entgegengebrachte Interesse.

Bei Herrn Dr. Markus Fischer möchte ich mich herzlich für die tolle Betreuung während der letzten drei Jahre bedanken. Seine zahlreichen Ideen waren mir stets eine große Motivation.

Vor allem aber möchte ich mich bei meinem besten Freund Dr. Stefan Gerhardt ganz herzlich bedanken, denn durch seine stets gewährte unendliche Hilfsbereitschaft, seiner super guten Laune sowie seiner moralischen Unterstützung konnte diese Arbeit gelingen.

Meiner Laborkollegin Dr. Kristina Kemter danke ich besonders herzlich für die großzügige Unterstützung bei meiner Arbeit, ich denke da u.a. an die nächtelangen NMR-Messungen, die unendliche Geduld und die gute Zusammenarbeit, die den Laboralltag bereicherte.

Frau Stefanie Bauer aus der Abt. Strukturforschung am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried danke ich recht herzlich für die fruchtbare Zusammenarbeit.

Herrn Richard Feicht danke ich ganz besonders für seine unschätzbare Hilfe bei der Proteinreinigung. Aber auch für die vielen kleinen Kaffeepausen, in denen er mich durch Rat und Tat seelisch und moralisch unterstützte.

Bei Herrn Fritz Wendling möchte ich mich für seine tatkräftige Hilfe bei der Überwindung diverser HPLC- und Computerproblemen ganz besonders herzlich bedanken.

Besonders möchte ich mich auch bei der inzwischen sehr geschrumpften Essensrunde Heidi Hofner, Johannes Kaiser und Werner Roemisch aber auch bei all

den ehemaligen Quirin Axthammer Heidi Herrmann, Rene Mühlberger, Rudi Robelek, Erik Schleicher, und vielen anderen mehr für die erfrischenden Gespräche und Diskussionen bedanken, die ein unvergesslicher Lichtblick jeden Tag darstellten.

Bei allen jetzigen und ehemaligen Mitgliedern des Lehrstuhls möchte ich mich für das freundschaftliche Arbeitsklima und die ständige Hilfsbereitschaft bedanken. Insbesondere gilt der Dank Petra Adam, Stefanie Echt, Wolfgang Eisenreich, Richard Feicht, Ilka Haase, Stefan Hecht, Heidi Hofner, Viktoria Illarionova, Boris Illarionov, Johannes Kaiser, Kristina Kemter, Annett Kiekebusch, Rene Mühlberger, Werner Roemisch, Susi Schiffmann, Erik Schleicher, Nick Schramek, Lars Schulte, Sebastian Schwamb, Angie Stetter und Fritz Wendling.

Bei den Kollegen vom Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried Martin Augustin, Gerd Bader, Stefanie Bauer, Holger und Berta Dobbek, Stefan Gerhardt, Jens Kaiser, Rupert Lang, Arne Ramsperger und Stefan Steinbacher möchte ich mich für die außergewöhnlich gute Atmosphäre und Zusammenarbeit, die ständige Hilfsbereitschaft, die zahlreichen tollen Feste und jede Menge Bier bedanken.

Meinen Eltern gebührt besonders liebevoller Dank für ihr Vertrauen und den grenzenlosen Rückhalt in allen Belangen.

Bei meinem Bruder möchte ich mich für die Wette bedanken, die mich beflügelt hat, meine Arbeit zügig voranzutreiben.

1	EINLEITUNG	1
1.1	Riboflavin.....	1
1.1.1	Riboflavinsynthase.....	2
1.1.1.1	Röntgenstruktur der Riboflavinsynthase aus <i>E. coli</i>	8
1.1.1.2	Riboflavinsynthasen aus Archaea.....	9
1.1.1.3	Sequenzhomologie zu biolumineszenten marinen Bakterien.....	10
1.2	Die Biosynthese der Folsäure.....	13
1.2.1	Dihydroneopterin Aldolase.....	16
1.2.2	Röntgenstruktur der Dihydroneopterin Aldolase aus <i>S. aureus</i>	16
1.2.2.1	Aktives Zentrum der Dihydroneopterin Aldolase.....	17
1.2.2.2	Reaktionsmechanismus der Dihydroneopterin Aldolase	17
1.3	Ziele der Arbeit.....	21
2	MATERIAL UND METHODEN	22
2.1	Geräte	22
2.2	Chemikalien	24
2.3	Extinktionskoeffizienten	25
2.4	Bakterienstämme.....	26
2.5	Expressionsvektor	26
2.6	Molekularbiologische Methoden.....	27
2.6.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	27
2.6.2	Reinigung von DNA-Fragmenten	27
2.6.2.1	Direkte Reinigung von PCR-Fragmenten (ohne Agarosegelelektrophorese)...	28
2.6.2.2	Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	29
2.6.3	Agarosegelelektrophorese.....	29
2.6.4	DNA-Konzentrationsbestimmung	30
2.6.5	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> - Zellen und Transformation	31
2.6.5.1	Kompetente Zellen nach Hanahan	31
2.6.5.2	Transformation mit kompetenten Zellen nach Hanahan.....	32
2.6.5.3	Herstellung von elektrokompetenten Zellen.....	32
2.6.5.4	Elektroporation elektrokompetenter Zellen	33
2.6.6	<i>In vitro</i> -Amplifikation von DNA mittels PCR.....	34
2.6.6.1	Standard-PCR	34
2.6.6.2	PCR-Screening	35
2.6.7	Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen.....	36
2.6.8	Ligierung von DNA-Fragmenten.....	37
2.6.9	DNA-Sequenzierung.....	37
2.6.10	Konstruktion von Mutantenplasmiden der Riboflavinsynthase aus <i>S. pombe</i>	38
2.6.11	Riboflavinsynthase aus <i>M. jannaschii</i>	39
2.6.12	Yellow-Fluorescent-Protein aus <i>V. fribrio</i>	39
2.6.13	Dihydroneopterin Aldolase aus <i>A. thaliana</i>	39

2.7	Stammhaltung und proteinchemische Methoden	39
2.7.1	Kulturmedien	39
2.7.2	Stammhaltung	40
2.7.3	Kulturbedingungen	41
2.7.3.1	Selenomethioninexpression	41
2.7.4	Zellaufschluss mit Ultraschall zur Proteingewinnung	42
2.7.5	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	43
2.7.6	Proteinbestimmung nach Bradford	44
2.8	Proteinreinigung	45
2.8.1	Expression und Reinigung der Riboflavinsynthase aus <i>S. pombe</i>	45
2.8.2	Reinigung der Riboflavinsynthase aus <i>M. jannaschii</i>	46
2.8.3	Reinigung der Dihydroneopterinaldolase aus <i>A. thaliana</i>	48
2.8.4	Bestimmung der enzymatischen Aktivität	49
2.8.4.1	Test auf Riboflavinsynthaseaktivität	49
2.8.4.2	Kinetische Untersuchung der Riboflavinsynthase aus <i>S. pombe</i>	49
2.8.4.3	Kinetische Untersuchung der Riboflavinsynthase aus <i>M. jannaschii</i>	50
2.8.4.4	Test auf Flavokinaseaktivität	50
2.8.4.5	Test auf Aldolaseaktivität	51
2.8.5	N-terminale Sequenzierung nach EDMAN.....	51
2.8.6	Analytische Ultrazentrifugation.....	51
2.8.7	NMR-Spektroskopie	54
2.8.7.1	¹⁹ F-NMR-Spektren.....	54
2.8.8	Massenspektrometrie	55
2.9	Kristallographische Methoden	55
2.9.1	Proteinkristallisation	55
2.10	Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)	57
2.10.1	Stationäre Phase	57
2.10.2	Mobile Phase	57
2.10.3	Auftrennung der Reaktionsprodukte des Testes auf Riboflavinsynthase- bzw. Flavokinaseaktivität	57
2.10.4	Auftrennung der Reaktionsprodukte des Testes auf Aldolaseaktivität	58
3	ERGEBNISSE	59
3.1	Untersuchungen zur Riboflavinsynthase aus <i>S. pombe</i>	59
3.1.1	Klonierung der Riboflavinsynthase und deren Mutanten aus <i>S. pombe</i>	59
3.1.2	Expression und Reinigung der Wildtyp Riboflavinsynthase aus <i>S. pombe</i>	61
3.1.2.1	Δ H24-Mutante der Riboflavinsynthase aus <i>S. pombe</i>	63
3.1.2.2	Selenomethioninanzucht.....	64
3.1.3	Molekulargewichtsbestimmung der Riboflavinsynthase aus <i>S. pombe</i> mittels MALDI-MS.....	64
3.1.4	Analytische Ultrazentrifugation.....	65
3.1.4.1	Grenzschichtsedimentation.....	65
3.1.4.2	Sedimentationsgleichgewichtsanalyse.....	66
3.1.5	Struktur der Riboflavinsynthase aus <i>S. pombe</i>	67
3.1.5.1	Kristallisation der Riboflavinsynthase aus <i>S. pombe</i>	67
3.1.5.2	Strukturbeschreibung der Riboflavinsynthase aus <i>S. pombe</i>	71
3.1.6	Photometrische Bestimmung des kinetischen Verhaltens der Wildtyp Riboflavinsynthase und Mutanten aus <i>S. pombe</i>	75

3.1.7	¹⁹ F-NMR-Untersuchungen der Riboflavinsynthase aus <i>S. pombe</i> mit verschiedenen Fluorliganden.....	78
3.1.7.1	¹⁹ F NMR Experiment der Wildtyp Riboflavinsynthase aus <i>S. pombe</i> mit 6-Trifluoromethyl-7-oxo-8-ribityllumazin.....	79
3.1.7.2	¹⁹ F NMR Experiment verschiedener Mutanten der Riboflavinsynthase aus <i>S. pombe</i> mit 6-Trifluoromethyl-7-oxo-8-ribityllumazin	82
3.1.7.3	¹⁹ F NMR Experiment mit Wildtyp und verschiedener Mutanten der Riboflavinsynthase aus <i>S. pombe</i> mit 6, 7-Bis(trifluoromethyl)-8-ribityllumazinhydrat (Epimer A)	85
3.2	Untersuchung zur Riboflavinsynthase aus <i>M. jannaschii</i>.....	89
3.2.1	Klonierung	89
3.2.2	Expression und Reinigung der Wildtyp Riboflavinsynthase aus <i>M. jannaschii</i> ..	91
3.2.2.1	Selenomethionin-Markierung der Wildtyp Riboflavinsynthase aus <i>M. jannaschii</i>	94
3.2.3	Analytische Ultrazentrifugation.....	94
3.2.3.1	Sedimentationsgleichgewichtsanalyse.....	94
3.2.4	Kristallisation der Riboflavinsynthase aus <i>M. jannaschii</i>	97
3.2.4.1	Kristallisation der Punktmutante P46S aus <i>M. jannaschii</i>	97
3.2.4.2	Kristallisation der Wildtyp Riboflavinsynthase aus <i>M. jannaschii</i>	99
3.2.5	Metallabhängigkeit der Riboflavinsynthase aus <i>M. jannaschii</i>	101
3.2.5.1	Versuche zur Aktivierung der Riboflavinsynthase aus <i>M. jannaschii</i> durch Zugabe divalenter Kationen.....	102
3.2.5.2	Versuche zur temperaturabhängigen Aktivierung der Riboflavinsynthase aus <i>M. jannaschii</i>	103
3.2.6	Photometrische Bestimmung des kinetischen Verhaltens der Riboflavinsynthase aus <i>M. jannaschii</i>	105
3.2.7	Untersuchung auf mögliche Flavokinaseaktivität.....	106
3.2.8	¹⁹ F-NMR-Untersuchungen der Riboflavinsynthase aus <i>M. jannaschii</i> mit 6,7-Bis(trifluoromethyl)-8-ribityllumazinhydrat und 6-Trifluoromethyl-7-oxo-8-ribityllumazin	108
3.3	Untersuchungen zu Yellow-Fluorescent-Protein aus <i>Vibrio fischeri</i>	110
3.3.1	Klonierung	110
3.3.2	Expressionsversuche von Yellow-Fluorescent-Protein aus <i>V. fischeri</i>	110
3.3.2.1	Fusionskonstrukt von Yellow-Fluorescent-Protein aus <i>V. fischeri</i> mit Maltose Binding Protein	112
3.3.2.2	Fusionskonstrukt von Yellow-Fluorescent-Protein aus <i>V. fischeri</i> mit His-Schwanz.....	112
3.4	Untersuchungen zur Dihydroneopterin Aldolase aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	113
3.4.1	Klonierung	113
3.4.2	Expression und Reinigung der Dihydroneopterin Aldolase aus <i>A. thaliana</i>	114
3.4.3	Struktur der Dihydroneopterin Aldolase aus <i>A. thaliana</i>	117
3.4.3.1	Kristallisation der Dihydroneopterin Aldolase aus <i>A. thaliana</i>	117
3.4.3.2	Strukturbeschreibung der Dihydroneopterin Aldolase aus <i>A. thaliana</i>	120
3.4.4	Bestimmung der enzymatischen Aktivität der Dihydroneopterin Aldolase aus <i>A. thaliana</i> mittels HPLC	123
3.4.4.1	Temperaturabhängigkeit der Dihydroneopterin Aldolase aus <i>A. thaliana</i>	124
4	DISKUSSION	125

4.1	Riboflavinsynthase aus <i>S. pombe</i>	125
4.2	Riboflavinsynthase aus <i>M. jannaschii</i>	142
4.3	Dihydronepterin Aldolase aus <i>A. thaliana</i>	145
5	ZUSAMMENFASSUNG	148
6	LITERATUR	153
7	ANHANG	169

Wissenschaftliche Abkürzungen

Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AT	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CEOL	Carboxyethyl-7-oxo-8-ribityllumazin
ddH ₂ O	<i>aqua bidestilata</i>
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DHNA	Dihydroneopterin Aldolase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamin-N', N', N', N'-tetraacetat
Epimer A	6, 7-Bis(trifluoromethyl)-8-ribityllumazinhydrat
FAD	Flavinadenindinukleotid
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
FMN	Flavinmononukleotid
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
h	Stunde
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IPTG	Isopropyl-β-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
kDa	kilo Dalton
LB	Luria-Bertani
min	Minute
MAD	Multiple Anomalous Dispersion
MJ	<i>Methanococcus jannaschii</i>
MPD	2-Methyl-2,4-pentandiol
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
Ni ²⁺ -NTA	Nickel(II)-Nitrilotriessigsäure
OD	optische Dichte

ORF	Open Reading Frame
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PEG	Polyethylenglycol
PCR	Polymerase Chain Reaction
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RS	Riboflavinsynthase
RT	Raumtemperatur
S	Svedberg
SDS	Sodium Dodecylsulfat
SSP	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TB	Thrombinschnittstelle
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultra Violett
UZ	Ultrazentrifugation
VF	<i>Vibrio fischeri</i>
YFP	Yellow-Fluorescent-Protein
WT	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Riboflavin

Riboflavin (Vitamin B₂) spielt in Form seiner Flavocoenzyme FMN (Riboflavin-5'-Phosphat; „Flavinmononukleotid“; siehe Abbildung 1.1) und FAD (Flavinadenindiphosphat, „Flavinadenindinukleotid“; siehe Abbildung 1.1) in allen Organismen für die Katalyse von vielen Redox-Reaktionen und für eine Vielzahl anderer Funktionen im Stoffwechsel eine wichtige Rolle. Seit der Entdeckung der Flavine in den 30iger Jahren (siehe Übersichtsartikel: Bacher *et al.* 2001) wurden durch umfangreicher Forschungsarbeiten zahlreiche Flavinabhängige Redoxenzyme identifiziert. In den letzten Jahren sind zahlreiche Übersichtsartikel zu den Arbeiten am Biosyntheseweg von Riboflavin erschienen (Bacher *et al.* 2001, 2000, 1996, 1993a, 1993b, 1991, Plaut *et al.* 1974, Plaut, 1971, 1961, Brown *et al.* 1982, 1963).

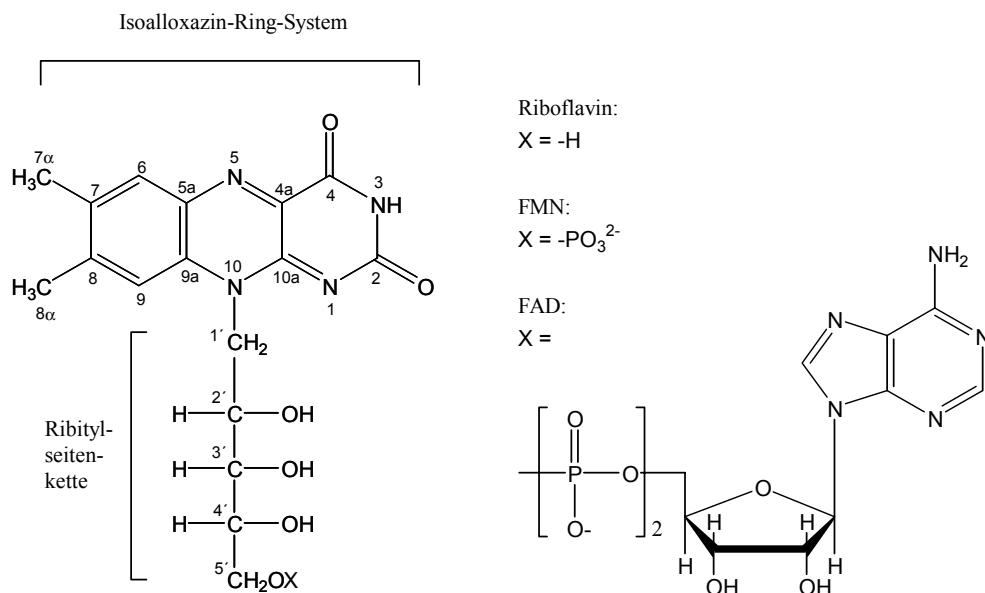


Abb. 1.1: Riboflavin (7, 8-Dimethyl-10-(D-1-Ribityl)-Isoalloxazin)

Pflanzen und viele Mikroorganismen können Flavine aus einfachen Grundstoffen synthetisieren. Tiere müssen Riboflavin bzw. Derivate mit der Nahrung aufnehmen (Müller *et al.* 1988). Zahlreiche humanpathogene Mikroorganismen (z.B. *Enterobacteriaceae*) sind auf die endogene Riboflavinbildung zwingend angewiesen und können das Vitamin bzw. die davon abgeleiteten Coenzyme nicht aus dem umgebenden Milieu aufnehmen, da sie nicht über ein entsprechendes Transportsystem verfügen. Hemmstoffe für die Enzyme der Riboflavinbiosynthese könnten deshalb als Antibiotika wirken.

Untersuchungen am Biosyntheseweg von Riboflavin wurden mit verschiedenen Organismen wie Eubakterien (*Bacillus subtilis*; *Escherichia coli*); Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*; *Candida guilliermondii*; *Schizosaccharomyces pombe*), Ascomyceten (*Ashbya gossypii*; *Eremothecium ashbyi*) und Archaea (*Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Methanococcus jannaschii*) durchgeführt.

1.1.1 Riboflavinsynthese

Die Riboflavinsynthese (RS) katalysiert den letzten Schritt im Biosyntheseweg von Riboflavin (siehe Abbildung 1.2). In der vorliegenden Arbeit wurde der Reaktionsmechanismus der RS näher untersucht.

Abbildung 1.2 zeigt den katalytischen Zyklus der Riboflavinbildung und die anschließende Metabolisierung des unphosphorylierten Riboflavins durch die Enzyme Flavokinase und FAD-Synthetase zu den Kofaktoren FMN und FAD, welche in allen zellulären Organismen unentbehrlich sind (Bacher *et al.* 1991b).

In stöchiometrischen Mengen bei dieser Dismutationsreaktion aus zwei 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin Molekülen entstehen Riboflavin (**IX**) und 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (**VI**). Letzteres wird als Substrat der Lumazinsynthase im Biosyntheseweg wiederverwendet (Plaut, 1963, Wacker 1964). Dabei dient ein Lumazinmolekül (**VIII**) als Donor einer 4 Kohlenstoffeinheit, welche auf das zweite Lumazinmolekül übertragen wird (Plaut 1960, Goodwin *et al.* 1961).

Diese Dismutationsreaktion läuft erstaunlicherweise auch ohne Katalysator unter relativ milden Bedingungen ab. So entsteht aus sauren oder neutralen wässrigen Lösungen von 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin bei etwa 90°C Riboflavin (Beach *et al.* 1969, Rowan *et al.* 1963, 1968).

Die enzymkatalysierte und die nicht-enzymkatalysierte Reaktion verlaufen unter identischer Regiochemie, in der die 4 Kohlenstoffatome mit umgekehrter Polarität in den Xylolring des Vitamins eingebaut werden (Bacher *et al.* 1983, Beach *et al.* 1970a, 1970b, Paterson *et al.* 1969, 1972, Sedlmaier *et al.* 1987).

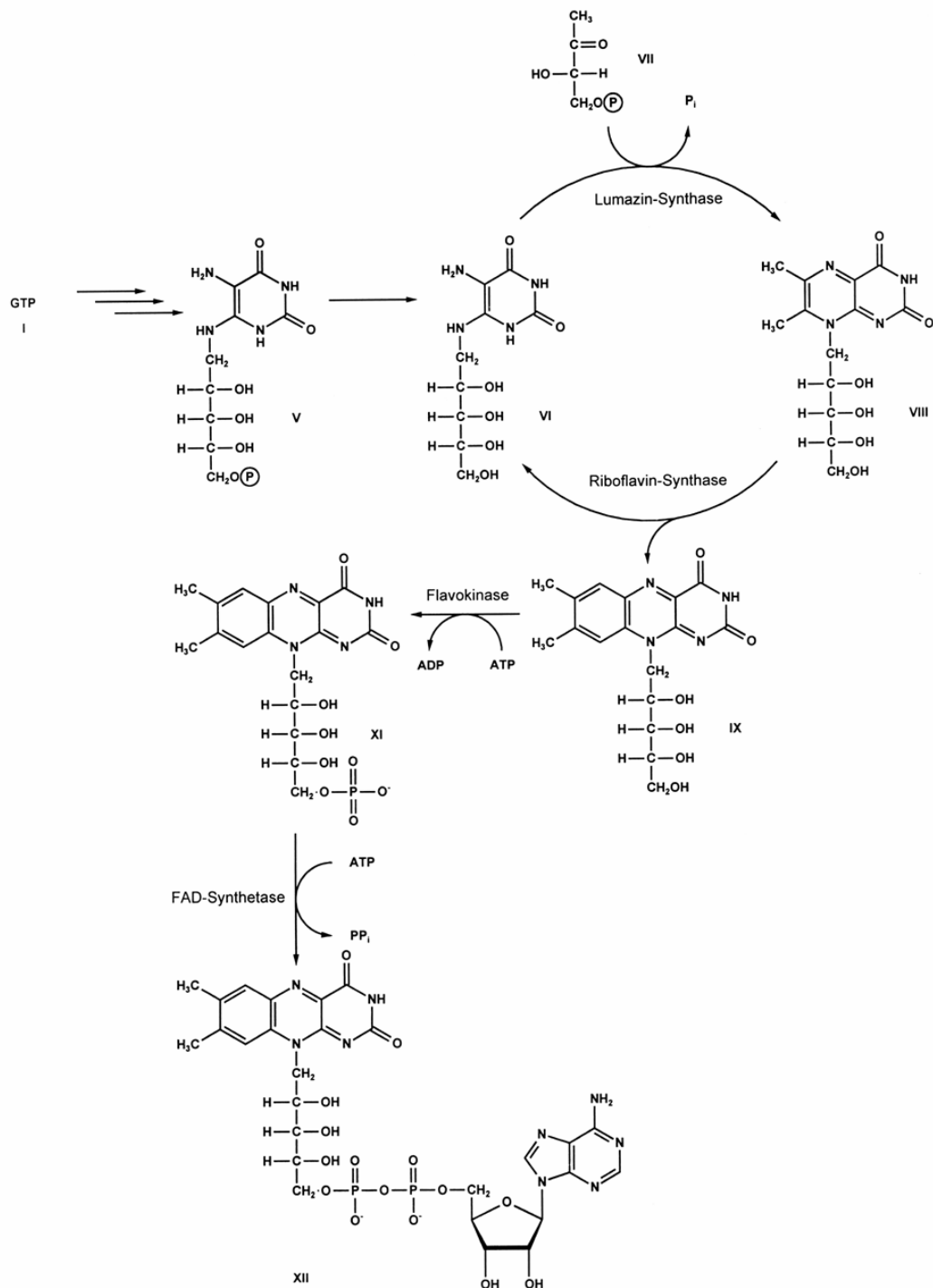


Abb. 1.2: Katalytischer Zyklus der Riboflavinbildung und anschließender Umsetzung zu den Kofaktoren Flavinmononukleotid (FMN; **XI**), Flavinadenindinukleotid (FAD; **XII**)

Unabhängig voneinander entwickelten Plaut und Wood ein Modell für den Mechanismus der Riboflavinsynthase katalysierten Dismutationsreaktion. Die Methylgruppe in Position 7 des 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazins ist mit einem pK-Wert von 8,5 ungewöhnlich sauer (Pfleiderer *et al.* 1973), so dass eine leichte Deprotonierung an dieser Stelle möglich ist. Das dabei entstehende Exomethylenanion (**1a**) (Beach *et al.* 1970a, Paterson *et al.* 1969, 1972, Plaut *et al.* 1970) greift im ersten Schritt ein benachbartes Lumazinmolekül in Position 7 an, welches ein an Position 6 gebundenes Nukleophil **X** enthält (Beach *et al.* 1969, 1970b, Plaut *et al.* 1975, 1976, Rowan *et al.* 1963, 1968, Paterson *et al.* 1969, 1972). Das daraus entstehende Lumazindimer (**3**) reagiert über mehrere Ringöffnungs- und Ringschlussreaktionen schließlich zu Riboflavin und 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion.

Als Nukleophil wurde ein Wassermolekül, eine Seitenkette einer Aminosäure oder die intramolekulare Reaktion mit der Ribitylseitenkette vorgeschlagen (Plaut *et al.* 1976). Für die enzymkatalysierte Reaktion ist die gleichzeitige Bindung zweier Substratmoleküle mit antiparalleler Orientierung erforderlich. Ligandenbindungsstudien haben bestätigt, dass jede Untereinheit der homotrimeren Riboflavinsynthase zwei Lumazinmoleküle binden kann (Harvey *et al.* 1966, Plaut 1971, Otto *et al.* 1981).

2001 wurde durch Illarionov und Mitarbeiter mit Hilfe einer sehr reaktionslangsamen Mutante S41A aus der *E. coli* Riboflavinsynthase ein pentazyklisches Dimerisierungsprodukt (**4**) von 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin erfolgreich isoliert (Abbildung 1.3). Dieses Intermediat wird durch die *E. coli* Riboflavinsynthase weiter zu Riboflavin in zwei Eliminierungsschritten umgesetzt. Davon ausgehend wurde ein neuer hypothetischer Reaktionsmechanismus der Riboflavinsynthase postuliert.

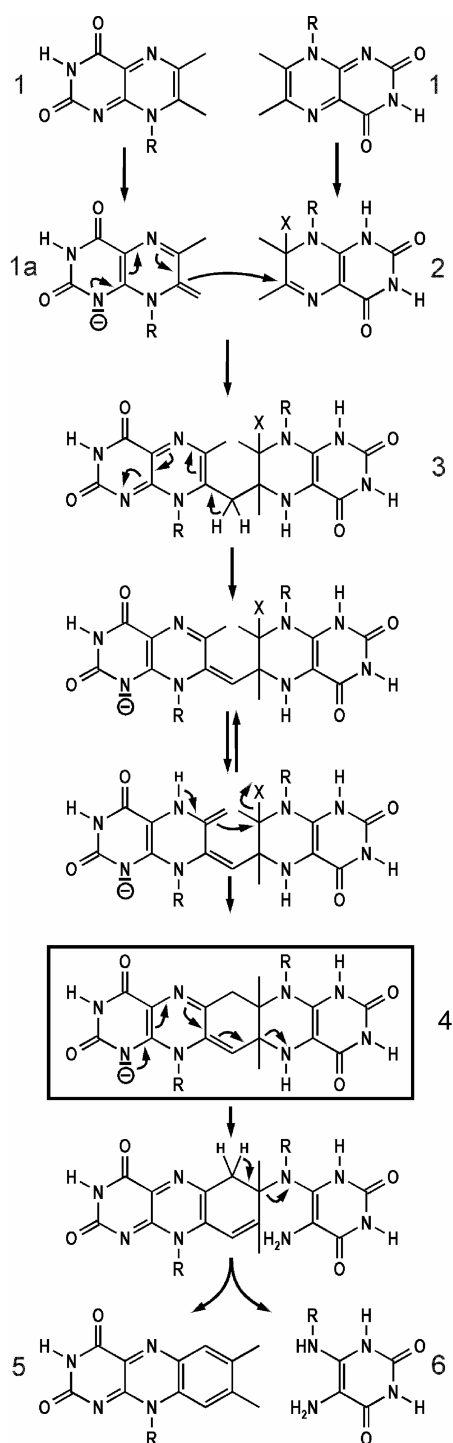


Abb. 1.3: Hypothetischer Reaktionsmechanismus der durch die Riboflavinsynthase katalysierten Riboflavinbildung (**5**) aus zwei Molekülen 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin (**1**) über das pentazyklische Intermediat (**4**), **X**: unbekanntes Nukleophil, **R**: Ribitylseitenkette (Illarionov *et al.* 2001).

Riboflavinsynthasen wurden in einer großen Zahl von Mikroorganismen und Pflanzen gefunden. Die Riboflavinsynthasen aus Eubakterien und Hefen sind homotrimere Proteine mit einer ungefähren Masse von 23 kDa pro Untereinheit.

Aus *B. subtilis* wurden zwei verschiedene Enzyme mit Riboflavinsynthase-Aktivität isoliert und charakterisiert. Die sogenannte leichte Riboflavinsynthase (70 kDa) ist aus einem Trimer identischer Untereinheiten aufgebaut. Die „schwere Riboflavinsynthase“ besteht aus einem bifunktionellen Enzymkomplex von Lumazin- und Riboflavinsynthase mit einer Masse von ca. 1 MDa (Schott *et al.* 1990c), wobei die trimere Riboflavinsynthase von einem Capsid aus 60 Lumazinsynthase-Untereinheiten mit ikosahedrischer 532 Symmetrie umgeben ist (Bacher *et al.* 1980, 1986, Ladenstein *et al.* 1986).

Die Aminosäuresequenzen der Riboflavinsynthase aus Eubakterien und Hefen sind durch ihre interne Sequenzhomologie charakterisiert (Schott *et al.* 1990a, 1990b).

Schott *et al.* (1990a) haben aus der internen Aminosäuresequenzhomologie die Hypothese abgeleitet, dass jede Untereinheit in zwei topologisch ähnliche Domänen gefaltet sei, wobei jede Domäne je ein Lumazinmolekül bindet. Erste Röntgenbeugungsexperimente von Meining *et al.* (1998) an Kristallen der Riboflavinsynthase aus *E. coli* unterstützten diese Hypothese. Das aktive Zentrum wurde an der Kontaktstelle zweier angrenzender Domänen lokalisiert. Es wurde angenommen, dass zwei Substratmoleküle planar zwischen angrenzenden Domänen übereinander liegen und zwar so, dass die Ribitylseitenketten entgegengesetzt sind. (Eberhardt *et al.* 1996).

Die N-terminale und C-terminale Domäne der *E. coli* Riboflavinsynthase konnte löslich in einem rekombinanten Bakterienstamm exprimiert werden. Die N-terminale Domäne (Rest 1-97) formte ein stabiles Homodimer mit relativ hoher Affinität zu Riboflavin. Meining *et al.* 1998 kristallisierten die N-terminale Domäne und konnten eine C₂-Symmetrie feststellen. Die Struktur des artifiziellen Dimers der N-terminalen Domäne in Komplex mit Riboflavin konnte mittels NMR-Spektroskopie ermittelt werden (Truffault *et al.* 2001) und steht in Einklang mit den Vermutungen aus den kristallographischen Experimenten (Meining *et al.* 1998).

¹⁹F NMR Protein Perturbationsstudien mit fluorsubstituierten Substratanalogen deuteten daraufhin, dass die Bindungsstellen der homotrimeren Riboflavinsynthase nicht topologisch äquivalent sind (Illarionov *et al.* 2001, Cushman *et al.* 1991, 1992, 1993). Diese Experimente zeigten, dass bestimmte Liganden in bis zu vier verschiedenen Zuständen an das Protein gebunden waren, wohingegen nur zwei verschiedene Zustände (einen für die N-terminale und einen für die C-terminale Domäne) in einem c₃-symmetrischen Homotrimer zu erwarten gewesen wären. Diese Beobachtungen stimmen sehr gut mit der Röntgenstrukturanalyse der *E. coli* Riboflavinsynthase überein, da diese keine trigonal molekulare Symmetrie ergab.

1.1.1.1 Röntgenstruktur der Riboflavinsynthase aus *E. coli*

Die Riboflavinsynthase aus *E. coli* ist ein Homotrimer aus Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von 23 kDa. Die mittels Röntgenstrukturanalyse bis zu einer Auflösung von 2,0 Å ermittelte Struktur der *E. coli* Riboflavinsynthase bestätigte die starke Ähnlichkeit der Faltungseigenschaften von N- bzw. C-terminaler Domäne. Über die Natur des aktiven Zentrums sowie über das reaktionseinleitende Nukleophil X und damit über die endgültige Klärung des Reaktionsmechanismus konnten nur Vermutungen aufgestellt werden (Liao *et al.* 2000). Liao und seine Mitarbeiter diskutieren, dass die Bildung eines aktiven Zentrums durch Zusammenlagerung benachbarter Monomere zustande kommt. Die beiden anderen möglichen aktiven Zentren bleiben dabei weit geöffnet (Liao *et al.* 2001). Durch eine trimere Struktur kann immer nur eine Umsetzung der Lumazine zum Riboflavin zeitgleich ablaufen.

1.1.1.2 Riboflavinsynthesen aus Archaea

Die Riboflavinsynthase aus *M. jannaschii* ist mit der aus *M. thermoautotrophicum* zu 66 % identisch. Untersuchungen zur letztgenannten Riboflavinsynthase wurden von Eberhardt *et al.* 1997 durchgeführt. Im Gegensatz zu den bislang bekannten Riboflavinsynthesen aus Hefe und Eubakterien braucht diese zwingend Mg-Ionen für die Riboflavinbildung aus 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin (Eberhardt *et al.* 1997).

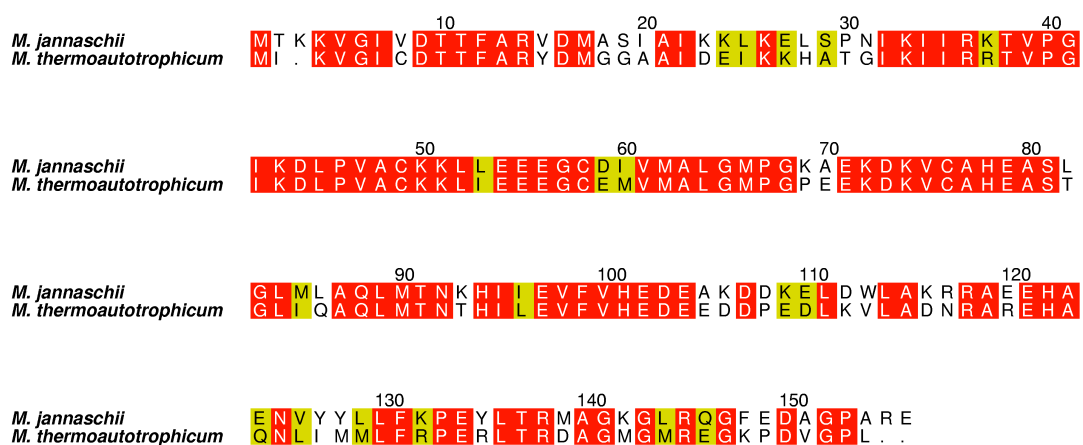


Abb. 1.4: Aminosäuresequenzvergleich der Riboflavinsynthesen aus *M. jannaschii* und *M. thermoautotrophicum*, die identischen Aminosäuren sind rot umrandet, die ähnlichen gelb unterlegt.

Auffällig ist auch, dass die Untereinheit der Riboflavinsynthase aus den Archaeobakterien im Vergleich zu denen aus Hefe und Eubakterien mit einer ungefähren Masse von 17 kDa kleiner ist. Eine interne Aminosäuresequenzhomologie, welche die Riboflavinsynthesen aus Hefe und Eubakterien auszeichnet, konnte nicht gefunden werden (Eberhardt *et al.* 1997).

1.1.1.3 Sequenzhomologie zu biolumineszenten marinen Bakterien

In biolumineszenten marinen Bakterien wurden Proteine mit Sequenzhomologie zur Riboflavinsynthese gefunden wie zum Beispiel das „Yellow-Fluorescent-Protein“ (YFP) aus *Vibrio fischeri* oder das „Lumazin-Protein“ (LumP) aus *Photobacterium leiognathi*. In der folgenden Abbildung 1.5 ist zu erkennen, dass 40 Aminosäuren identisch sind. Es ist anzunehmen, dass diese eine Rolle in der Lumazinbindung spielen.

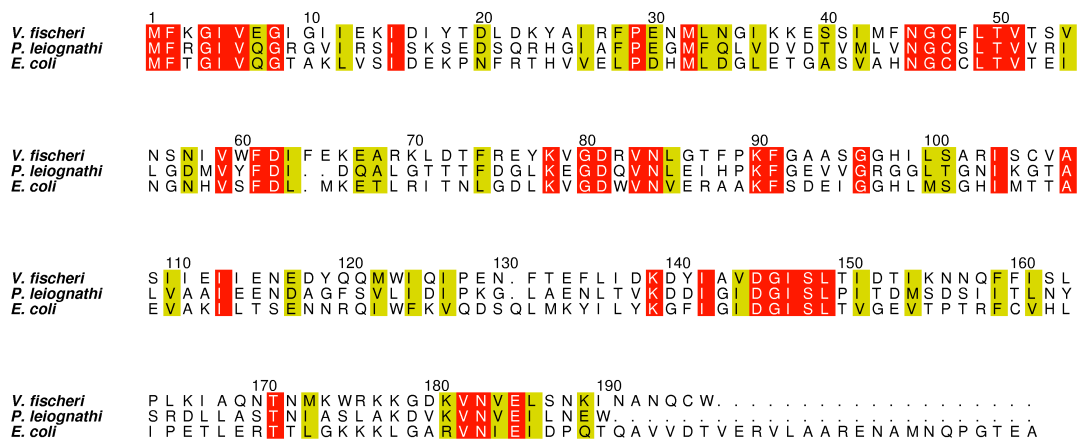


Abb. 1.5: Sequenzvergleich von YFP aus *V. fischeri*, LumP aus *P. leiognathi* und Riboflavinsynthese aus *E. coli*, die identischen Aminosäuren sind rot umrandet, die ähnlichen gelb unterlegt.

Die Lichtemission dieser biolumineszenten Bakterien ist das Ergebnis einer enzymkatalysierten Reaktion. Durch die Luziferase und Flavin-Monooxygenase entsteht aus FMNH₂, O₂ und einem langkettigen Aldehyd unter Lichtemission FMN, H₂O und eine langkettige Fettsäure (Baldwin *et al.* 1990, Daubner *et al.* 1987). Das Emissionsmaximum liegt bei den meisten *V. fischeri*-Stämmen bei 485 nm (blau). Leisman und Nealson identifizierten 1982 ein flavinhaltiges YFP aus dem *V. fischeri* Y-1-Stamm. Sie konnten zeigen, dass in Anwesenheit von YFP das Emissionsspektrum der Luziferase einen zweiten Peak bei 545 nm zeigt. Dieser Effekt scheint aber temperaturabhängig zu sein (Ruby *et al.* 1977). Die *V. fischeri*

Y-1-Zellen emittieren bei niedrigen Temperaturen gelbes Licht, bei höheren Temperaturen verschiebt sich der Peak reversibel zu blau (Cho *et al.* 1989).

Im Gegensatz dazu emittieren die marinen Bakterien *P. phosphoreum* und *P. leiognathi* das Licht bei einem Maximum von 470 nm. Beide Organismen produzieren das LumP, welches innerhalb der beiden Spezies leicht unterschiedlich ist und ein Molekulargewicht von 22 kDa besitzt (Gast *et al.* 1978). Als prosthetische Gruppe kann LumP 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin (Koka *et al.* 1979), Riboflavin und, noch schwächer gebunden, FMN enthalten, wobei die letzten beiden keinen biolumineszenten Effekt zeigen (Petushkov *et al.* 1995). Ausschließlich Lumazin verursacht *in vitro* eine Verschiebung im Emissions-Spektrum verschiedener Luziferasen (Lee *et al.* 1982), ähnlich wie bei YFP (Baldwin *et al.* 1990). Als Erklärung hierfür gilt ein langlebiger und enger Komplex zwischen LumP und einem Intermediat der Biolumineszenzreaktion, der in zeitaufgelösten Anisotropieexperimenten gefunden werden konnte (Lee 1993, Lee *et al.* 1989a, b). Innerhalb dieses Komplexes ist eine schwache gekoppelte Dipol-Dipol-Wechselwirkung zwischen dem Flavin des Fluoreszenztransienten (Luziferase-Flavin) und dem Lumazin-Liganden (Petushkov *et al.* 1996) vorhanden. Diese Energieeffekte sind mit dem Förster-Transfer vereinbar (Förster *et al.* 1948).

Die Luziferase katalysierte Reaktion ist im Gegensatz zur Autooxidation von FMNH₂ um den Faktor 20 verlangsamt (Gibson *et al.* 1962, 1963), so war es möglich Intermediate der Reaktion zu isolieren und zu charakterisieren. Sirokman *et al.* folgerten 1995 daher, dass YFP mit einem Reaktionsintermediat (postuliert: Peroxyhemiacetal) interagiert und einen Komplex bildet, der reversibel ist und bei höheren Temperaturen bevorzugt dissoziiert.

Petushkov *et al.* beschrieben 1996 den physikalischen Mechanismus für die Antennen-Proteine LumP und YFP noch detaillierter. Dabei hat der aliphatische Partner die Funktion, die Proteine (YFP oder LumP und Luziferase-Intermediat) zusammenzuhalten und eine mögliche Konformationsänderung zu induzieren. Es wird anhand des Modells vorgeschlagen, dass der Ligand des fluoreszierenden Proteins in der Nähe des aktiven Zentrums der Luziferase liegt.

Diese monomeren lumineszenten Proteine haben keine katalytische Aktivität und binden je ein Molekül 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin, Riboflavin oder FMN pro Proteinmolekül. Bei YFP ist FMN als Ligand die dominante Spezies neben Riboflavin. Die gebundene Menge des jeweiligen Liganden variiert abhängig von den Wachstumsbedingungen (Petushkov *et al.* 1995), aber auch die Bindung von 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin ist möglich (Petushkov *et al.* 1997). Die Gleichgewichtskonstante K_d für die Dissoziation von YFP zu FMN und dem Apo-YFP ist temperaturabhängig (4°C: 10 μ M, 15°C: 0,1 μ M) (Sirokman *et al.* 1995).

Das Gen erhielt die Bezeichnung luxY (Ruby *et al.* 1977). YFP ist ca. 24 kDa groß und nur die monomere Form zeigt enzymatische Aktivität (Sirokman *et al.* 1995).

1.2 Die Biosynthese der Folsäure

Erste Hinweise wurden im Jahre 1958 erhalten, dass Purine und im besonderen GTP als Vorstufen in der Folat-Biosynthese dienen (Aaronson *et al.* 1958). 1961 konnte durch Einbauexperimente von C¹⁴-markierten Purinen an Puppen des Kohlweißlings gezeigt werden, dass das aus den Flügeln der frisch geschlüpften Schmetterlinge isolierte Leucopterin tatsächlich aus Purinen-Vorstufen gebildet wurde (Weigand *et al.* 1961).

Der heutige Kenntnisstand in der Folat Biosynthese ist im wesentlichen Brown und seinen Mitarbeitern zu verdanken, die Ende der 60er und Anfang der 70er die einzelnen Schritte der Biosynthese untersucht haben (Brown *et al.* 1982, Green *et al.* 1996). Da Säugetiere Folsäure selbst nicht synthetisieren können, sind sie auf Folat aus der Nahrung angewiesen oder beziehen sie von Mikroorganismen aus ihrem Darmtrakt (Friedrich *et al.* 1987).

Der Folsäure-Biosyntheseweg ist als „Drug-Target“ für antimikrobielle und antiparasitäre Therapie gut untersucht. Die ersten synthetischen Breitband-Antibiotika waren Sulfonamide, deren Wirkungsweise über die Inhibition der Dihydropteroat Synthase erfolgt (Roland *et al.* 1979, Achari *et al.* 1997, Skold *et al.* 2000). Trimethoprim wirkt durch Inhibition der Dihydrofolat Reduktase (DHFR) Aktivität gegen eine Vielzahl von pathogenen Bakterien (Singer *et al.* 1966, Schweitzer *et al.* 1990, Skold *et al.* 2001).

In Abbildung 1.6 ist eine verkürzte Version der Tetrahydrofolat Biosynthese dargestellt.

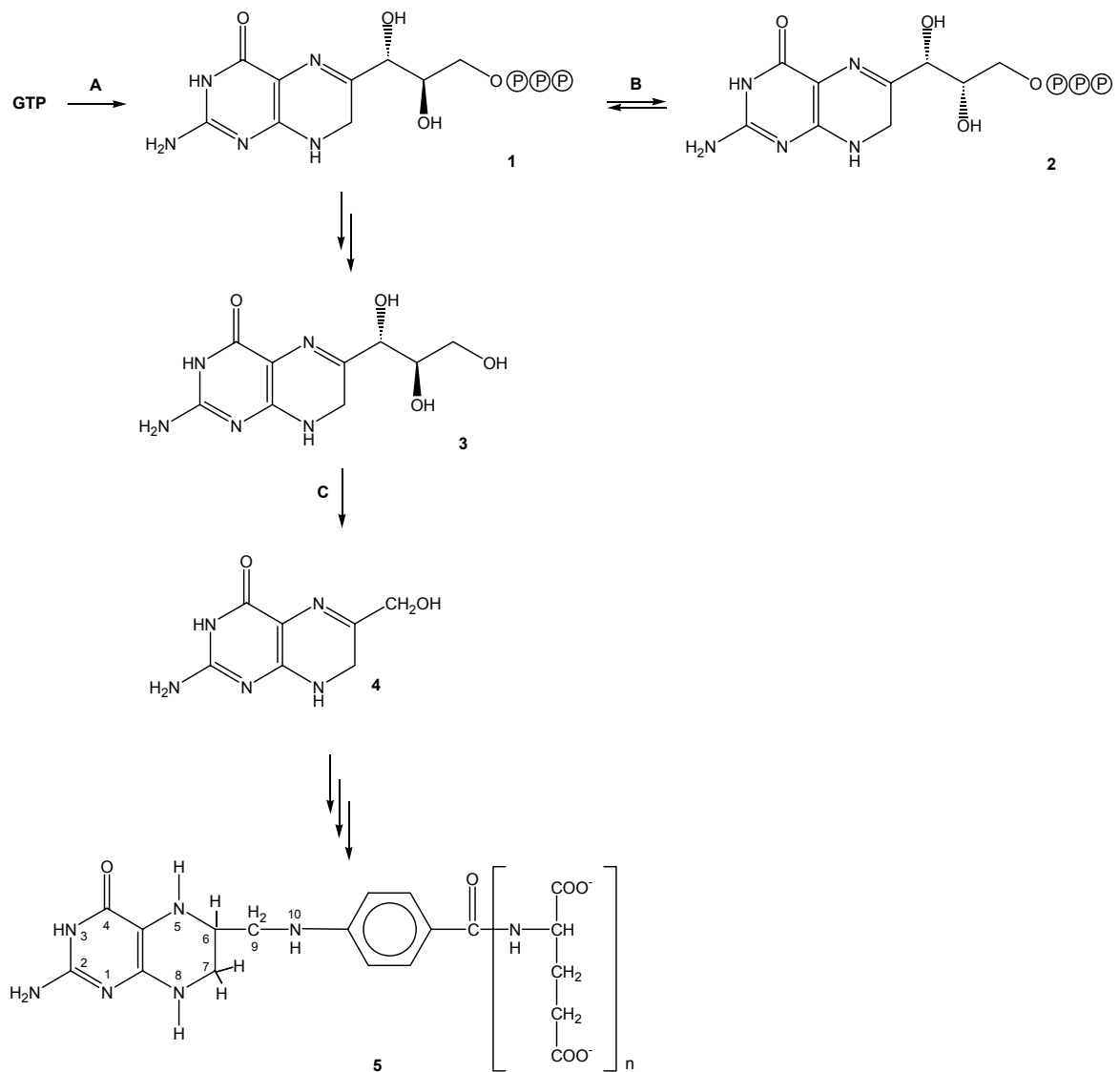


Abb. 1.6: Tetrahydrofolat-Biosynthese am Beispiel von *E. coli*. **A**, GTP Cyclohydrolase I; **B**, Dihydroneopterintriphosphat Epimerase; **C**, Dihydroneopterin Aldolase; **1**, 7,8-Dihydro-D-neopterin 3'-triphosphat; **2**, 7,8-Dihydro-L-monapterin 3'-triphosphat; **3**, 7,8-Dihydro-D-neopterin; **4**, 6-Hydroxymethyl-7,8-dihydropterin; **5**, Tetrahydrofolat.

Die GTP-Cyclohydrolase I (**A**) katalysiert den ersten Schritt des Aufbaus der Pteridinuntereinheit, dabei wird GTP zu 7,8-Dihydro-D-neopterin 3'-triphosphat (**1**) unter Abspaltung von Formiat umgesetzt (Nar *et al.* 1995). Homologien zur GTP-Cyclohydrolase II, welche den ersten Schritt der Riboflavin Biosynthese katalysiert, bestehen nicht.

Über die nächsten beiden Schritte zu 7,8-Dihydro-D-neopterin (**3**) ist bislang wenig bekannt. Suzuki und Brown postulierten, dass zur Abspaltung des Triphosphat-Restes von Dihydroneopterintriphosphat zwei aufeinander folgende, enzymatisch katalysierte Reaktionen nötig sind (Suzuki *et al.* 1974). Der erste Schritt würde demnach durch eine spezifische Dihydroneopterintriphosphat-Pyrophosphatase katalysiert, während die noch verbliebene Phosphatgruppe durch unspezifische Phosphataseaktivität entfernt wird. In jüngster Zeit wurde jedoch postuliert, dass die Abspaltung von Pyrophosphat *in vitro* allein durch die Anwesenheit zweiwertiger Kationen wie Mg^{2+} und Ca^{2+} katalysiert wird (De Saizieu *et al.* 1995).

Die Umwandlung von 7,8-Dihydro-D-neopterin (**3**) zu 6-Hydroxymethyl-7,8-dihydropterin (**4**) wird durch die Dihydroneopterin Aldolase (**C**) katalysiert (Mathis *et al.* 1980). 6-Hydroxymethyl-7,8-dihydropterin (**4**) wird durch nachfolgende Kondensation mit 4-Aminobenzoat und Glutamat durch Dihydropteroat Synthase und Dihydrofolat Synthetase zu Dihydrofolat umgesetzt (Green *et al.* 1996).

Heine und Brown haben in *E. coli* ein Enzym die Dihydroneopterintriphosphat Epimerase (**B**) gefunden, welches die Epimerisierung von 7,8-Dihydro-D-neopterin 3'-triphosphat (**1**) zu 7,8-Dihydro-L-monapterin 3'-triphosphat (**2**) katalysiert (Heine *et al.* 1975).

Die Primärstruktur zeigt Ähnlichkeiten zur Dihydroneopterin Aldolase Domäne eines multifunktionalem Folat-Biosynthese Enzyms aus *Pneumocystis carinii* (Hausmann *et al.* 1997).

Substituierte Tetrahydrofolate (**5**) haben C1-Einheiten an das N5- oder N10-Stickstoffatom gebunden. Sie dienen bei einer Reihe von Biosynthesen als Donoren von C1-Einheiten, so wird z.B. aus Homocystein durch Übertragung einer Methylgruppe (C1-Einheit) vom N5-Tetrahydrofolat Methionin gebildet. Bei Abbaureaktionen wiederum können Tetrahydrofolate als Akzeptor dienen. Die

Hauptquelle dieser C1-Einheiten stellt die Umwandlung von Serin zu Glycin dar, wobei N5, N10-Methylen-Tetrahydrofolate entsteht.

1.2.1 Dihydroneopterin Aldolase

Die Dihydroneopterin Aldolase (DHNA) katalysiert die Spaltung von 7,8-dihydroneopterin zu 6-Hydroxymethyl-7,8-dihydropterin und Glykolaldehyd. Mathis und Brown konnten das Enzym aus einem Wildtypstamm von *E. coli* bis zur Homogenität reinigen (Mathis *et al.* 1970). Dabei war die außerordentliche Hitzestabilität von großer Hilfe. Der K_m -Wert für Dihydroneopterin beträgt 9 μM (Mathis *et al.* 1970). Das Produkt 6-Hydroxymethylpterin ist ein potenter Inhibitor für die DHNA mit einem K_i von 1,7.

1.2.2 Röntgenstruktur der Dihydroneopterin Aldolase aus *S. aureus*

Die 7,8-Dihydroneopterin Aldolase (SaDHNA) aus *S. aureus* ist ein Homooktamer aus Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von 13,75 kDa. Die Aminosäuresequenz von SaDHNA ist ähnlich zu den meisten anderen bakteriellen, monofunktionellen Enzymen. Acht SaDHNA Untereinheiten bilden durch Zusammenlagerung zweier vierer-Ringe ein zylindrisches Homooktamer mit 422-Raumgruppensymmetrie und einem Durchmesser von 13 Å. Eine Stabilisierung dieser Quartärstruktur erfolgt ausschließlich durch hydrophobe Wechselwirkungen der Seitenketten benachbarter Untereinheiten. Die innere Oberfläche des Hohlzylinders enthält überwiegend geladene Reste, jeweils sechs positive und negative Ladungen von jedem Monomer.

Die Struktur von SaDHNA konnte mittels Röntgenstrukturanalyse bis zu einer Auflösung von 1,65 Å gelöst werden. Durch „Soaking“-Experimente konnte die Komplexstruktur mit dem Produkt 6-Hydroxymethyl-7,8-dihydropterin aufgeklärt und somit das aktive Zentrum lokalisiert werden (Hennig *et al.* 1998).

1.2.2.1 Aktives Zentrum der Dihydroneopterin Aldolase

Die acht äquivalenten Substratbindestellen der SaDHNA sind zwischen je zwei Untereinheiten des Homoktameres lokalisiert. Die Oberfläche der Pterin-Erkennungsstelle ist gekennzeichnet durch eine tiefe und enge Tasche mit überwiegend negativer Ladung. Glu74 bildet eine Salzbrücke mit dem Pyrimdonteil des Liganden (N3 und das Amin an C2) aus. Durch Wasserstoffbrückenbindung wird ein Wassermolekül zum Sauerstoffatom an C4 des Liganden gebunden. Des Weiteren sind die Carbonylgruppe von Asn71 und die ϵ -Aminogruppe von Lys100 an diesem Netzwerk aus Wasserstoffbrückenbindungen durch Wassermoleküle im Protein beteiligt. Eine weitere Wasserstoffbrücke wird zwischen der 2-Aminogruppe und N1 des Liganden und der Carbonylgruppe von Val52 gebildet. Die meisten hydrophoben Interaktionen sind durch die Seitenketten von Tyr54, Val48, Leu72 und Ala18 in der Bindung des Pterins bestimmt. Die zwei streng konservativen Aminosäuren Glu22 und Lys100 sind eng zu der Hydroxygruppe des Produktes positioniert und daher wichtige Repräsentanten für katalytisch essentielle Reste. Diese Art der Pterin-Erkennungsstelle ist ähnlich zu denen, die in Dihydrofolatreduktase und 6-Pyruvoyltetrahydropterin Synthase beobachtet wurden (Hennig *et al.* 1998).

1.2.2.2 Reaktionsmechanismus der Dihydroneopterin Aldolase

Die strukturellen Informationen und Ergebnisse der Mutagenese erlaubten einen Reaktionsmechanismus zu formulieren. Die DHNA wurde aufgrund ihrer Ähnlichkeit zur Kaninchenmuskel-Aldolase als Aldolase klassifiziert. Es war auch nicht überraschend, dass im aktiven Zentrum ein optimiertes Wasserstoffbrücken-Netzwerk für die Bildung eines initialen Iminium-Komplexes vorhanden ist. Dafür ist an N5 von 7,8-Dihydroneopterin ein Proton erforderlich. Der pK_a von N5 für 7,8-Dihydroneopterin ist 2,5 genau wie für 7,8-Dihydrobiopterin und 7,8-Dihydrofolat. Bei der Dihydrofolat Reduktase (DHFR) gibt es eine pK_a -Verschiebung um 4 Einheiten (bedingt durch die Interaktionen mit den Proteinseitenketten) auf 6,5, was auch für 7,8-Dihydroneopterin vorstellbar ist. In Analogie zur DHFR scheint die invariante Carboxylatgruppe, welche in die Pterinerkennungsstelle involviert ist,

eine wichtige Rolle in der Katalyse zu spielen. Möglicherweise durch die Stabilisierung des N5-protonierten Substrates. Bei der Beteiligung des protonierten N5 in der Reaktion wird weiter vermutet, dass weder Neopterin noch Tetrahydroneopterin als Substrat eingesetzt werden kann. Tetrahydroneopterin enthält kein Imin, welches für die Reaktion notwendig wäre. Die aromatische Natur des Neopterin würde das Imin während der Delokalisation deaktivieren (Hennig *et al.* 1998). Mathis und Brown vermuteten, dass das Proton von der β -Hydroxygruppe einer allgemeinen Base zu einem Enaminderivat abstrahiert wurde (Mathis *et al.* 1980). Aber die Kristallstruktur des binären Komplexes lässt vermuten, dass Lys100 in der richtigen Position ist, um als Base zu agieren. Die essentielle Rolle von Lys100 konnte durch Mutagenese (K100A) gezeigt werden, wodurch die komplette Aktivität verloren ging, sowie die Fähigkeit, das Substrat zu binden. (Hennig *et al.* 1998).

In Abbildung 1.7 ist der hypothetische Reaktionsmechanismus der Dihydroneopterin Aldolase dargestellt, welcher in Illarionova *et al.* 2002 postuliert wird.

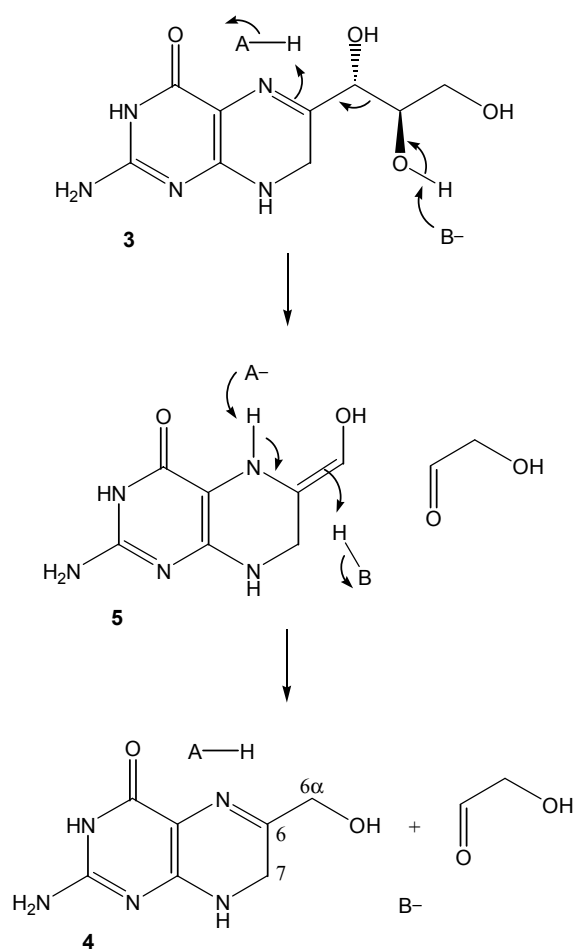


Abb. 1.7: Hypothetischer Reaktionsmechanismus der Dihydroneopterin Aldolase.

Es wird angenommen, dass die Dihydroneopterin Aldolase in einer retroaldoltypischen Reaktion 7,8-Dihydro-D-neopterin spaltet. Hierzu gibt es keine experimentellen Hinweise (Mathis *et al.* 1970). Im ersten Schritt dieses hypothetischen Mechanismus ist eine Protonierung am C6 α -Atom des postulierten Intermediates (5) erforderlich. Als Protonenquelle können dabei Seitenketten des Proteins, das Solvenz selbst oder Protonen eines vorangegangenen Intermediates dienen. Um die Stereochemie dieser Protonierung zu bestimmen, haben Illarinoa *et al.* 2002 mittels NMR-Spektroskopie den Einbau von Deuterium aus dem Solvenz in das heterozyklische Reaktionsprodukt untersucht. [1',2',3',6,7-¹³C₅] Dihydroneopterin in deuteriertem Puffer mit DHNA reagierte zu [6 α ,6,7-¹³C₃]-Hydroxymethyl-7, 8 dihydropterin (4), welches durch eine Reihe von Reaktionsschritten in 6-(R)-[6,7,9,11-¹³C₄]5,10-Methylentetrahydropteroat

umgewandelt wurde. Im letzten Schritt wurde 6-(S)-Tetrahydropteroat mit ^{13}C -Formaldehyd behandelt.

Es konnte gezeigt werden, dass am C7 von 6-(R)-[6,7,9,11- ^{13}C]5,10-Methylentetrahydropteroat durch die GTP Cyclohydrolase I Deuterium eingebaut wurde, welches aus dem Solvenz stammte. Das 6α Wasserstoffatom von (**4**) besitzt erhöhte CH-Azidität aufgrund der Aktivierung des Amins im Dihydropyrazinring. Diese Aktivierung sollte sich auch auf das benachbarte C-7 Ringatom ausbreiten, aber die Azidität von den 6α und C7 Protonen scheint unterschiedlich, was die Abwesenheit von einem Deuteriumüberschuß in der Position 7 der Methylengruppe von 6-(R)-[6,7,9,11- ^{13}C]5,10-Methylentetrahydropteroat erklären könnte. Die Daten erlauben keinen Zweifel, dass die Protonierung des Intermediats (**5**) durch die Dihydroneopterin Aldolase bevorzugt in pro-S-Position erfolgt. Wegen des Deuteriumüberschusses am 6α C-Atom von (**4**) kann der Grad der Stereospezifität der Protonierung des Intermediates nicht bestimmt werden. Nicht beantwortet werden konnte die Frage, ob für den Protonentransfer zum 6α C-Atom des Enols (**5**) entweder eine azide Gruppe des Proteins oder das Lösungsmittel Wasser verantwortlich ist. Allerdings konnte die Protonierung durch ein Proton, welches in einem früheren Reaktionsschritt vom Substrat abstrahiert worden ist, ausgeschlossen werden (Illarinova *et al.* 2002).

1.3 Ziele der Arbeit

Vorrangiges Ziel der Arbeit war es, den Reaktionsmechanismus der Riboflavinsynthase (RS) mit biochemischen und spektroskopischen Methoden zu untersuchen. Ein weiterer Schwerpunkt lag dann beugungsfähige Kristalle der RS zu erhalten, um die dreidimensionale Struktur in Zusammenarbeit mit Kristallographen aufklären zu können. Die Erkenntnisse aus den biochemischen/spektroskopischen Untersuchungen sollten zusammen mit den Informationen aus den röntgenkristallographischen Daten ein tieferes Verständnis für den Reaktionsmechanismus vermitteln.

Neben der eukaryontischen RS aus der Hefe *Schizosaccharomyces pombe* sollte auch die RS aus dem hyperthermophilen Archaeobakterium *Methanococcus jannaschii* charakterisiert werden.

Die Enzyme der Riboflavin Biosynthese spielen eine wichtige Rolle als potentielle „Target“-Proteine bei der Entwicklung neuer Wirkstoffe für die Medizin.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Hochdrucksterilisator:

Sanoclav CV 2/1600, Kelomat Haushaltsgeräte (Traun/Österreich)

Analysenfeinwaage:

1602 MP, Sartorius (Göttingen)

Vakuumpumpe:

MZ 2C (VAKUUBRAND GmbH + Co/Wertheim)

zum Filtrieren und Entgasen der Eluenten für die Säulenchromatographien

pH-Meter:

E 603 mit Standard-Glaselektrode Deutsche Metrohm (Filderstadt)

Thermoblock:

Teche DRI-Block DB-2A (Gesellschaft für Laborgeräte mbH/Wertheim)

Zentrifugen:

Eppendor fzentrifuge Z 230 M mit Rotor 220 59 V, Hermle (Gosheim)

Eppendorfkühlzentrifuge Z 382 K, Hermle (Gosheim)

Kühlzentrifuge Sorval Superspeed RC-2B und RC-5B mit den Rotoren GSA, GS-3 und SS-34 (DuPont Instruments/Bad Homburg)

Vakuumpumpe Roto-Vac 3, Biotech-Fischer (Reiskirchen)

Elektrophoreseausrüstung:

Elektrophoreseapparatur Hoefer Mighty Small SE 250/SE260, Scientific Instruments (San Francisco)

Spannungsquelle Electrophoresis Power Supply EPS 300/600, Pharmacia Biotech (Freiburg)

Photodokumentation:

UV-Leuchttisch (302 nm) UVIS 131100 mit Kamera RA1, Desaga (Heidelberg), Drucker Video Copy Prozessor P68E, Mitsubishi (Japan), Computer 386X, Vilber Lourmat (Marne la Vallee, Frankreich)

Spektralphotometer:

UV-VIS-Spektrometer Ultraspec Plus, Pharmacia (Freiburg) mit Quarzküvetten von Helma/Mühlheim (Baden) zur Messung der Proteinkonzentration bei 280 nm Spektralphotometer Novaspec II, Pharmacia (Freiburg) zur OD₆₀₀-Messung und der Bradfordbestimmung mit 1/2 Mikro-Plastikküvetten (ratiolab)

Fluorimeter:

DNA-Fluorimeter TKO 100, Hoefer Scientific Instr. (San Francisco/USA)

PCR-Maschine:

Gene Amp PCR System 2400, Perkin Elmer (Norwalk, Connecticut, USA)

Elektroporator:

Gene Pulse mit Pulse Controller (Biorad, München)

Thermostatisierung:

Schüttelinkubator ISF-1-V, Adolf Kühner AG (Schweiz)

Certomat HK, B. Braun Biotech International

Brutschrank:

Psychrotherm, New Brunswick Scientific Corp. (New Brunswick, N.J., USA)

-80°C-Biofreezer:

U570 Premium, Ultra Low Temperature freezer, New Brunswick, (N.Y., USA)

Ultraschallgerät:

Branson Sonifier B-12A mit "L"-Converter, Branson SONIC Power Company (Dunbury, USA, Connecticut)

Chromatographische Proteinreinigung:

Q-Sepharose (Amersham Pharmacia, Freiburg)

Phenyl-Sepharose CL4B (Amersham Pharmacia, Freiburg)

Superdex 200 26/200 (Amersham Pharmacia, Freiburg)

Anlage zur analytischen Hochleistungsflüssigkeitschromatographie:

Knauer HPLC PUMP 64 (Knauer, Bad Homburg)

Fluoreszenz HPLC-Monitor RF-535 (Shimazu, Duisburg)

Hypersil-ODS-5 μ (Schambeck SFP GmbH, Bad Honnef)

FPLC-Anlage:

Pumpe: Pharmacia LKB GP-10

UV-Detektor: LKB Uvicord SII

(Amersham Pharmacia, Freiburg)

NMR-Spektroskopie:

DRX 500 FT-NMR-Spektrometer (Bruker, Heidelberg)

Pipettierroboter für Kristallisationsplatten:

Robocycler Gradient 96 (Stratagene, Heidelberg)

2.2 Chemikalien

Für diese Arbeit wurden Chemikalien von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma (Deisenhofen), Serva (Heidelberg), Aldrich (Steinheim), Boeringer GmbH (Mannheim), Biolabs (Schwalbach), Fluka (Neu-Ulm) und Life Technologies Ltd. (Paisley, Großbritannien) verwendet.

2.3 Extinktionskoeffizienten

In der folgenden Tabelle sind die Extinktionskoeffizienten aufgelistet, die zur Konzentrationsbestimmung verwendet wurden.

Tabelle 2.1: Extinktionskoeffizienten zur Bestimmung der jeweiligen Konzentration

Verbindung	pH-Wert	λ [nm]	ϵ [M ⁻¹ cm ⁻¹]	Literatur
Riboflavin	7	470	9100	Plaut <i>et al.</i> 1971
	1	445	11500	Cresswell <i>et al.</i> 1980
	7	445	12500	Whitby 1953
6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin	1	410	10300	Plaut <i>et al.</i> 1971
6,7-Bis(trifluormethyl)-8-ribityllumazin (Epimer A)	1	339	7943	Cushman <i>et al.</i> 1990
6,7-Bis(trifluormethyl)-8-ribityllumazin (Epimer B)	1	341	7079	Cushman <i>et al.</i> 1990
6-Trifluormethyl-7-oxo-8-ribityllumazin	1	341	12300	Cushman <i>et al.</i> 1990
5-Nitro-6-ribitylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidindion	1	323	14200	Cresswell <i>et al.</i> 1980
5-Nitroso-6-ribitylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidindion	7	313	17300	Winestock <i>et al.</i> 1971

2.4 Bakterienstämme

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die folgenden *E. coli*-Stämme mit den angegebenen Genotypen verwendet.

Table 2.2: verwendete *E. coli* Stämme

Stamm	Genotyp	Literatur
XL1-Blue	recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac[F', proAB, lacI ^q ZΔM15, Tn10(tet ^r)]	Bullock <i>et al.</i> 1987
M15[pREP4]:	lac, ara, gal, mtl, recA ⁺ , uvr ⁺ , [pREP4: lacI, kan ^r]	Zamenhof <i>et al.</i> 1972
BL21(DE3)	F ⁻ , ompT, hsdS _B , (r _B ⁻ , m _B ⁻), gal, dcm (DE3)	Studier <i>et al.</i> 1991
B834 (DE3)	F ⁻ , ompT, hsdS _B , (r _B ⁻ , m _B ⁻), gal, dcm met (DE3)	Leahy <i>et al.</i> 1992

2.5 Expressionsvektor

Als Expressionsvektor für *E. coli* wurde das Plasmid pNCO113 aus der pDS-Familie (Bujard *et al.* 1987) eingesetzt. Es leitet sich von den Plasmiden pDS56/RBSII und pDS781/RBSII-DHFRS (Stüber *et al.* 1990) und liegt in der Zelle in mittlerer Kopienzahl vor.

Neben den Standardstrukturelementen wie Replikationsursprung (ori), T5-Promotor, ribosomaler Bindungsstelle (welche aus der Shine-Dalgarno-Sequenz zusammen mit dem ATG-Start-Codon gebildet wird), Polylinker, zwei Transkriptionsterminatoren und β-Lactamasegen besitzt der Vektor noch zwei lac-Operatoren, die eine Regulation des starken T5-Phagenpromotors erlauben. Hierzu wird der pNCO113 zusammen mit dem pREP4-Vektor im Expressionsstamm *E. coli* M15 eingesetzt, der über zusätzliche Kopien des lacI-Gens verfügt und so die Zelle zur konstitutiven Expression des lac-Repressors befähigt. Über das neo-Gen, welches die Neomycinphosphotransferase II codiert, vermittelt das Plasmid pREP4 außerdem eine Kanamycinresistenz.

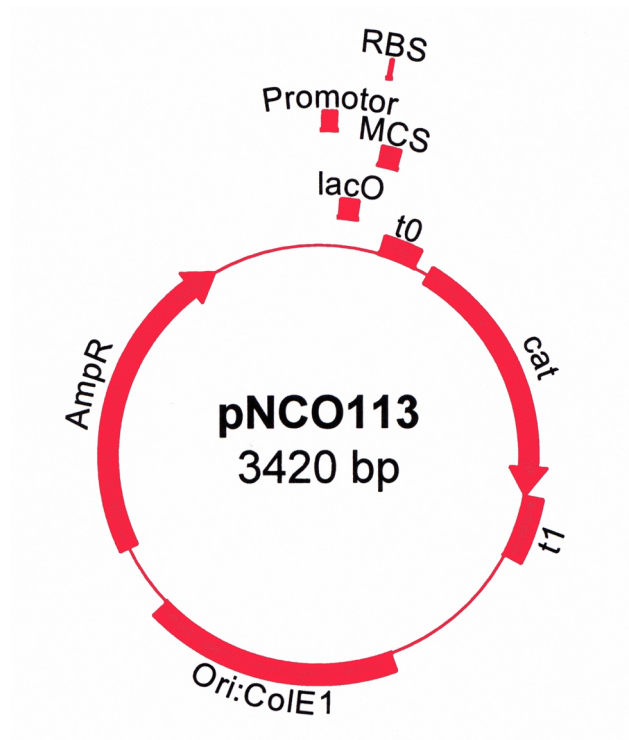


Abb. 2.1: Expressionsplasmid pNCO113: P: T5-Promotor; lacO: lacOperator; S/D: Shine-Dalgarno-Sequenz; MCS: Multiple Cloning Site; t0 und t1: Terminatorsequenzen; (cat): nicht aktives Gen der Chloramphenikoltransferase (Leserahmenverschiebung); AmpR.: Ampicillin-Resistenzgen; Ori:ColE1: Replikationsursprung.

2.6 Molekularbiologische Methoden

2.6.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Plasmid-DNA kann je nach Qualitätsanspruch auf zwei Arten gewonnen werden. Während die Schnellmethode DNA geringerer Qualität lieferte, die aber für analytische Zwecke (z. B. Restriktionsverdau) ausreichend war, lieferte die DNA-Präparation extrem saubere DNA, die sich für die präparative Anwendung eignet.

2.6.2 Reinigung von DNA-Fragmenten

Die Reinigung von DNA aus PCR- oder Restriktionsansätzen wurde unter Verwendung von Peqlab-Säulchen (Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen))

durchgeführt. Die DNA-Lösung wird bei dieser Methode mit einem chaotropen Salz (Solubilisierungspuffer) zur Zerstörung der DNA-Hydrathülle versetzt, so dass eine Bindung der DNA an die Silikagel-Membran möglich wird. Die Elution der DNA erfolgt, nach Entfernen der Salzlösung mit einem speziellen Waschpuffer und dann mit Wasser.

2.6.2.1 Direkte Reinigung von PCR-Fragmenten (ohne Agarosegelelektrophorese)

Um PCR-Fragmente für Restriktionen oder Ligierungen einsetzen zu können, müssen sie in der Regel von Zutaten der PCR, wie dNTP's oder Reste von Primern befreit und umgepuffert werden. Der PCR-Ansatz wurde daher, nachdem durch Agarosegelelektrophorese festgestellt wurde, dass die Reaktion nur ein DNA-Fragment geliefert hatte, mit Solubilisierungspuffer versetzt und auf die Extraktionssäule gegeben. Anschließend erfolgte eine kurze Zentrifugation (8000 U/min, 2 min, RT). Das Zentrifugat wurde verworfen. In die Säule wurde anschließend 750 µl Waschpuffer gegeben und zentrifugiert (siehe oben). Das Zentrifugat wurde verworfen und der Zentrifugationsschritt wiederholt. Das Säulchen mit der gewaschenen Membran wurde anschließend in ein neues steriles Eppendorf-Gefäß überführt. Die Elution der DNA erfolgte, je nach erwarteter DNA-Menge mit 10-70 µl bidestilliertem Wasser (RT, 15 min). Anschließend erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (siehe oben). Das Zentrifugat wurde am DNA-Fluorimeter vermessen (Konzentrationsbestimmung).

2.6.2.2 Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Restriktions- oder PCR-Ansätze wurden zunächst mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und die DNA durch Färbung mit Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht. Die betreffenden Banden wurden mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten, das Gelstück wurde in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß überführt und mit Solubilisierungspuffer bis zur 2 ml Marke aufgefüllt. Nach Aufschmelzen (55°C, ca. 10 min) des Gelstückes wurde wie unter Punkt 2.6.2.1 beschrieben, verfahren.

2.6.3 Agarosegelelektrophorese

Agarose-Gelsysteme dienen sowohl zur Trennung und Analyse von linearen DNA-Fragmenten und superhelikaler Plasmid-DNA als auch zur präparativen Isolierung von DNA-Fragmenten. Durch Variation der Agarosekonzentration lassen sich Fragmente im Bereich von 60-0.05 kb elektrophoretisch auftrennen. Als Längenstandards werden DNA-Molekular-Gewichtsmarker verwendet, deren Fragmentgrößen bekannt sind. Durch Auftrag der Laufstrecke der Fragmente vom Auftragungsort aus gegen den Logarithmus der Fragmentgröße wurde eine Kalibriergerade erhalten, mit deren Hilfe die Größe unbekannter Bruchstücke bestimmt werden kann. Als Molekulargewichtsstandard wurde ein Leitermarker der Firma Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen) verwendet (peqGold DNA-Leiter für Fragmentgrößen zwischen 100 und 10000 bp).

Es wurden Gele - abhängig von den zu erwarteten Fragmentgrößen - mit einer Agarosekonzentration von 1-3 % in TAE-Puffer verwendet. Die Agarose wurde in TAE-Puffer gekocht und nach Abkühlen auf ca. 60°C in einen Gelträger gegossen. Die erstarrte Gelmatrix wurde in die Elektrophoresekammer eingesetzt und mit TAE-Puffer überschichtet. Vor dem Auftragen der Proben in die Geltaschen wurden diese mit Probenpuffer (1:10 (v/v)), der zum Beschweren und als Farbmarder diente, versetzt. Der Elektrophoreselauf wurde bei einer konstanten Spannung von 80-120 V durchgeführt und dauerte, je nach Laufstrecke und angelegter Spannung zwischen 30 und 120 min. Das Gel wurde nach Beendigung der Elektrophorese in Ethidiumbromid (1µg/ml Wasser) 15 min unter Lichtausschluß gefärbt, mit entionisiertem Wasser gewaschen und unter UV-Licht (323 nm) dokumentiert. Bei präparativen Ansätzen wurden die betreffenden DNA-Banden mit einem Skalpell auf dem UV-Leuchttisch ausgeschnitten und anschließend gereinigt.

TAE-Puffer (50x): 2,0 M Tris/Acetat pH 8,2
0,1 M EDTA

Probenpuffer für Agarosegelelektrophorese: 50 % (v/v) Glycerin
0,25 % (w/v) Bromphenolblau
0,25 % (w/v) Xylenblau
in TE-Puffer gelöst

2.6.4 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die DNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte fluorimetrisch unter Verwendung des Farbstoffes Bisbenzimid H 33258. Das Absorptionsmaximum der Einlagerungsverbindung von DNA und Farbstoff liegt bei 365 nm, das Emissionsmaximum bei 458 nm. Das benutzte Fluorimeter verwendet zur Anregung eine Quecksilberlampe mit einer Bandbreite von 100 nm. Die Emission wird von einem Photomultiplier mit einer Bandbreite von 10 nm gemessen.

Vor jeder DNA-Bestimmung muss das Gerät neu kalibriert werden. Dazu wurde zunächst ein Nullwert mit frischer Farbstofflösung (1x-TNE-Puffer mit 0,1 µg/ml Bisbenzimid) bestimmt. Anschließend wurde 2 µl einer Lösung mit bekannter DNA-Konzentration in 2 ml Farbstofflösung gemessen und diese Konzentration am Fluorimeter eingestellt. Nun konnten 2 µl der DNA-Probe unbekannter Konzentration in jeweils 2 ml Farbstofflösung vermessen werden. Das Ergebnis konnte direkt in µg/µl abgelesen werden.

TNE-Puffer (10x): 100 mM Tris/HCl pH 7.4
 10 mM EDTA
 1 M NaCl

2.6.5 Herstellung kompetenter *E. coli*- Zellen und Transformation

2.6.5.1 Kompetente Zellen nach Hanahan

Zur Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen wurde die Methode nach Hanahan (1985) verwendet. Mit dieser Methode konnten Transformationsraten von 10^6 bis 10^7 Kolonien pro µg 'supercoiled Plasmid-DNA' erreicht werden.

Für die Herstellung kompetenter Zellen wurden 200 ml LB-Medium (mit Antibiotikazusätzen je nach Zelltyp) mit 2 ml einer bei 28°C gewachsenen Übernachtskultur angeimpft und mit 2 ml einer 2 M Mg^{2+} -Lösung (Endkonzentration: 5 mM $MgCl_2$, 5 mM $MgSO_4$) versetzt. Bei 37°C im Schüttelinkubator (200 U/min) bis zu einer OD_{600} von 0,4 bebrütet. Um das Zellwachstum zu stoppen, wurde die Kultur 15 min auf Eis gekühlt und anschließend zentrifugiert (2300 U/min, 30 min, 4°C). Der Rückstand wurde in 100 ml eiskaltem RF1-Puffer aufgenommen. Nach weiteren 15 min Inkubation auf Eis wird erneut zentrifugiert (2300 U/min, 30 min, 4 °C), das Pellet in 10 ml eiskaltem RF2-Puffer suspendiert und weitere 15 min auf Eis inkubiert. Die kompetenten Zellen wurden in Kryo-Gefäße zu 0,8 ml portioniert und zur Langzeitlagerung sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren.

RF1-Puffer: 100 mM RbCl
50 mM MnCl₂*4 H₂O
30 mM K-Acetat
10 mM CaCl₂ 2 H₂O
15 % (w/v) Glycerin
pH 5,8 mit Essigsäure eingestellt und sterilfiltriert

RF2-Puffer: 10 mM MOPS
10 mM RbCl
75 mM CaCl₂ 2 H₂O
15 % (w/v) Glycerin
pH 6,3 mit Essigsäure eingestellt und sterilfiltriert

2.6.5.2 Transformation mit kompetenten Zellen nach Hanahan

Für die Transformation von Plasmid-DNA wurden die gefrorenen kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut. 200 µl dieser Zellsuspension wurden mit 10-100 pg DNA in einem Volumen von 1-20 µl versetzt und eine Stunde auf Eis inkubiert. Nach dem anschließenden Hitzeschock für 90 s bei 42°C und zwei min Eiskühlung wurden 800 µl LB-Medium (ohne Antibiotikazusatz) zur phänotypischen Expression zugegeben. Anschließend wurden 20 bzw. 200 µl des Transformationsansatzes auf Selektivagarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet.

2.6.5.3 Herstellung von elektrokompenten Zellen

Elektrokompente Zellen sind nach dem Protokoll von Dower *et al.* (1988) in leicht modifizierter Form hergestellt worden.

Mit 20 ml Vorkultur, die nicht länger als 16 h bei 30°C bebrütet wurde, wurden 400 ml LB-Medium angeimpft. Sobald die Kultur eine optische Dichte von 0,5-0,7 (bei 600 nm) erreicht hatte, wurde sie 15 min lang auf Eis gestellt. Danach wurden die Zellen in einem auf 4°C vorgekühlten Sorvall-GS3-Rotor bei 4000 U/min abzentrifugiert. Der Überstand wurde möglichst vollständig abdekantiert und der Rückstand in 500 ml 10%iger eiskalter, steriler Glycerinlösung resuspendiert, anschließend wurde wie oben zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Dieser Schritt wurde noch zweimal wiederholt, wobei einmal 250 ml bzw. 10 ml der obigen Lösung eingesetzt wurden. Dann wurde nochmals wie oben zentrifugiert, der

Überstand verworfen und der Rückstand in einem endgültigen Volumen von 1 ml 10 %iger eiskalter, steriler Glycerinlösung suspendiert. Die Suspension wurde in Kryo-Gefäßen zu 0,4 ml portioniert und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Transformationsrate betrug ca. 10^6 Transformanden/ μg DNA.

2.6.5.4 Elektroporation elektrokompetenter Zellen

Einstellungen der Elektroporationsapparatur:

Kapazität: 25 μF
Widerstand: 200 Ω
Spannung: 2,5 kV

40 μl elektrokompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut und in ein steriles, vorgekühltes 1,5 ml Eppendorf-Gefäß pipettiert und mit ca. 10 ng Plasmid-DNA in einem Volumen von 1 μl versetzt. Dann wurde der Ansatz in eine Elektroporationsküvette (Spaltbreite 0,2 cm), die auf Eis vorgekühlt wurde, überführt. Diese wurde im Küvettenhalter in die Elektroporationskammer geschoben, so dass Kontakt zu den Elektroden bestand. Anschließend wurde ein Puls mit den oben aufgeführten Parametern appliziert, die Zellen sofort in 1 ml SOC-Medium suspendiert und 1 h bei 37°C im Schüttelinkubator bebrütet (phänotypische Expression). Portionen von 10 bzw. 100 μl wurden anschließend auf Selektivagar-Platten ausplattiert.

SOC-Medium: 20 g Caseinhydrolysat
 5 g Hefeextrakt
 10 mM NaCl
 2,5 mM KCl
 10 mM MgCl₂
 10 mM MgSO₄
 20 mM Glucose

2.6.6 *In vitro*-Amplifikation von DNA mittels PCR

Die von Mullis *et al.* (1987) entwickelte Methode zur Vervielfältigung von DNA wurde zur Amplifikation, Gentotalsynthese und Mutagenese der Ziel-DNA und zur Analyse von Bakterienklonen verwendet.

2.6.6.1 Standard-PCR

Durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Saiki *et al.* 1985) können innerhalb kurzer Zeit definierte DNA-Abschnitte *in vitro* enzymatisch exponentiell amplifiziert werden. Für die PCR-Reaktion werden zwei komplementäre Oligonukleotide („*Primer*“) benötigt, die die zu amplifizierende Sequenz auf der DNA-Matrize („*Template*“) einschließen. Dadurch sind thermostabile DNA-Polymerasen wie z. B. *Taq*, *Pwo* und Deep Vent in der Lage, aus diesen Primern unter dNTP Verbrauch doppelsträngige DNA neu zu synthetisieren, die um das 10^6 bis 10^7 fache gegenüber der Ausgangskonzentration an „*Template*“-DNA angereichert ist.

Für einen präparativen PCR-Ansatz (100 μ l) wurden 10 ng Matrizen-DNA, je 100 pmol Primer und 1 U *Taq*-DNA-Polymerase (Finnzyme, Epsoo, Finnland) aus *Thermus aquaticus* eingesetzt. Zusätzlich wurden 25 mM Magnesiumionen ($MgCl_2$) zugesetzt, da es sich bei der *Taq*-Polymerase, um ein Mg-abhängiges Enzym handelt.

Folgendes Pipettierschema wurde für den Ansatz verwendet:

- 76 μ l H_2O_{bidest}
- 10 μ l *Taq*-Puffer
- 6 μ l Mg^{2+} (25 mM)
- 4 μ l dNTP's (je 200 μ M)
- 1 μ l Primer I (100 pmol)
- 1 μ l Primer II (100 pmol)
- 1 μ l Matrizen-DNA
- 1 μ l *Taq*-Polymerase (1 U)

Die Amplifikation der DNA wurde im Thermozykler (GeneAmp[®] PCR-System 2400; Perkin Elmer) bei folgenden Standardbedingungen durchgeführt, wobei n=25.

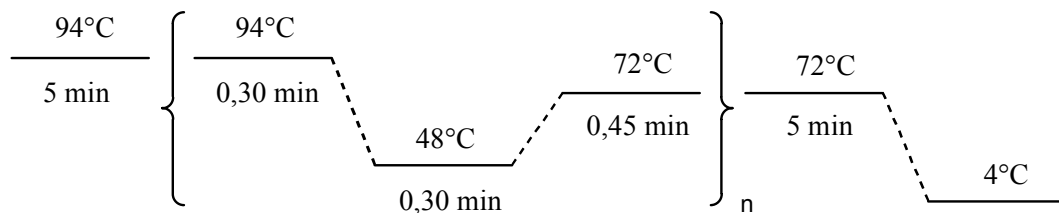


Abb. 2.2: Temperaturverlauf einer Standard-PCR-Reaktion

2.6.6.2 PCR-Screening

Das PCR-„Screening“ dient der schnellen Analyse des Genotyps von Bakterienkolonien und verwendet das unaufgeschlossene Zellmaterial einer Kolonie auf Agarplatten als Matrize. Diese Methode wurde angewendet, um über Nacht angewachsene Transformationskolonien auf Vorhandensein des klonierten Transgens hin zu überprüfen. Die gewünschten Kolonien wurden mit einem sterilen Zahnstocher angepickt und im PCR-Gefäß in vorgelegtem PCR-Mix suspendiert (Clackson *et al.* 1991).

Die Bakterienzellen wurden während der ersten Runde der PCR bei 94°C thermisch lysiert und geben die Matrize, die Plasmid-DNA, der Reaktion frei. Pro PCR-Gefäß wurden 30 µl PCR-Mix vorgelegt und durch Drehen des Zahnstochers suspendiert. Nach erfolgtem Eintauchen des Zahnstochers in die PCR-Lösung wurden Kopien von den jeweiligen Transformanden (durch Einstechen des Zahnstochers auf einer LB-Platte) angelegt. Diese Vorgehensweise erlaubte später ein gezieltes Rückgreifen auf den zuvor analysierten Klon. Die PCR wurde unter Standardbedingungen durchgeführt.

Screeningstammlösung für 24 Proben: (PCR-Mastermix)	80 µl Taq-Puffer 48 µl MgCl ₂ (25 mM) 64 µl dNTP's (je 200 µM) 10 µl Oligonucleotid I (100 pM) 10 µl Oligonucleotid II (100 pM) 10 µl Taq-Polymerase (1 U) 578 µl H ₂ O _{bidest}
---	---

Taq-Puffer:	75 mM Tris/HCl pH 9,0 20 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 0,01 % (w/v) Tween 20 1,5 mM MgCl ₂
--------------------	---

2.6.7 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Zur Charakterisierung von DNA durch Restriktionsanalyse oder bei der Konstruktion von Plasmiden wurden 0,1–2,0 µg DNA mit 0,1–2 Units verschiedener Restriktionsendonukleasen (New England Biolabs, Schwalbach) für 60–120 min nach den jeweiligen Angaben des Herstellers geschnitten. Die Fragmentierung der DNA wurde über die elektrophoretische Auftrennung auf einem Agarosegel überprüft.

Die Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen wurde nach den vom Hersteller angegebenen Bedingungen mit den mitgelieferten Puffer-10x-Konzentraten durchgeführt.

Die analytische Restriktionsanalyse diente der Überprüfung der eingefügten Mutationen. Dazu wurde im Allgemeinen folgender Ansatz verwendet:

2-8 µl DNA (ca. 0,2-1,0 µg DNA)
1,0 µl Puffer (10x)
1,0 µl Enzym (ca. 10 U)
mit H₂O_{bidest} auf 10 µl auffüllen

Die Inkubation erfolgte bei dem vom Hersteller angegebenen Temperaturoptimum für das jeweilige Restriktionsenzym für 60 - 90 min.

Präparative Ansätze (10-15 µg DNA) wurden in einem Gesamtvolumen von 120 µl durchgeführt und die Volumina der anderen Lösungen entsprechend erhöht. Die Inkubation erfolgte bei der optimalen Temperatur für 3 h. Die vollständige Spaltung wurde auf einem Agaraosegel überprüft.

2.6.8 Ligierung von DNA-Fragmenten

Die ATP-abhängige T4-DNA-Ligase katalysiert die Verknüpfung der DNA-Stücke mit Einzelstrangüberhängen durch die Bildung von Phosphorsäurediesterbindungen zwischen den 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatgruppen (Sagmarella *et al.* 1979).

Die kovalente Verknüpfung zweier DNA-Fragmente nach Spaltung durch Restriktionsenzyme erfordert die Bildung von Phosphodiesterbindungen durch DNA-Ligase. Dazu muß mindestens ein DNA-Fragment einen Phosphatrest am 5'-Ende tragen. Zur Ligierung wurden 20 -100 fmol Plasmid-DNA und ein 2-5 facher molarem Überschuß an Insert-DNA in Wasser vorgelegt. Nach 10 minütiger Inkubation im Wasserbad (bei 55°C) und anschließender 5 minütiger Eiskühlung wurden Ligasepuffer und T4-DNA-Ligase (beides von Gibco-BRL, Eggenstein) zugesetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Ligierungsansatz:	150-300 ng Vektor DNA
	x ng Insert DNA (molares Verhältnis Vektor zu Insert (s. o.))
	2 µl 10x Ligationspuffer (NEB)
	1 µl T4 DNA-Ligase (NEB)
	ad 20 µl mit H ₂ O _{bidest}

2.6.9 DNA-Sequenzierung

Die entsprechenden Expressionsplasmide wurden von MWG (Ebersberg) sequenziert. Dafür wurden 20 µl Plasmid mit 2 µl 1:20 verdünnten Primern gemischt. Als Primer wurden im Normalfall pNCO-Vo und mRNA5 verwendet, sofern damit die gesamte Gensequenz des Inserts abgedeckt war. Die Sequenzierungsreaktion erstreckt sich auf ca. 500 bp.

2.6.10 Konstruktion von Mutantenplasmiden der Riboflavinsynthase aus *S. pombe*

In enger Kooperation mit Dr. Markus Fischer entstand das Konstrukt pNCO-SSP-Rib5-WT. Für die C-terminale Deletion wurde dieses als Template eingesetzt, die verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 2.3 aufgeführt.

Tabelle 2.3: Primer für die C-terminale Kürzung

C-terminale Deletion	Primerbezeichnung	Primersequenz
ΔC5	SSP-Rib5-ΔC5-HindIII-Hi	5'-tat tat tat aag ctt taa atc cag tca gca ata tgg gcc tct ac
ΔH24	SSP-Rib5-ΔC24-BamHI	5'-tat tat gga tcc geg gtt agt caa cca tca acg ttt act aaa tcg cc
-	pNCO-Vo-EcoRI	5'-gtg agc gga taa caa ttt cac aca g-3'

Für den Nachweis der C-terminalen Kürzung der Riboflavinsynthase aus *S. pombe* wurde das amplifizierte *rib5* Gen mit spezifischen Restriktionsendonukleasen (AgeI, ΔC5 und SacII, ΔH24) verdaut. Die Fragmentgrößen der PCR-Amplifikate dienen zur Identifikation. Für den Restriktionsverdau wurden Enzyme von New England Biolabs eingesetzt, sowie die für das jeweilige Restriktionsenzym vorgeschlagenen Puffer verwendet.

2.6.11 Riboflavinsynthase aus *M. jannaschii*

Die Expressionsplasmide pNCO113-MJ-RibC und pNCO113-MJ-RibC-P46S, pNCO113-MBP-H6-MJ-RibC entstanden in enger Kooperation mit Dr. Markus Fischer. Die Mutation P46S war das Zufallsprodukt bei der Klonierung der Wildtyp *M. jannaschii* Riboflavinsynthase.

2.6.12 Yellow-Fluorescent-Protein aus *V. fibrio*

Die Expressionsplasmide pNCO113-VF-Luxy, pNCO113-H6-VF-Luxy und pNCO113-MBP-TB-VF-Luxy entstanden in enger Kooperation mit Dr. Markus Fischer.

2.6.13 Dihydroneopterin Aldolase aus *A. thaliana*

Die Expressionsplasmide pNCO113-AT-FolB1 und pNCO113-AT-FolB2 wurden freundlicherweise von Dr. Markus Fischer zur Verfügung gestellt.

2.7 Stammhaltung und proteinchemische Methoden

2.7.1 Kulturmedien

Die Kulturmedien wurden nach den unten aufgeführten Rezepturen hergestellt und bei 120 °C und ca. 1.5 bar für 25 min autoklaviert. Für LB-Platten wurden vor dem Autoklavieren zusätzlich 12 g/l Agar zugegeben. Die Antibiotikallösungen wurden dem auf ca. 50°C abgekühltem Medium zugegeben. Für Riboflavin-Medium wurde vor dem Autoklavieren 400 mg/l Riboflavin zugesetzt.

Tabelle 2.3: Zusammensetzung der verschiedenen Medien

Bezeichnung	Zusammensetzung ^{o)}
LB-Medium (Luria-Bertani)	10 g Caseinhydrolysat 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl
LB-Medium/Glyzerin	LB-Medium 50 % (v/v) Glyzerin
SOC-Medium	20 g Caseinhydrolysat 5 g Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 20 mM Glucose
LB-AMP170	LB-Medium 170 mg Ampicillintrihydrat
LB-Kan15	LB-Medium 15 mg Kanamycinsulfat
LB-AMP170/KAN15	LB-Medium 170 mg Ampicillintrihydrat 15 mg Kanamycinsulfat

^{o)}Die Rezepturen beziehen sich auf 1 l Gesamtvolumen.

2.7.2 Stammhaltung

Für kurzzeitige Lagerung (1-2 Wochen) und schnelle Verfügbarkeit (DNA-Präparation) wurden die Bakterienkulturen auf Agarplatten bei 4°C gelagert. Von jedem neu erstellten Bakterienklon wurde unmittelbar nach der Überprüfung der DNA eine Kultur in Stickstoff eingefroren. Dazu wurden 10 ml einer Übernachtskultur abzentrifugiert und der Rückstand in 0,8 ml des LB-Glyzerinmediums suspendiert und bei -80°C eingefroren.

2.7.3 Kulturbedingungen

Bakterienkulturen von *E. coli* wurden bei 37°C im Schüttelinkubator kultiviert. Die Anzucht der Bakterienkulturen wurde in einem Volumen von 25 ml in 100 ml Erlenmeyerkolben durchgeführt. Es wurde zunächst eine Übernachtskultur (ca. 15 ml) mit Zellen, welche aus einer Einzelkolonie stammten, angeimpft. Die Hauptkultur wurde 1:50 (v/v) mit der Übernachtskultur angeimpft (10 ml dieser Übernachtskultur wurden für die oben genannte Stickstoffkultur eingesetzt).

Das Wachstum der Flüssigkulturen wurde durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm gegen unbewachsenes Medium als Nullwert verfolgt.

Expressionsstämme wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bebrütet und dann die Bildung des Zielproteins mit IPTG in einer Konzentration von 2 mM induziert. Bei *E. coli* XL1-Blue und M15-Stämmen erfolgte anschließend eine fünfstündige Inkubation bei 37°C.

Nach der Fermentation wurden die Zellen mittels Zentrifugation (4000 U/min, 10 min, RT) geerntet, mit 0,9 %iger Saline (20 % des Volumens der Hauptkultur; Saline: 0,9 % NaCl-Lsg.) und bei -20°C bis zu einer weiteren Verwendung gelagert.

2.7.3.1 Selenomethioninexpression

Für die Selenomethionin-Expression wurden Methionin-auxotrophe *E. coli* B834-Zellen verwendet (Budisa *et al.* 1995, Pieper *et al.* 1997, Doublet 1997). Die Übernachtskultur (50 ml) wurde wie beschrieben angezogen, abzentrifugiert und in 20 ml NMM-Medium (*New Minimal Medium*) resuspendiert. Die 4 l Hauptkultur (8 Kolben mit je 500 ml) wurde dann mit je 5 ml angeimpft und wie unter 1.7.3 beschrieben weiter behandelt.

NMM-Medium:	370 ml H ₂ O (autoklaviert in 2 l Erlenmeyerkolben mit Schikanen)
	50 ml Salzlösung
	50 ml Aminosäurelösung I
	30 ml Seleno-DL-Methioninlösung (1 mg/ml)
	90 mg Ampicillin

	0,5 ml Spurenelementlösung
	0,5 ml Biotinlösung (1 mg/ml)
	0,5 ml Thiaminlösung (1 mg/ml)
	0,5 ml Ammoniumeisen-II-sulfat (1 mg/ml)
Spurenelementlösung:	5 μ l $MnCl_2$ (10 mg/ml), 5 μ l $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$ (10 mg/ml), 5 μ l Na_2MoO_4 (10 mg/ml), 5 μ l $ZnSO_4$ (10 mg/ml) mit H_2O auf 50ml auffüllen
Aminosäurelösung I:	274 ml H_2O , 476 ml 1 M K_2HPO_4 , 220 ml 1 M KH_2PO_4 , 0,5 g jeder Aminosäure (außer Methionin, Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin), 30 ml Aminosäurelösung II
Aminosäurelösung II:	je 0,5 g Phenylalanin, Tryptophan, Tyrosin, 28,5 ml H_2O , 1,5 ml 32%ige HCl
Salzlösung:	75 ml 1M $(NH_4)_2SO_4$, 17 ml 5 M $NaCl$, 10 ml 1 M $MgSO_4$, 200 ml 1 M Glucose, 10 ml $CaSO_4 \cdot 2 H_2O$ (1 mg/ml), 688 ml H_2O

2.7.4 Zellaufschluss mit Ultraschall zur Proteingewinnung

Zellrückstände aus *E. coli* Kulturen wurden durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen.

Zum Aufschluss wurden die gewaschenen Zellen in 800 μ l Aufschlusspuffer suspendiert und auf 4

$^{\circ}C$ gekühlt. Die Zellsuspension wurde dann 8 s mit der Nadel des Ultraschallgerätes bei Stufe 4,5 behandelt. Nach einminütiger Eiskühlung wurde die Ultraschallbehandlung wiederholt. Bei größeren Zellmengen erfolgte der Aufschluss mit der großen Spitze des Ultraschallgerätes durch 20 Pulse bei Stufe 4 und sechsmaliger Wiederholung nach einer fünfminütigen Eiskühlung. Der Aufschlusspuffer war dann abhängig von dem anschliessend verwendeten Chromatographieschrittes und richtete sich nach dem dafür benötigten Equilibrierungspuffer. Anschließend wurde unlösliches Protein und Zellmembranbestandteile abzentrifugiert (15000 U/min, 10 min) und mit dem Überstand (Rohextrakt) weitergearbeitet.

Aufschlusspuffer: 50 mM K-Phosphat pH 7,0
10 mM EDTA
10 mM Na₂SO₃
0,3 mM PMSF

2.7.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Es wurde eine denaturierende Polyacrylamidelektrophorese nach Laemmli (1970) durchgeführt. Routinemäßig wurden Gele mit 4 % Acrylamid im Sammelgel und 16 % Acrylamid im Trenngel angefertigt.

Trenngel (16 %): 4 ml 40 %ige Acrylamidlösung
2,5 ml Trenngelpuffer
3,50 ml mit H₂O_{bidest}
50 µl 10 %iger APS-Lösung
10 µl TEMED

Sammelgel (4 %): 0,4 ml 40 %ige Acrylamidlösung
2,5 ml Sammelgelpuffer
2,1 ml mit H₂O_{bidest}
50 µl 10 %iger APS-Lösung
5 µl TEMED

Die Rohextrakte wurden 1:3 mit 2x-Sample-Puffer verdünnt und 10 min bei 95°C gekocht, anschließend abzentrifugiert (14000 U/min, 1 min, RT) und 10 µl des klaren Überstandes in die Taschen des Sammelgels aufgetragen.

Als Proteinstandard diente Dalton Mark VII-L von Sigma (Deisenhofen) mit Proteinbanden bei 66, 45, 36, 29, 24, 20 und 14 kDa.

Die Elektrophorese wurde bei konstant 35 mA pro SDS-Gel durchgeführt.

Zur Anfärbung wurde das Gel für 20 min mit der Färbelösung inkubiert. Mittels der Entfärbelösung, die zweimal gewechselt wurde, erfolgte die Entfärbung des Gelhintergrundes innerhalb von 1 h.

Sammelgelpuffer:	0,25 M Tris/HCl pH 6,8 0,2 % SDS
Trenngelpuffer:	1,5 M Tris/HCl pH 8,3 0,4 % SDS
Acrylamidlösung (40 %):	40 % (w/v) Acrylamid 3% (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid
APS-Lsg:	10 % (w/v) in H ₂ O _{bidest.}
Elektrophoresepuffer:	25 mM Tris pH 8,3 192 mM Glycin 0,1 % SDS
2x-Sample-Puffer:	6 % 2-Mercaptoethanol 10 % Glycerin 6 % (w/v) SDS 0,05 % Bromphenolblau 0,062 M Tris/HCl, pH 6,8
Färbelösung:	0,2 % (w/v) Coomassie Blue R 250 40 % Methanol 10 % Eisessig
Entfärbelösung:	50 % Methanol 10 % Eisessig

2.7.6 Proteinbestimmung nach Bradford

Der Proteingehalt des Rohextraktes wurde nach einer Variante der Methode von Bradford (Bradford 1976; Read *et al.* 1981; Compton *et al.* 1985) bestimmt.

Das Farbstoffreagenz wurde durch Auffüllen von 0,1 g Serva Blue G, 100 ml 16 M Phosphorsäure und 47 ml Ethanol in Wasser gewonnen, filtriert und im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt.

Die konzentrierten Proben wurden zunächst mit Bradfordpuffer verdünnt. Für den Testansatz wurden als Dreifachbestimmung jeweils 50 µl verdünnte Probe und 950 µl Bradfordfarbstoffreagenz versetzt und 5 Minuten bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Anschließend wurde bei 595 nm gegen einen Leerwert aus 50 µl Bradfordpuffer und 950 µl Farbstoffreagenz die Extinktion bestimmt.

Die Ergebnisse wurden mittels einer mit Rinderserumalbumin als Standard erhaltenen Kalibriergeraden in Proteinkonzentrationen umgerechnet.

Bradfordpuffer: 2,0 g Na_2HPO_4
 0,6 g NaH_2PO_4
 7,0 g NaCl
 0,2 g NaN_3
 pro 1 Liter

2.8 Proteinreinigung

2.8.1 Expression und Reinigung der Riboflavin Synthase aus *S.*

pombe

Das isolierte Expressionsplasmid pNCO113-SSP-Rib5-WT wurde in *E. coli* XL-1 Blue-Zellen transformiert. Der Test auf Proteinexpression des Konstruktes erfolgte aus einer 25 ml Übernachtskulturen (LB-Medium mit 170 mg/ml Ampicillin). In der Analyse des Gesamtproteins mittels SDS-PAGE-Analyse lag die Expressionsrate bei lediglich 10% des Gesamtproteins. Eine dreifache Expressionssteigerung erbrachte die Transformation des Konstruktes in den rekombinanten *E. coli* M15(pREP4) Stamm. Eine 2 l-Expressionskultur wurde mit einer 25 ml Übernachtskultur (LB-Medium mit 170 mg/l Ampicillin, 15 mg/l Kanamycin) 1:50 angeimpft und ab einer OD_{600} von 0,6 mit 2 mM IPTG (Endkonzentration) induziert und für vier weitere Stunden bei 37°C kultiviert.

Die Reinigung der Riboflavinsynthase aus *S. pombe* erfolgte aus dem rekombinanten *E. coli* M15(pREP4) Stamm, der das Expressionsplasmid pNCO113-SSP-Rib5-WT trägt. 6 g feuchtes Zellpellet wurde in 35 ml 20 mM K-Phosphat-Puffer (pH 7,0) resuspendiert und wie in Abschnitt 2.7.4 beschrieben mittels Ultraschallbehandlung aufgeschlossen.

Der so erhaltene Zellrohextrakt wurde bei RT an einer FPLC-Anlage auf eine mit 20 mM K-Phosphat-Puffer (pH 7,0) equilibrierte Sepharose Q Säule ($V = 90\text{ml}$) aufgetragen (Flussrate: 5ml/min). Die Elution erfolgte mit 700 ml eines linearen Gradienten von 0-1 M KCl in 20 mM K-Phosphat-Puffer (pH 7,0). Mittels SDS-Gel wurden die Fraktionen bestimmt und dann vereinigt, welche eine Expressionsbande

bei 22,8 kDa enthielten und die wenigsten Fremdproteinbanden zeigten. Mittels Ultrafiltration (Amicon Rührzelle; Membran 10 kDa untere Ausschlussgrenze) wurde auf ca. 5 ml Volumen je nach Proteinkonzentration eingengt. Die weitere Reinigung der RS und gleichzeitige Abschätzung des nativen Molekulargewichtes erfolgte mittels Gelfiltrationschromatographie (Superdex 200; 2,6 x 60 cm). Die Gelfiltrationssäule wurde mit einem Puffer aus 20 mM K-Posphat (pH 7,0), 70 mM KCl equilibriert und isokratisch entwickelt. Die im Enzymtest aktiven Fraktionen wurden vereinigt und auf eine mit 20 mM K-Phosphat-Puffer (pH 7,0), 500 mM Ammoniumsulfat equilibrierte Phenyl-Sepharose CL4B Säule (V = 10 ml) aufgetragen. Die Elution erfolgte mit 100 ml eines linearen Gradienten von 0-10% Glycerin in 20 mM K-Phosphat (pH 7,0). Für die Kristallisationsexperimente wurde die Probe über eine HI PREP 26/10 Säule in 50 mM Tris/HCl (pH 7,0), 100 mM KCl umgepuffert.

2.8.2 Reinigung der Riboflavinsynthase aus *M. jannaschii*

Die Reinigung der RS erfolgte aus dem rekombinanten *E. coli* M15(pREP4) Stamm, der das Expressionsplasmid pNCO113-MJ-RibC trägt. 5 g feuchte Zellmasse wurden in 35 ml 50 mM Tris/HCl Puffer (pH 7) suspendiert und wie in Abschnitt 2.7.4 beschrieben mittels Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. Der so erhaltene Rohextrakt wurde einer Hitzebehandlung unterzogen. Hierbei wurde die Proteinlösung auf einem Magnetrührer auf 80°C erhitzt und die Temperatur für 5 min gehalten. Anschließend die ausgefallenen Proteine abzentrifugiert und der Überstand mittels Amicon-Rührzelle (3 kDa Membran untere Ausschlussgrenze) aufkonzentriert. Die weitere Reinigung der RS und gleichzeitige Abschätzung des nativen Molekulargewichtes erfolgte mittels Gelfiltrationschromatographie (Superdex 200; 2,6 x 60 cm). Die Gelfiltrationssäule wurde mit einem Puffer aus 20 mM K-Posphat (pH 7,0), 70 mM KCl equilibriert und isokratisch entwickelt. Die Elution erfolgte nach ca. 205 ml. Wenn die Proben ausschließlich für die Kristallisation verwendet wurden, dann erfolgte die Gelfiltrationschromatographie mit einem Puffer aus 50 mM Tris/HCl (pH 7,0), 100 mM KCl.

2.8.2.1 Reinigung des MBP-H6-Fusionkonstruktes der Riboflavinsynthese aus *M. jannaschii*

Die Reinigung des Fusionkonstruktes erfolgte aus dem rekombinanten *E. coli* X11-Blue-Zellen, die das Expressionsplasmid pNCO113-MBP-H6-MJ-RibC tragen. 6 g feuchte Zellmasse wurden in 40 ml PBS-Puffer (pH 7,3) suspendiert und wie in Abschnitt 2.7.4 beschrieben mittels Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. Der so erhaltene Überstand wurde im ersten Affinitäts-Reinigungsschritt auf eine mit PBS-Puffer equilibrierte Amylosesäule (7,5 ml) aufgetragen. Die Säule wurde mit ca. 60 ml PBS-Puffer gewaschen, um die nicht gebundenen Proteine abzutrennen. Anschliessend erfolgte die Elution des über das Maltose-Bindeprotein gebundenen Fusionkonstruktes mit einer 10 mM Maltoselösung. Nach SDS-PAGE-Analyse wurden die entsprechenden Fraktionen vereinigt und dann auf eine zweite Affinitätssäule, eine Ni-NTA-Säule (5 ml), aufgetragen, die mit 20 mM Tris/HCl (pH 8,0), 500 mM NaCl, 10 mM Imidazol und 10 mM β -Mercaptoethanol equilibriert wurde. Die nicht über den 6-fachen Histidinrest gebundenen Proteine wurden mit dem Equilibrierungspuffer von der Säule gewaschen, die Elution des Fusionskonstruktes erfolgte mit einem stufenförmigen Imidazolgradienten. Der jeweils 5 ml eines mit 50, 100, 200, 300 und 500 mM Imidazol enthaltenen Equilibrierungspuffer beinhaltete. Bei einer Konzentration von ca. 200 mM Imidazol konnte das Fusionskonstrukt von der Säule eluiert werden. Im Anschluss wurden die Fraktionen vereinigt und gegen einen 20 mM Tris/HCl (pH 8,0), 100 mM KCl Puffer über Nacht dialysiert, um das Imidazol zu entfernen. Danach erfolgte eine weitere Reinigung des Fusionskonstruktes und gleichzeitige Abschätzung des nativen Molekulargewichtes mittels Gelfiltrationschromatographie (Superdex 200; 2,6 x 60 cm). Die Gelfiltrationssäule wurde mit einem Puffer aus 20 mM Tris/HCl (pH 8,0), 100 mM KCl equilibriert und isokratisch entwickelt.

2.8.3 Reinigung der Dihydroneopterinaldolase aus *A. thaliana*

Die Expressionsplasmide pNCO113-AT-FolB1-11 (1) und pNCO113-AT-FolB2-2 (2) wurden in den rekombinanten *E. coli* M15(pREP4) Stamm transformiert. Das Reinigungsprotokoll ist für (1) und (2) identisch. Ca. 6 g feuchte Zellmasse aus einer 2l-Anzucht wurden in 35 ml 50 mM Tris/HCl (pH 8,3) suspendiert und wie in Abschnitt 2.7.4 beschrieben mittels Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. Der so erhaltene Zellrohextrakt wurde bei RT an einer FPLC-Anlage auf eine mit 50 mM Tris/HCl-Puffer (pH 8,3) equilibrierte Sepharose Q Säule (V = 66 ml) aufgetragen (Flussrate: 5ml/min). Die Elution erfolgte mit 500 ml eines linearen Gradienten von 0-1 M KCl in 50 mM Tris/HCl-Puffer (pH 8,3). Mittels SDS-Gel wurden die Fraktionen bestimmt und dann vereinigt, welche eine Expressionsbande bei 14,1 kDa enthielten und die wenigsten Fremdproteinbanden zeigten. Es folgte eine Fällung der Proteine mit kaltgesättigter Ammoniumsulfat-Lösung, nach Zentrifugation wurde das Pellet mit 3 ml 50 mM Tris/HCl-Puffer (pH 8,3) resuspendiert. Die weitere Reinigung der Dihydroneopterin Aldolase und gleichzeitige Abschätzung des nativen Molekulargewichtes erfolgte mittels Gelfiltrationschromatographie (Superdex 200; 2,6x60 cm). Die Gelfiltrationssäule wurde mit einem Puffer aus 50 mM Tris/HCl (pH 8,3), 70 mM KCl equilibriert und isokratisch entwickelt. Die Elution erfolgte nach ca. 188 ml (entspricht ungefähr 100 kDa). Die vereinigten Fraktionen wurden auf eine mit 50 mM Tris/HCl-Puffer (pH 8,3) equilibrierte Red-Sepharose CL-6B Säule (V = 11 ml) aufgetragen. Die Elution erfolgte mit 80 ml eines linearen Gradienten von 0-1 M KCl. Im Gegensatz zu (1) wurde (2) im Durchlauf beobachtet. Die Fraktionen wurden über eine 30 kDa Macrosep[®] konzentriert.

2.8.4 Bestimmung der enzymatischen Aktivität

2.8.4.1 Test auf Riboflavinsynthaseaktivität

Die Aktivitätsbestimmung erfolgte nach einer Methode von Plaut *et al.* (1971). Der Testansatz mit einem Gesamtvolumen von 500 μl enthielt: 100 mM K-Phosphat-Puffer, pH 7,2, 10 mM Na_2SO_3 ; 10 mM EDTA; 6 mM Dimethyl-8-ribityllumazin und zwischen 2 und 20 μl Enzymlösung. Der Ansatz wurde bei 37°C 15 min inkubiert und anschließend zentrifugiert. Der Überstand wurde bei 470 nm gegen einen Referenzwert (Ansatz ohne Enzym) photometrisch gemessen. Die gebildete Riboflavинmenge konnte mit Hilfe des Absorptionskoeffizienten von Riboflavin ($\epsilon_{470}=9100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) und der gemessenen Exstinktion berechnet werden.

2.8.4.2 Kinetische Untersuchung der Riboflavinsynthase aus *S. pombe*

Ein typischer Reaktionsansatz für die Kinetikmessungen von RS aus *S. pombe* wurde in 100 mM K-Phosphat-Puffer, pH 7,2, 10 mM Na_2SO_3 , 10 mM EDTA durchgeführt. Die Substratkonzentration variierte je Messung zwischen 1 und 160 μM 6,7-Dimethyl-8-Ribityllumazin. Die Messungen erfolgten bei 37°C. Das Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes betrug 500 μl . Der Reaktionsansatz wurde vor dem Start der Reaktion für 5 min bei 37°C im Photometer in Plastikkuvetten vortemperiert und die Riboflavinbildung bei 470 nm beobachtet. Die gebildete Riboflavinmenge konnte mit Hilfe des Absorptionskoeffizienten von Riboflavin ($\epsilon_{470}=9100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) und der gemessenen Exstinktion berechnet werden.

2.8.4.3 Kinetische Untersuchung der Riboflavinsynthese aus *M. jannaschii*

Der Reaktionsansatz für die Messungen von Wildtyp und der Punktmutante aus *M. jannaschii* enthielt 50 mM Tris/HCl, pH 7,0, sowie 5 mM MgCl₂, die Substratkonzentration variierte von 1-160 µM 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin. Die Messungen erfolgten bei 40°C. Das Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes betrug 500 µl. Der Reaktionsansatz wurde vor Start der Reaktion für 5 min bei 40°C im Photometer in Plastikküvetten vortemperiert und die Riboflavinbildung bei 470 nm beobachtet. Die gebildete Riboflavinmenge konnte mit Hilfe des Absorptionskoeffizienten von Riboflavin ($\epsilon_{470}=9100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) und der gemessenen Extinktion berechnet werden. Für die Untersuchung der Aktivierung durch zweiwertige Metallionen wurde eine Substratkonzentration von 100 µM 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin eingesetzt, die Metallösungen hatten eine Konzentration von 5 mM im Reaktionsansatz.

2.8.4.4 Test auf Flavokinaseaktivität

Der Testansatz (150 µl Gesamtvolumen) enthielt 30 µl Enzym, 26 mM MgCl₂, 2 mM ATP in 100 mM Tris/HCl, pH 8,0. Als Substrat wurden sowohl 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin (300 µM) als auch Riboflavin (300 µM) eingesetzt. Die Inkubationszeit bei 40°C betrug 30 min. Anschließend wurde die Reaktion durch 50 µl 20%ige TCA-Lösung abgestoppt. Substrat und Produkte wurden mittels analytischer HPLC, wie in Abschnitt 2.10.3 beschrieben analysiert.

2.8.4.5 Test auf Aldolaseaktivität

Die Zusammensetzung des Testansatzes im Standardenzymtest mit einem Gesamtvolumen von 120 µl war folgendermaßen: 100 mM Tris/HCl pH 8,0; 5 mM DTT; 70 µM Dihydroneopterin und zwischen 2 und 20 µl Enzymlösung. Nach 15 - 30 min Inkubationszeit bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 30 µl 5KJ/J₂-Lösung (1M HCl, die 1 % J₂; 2 % KJ enthält) gestoppt. Nach 5 min bei RT wurde das überschüssige Jod durch 10 ml 2%ige Ascorbinsäurelösung reduziert, es erfolgte ein Farbumschlag von gelb-orange zu farblos. Substrat und Produkte wurden mittels analytischer HPLC, wie in Abschnitt 2.9.3 beschrieben analysiert.

2.8.5 N-terminale Sequenzierung nach EDMAN

Nach der Methode des *EDMAN*-Abbaus (Edman *et al.* 1975) wird die N-terminale Aminosäure mit Phenylisothiocyanat umgesetzt und dabei als Phenylthiohydantoin-Derivat abgespalten. Nach einer HPLC-Auftrennung wird die Aminosäure durch Vergleich eines mitgetrennten Standard-Aminosäuregemisches identifiziert.

Zur Sequenzanalyse gereinigter rekombinanter Proteine wurden 60 bis 100 µg Protein in einem Gesamtvolumen von max. 100 µl auf eine mit 10 µl Methanol vorbehandelten ProSorb PVDF-Membran (Perkin Elmer, Applied Biosystems, Foster City, USA) pipettiert und dort immobilisiert.

Die anschließende Sequenzierung wurde freundlicherweise in exzellenter wissenschaftlicher Zusammenarbeit von Herrn PD. Dr. Peter Köhler am Institut für Lebensmittelchemie bearbeitet.

2.8.6 Analytische Ultrazentrifugation

Zur Bestimmung des nativen Molekulargewichtes wurden mit Riboflavinsynthasen aus *M. jannaschii* und *S. pombe* Sedimentationsgleichgewichtsversuche in der analytischen Ultrazentrifuge (Beckman Optima XL-I,) durchgeführt. Die Proteinkonzentration der jeweiligen Probe wurde über die Absorption bei 280 nm bestimmt. Die Absorption der Proben betrug etwa 0,4. Zur Messung wurden nur die Proteinfractionen verwendet, die mittels SDS-PAGE Analyse die gewünschten Proteinbanden zeigten. Es wurden Aluminiummittelstücke verwendet, in deren

Messzelle 150 μl Proteinlösung und 15 μl Öl (Fluorochemical FC 43, Beckman) injiziert wurden. Als Referenz im zweiten Sektor des Mittelstücks wurde Puffer aus dem letzten Reinigungsschritt des jeweiligen Proteins verwendet. Alle Versuche wurden bei 4°C für die *S. pombe* RS und bei 10°C für die *M. jannaschii* RS und 11000 U/min durchgeführt, zur Einstellung des Gleichgewichtes war 72 h nötig. Für die RS aus *S. pombe* wurde ein Sedimentationslauf durchgeführt, die Absorption bei 280 nm der dazu verwendeten Probe betrug 1,0. Sie wurde bei 50000 U/min zentrifugiert, alles 10 min wurde eine Messung durchgeführt. Die Auswertung erfolgte nach Gleichung 1 und 2.

$$A_r = A_0 \cdot e^{[H \cdot M(x^2 - x_0^2)]} + E \quad (\text{Gleichung 1})$$

$$H = \frac{(1 - \bar{v}\rho)}{2RT} \omega^2 \quad (\text{Gleichung 2})$$

Die Parameter haben folgende Bedeutung:

A_r	Absorption am Punkt x
A_0	Absorption am Punkt x_0
M	Molekulargewicht
E	konstante Abweichung von der Absorption (z.B. verursacht durch absorbierende niedermolekulare Verbindungen, die im gegebenen Schwerefeld nicht sedimentiert werden)
\bar{V}	Partielles spezifisches Volumen
ρ	Dichte der Lösung
ω	Winkelgeschwindigkeit
R	Gaskonstante
T	absolute Temperatur

Das partielle spezifische Volumen bei 4°C wurde näherungsweise nach Cohn *et al.* 1943 aus den partiellen spezifischen Volumina der Aminosäuren nach Gleichung 3 berechnet.

$$\bar{V}_c = \frac{\sum_i W_i \bar{V}_i}{\sum_i W_i} = \frac{\sum_i N_i M_i \bar{V}_i}{\sum_i N_i M_i} \quad (\text{Gleichung 3})$$

Die Parameter haben folgende Bedeutung:

- \bar{v}_c partielles spezifisches Volumen des Proteins
- W_i Massenanteil des Aminosäurerests i am Protein
- M_i Molekulargewicht des Aminosäurerests i
- N_i Anzahl der Aminosäurereste i im Protein
- \bar{v}_i partielles spezifisches Volumen des Aminosäurerests i

Die Werte für \bar{v}_i wurden aus Laue *et al.* 1992 entnommen.

Gleichung 3 liefert ein partielles spezifisches Volumen bei einer Temperatur von 25°C, da die Analyse der WT-RS aus *S. pombe* aber bei 4°C, die der WT-RS und P46S-Mutante aus *M. jannaschii* bei 10°C durchgeführt wurde, muss dieser Wert korrigiert werden, dies ist durch Gleichung 4 möglich.

$$\bar{V}_T = \bar{V}_{25} + \left[4,25 \cdot 10^{-4} (T - 298,15) \right] \quad (\text{Gleichung 4})$$

Die Parameter bedeuten:

- \bar{V}_T partielles spezifisches Volumen bei der Temperatur T
- \bar{V}_{25} partielles spezifisches Volumen bei der Temperatur 25°C
- T absolute Temperatur

Des Weiteren ist es notwendig, die Dichte des Lösungsmittels zu kennen. Die näherungsweise Berechnung wurde mit Gleichung 5 und 6 gelöst.

$$\rho_{T,b} = \frac{(0,998234 + \sum \Delta\rho_{ci})\rho_T}{0,998234} \quad (\text{Gleichung 5})$$

Die Dichteinkremente der einzelnen Pufferkomponenten mit der molaren Konzentration c_i wurden nach Gleichung 6 berechnet.

$$\Delta\rho_{c_i} = \left(A_i + Bc_i^{0,5} + C_i c_i + D_i c_i^2 + E_i c_i^3 + F_i c_i^4 \right) - 0,998234$$

(Gleichung 6)

Die Parameter A_i - F_i wurden aus Laue *et al.* 1992 entnommen.

2.8.7 NMR-Spektroskopie

2.8.7.1 ^{19}F -NMR-Spektren

^{19}F -NMR-Spektren verschiedener Fluorliganden wurden bei 470 MHz in Wasser mit ca. 10 % D_2O aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen wurden extern durch 50 mM Natrium-trifluoracetat (pH 7,0) referenziert.

Für Ligandtitrationen mit Riboflavinsynthasen bzw. deren Mutanten wurden die jeweiligen Proteine mittels Ultrafiltration auf Konzentrationen im Bereich von 15-30 mg/ml aufkonzentriert. Die eingesetzte Proteinkonzentration wurde mit der Methode nach Bradford bzw. durch photometrische Messung der Absorption bei 280 nm mittels des aus der Aminosäuresequenz berechneten Extinktionskoeffizienten ermittelt. Die Proteine befanden sich in 20 mM K-Phosphat-Puffer (pH 7,0), 100 mM KCl. Alle Proben enthielten 10-15 % D_2O . Die Messungen wurden bei 11°C durchgeführt.

Um eine große Volumenzunahme während der Ligandentitration zu vermeiden, wurden jeweils nur sehr kleine Portionen des konzentrierten Fluorliganden direkt in das NMR-Rohr titriert. Die Endkonzentrationen der eingesetzten Liganden lagen zwischen 500-4000 μM . Die Spektren wurden mit einer Linienverbreiterung von 20 Hz transformiert und die Signale des freien und enzymgebundenen Fluorliganden integriert. Für die ^{19}F -NMR-Spektren mit ^1H -Entkopplung waren beide Kanäle über denselben Verstärker geroutet. Zwischen ^{19}F - und ^1H -Frequenz wurde per Software umgeschaltet (Befehl `swito_f` bzw. `swito_h`; Umschalt delay (d12) 20 ms). Der Datensatz betrug 64 K; das Relaxationsdelay (d1) 1 s, der Pulswinkel (p1) 70 °

(10 μ s) und die ^1H -Breitband-Entkopplung mit 20 db abgeschwächt. Je nach Konzentration von Protein und Fluorligand betrug die Anzahl der Scans zwischen 500 und 20000. Die Messungen wurden in enger Zusammenarbeit mit Frau Dr. Kristina Kemter (TU München) durchgeführt.

2.8.8 Massenspektrometrie

Die relativen Molekulargewichte der gereinigten Riboflavinsynthasen aus *S. pombe*, *M. jannaschii* und Dihydroneopterin Aldolase aus *A. thaliana* wurde an einem Triple-Quadrupol Ionenspray-Massenspektrometer API365 (Fa. SciEx, Thornhill, Ontario, Kanada) bestimmt. Eine Kalibrierung der m/z-Skala wurde mit Ammonium-Addukten von Polypropylenglykol-Oligomeren durchgeführt. Aus den m/z-Peaks aller erzeugten Molekülonen mit multipler Ladung wurden die durchschnittlichen Molekulargewichte ermittelt (Covey *et al.*, 1988), (Mann *et al.* 1989). Die Spektren wurden freundlicherweise von Frau Sylvia Koerner am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried erstellt und ausgewertet.

2.9 Kristallographische Methoden

2.9.1 Proteinkristallisation

Zur Erzeugung von Proteineinkristallen sind heute verschiedene Methoden beschrieben (McPherson, 1990), von denen die Methode der Dampfdiffusion die häufigste Anwendung findet. Dazu wird die hochkonzentrierte Proteinlösung mit einem Fällungsmittel (Präzipitans) versetzt und ein Konzentrationsgradient über einem Reservoir mit höherer Konzentration des Präzipitanses erzeugt. Durch Diffusion des Lösungsmittels innerhalb eines abgeschlossenen Gefäßes bildet sich eine übersättigte Proteinlösung, in der sich bei günstigen intermolekularen Wechselwirkungen Kristallisationskeime aneinander gelagerter Proteinmoleküle bilden. An diesen Keimen kann dann ein definiertes Kristallwachstum erfolgen. Die auftretenden Wechselwirkungen werden u. a. durch die Proteinkonzentration, durch die chemischen Eigenschaften und Konzentration des Fällungsmittels, Temperatur und pH-Wert bestimmt. Dadurch stellt die Kristallisation ein vieldimensionales

Problem dar, welches durch faktorielle „*Screening*“-Experimente eingegrenzt werden kann (Carter *et al.* 1979; Jancarik *et al.* 1991).

Charakteristisch für Proteinkristalle ist eine, durch einen Solvensgehalt von etwa 40 % bis zu 80 % bedingte, lockere Packung der Moleküle, die in vielen Fällen nur durch wenige Kristallkontakte zusammengehalten werden. Dadurch entstehen große Lösungsmittelkanäle im Proteinkristall, durch die es möglich ist, z.B. Substrate, Inhibitoren und anorganische Salze in den Kristall einzubringen.

Für das „*Screening*“ einer großen Anzahl von Kristallisationsbedingungen wurde das Prinzip des „*sparse matrix sampling*“ angewandt (Carter *et al.* 1979; Jancarik *et al.* 1991). Hierbei wird eine faktorielle Suche durchgeführt, um möglichst weit gestreute Stichproben aus dem vieldimensionalen Raum der Kristallisationsbedingungen zu nehmen. Die Kristallisationsansätze erfolgten nach der Dampfdiffusionsmethode (McPherson, 1990) im sitzenden Tropfen „*sitting drop*“ in Cryschem Plates, sowie in Q-Plates II (Hampton Research, Laguna Niguel, USA). Die Cryschem Platten wurden mit transparenter Klebefolie (CrystalClear, Manco. Inc., Avon, USA) verschlossen. Der Kristallisationsverlauf wurde über mehrere Wochen/Monate bei 18°C verfolgt.

Zur Anwendung kamen die CrystalScreens I und II, sowie AdditiveScreen I-III (Hampton Research, USA). Dabei wurden jeweils 2 µl (9 mg/ml) Proteinlösung mit 2 µl des Kristallisationspuffers vermischt und gegen 300 µl Reservoirlösung equilibriert. In weiteren Versuchen zur Optimierung der Kristallisationsbedingungen kamen verschiedene Präzipitanzien (u. a. PEG verschiedener Molekulargewichte, MPD) variiert gegen verschiedene pH-Werte, sowie unterschiedliche Additive (Hampton Research, Laguna Niguel, USA) zum Einsatz.

2.10 Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

2.10.1 Stationäre Phase

Analytisch: Reverse Phase Hypersil ODS 5 μ (250 x 4.6 mm); Schambeck GmbH (Bad Honnef)

2.10.2 Mobile Phase

Methanol für HPLC-Zwecke war rektifiziert, ebenso wurde entionisiertes Wasser nochmals destilliert. Methanol und wässrige Eluentenkomponenten wurden getrennt über ein Membranfilter filtriert, gemischt und 30 min an der Vakuumpumpe entgast. Zusatzstoffe hatten grundsätzlich analytische Qualität.

Eluent A1: 25 % Methanol (v:v), 5 mM Ammoniumacetat

Eluent A2: 7 % Methanol (v:v), 30 mM Ameisensäure

2.10.3 Auftrennung der Reaktionsprodukte des Testes auf Riboflavinsynthese- bzw. Flavokinaseaktivität

6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin, Riboflavin bzw. FMN wurden isokratisch an Säulen des Typs Reverse Phase Hypersil ODS 5 μ (250 x 4.6 mm) mit Eluent A1 und einer Flussrate von 0,7 ml/min aufgetrennt und fluorimetrisch quantifiziert (Anregung 470 nm; Emission 530 nm).

6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin eluierte unter diesen Bedingungen bei einem Volumen von 2,8 ml, FMN bei 4,2ml und Riboflavin bei einem Retentionsvolumen von 13 ml. Als Standards dienten wässrige Lösungen, deren Konzentration bei 410 nm (6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin) und bei 445 nm (FMN, Riboflavin) photometrisch bestimmt worden war.

2.10.4 Auftrennung der Reaktionsprodukte des Testes auf Aldolaseaktivität

7,8-Dihydro-D-neopterin und 6-Hydroxymethyl-7,8-dihydropterin wurden isokratisch an Säulen des Typs Reverse Phase Hypersil ODS 5 μ (250 x 4.6 mm) mit Eluent A2 und einer Flussrate von 0,7 ml/min aufgetrennt und fluorimetrisch quantifiziert (Anregung 365 nm; Emission 446 nm).

7,8-Dihydro-D-neopterin eluierte unter diesen Bedingungen bei einem Volumen von 7,4 ml und 6-Hydroxymethyl-7,8-Dihydropterin bei einem Retentionsvolumen von 10,4 ml. Als Standard diente eine wässrige Lösung von 7,8-Dihydro-D-neopterin, deren Konzentration bei 330 nm photometrisch bestimmt worden war.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zur Riboflavinsynthese aus *S. pombe*

P. Lindner isolierte 1893 als erster die Hefe *S. pombe* aus ostafrikanischem Bier (*Pombe* ist das Suaheli-Wort für Bier). Hefen z.B. Endomyceten (bilden Ascosporen) sind überwiegend einzellig wachsende Pilze mit einem Durchmesser zwischen 5 und 10 μm . *S. pombe* besitzt mit 4827 Genen das kleinste Genom unter den Eukaryonten. Mit 4730 Introns, welche sich auf ca. 43% der Gene erstrecken, sind es weitaus mehr als z.B. bei *S. cerevisiae*. Diese große Anzahl an Introns lässt darauf schließen, dass durch alternatives Spleißen Proteinvarianten generiert werden können, welche möglicherweise regulative Funktionen in der Zelle haben können. *S. pombe* dient als guter Modellorganismus zur Untersuchung von bestimmten Krebskrankungswegen, denn 50 Gene haben eine signifikante Ähnlichkeit mit „Human-Disease“-Genen (Wood *et al.* 2002).

3.1.1 Klonierung der Riboflavinsynthese und deren Mutanten aus *S. pombe*

Das Konstrukt pNCO-SSP-Rib5-WT (AF505789) und die Plasmide entsprechender Mutanten C48A, C48M, C48S, S41A, S146A, S146C zur Überexpression rekombinanter Riboflavinsynthese (RS) aus *S. pombe* entstanden in enger Kooperation mit Dr. Markus Fischer (TU München) und Dr. Boris Illarionov (TU München).

Um den Mechanismus der RS im Detail aufzuklären wurden Wildtyp Enzym sowie die obengenannten Mutanten der RS exprimiert, gereinigt und enzymatisch charakterisiert.

Des Weiteren wurden in Löslichkeitsstudien Konstrukte der RS verwendet deren C-Termini um 5 (ΔC5) bzw. 24 (ΔH24) Aminosäuren verkürzt wurde. Die dazu verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 3.1 aufgeführt.

Tabelle 3.1: Primer für die C-terminale Kürzung

C-term. Deletion	Primer	Primersequenz
$\Delta C5$	SSP-Rib5- $\Delta C5$ - <i>HindIII</i> -Hi	5'-tat tat tat <u>aag ctt</u> taa atc cag tca gca ata tgg gcc tct ac-3'
$\Delta H24$	SSP-Rib5- $\Delta H24$ - <i>BamHI</i> -Hi	5'-tat tat gga <u>tcc gcg gtt</u> agt caa caa tca acg ttt act aaa tcg cc-3'
pNCO-Vo	<i>EcoRI</i>	5'-gtg agc gga taa caa ttt cac aca g-3'
mRNA5	-	5'-ctc cat ttt agc ttc cta gct cct g-3'

Die Oligonukleotide erlaubten nachfolgend eine erfolgreiche Ligierung in den Expressionsvektor pNCO113 über *EcoRI/HindIII* ($\Delta C5$) bzw. *EcoRI/BamHI* ($\Delta H24$). Die Kolonien wurden mit den Primern pNCO-Vo und mRNA5 gescreent. Für den eindeutigen Nachweis der korrekt amplifizierten SSP-Rib5- $\Delta C5$ ($\Delta H24$)-Konstrukte wurde ein analytischer Verdau mit der spezifischen Restriktionsendonuklease *AluI* bzw. *SacII* angesetzt. Die spezifischen Schnittstellen von *AluI* bzw. *SacII* in den Konstrukten sind in Tabelle 3.1 kursiv markiert.

Die erwartete Fragmentgröße der PCR-Amplifikate wurde mittels Agarosegelelektrophorese eindeutig nachgewiesen. Durch die Amplifikation mit dem Primer mRNA5 war es möglich, die durch den Verdau abgeschnittene Sequenz deutlich von der ungeschnittenen zu unterscheiden, da der Primer mRNA5 auf dem pNCO113-Vektor bindet.

Eine anschließende DNA-Sequenzierung der erhaltenen Konstrukte pNCO-SSP-Rib5- $\Delta C5$ (609 bp) und SSP-Rib5- $\Delta H24$ (552 bp) bestätigte die korrekte Nukleotidsequenz.

3.1.2 Expression und Reinigung der Wildtyp Riboflavinsynthase aus *S. pombe*

Es wurde versucht, die native Wildtyp Riboflavinsynthase aus *S. pombe* (WT-RS), bestehend aus 208 Aminosäuren, in *E. coli* zu exprimieren und durch verschiedene chromatographische Schritte zu isolieren. Die Überexpression der WT-RS aus *S. pombe* erfolgte, wie in 2.8.1 beschrieben, mit den Transformanten M15pRep4-SSP-Rib5-WT im Schüttelkolben bei 37°C. Die einzelnen Reinigungsschritte wurden durch SDS-PAGE-Analyse verfolgt (siehe Abbildung 3.2) und bis zur elektrophoretischen Homogenität aufgereinigt. Als chromatographische Reinigungsschritte diente hierbei als erstes eine Q-Sepharosesäule mit KCl-Gradienten und im Anschluss daran ein Gelfiltrationslauf, der neben der Reinigung auch eine Abschätzung des nativen Molekulargewichtes erlaubte. Dies war möglich, da die Gelfiltrationssäule mit definierten Proteinen kalibriert war und somit anhand des Retentionsvolumens das Molekulargewicht aus der Kalibriergeraden abgelesen werden konnte.

In mehreren Reinigungsexperimenten konnte die RS aus *S. pombe* reproduzierbar bei einem Retentionsvolumen von 210 ml eluiert werden, was auf ein Molekulargewicht von 69 kDa hinwies. Damit liegt die, RS aus *S. pombe*, deren rechnerisches Molekulargewicht der Untereinheit ca. 23 kDa beträgt als Trimer vor.

Die gereinigten Proben der Riboflavinsynthase aus *S. pombe* zeichneten sich alle durch eine intensiv gelbe Färbung aus.

Für die anschließenden Kristallisationsexperimente wurde die Probe über eine HI PREP 26/10 Säule in 50 mM Tris/HCl pH 7,0, 100 mM KCl umgepuffert und auf eine Konzentration von 9 mg/ml eingestellt.

Die folgende Abbildung zeigt exemplarisch die chromatographischen Reinigungsschritte. Der KCl-Gradient der Q- Sepharose ist mit roter Linie eingezeichnet. Der grüne Peak soll die gesammelten Fraktionen, die die RS aus *S. pombe* enthalten, verdeutlichen.

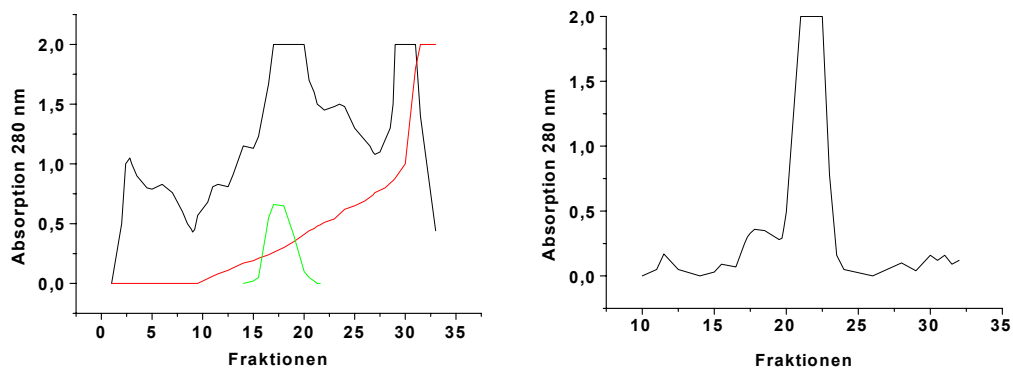


Abb. 3.1: links, Chromatographie von Wildtyp RS an Q-Sepharose; rechts, Chromatographie von Wildtyp RS an S200.

Die Abbildung 3.2 zeigt den Reinigungseffekt der verschiedenen Säulenschritte bei der Reinigung von WT-RS aus *S. pombe*.

Das rechnerisch zu erwartende Molekulargewicht für die Untereinheit ist durch eine deutliche Proteinbande bei 23 kDa sehr gut zu erkennen.

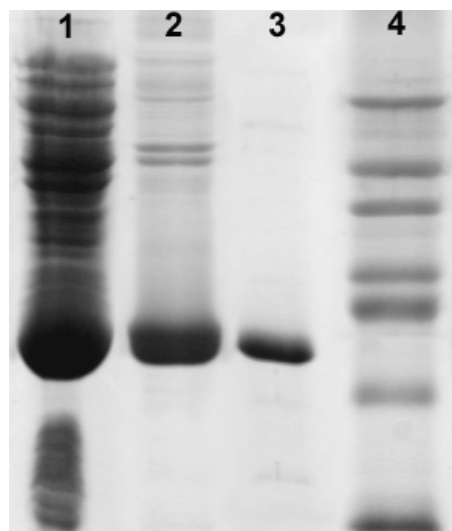


Abb. 3.2: SDS-PAGE vom Reinigungsverlauf der WT-RS aus *S. pombe*. Spur 1, Rohextrakt M15 pRep4-SSP-Rib5-WT; Spur 2, WT-RS nach Q-Sepharose; Spur 3, WT-RS nach Gelfiltrationssäule, Spur 4, Markerproteine mit den Molekulargewichtsstandards (von oben nach unten) 66, 45, 36, 29, 24, 20 und 14 kDa.

Zur weiteren Charakterisierung wurde die gereinigte WT-RS aus *S. pombe* auf einer PVDF-Membran immobilisiert und einer N-terminalen Sequenzanalyse unterzogen.

Die ersten 20 Aminosäuren (MFTGLVEAIGVVKDVQGTID) der N-terminalen Sequenzanalyse identifizierten das gereinigte Protein zu 100% als WT-RS aus *S. pombe*. Die Analyse wurde freundlicherweise von PD Dr. Peter Köhler am Institut für Lebensmittelchemie durchgeführt.

Weiterhin wurden nach dem gleichen Reinigungsprotokoll die Mutanten C48A, C48M, C48S, S41A und Δ C5 gereinigt. Zwei weitere gereinigte Mutanten S146A und S146C wurden freundlicherweise von Dr. Boris Illarionov (TU München) zur Verfügung gestellt.

3.1.2.1 Δ H24-Mutante der Riboflavinsynthase aus *S. pombe*

Das charakterisierte Plasmid pNCO113-SSP-Rib5- Δ H24 wurde in *E. coli* XI-1 Blue-Zellen transformiert. Der Test auf Expression erfolgte analog zur Expression von Wildtyp RS (3.1.2). Eine Steigerung des Expressionsniveaus konnte auch hierbei durch die Transformation in *E. coli* M15(pREP4) Zellen erzielt werden. Die rekombinante Mutante Δ H24 der RS lag vollständig als unlösliches Protein (Einschlußkörper) mit dem erwarteten, korrekten Molekulargewicht von 20 kDa in den Fraktionen des Gesamtproteins vor.

Um den Anteil löslicher RS- Δ H24 in den Fraktionen des Rohextraktes zu erhöhen, wurden verschiedene Methoden zur Vermeidung von Einschlußkörpern angewandt. Beispielsweise wurden die Expressionskulturen bei verschiedenen Temperaturen (25°C, 28°C, 30°C, 32°C, 37°C) kultiviert. Des Weiteren wurde die Menge an IPTG im Bereich von 0,5-2 mM Endkonzentration in den Expressionskulturen sowie entsprechende Induktionszeiten (4 h, 6 h und 16 h) variiert. Alle Versuche lösliches Protein von RS- Δ H24 zu bekommen, schlugen fehl.

3.1.2.2 Selenomethioninanzucht

Das isolierte Plasmid pNCO113-SSP-Rib5-WT wurde in *E. coli* B834 (DE3) Zellen transformiert.

Die WT-RS aus *S. pombe* wurde in einer 4 l *E. coli* Kultur mit einer Induktionszeit von fünf Stunden exprimiert. Die Reinigung des SeMet-Materials war identisch zur nativen WT-RS.

Die Ausbeute für gereinigte SeMet-RS betrug etwa ein viertel im Vergleich zur Ausbeute an gereinigter WT-RS.

Für die Kristallisation wurde die Probe über eine HI PREP 26/10 Säule in 50 mM Tris/HCl pH 7,0, 100 mM KCl umgepuffert und auf eine Konzentration von 9 mg/ml eingestellt.

3.1.3 Molekulargewichtsbestimmung der Riboflavinsynthese aus *S. pombe* mittels MALDI-MS

Mit Hilfe der SDS-PAGE ist eine grobe Abschätzung der molekularen Masse der Protein-Untereinheit möglich, wesentlich genauer kann die molekulare Masse der Untereinheit ist durch MALDI-MS bestimmt werden. Durch eine kalibrierte Gelfiltrationssäule lässt sich aufgrund des Retentionsvolumens die native Größe des Proteins ungefähr bestimmen.

Die Massenbestimmung mittels SDS-PAGE lieferte eine Masse von ca. 23 kDa. Diese abschätzende Analyse stimmt sehr gut mit der errechneten Masse von 22,861 kDa überein.

Die MALDI-MS-Bestimmung ergab ein Molekulargewicht von 22,863 kDa für WT-RS aus *S. pombe* und 22,304 kDa für die Deletionsmutante $\Delta C5$.

Beide Ergebnisse entsprechen exakt dem errechneten Molekulargewicht beider gereinigter Proteine.

Der Unterschied von 0,5 kDa konnte auf dem SDS-Gel nur bei direktem Vergleich beider Proteine nebeneinander ermittelt werden.

Die Elution der gewünschten Proteinfractionen auf der Gelfiltration ergab ein Retentionsvolumen von 210 ml. Dies entspricht einem nativen Molekulargewicht von etwa 69 kDa.

Damit liegt die RS aus *S. pombe*, wie auch die bislang bekannten RS wie z. B. aus *E. coli*, nativ als Homotrimer in einer Proteinlösung vor.

Die Ergebnisse der präparativ-analytischen Gelfiltration konnte mittels analytischer Ultrazentrifugation eindeutig bestätigt werden.

3.1.4 Analytische Ultrazentrifugation

3.1.4.1 Grenzschichtsedimentation

Native RS aus *S. pombe* sedimentiert als eine symmetrische Grenzschicht mit einer Sedimentationsgeschwindigkeit von $s_{20} = 4,1$ S

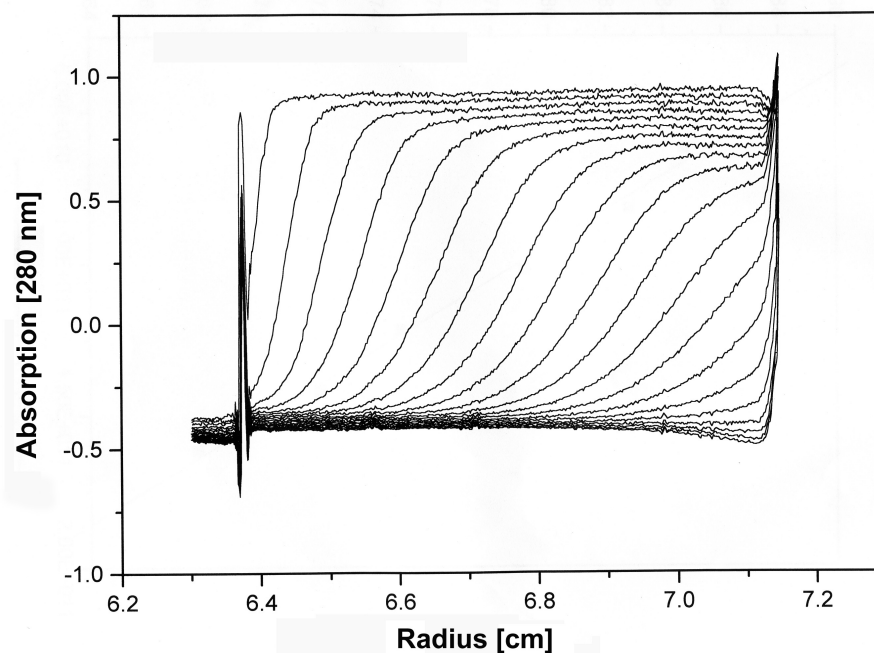


Abb. 3.3: Eine Lösung von 1,6 mg/ml RS aus *S. pombe* in 20 mM K-P, 100 mM KCl, pH 7,0 wurde bei 20°C und 55000 U/min zentrifugiert. Die Absorption bei 280 nm wurde in Intervallen von 10 min bestimmt.

3.1.4.2 Sedimentationsgleichgewichtsanalyse

Zur Bestimmung des nativen Molekulargewichtes und damit der Quartärstruktur der RS aus *S. pombe* wurde eine Sedimentationsgleichgewichtsanalyse durchgeführt.

Die Auswertung erfolgte mit der Software XLA-Data-Analysis (siehe in Material und Methoden unter 2.8.6).

Für den verwendeten 20 mM K-P-Puffer, 100 mM KCl, pH 7,0 ergab sich eine Dichte bei 4°C von 1,00660 g/ml.

Tabelle 3.2 Bedingungen des Sedimentations-Gleichgewichtslaufes

Parameter	
Temperatur [°C]	4
Zentrifugationsgeschwindigkeit [U/min]	11000
Anfangsabsorption [280 nm]	0,42
Partielles spezifisches Volumen [ml/g]	0,73
Pufferdichte [g/ml]	1,00660
Proteinkonzentration [mg/ml]	0,7

Es wurden Sedimentationsgleichgewichtsläufe der WT-RS aus *S. pombe* mit und ohne das Substratanalogon 6-Carboxyethyl-7-Oxo-8-Ribityllumazin (CEOL) durchgeführt.

Bei Zugabe des Liganden ergab sich ein um 2 kDa größeres Molekulargewicht von 76 kDa. Die errechnete Masse der WT-RS ohne Ligand ergab 74 kDa. In Gegenwart von CEOL sedimentierte WT-RS immer noch als Trimer, so dass keine Zerstörung der nativen Struktur durch CEOL statt fand.

3.1.5 Struktur der Riboflavinsynthase aus *S. pombe*

3.1.5.1 Kristallisation der Riboflavinsynthase aus *S. pombe*

Die gereinigte WT-RS aus *S. pombe* wurde mit einer Konzentration von 9 mg/ml in 20 mM Tris/HCl pH 7.0, 100 mM KCl in „Screening“-Experimenten unter Verwendung der *sitting drop*-Methode (siehe 2.9.1) eingesetzt. Des Weiteren wurden verschiedene Liganden zur Stabilisierung der RS in den Kristallisationsansätzen getestet. Zum Einsatz kamen 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin, Riboflavin, 5-Nitro-6-ribitylamino-2,4(1*H*, 3*H*)-pyrimidindion und 6-Carboxyethyl-7-oxo-8-ribityllumazin (CEOL).

Initiale Co-Kristalle der RS aus *S. pombe* mit dem substratanalogen Inhibitor CEOL konnten im MPD-Grid-Screen identifiziert werden. Eine weitere Optimierung der Parameter führte schließlich zu einer reproduzierbaren Kristallisationsbedingung der WT-RS. Hierzu wurden 2 µl RS (9 mg/ml) in CEOL mit 2 µl Reservoirlösung (65 % (v/v) MPD, 0,1 M Bicine pH 9.0) gemischt. Die Kristalle wuchsen innerhalb weniger Tage bei Raumtemperatur zu einer ausreichenden Größe von ca. 0,2 x 0,05 x 0,05 mm³. Die Kristallisationsbedingung erwies sich aufgrund der hohen MPD-Konzentration als kryotauglich und ein erster nativer Kryodatensatz mit einer Auflösung von 2,7 Å wurde in enger Kooperation freundlicherweise von Dr. Stefan Gerhardt am Max-Planck-Institut für Biochemie mit einer *Image Plate* an einem Röntgendrehanodengenerator aufgenommen.

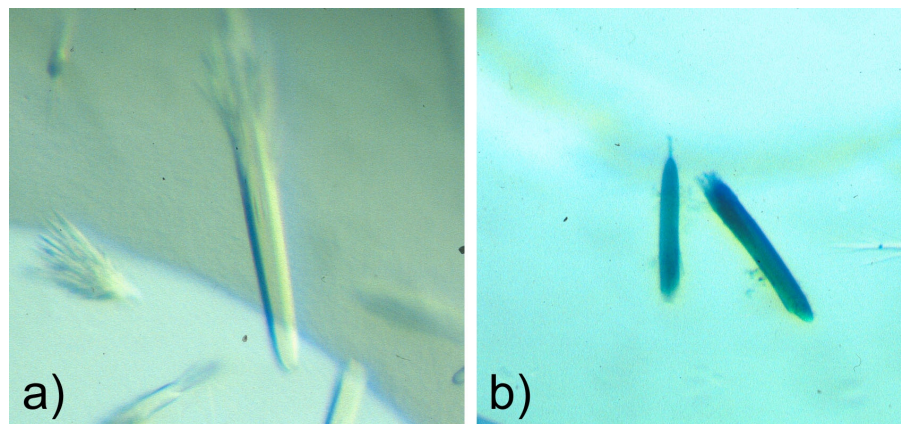


Abb. 3.4: Kristalle der Wildtyp RS aus *S. pombe* in **a)** 65 % (v/v) MPD, 0,1 M Bicine pH 9.0 und **b)** Schweratom-„Soak“ mit $[\text{Ta}_6\text{Br}_{12}]^{2+}$ der gleichen RS-Kristalle.

Zu diesem Zeitpunkt waren keine Daten zur Lösung der Riboflavinsynthasestruktur bekannt, so dass Strategien zur Strukturlösung mittels Schweratomderivate verfolgt wurden. Durch „Soaken“ nativer Co-Kristalle mit Thiomerosal (Natriumethylmercurithiosalicylat, $\text{C}_2\text{H}_5\text{-HgS-C}_6\text{H}_4\text{COONa}$) und mit Tantalbromid konnten zwei unabhängige Schweratomderivate erhalten werden. In Abbildung 3.4 ist die grünliche Färbung der Kristalle (**b**) durch den Tantalbromid-Cluster deutlich zu erkennen.

Zwischen dem nativen und den entsprechenden Derivaten konnte durch anschließende Berechnung der Differenz-*PATTERSON*-Funktionen die möglichen Schweratompositionen der Hg-Atome und des $[\text{Ta}_6\text{Br}_{12}]^{2+}$ -Clusters eindeutig identifiziert werden.

Von diesem gesicherten Hg-Derivat (Hg-DERI 1) wurden freundlicherweise von Dr. Stefan Gerhardt MAD-Daten am Deutschen Elektronen Synchrotron (DESY) in Hamburg aufgenommen.

Der Autoindizierungsalgorithmus nach Kabsch (Kabsch 1988) lieferte eine hexagonale Gittermetrik mit Gitterkonstanten von $a = b = 70,32 \text{ \AA}$ und $c = 93,2 \text{ \AA}$ und Winkeln von $\alpha = \beta = 90^\circ$ und $\gamma = 120^\circ$.

Das Verhältnis von Zellvolumen zu molekularer Masse $V_m = 3,0 \text{ \AA}^3/\text{Dalton}$ (Matthews *et al.* 1968) zeigt das Vorliegen eines RS-Monomeres in der asymmetrischen Einheit mit einem Solvensgehalt von 59 % an.

Die Abbildung 3.5 zeigt eine Diffraktionsaufnahme aus dem RS Hg-DERI 1 MAD-Datensatz, aufgenommen mit einem CCD-Detektor.

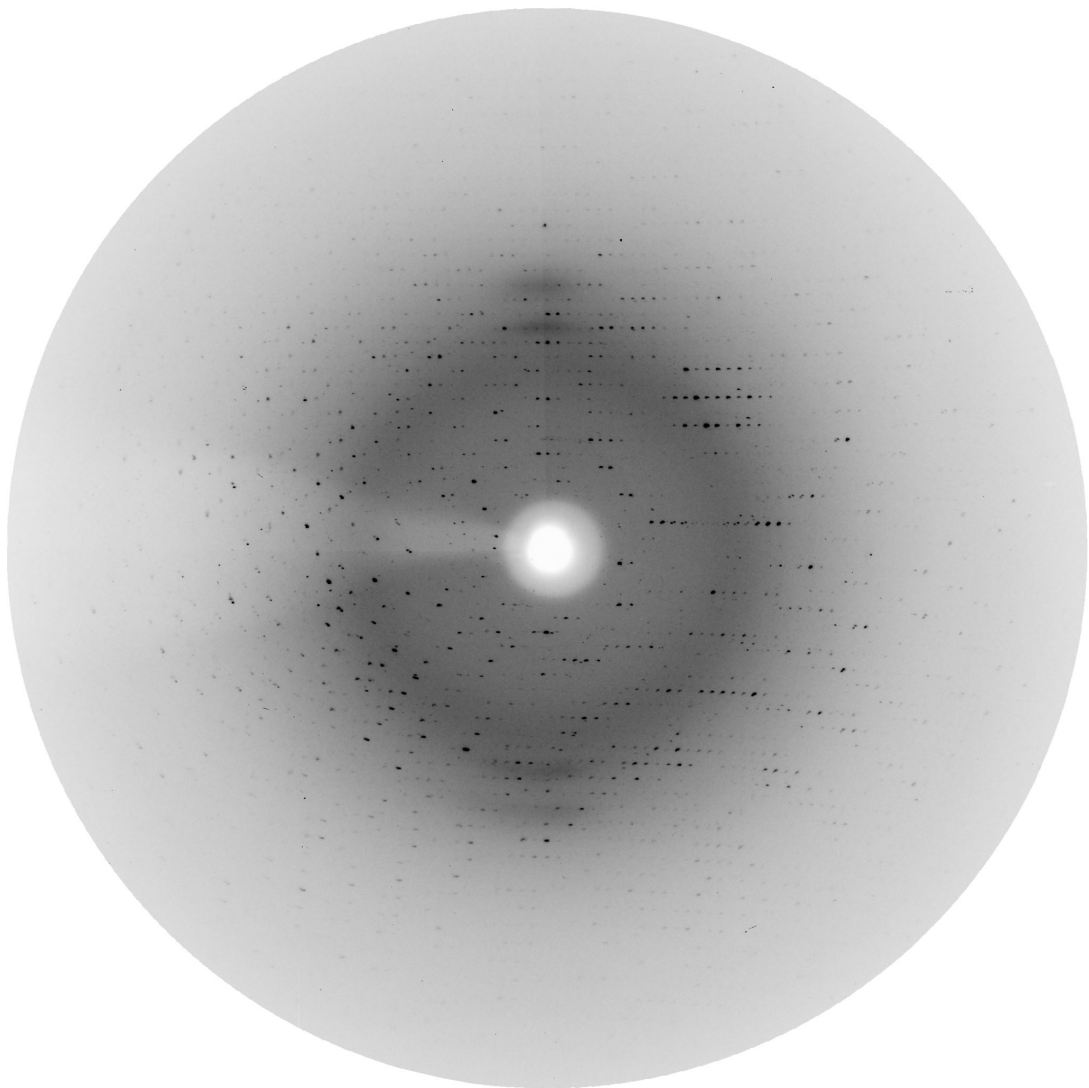


Abb. 3.5: Rotationsaufnahme des MAD-Datensatzes der RS aus *S. pombe* aufgenommen am DESY (Hamburg) auf einem CCD-Detektor. Die Auflösung am Detektorrand beträgt $2,0 \text{ \AA}$, der Plattenabstand 160 mm , die Rotation $0,5^\circ$ und die Wellenlänge $0,949 \text{ \AA}$.

Tabelle 3.3: Datensammlungs- und Verfeinerungsstatistik des MAD-Datensatzes (Hg-DERI 1) und des nativen Datensatzes (NATI) der RS aus *S. pombe*.

Datenprozessierungs- und Verfeinerungsstatistik				
	Hg-DERI 1			NATI
Raumgruppe	P6 ₁			P6 ₁
Zellkonstanten	a = b = 70,50 Å c = 92,95 Å $\alpha = \beta = 90^\circ, \gamma = 120^\circ$			a = b = 70,32 Å c = 92,37 Å $\alpha = \beta = 90^\circ, \gamma = 120^\circ$
Auflösungsbereich [Å]	19,88 – 2,1			20,6 – 2,7
Unabhängige Reflexe ($I > 2,0\sigma(I)$)	15097 (19,88 – 2,1 Å)			6988 (20,6 – 2,7 Å)
Letzte Auflösungsschale [Å]	2,14 – 2,1			2,85 – 2,7
	Remote	Peak	Edge	
Wellenlänge [Å]	0,9499	1,000	1,010	CuK α
Multiplizität	2,1	2,1	2,1	2,7
R_{merge}^*	0,097	0,098	0,101	0,127
R_{merge} (letzte Auflösungsschale)	0,265	0,302	0,314	0,348
Vollständigkeit der Daten [%]	94,5	94,5	93,1	97,8
... in der letzten Auflösungsschale [%]	95,3	95,2	69,8	97,8
Unabhängige Reflexe [§]	28494	28350	27976	
R -Faktor [%] [*]	18,5			19,8
R_{free} [%] [#]	22,0			26,3
<i>r.m.s.</i> -Abweichung von Idealwert der				
Bindungslängen [Å]	0,006			0,007
Bindungswinkel [°]	1,24			1,21
Mittlerer B-Faktor, Protein [Å ²]	27,2			28,6
Mittlerer B-Faktor, Ligand [Å ²]	23,0			26,9
Mittlerer B-Faktor, Solvens [Å ²]	32,4			28,7
Mittlerer B-Faktor, Hg ²⁺ -Ion [Å ²]	40,6			
Anzahl Proteinatome (nicht H)	1558			1558
Anzahl Ligandenatome (nicht H)	54			54
Anzahl Schweratome	1			-
Anzahl Wassermoleküle	121			79
(Φ, Ψ) Winkel Verteilung im				
bevorzugten Bereich [%]	86,0			80,3
zusätzlich erlaubten Bereich [%]	14,0			19,7
weitläufig erlaubten Bereich [%]	0,0			0,0
verbotenen Bereich [%]	0,0			0,0

* R -Faktor = $\sum_{\text{hkl}} | |F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}| | / \sum_{\text{hkl}} |F_{\text{obs}}|$
[#] R_{free} berechnet mit 5 % Reflexe, die nicht in die Verfeinerung einbezogen wurden
[§] Reflexe behandelt als unabhängige FRIEDEL-Paare

63 $R_{\text{merge}} = \sum |I_i - \langle I \rangle| / \sum I_i$, wobei I_i eine individuelle Messung der Intensität ist und $\langle I \rangle$ die gemittelte Intensität für diesen Reflex ist.

Eine anschließende MAD-Phasierung mit der Hg-Schweratomposition und allen drei gemessenen Wellenlängen (Peak, Remote und Edge) lieferte eine eindeutig interpretierbare Elektronendichtekarte, in der nach Dichtemodifikation (*solvent-flattening*) die Orientierung der Aminosäuren 1 bis 202 der RS-Sequenz aus *S.*

pombe sichtbar war. Die experimentelle Elektronendichte war von außerordentlich guter Qualität, so dass 203 der 208 Aminosäuren einer monomeren Untereinheit der RS aus *S. pombe* eingebaut werden konnten. Im weiteren Verlauf konnte die F_o-F_c Elektronendichte zweier Inhibitormoleküle CEOL charakterisiert und deren Modelle eingepasst werden. Abschließend wurde das RS Atommodell bis zu einem *R*-Faktor von 18,5 % (freier *R*-Faktor 22 %) bei einer maximalen Auflösung von 2,1 Å verfeinert. Für die C-terminalen Aminosäuren 203–208 zeigte sich auch in diesem Stadium der Verfeinerungen keine interpretierbare Dichte. Diese Daten wurden freundlicherweise von Dr. Stefan Gerhardt zur Verfügung gestellt.

Kristallisationsexperimente mit den Mutanten C48A, C48S und S41A der RS aus *S. pombe* ergab unter den identischen Kristallisationsbedingungen keine Kristalle.

3.1.5.2 Strukturbeschreibung der Riboflavinsynthase aus *S. pombe*

Die RS aus *S. pombe* ist in Lösung ein homotrimeres Protein mit einem Molekulargewicht von 22,8 kDa pro Untereinheit, doch in der Kristallstruktur liegt es als Monomer vor. Das aktive Zentrum konnte durch den substratanalogen Inhibitor CEOL eindeutig identifiziert werden. Die RS aus *S. pombe* ist aufgrund ihrer Faltungstopologie der Klasse der α/β Enzyme zuzuordnen. Das atomare Modell des RS-Monomeren besteht im Kern aus zwei β -barrel und einer C-terminalen α -Helix (siehe Abbildung 3.6). Die C-terminale α -Helix wird von den Resten 185 bis 203 gebildet. Die letzten fünf Aminosäuren zeigten keine interpretierbare Dichte.

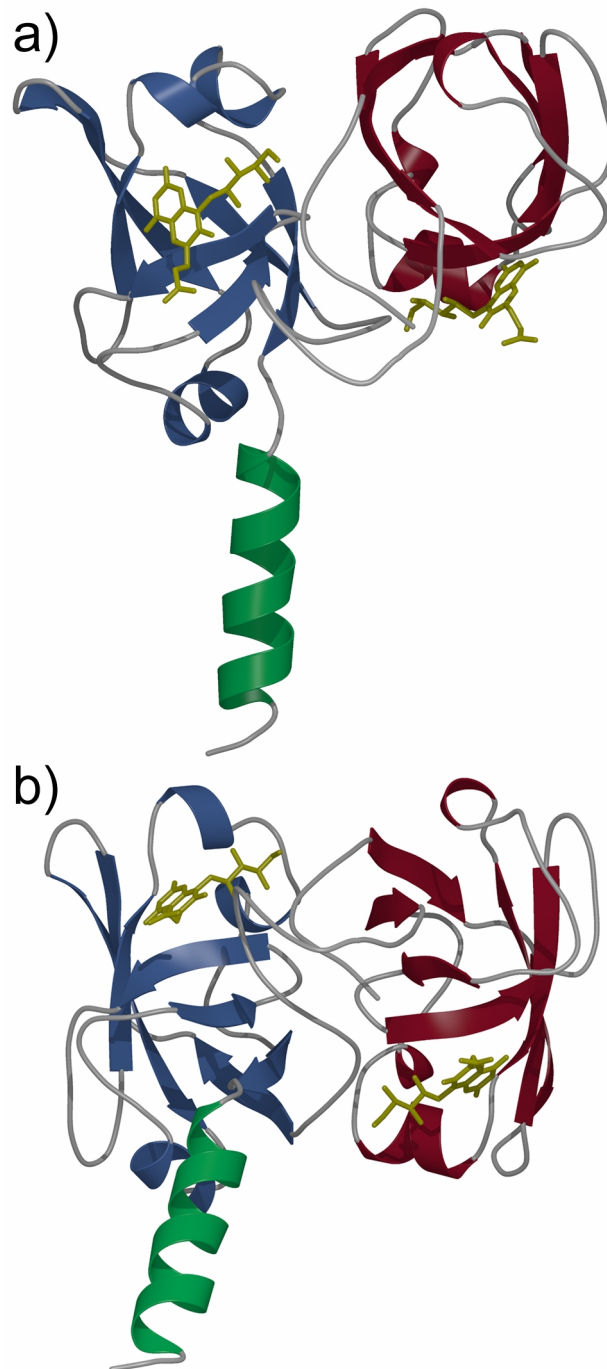


Abb. 3.6: Stereodarstellung des *S. pombe* Riboflavinsynthase Monomers. Das N-terminale β -*barrel* ist blau und das mittlere C- β -*barrel* ist rot dargestellt. Der gebundene Inhibitor CEOL ist im aktiven Zentrum gelb eingezeichnet, die C-terminale α -Helix grün eingefärbt.

Das N-terminale β -barrel besteht aus 90 Aminosäuren (Met1 bis Ser90) und die mittlere Domäne (C-Fassmotiv) schließt sich von Ser91 bis Val184 an. Beide Domänen weisen topologisch äquivalente Bindungsstellen des Substrates 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin auf. Die Hauptketten- C_{α} -Atome des N- β -barrels überlagern mit denen des C- β -barrels mit einer sehr geringen *r.m.s.*-Abweichung von 0,97 Å für 84 C_{α} -Atome, was die große Ähnlichkeit der beiden Domänen in ihrer Faltung zueinander zeigt und eine pseudo-zweizählige Symmetrie innerhalb des Proteins offensichtlich macht.

In Abbildung 3.7 ist die Überlagerung der Hauptketten- C_{α} -Atome der N-terminalen Domäne (rot) mit denen der mittleren Domäne (blau) gezeigt. Die Lagen, der beiden in den aktiven Zentren der RS Domänen gebundenen Lumazinderivate (Kugel- und Stab-Zeichnung) kommen dabei in annähernd exakter Übereinstimmung. Die gebundenen Inhibitoren (CEOL) sind in ihrer Elektronendichtekarte bei 2,1 Å ausgezeichnet definiert und sind mit Temperaturfaktoren von 23,0 Å² sehr rigide gebunden. Die Inhibitoren werden hauptsächlich über hydrophile Seitenkettenkontakte gebunden und identifizieren eindeutig zwei Substratbindungsstellen in den beiden β -barrels auf gegenüberliegenden Seiten der RS.

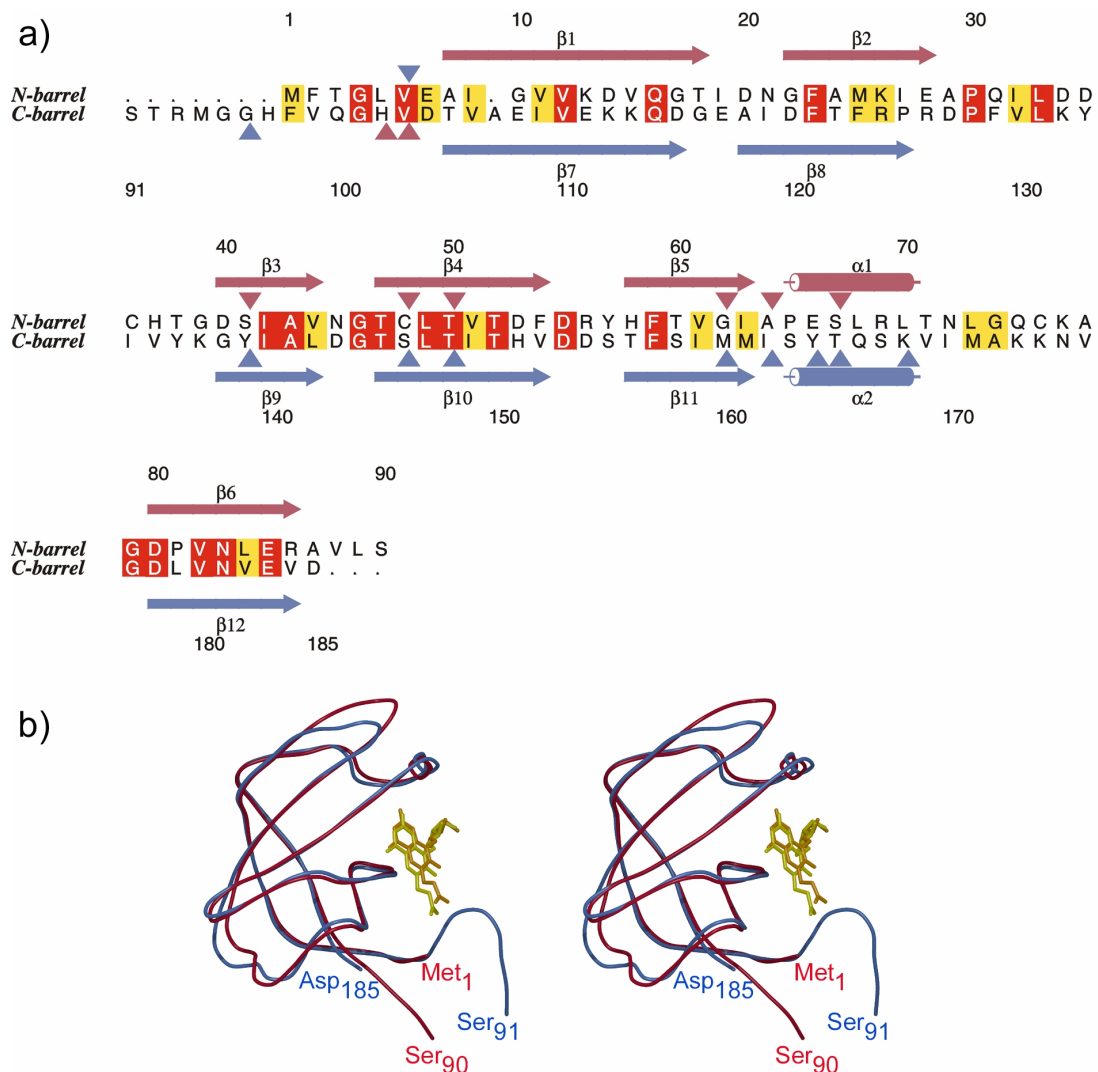


Abb. 3.7: **a)** Interner Strukturvergleich des N-terminalen β -barrels (rot) und des C-terminalen β -barrels (blau) der RS aus *S. pombe*; **b)** Stereodarstellung der internen Überlagerung des N-terminalen β -barrels (rot) von Aminosäure Met1 bis Ser90 mit dem C-terminalen β -barrels (blau) von Ser91 bis Val184. Der CEOL-Inhibitor ist in Kugel-und-Stab-Zeichnung dargestellt und markiert die Substratbindungsstelle in der RS.

Die bei der Bindung des Inhibitors beteiligten Aminosäuren sind in obiger Abbildung mit roten Dreiecken für das N-terminale β -barrel und mit blauen Dreiecken für das C-terminale β -barrel gekennzeichnet.

3.1.6 Photometrische Bestimmung des kinetischen Verhaltens der Wildtyp Riboflavinsynthase und Mutanten aus *S. pombe*

Die photometrische Bestimmung der Riboflavinbildung durch die RS aus *S. pombe* erfolgte wie in 2.8.4.2 beschrieben. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Enzymlösung gestartet. Die eingesetzten Enzymkonzentrationen im Reaktionsansatz lagen bei 14 µg/ml. Die Riboflavinbildung wurde bei 470 nm über 10 min gemessen und im Anschluß durch die Steigung die Anfangsgeschwindigkeit ermittelt. Die einzelnen Messwerte erfolgten in einer 6-fach-Bestimmung. Als Berechnungsgrundlage der gebildeten Riboflavinmenge diente der Absorptionskoeffizient $\varepsilon_{470}=9100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ von Riboflavin bei pH 7. Die Daten wurden mit dem Programm Origin (Microcal) bestimmt und mit der Hill-Funktion gerechnet (siehe Gleichung 1).

$$y = V_{\max} \frac{x^n}{k^n \cdot x^n} \quad \text{(Gleichung 1)}$$

Dabei ergab sich für die WT-RS aus *S. pombe* eine Geschwindigkeit v_{\max} von 158 nmol $\text{mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ und einem Hill-Koeffizienten von $n=1,8$. Die folgende Abbildung 3.8 zeigt die Riboflavinbildung in Abhängigkeit von der Lumazinkonzentration.

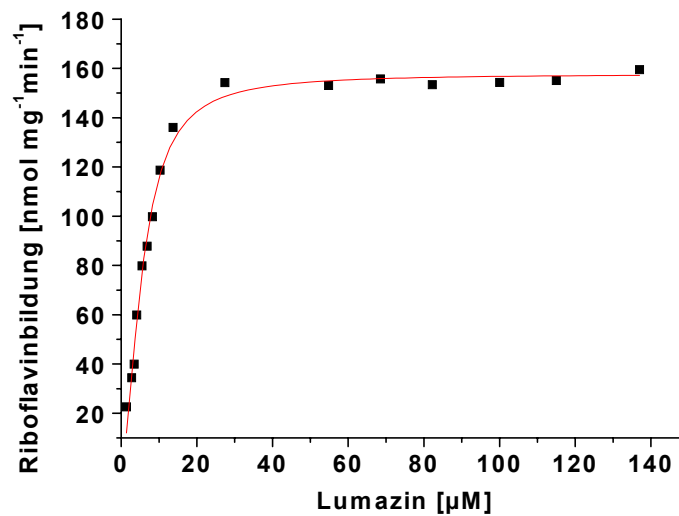


Abb. 3.8: Kinetik von Wildtyp Riboflavinsynthese aus *S. pombe*: Bildung von Riboflavin aus 6, 7-Dimethyl-8-ribityllumazin.

In der Tabelle 3.4 sind die kinetischen Eigenschaften der WT-RS aus *S. pombe* und verschiedener Mutanten aufgeführt.

Tabelle 3.4: Kinetische Eigenschaften der RS aus S. pombe

Riboflavin Synthase aus <i>S. pombe</i>	V_{\max} [nmol mg⁻¹ min⁻¹]	K [µM]	Hill-Koeffizient n
Wildtyp	158 ± 2,9	5,7 ± 0,2	1,8 ± 0,1
ΔC5	149 ± 3,3	5,0 ± 0,2	2,6 ± 0,3
S146A	181 ± 4,1	3,7 ± 0,2	1,3 ± 0,1
S146C	178 ± 7,2	8,9 ± 1,3	1,0 ± 0,1
C48S	27 ± 1	1,1 ± 0,1	1,8 ± 0,4
C48A	< 0,1	-	-
C48M	< 0,1	-	-

Der Austausch von Cys48 durch Alanin oder auch Methionin führte zu enzymatisch inaktiven Mutanten.

Die C48S-Mutante zeigte mit einer spez. Restaktivität von 27 nmol mg⁻¹ min⁻¹ ein sechstel der entsprechenden Wildtyp-Aktivität.

In der folgenden Abbildung 3.9 sind die Graphen der Mutanten S146A und S146C aufgeführt.

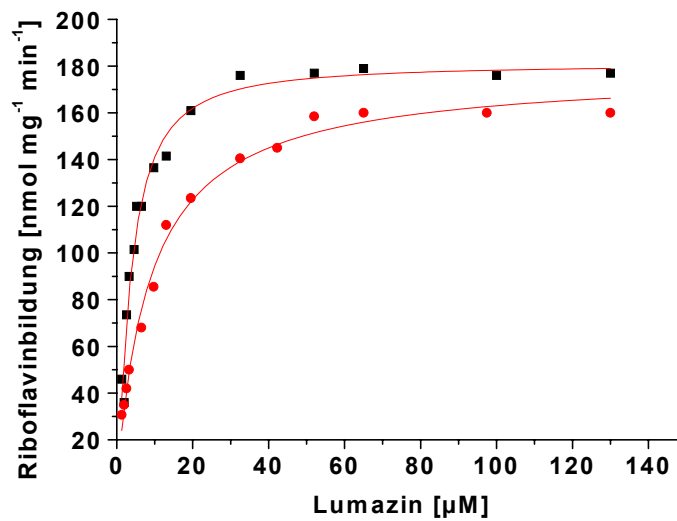


Abb. 3.9: Kinetik von den S146A- und S146C-Mutanten der Riboflavinsynthese aus *S. pombe*: Bildung von Riboflavin aus 6, 7-Dimethyl-8-ribityllumazin; ● S146C-Mutante; ■ S146A-Mutante.

Der topologisch äquivalente Rest zu Cys48 ist in der C-terminalen Domäne mit S146 gegeben. Die Mutationen S146A und S146C zeigten im Enzymtest nur einen geringen Einfluss auf die katalytische Aktivität. Bei der Mutante S146C geht die Kooperativität verloren. Damit konnte das Modell von Michaelis-Menten angewandt werden. Das größere Cystein bewirkt einen Verlust der positiven Kooperativität, der bei der S146A nicht so stark ausgeprägt ist.

3.1.7 ^{19}F -NMR-Untersuchungen der Riboflavinsynthase aus *S. pombe* mit verschiedenen Fluorliganden

Bei Messungen eines ^{19}F NMR Spektrum eines Protein/Ligand Komplexes können störende Protein- oder Lösungsmittelsignale vernachlässigt werden, da nur NMR-Signale vom Fluorliganden aufgenommen werden. Des Weiteren ist der Verschiebungsbereich der ^{19}F Kerne sehr breit.

Die Signale von Trifluormethylgruppen zum Beispiel variieren um etwa 50 ppm, somit ist diese Methode sehr sensitiv, da schon kleinste Änderungen in der chemischen Umgebung der Fluorkerne Signalverschiebungen um mehrere ppm verursachen können. Ein Wechsel eines Fluorliganden von der freien Solvensumgebung in die Bindungstasche eines Proteins kann z.B. eine solche Änderung induzieren. Dabei sind die ^{19}F NMR Signale von proteingebundenen Fluorliganden oft so weit von den Signalen des freien Liganden separiert, dass sich beide Signale durch Integration quantitativ auswerten lassen.

^{19}F NMR Untersuchungen mit fluorsubstituierten Intermediatanlogen zeigten, dass die Bindungsstellen der homotrimeren RS der *S. pombe* topologisch nicht äquivalent sind.

Die Liganden 6,7-Bis(trifluoromethyl)-8-ribityllumazinhydrat (Epimer A) und 6-Trifluoromethyl-7-oxo-8-ribityllumazin (Oxo) (siehe Abbildung 3.11) zeigten bis zu vier verschiedene Bindungszustände in ihren ^{19}F -NMR-Spektren.

Cushman und seine Mitarbeitern haben eine Reihe dieser strukturanalogen Verbindungen des 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazins synthetisiert, hierbei wurden die Methylgruppen durch Trifluormethylgruppen ersetzt (Cushman *et al.* 1991).

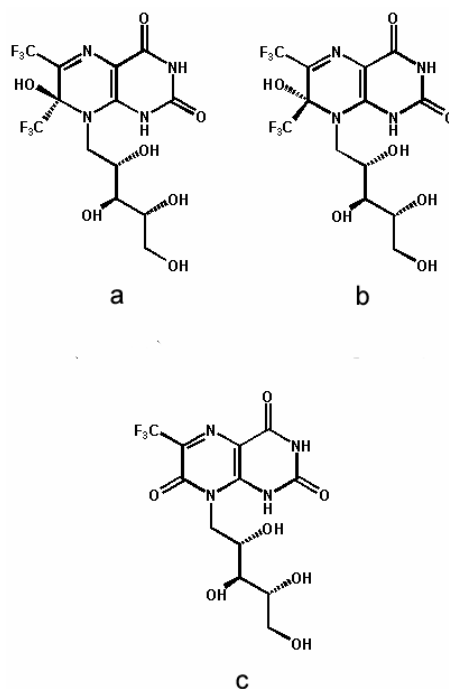


Abb. 3.10: **a)** 6,7–Bis(trifluoromethyl)-8-ribityllumazinhydrat (Epimer A); **b)** Epimer B; **c)** 6-Trifluoromethyl-7-oxo-8-ribityllumazin (Oxo).

Die ^{19}F -NMR-Experimente wurden in enger Kooperation mit Dr. Kristina Kemter (TU München) durchgeführt.

3.1.7.1 ^{19}F NMR Experiment der Wildtyp Riboflavinsynthese aus *S. pombe* mit 6-Trifluoromethyl-7-oxo-8-ribityllumazin

Die Proteinlösung der Wildtyp RS aus *S. pombe* (ca. 1,1 mM Monomerenkonzentration) in 20 mM K-Phosphat-Puffer, 100 mM KCl und 10% D_2O , pH 7,0 wurde mit einer steigenden Konzentration des Fluorliganden 6-trifluormethyl-7-oxo-8-ribityllumazin titriert. Das Titrationsexperiment ist in Abbildung 3.12 gezeigt und macht die besondere Komplexität der Wechselwirkungen des Proteins mit dem Liganden sichtbar.

Die Ligandenkonzentrationen für jeden einzelnen Titrationsschritt sind in der Abbildung 3.11 in jedem Spektrum eingezeichnet. Die Lage des freien Liganden in den Spektren ist durch die gestrichelte Linie gekennzeichnet.

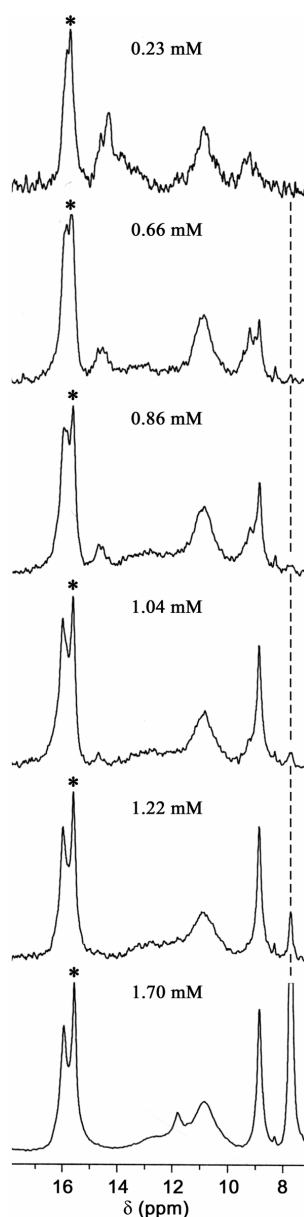


Abb. 3.11: ^{19}F NMR Spektren der Titration der Riboflavinsynthase aus *S. pombe* mit 6-Trifluormethyl-7-oxo-8-ribityllumazin (Oxo). Die eingesetzte Monomerenkonzentration betrug 1,1 mM. Die Konzentrationen des Fluorliganden sind in den einzelnen Titrationsschritten über jedem Spektrum angegeben. Die Spektren sind auf die Signalintensität des Signals bei 15,6 ppm kalibriert, welches durch einen * gekennzeichnet ist. Durch gestrichelte Linien sind die Signale des freien Liganden gekennzeichnet. Die Spektren wurden mit einer Linienverbreiterung von 20 Hz transformiert.

Das erste Spektrum zeigt, bei dem der Ligand in einem deutlichen Unterschuss zu der Monomerenkonzentration eingesetzt wurde, dass das ^{19}F NMR Spektrum von einem relativ scharfen Signal bei 15,6 ppm dominiert wird, welches noch eine Schulter bei ungefähr 15,8 ppm trägt. Im Rauschen des Spektrums sind drei weitere stark linienverbreiterte Signale zu sehen. Ein Doppelsignal bei 14,6 und 14,3 ppm sowie ein einzelnes sehr breites Signal bei 10,9 ppm und ein kleines Doppelsignal bei 9,4 und 9,1 ppm. Der weitere Verlauf der Titration \square abel das Signal bei 10,9 ppm unverändert, wie auch das dominante Signal bei 15,6 ppm. Allerdings wird die Schulter bei 15,8 ppm kleiner und es bildet sich ein zweites Signal bei 16,0 ppm heraus. Deutlich erkennbar ist die Entwicklung bei zunehmender Ligandenkonzentration eines bei 8,8 ppm vergleichsweise scharfen Signales. Das anfangs vorhandene Signal bei 9 ppm verschwindet im Rauschen des Spektrums. Eine Abnahme des Signals bei 14,7 ppm kann mit zunehmender Ligandenkonzentration beobachtet werden. Der Titrationsverlauf zeigt, dass eine verbreiterte Erhebung zwischen den Signalen bei 10,9 ppm und 15,6 ppm immer weiter nach höherem Feld hin wandert.

Im letzten Spektrum des mit Liganden gesättigtem Protein ist zu erkennen, dass zwei Signale bei 15,6 und 16,0 ppm das Spektrum kennzeichnen sowie ein vergleichsweise scharfes Signal bei 8,8 ppm. Im Verschiebungsbereich zwischen diesen Signalen liegt das von Anfang an vorhandene Signal bei 10,9 ppm und das erst mit zunehmender Ligandenkonzentration entstandene Signal bei 11,8 ppm, an das sich noch eine sehr breite Erhebung, die sich von 12 und 14 ppm erstreckt, anschließt.

Bedingt durch die Veränderung der Konzentrationsverhältnisse von Protein/Ligand ergaben sich unterschiedliche Intensitäten und chemischen Verschiebungen während der Titration, dadurch zeigt sich die starke Komplexität der Protein/Ligand Wechselwirkungen und belegt sehr deutlich die Dynamik, die hinter dieser Reaktion steckt.

Eine Zuordnung der Signale im ^{19}F NMR Spektrum des mit Liganden gesättigten Proteins erfolgte mit Hilfe der im nächsten Kapitel folgenden Abbildung des gleichen Tritrationsexperimentes mit den Mutanten der RS aus *S. pombe*, so dass das intensive Doppelsignal bei 16,0 ppm bzw. 15,7 ppm der N-terminalen

Bindungsstelle zugeordnet und der Verschiebungsbereich zwischen diesem Signal und dem Signal für den freien Liganden der C-terminalen Bindungsstellen mit unterschiedlicher chemischer Umgebung zugeordnet wurde. Daraus ergeben sich für die N-terminale Bindungsstelle im Verlauf der Titration nur unwesentliche Veränderungen, da in allen sechs Spektren ein sehr intensives Signal zu sehen ist. Allerdings kann im Verschiebungsbereich der C-terminalen Bindungsstellen im Spektrum mit Ligandenunterschluß drei fast gleich intensive Signale beobachtet werden, die sich unterschiedlich entwickeln. So verändert sich das Signal bei 10,8 ppm bei weiterer Sättigung des Proteins mit Liganden überhaupt nicht. Die beiden anderen Signale aber wandern im Spektrum und verändern auch die Intensitäten.

Aus dieser Dynamik können durch die Beladung des Fluorliganden verursachte Konformationsänderungen des Proteins interpretiert werden, die während der ganzen Titration durchlaufen werden.

3.1.7.2 ^{19}F NMR Experiment verschiedener Mutanten der Riboflavinsynthase aus *S. pombe* mit 6-Trifluoromethyl-7-oxo-8-ribityllumazin

Die Titrationsexperimente der Wildtyp RS aus *S. pombe* wurden analog mit den Mutanten durchgeführt. Verwendet wurden Punktmutanten, die im N-terminalen Cys48-Rest und dem topologisch äquivalenten C-terminalen Ser146-Rest verändert wurden. Das Cys48 wurde durch Met, Ala und Ser ersetzt, der Ser146-Rest durch Cys und Ala.

Durch die Mutation des Cys48 Restes ergibt sich einen starken Effekt auf die ^{19}F NMR Spektren im Vergleich zum Wildtyp, was sehr gut in der Abbildung 3.12 zu sehen ist. Dieser Einfluss beschränkt sich nicht nur auf die Veränderung eines einzelnen Signales, sondern erstreckt sich auf das gesamte Spektrum.

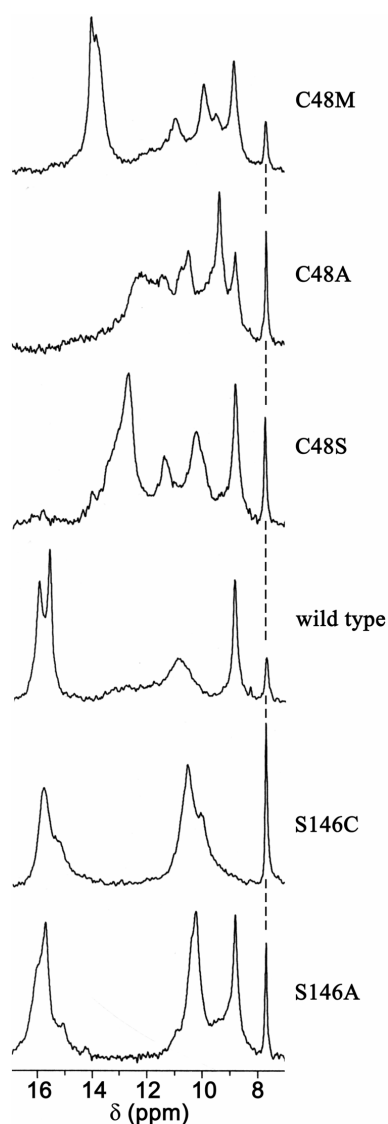


Abb. 3.12: ^{19}F NMR Spektren von 6-Trifluormethyl-7-oxo-8-ribityllumazin im Komplex mit den Mutanten der RS aus *S. pombe* im Vergleich dazu mit dem Wildtyp Spektrum. Die einzelnen Komponenten enthielten folgende Konzentrationen: C48M, 0,85 mM, 1,10 mM Oxo; C48A, 0,44 mM, 0,57 mM Oxo; C48S, 0,46 mM, 0,80 mM Oxo; Wildtyp 0,84 mM, 1,22 mM Oxo; S146C, 0,61 mM, 0,92 mM Oxo; S146A, 0,77 mM, 1 mM Oxo. Alle Proben enthielten 20 mM Phosphat Puffer, 100 mM KCl und 10% D_2O bei pH 7. Die Signale des freien Liganden sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet. Die Spektren wurden mit einer Linienverbreiterung von 20 Hz transformiert.

Der Austausch der Aminosäure Cys48 durch die im Vergleich kleineren Reste Alanin sowie Serin bewirkt, dass der im Wildtyp Spektrum dominierende

Doppelpeak bei 16,0 bzw. 15,6 ppm bei C48S auf 12,7 ppm Hochfeld verschoben wird. Im Fall von C48A verschwindet und verändert er sein Aussehen. Der im Vergleich größere Rest Methionin bewirkt allerdings eine deutlich geringere Verschiebung dieses Wildtyp Signals (16,0 bzw. 15,6 ppm) etwa nur 2 ppm Hochfeld auf 14 ppm bzw. 13,7 ppm hin. Verglichen mit dem Wildtyp Spektrum bleibt im Falle der C48M Mutante das Aufspaltungsmuster der an das Protein gebundenen 6-CF₃ Gruppe ziemlich ähnlich. Die restlichen Signale zeigen nur leichte Verschiebungsänderungen bzw. Änderungen in ihren Intensitäten und Linienbreiten.

Das Aufspaltungsmuster der Mutante C48S bleibt zu dem des Wildtyp Spektrums bis auf leichte Verschiebungsänderungen und auffällige Änderungen der Intensitätsverhältnisse sowie Linienbreiten weitgehend erhalten. Auffallend anders zeigt sich das Spektrum der C48A-Mutante. Gemeinsamkeit der C48-Mutanten mit dem Wildtyp Spektrum ist das weitgehend scharfe Signal bei 8,8 ppm, welches aber bei der C48A-Mutante relativ zu den anderen C48-Mutanten und dem Wildtyp Spektrum weniger intensiv und separiert ist. Des Weiteren zeigt sich ein dominierendes Signal bei einer chemischen Verschiebung von 9,3 ppm, welches im Falle aller anderen C48-Mutanten und im Falle des Wildtyps nur in den Anfangsstadien der Titrationen also bei Ligandenunterschuss im Spektrum zu beobachten ist (Daten nicht gezeigt, persönliche Mitteilung von Frau Dr. Kristina Kemter). Im hier austitrierten Spektrum ist das Signal nicht mehr zu sehen, da es im Laufe der Titration dem wachsenden Signal bei 8,8 ppm weicht.

Der Austausch des zum Cys48 topologisch äquivalenten C-terminalen Rest Ser146 durch die Mutanten S146C und S146A hat ebenso großen Einfluss auf die ¹⁹F NMR Spektren. Das Signal bei 8,8 ppm, welches im Wildtyp-Spektrum und in allen C48 Mutanten Spektren vorhanden ist, ist im Fall von der S146C-Mutante verschoben oder aber auch nicht mehr vorhanden, bei der S146A-Mutante ist es ein scharfes und sehr intensives Signal. Beiden Mutanten S146C und S146A ist im austitrierten Spektrum gemeinsam, dass jeweils zwei ungefähr gleich intensive Signale bei einer Verschiebung von 15,7 ppm und 10,5 ppm für S146C, sowie 10,2 ppm für S146A vorhanden sind. Für die Ser146-Mutanten gilt ebenfalls, dass sich der Einfluss der Mutation auf das gesamte Spektrum bemerkbar macht. Andererseits ist durch die

Mutation an Position S146 eine deutliche Vereinfachung des Aufspaltungsmusters der Signale im Vergleich zu den Cys48-Mutanten und Wildtyp zu erkennen. Dies steht auch im Einklang mit den kinetischen Daten, die für diese Mutanten einen Hill-Koeffizienten um $n=1$ zeigen, was einem Michaelis-Menten-Modell entspricht und der positive kooperative Effekt entfällt.

Die Signale bei der Verschiebung von 15,7 ppm in den Spektren der Mutanten S146C und S146A entsprechen dem Doppelsignal im Wildtyp Spektrum bei 16,0 bzw. 15,7 ppm. In den Spektren der Cys48-Mutanten konnte da ja eine deutliche Variation der chemischen Verschiebungen beobachtet werden. Die Verschiebung bleibt in den Spektren der Ser146-Mutanten verglichen mit dem Wildtyp für dieses Signal unverändert.

Aufgrund der Mutationen im N-terminalen und C-terminalen Bereich der RS können Schlussfolgerungen in Bezug auf die Zuordnung der Signale zu den entsprechenden Domänen gezogen werden.

Das Signal im Wildtyp Spektrum bei 16,0 bzw. 15,7 ppm ist demnach der N-terminalen Bindungsstelle zuzuordnen, da die Ser146-Mutanten in diesem Bereich kaum Veränderung zeigten. Während das Signal bei 8,8 ppm bei den Cys48-Mutanten völlig invariant ist, kann dieser Verschiebungsbereich, der in den Ser146-Mutanten variiert als C-terminale Bindungsstelle zugeordnet werden.

Die unterschiedlichen chemischen Umgebungen zeigen wie sehr dynamisch verschieden die Proteine während der Beladung mit Liganden beeinflusst werden.

3.1.7.3 ^{19}F NMR Experiment mit Wildtyp und verschiedener Mutanten der Riboflavinsynthese aus *S. pombe* mit 6, 7-Bis(trifluoromethyl)-8-ribityllumazinhydrat (Epimer A)

In der folgenden Abbildung 3.13 ist das Titrationsexperiment von Wildtyp RS und den Punktmutanten aus *S. pombe* mit dem zweiten Fluorliganden 6, 7-Bis(trifluoromethyl)-8-ribityllumazinhydrat (Epimer A) dargestellt, analog zu den bislang gezeigten ^{19}F NMR Experimenten sind alle Proben in 20 mM Phosphat Puffer, 100 mM KCl und 10% D_2O bei pH 7,0. Die Signale des freien Liganden sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet.

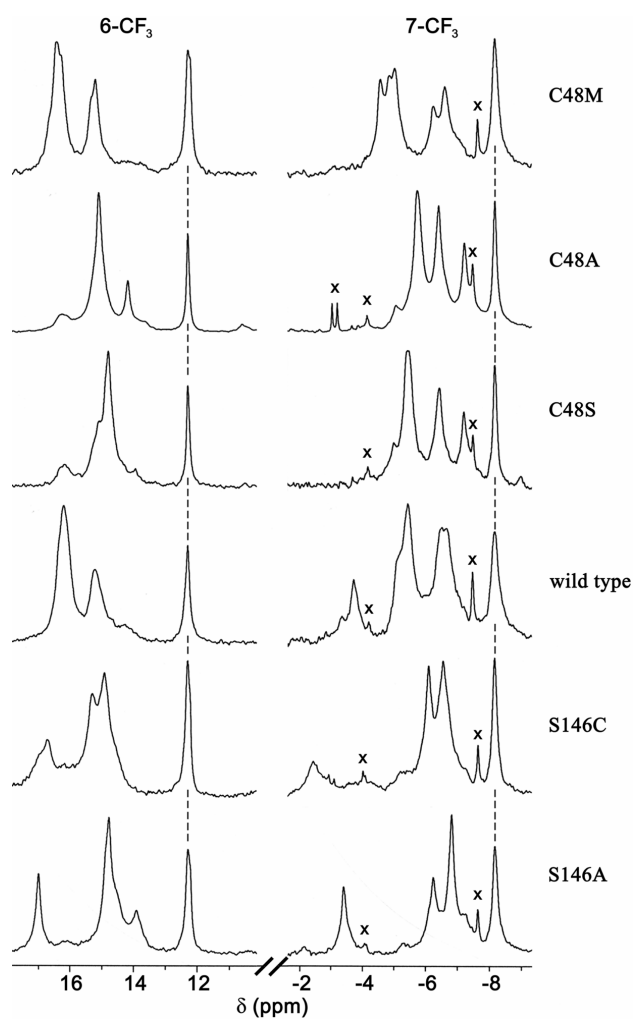


Abb. 3.13: ^{19}F NMR Spektren von 6,7-Bis(trifluormethyl)-8-ribityllumazin (Epimer A) im Komplex mit Mutanten der RS aus *S. pombe* im Vergleich mit dem Wildtyp-Spektrum. Die einzelnen Komponenten enthielten folgende Konzentrationen: C48M, 0,90 mM, 0,94 mM Epimer A; C48A, 0,57 mM, 0,33 mM Epimer A; C48S, 0,60 mM, 0,42 mM Epimer A; Wildtyp, 0,77 mM, 0,60 mM Epimer A; S146C, 0,78 mM, 0,65 mM Epimer A; S146A, 1,03 mM, 1 mM Epimer A. Die Spektren wurden mit einer Linienverbreiterung von 20 Hz transformiert.

Die in der Abbildung als erstes gezeigte Mutante C48M besitzt im Vergleich mit dem Wildtyp Spektrum für die beiden 6-CF₃ und 7-CF₃ Trifluormethylgruppen ein kaum verändertes Aufspaltungsmuster. Auffallend ist das Fehlen des verhältnismäßig kleinen Signals im Wildtyp Spektrum bei -3,6 ppm im Spektrum der C48M-Mutante. Dies haben die drei Cys48-Mutanten gemeinsam, denn auch die mit Epimer A gesättigten Mutanten C48A und C48S fehlt das entsprechende Signal. Bei -7,1 ppm ist bei den Mutanten C48A und C48S ein Signal zu beobachten, welches weder im Wildtyp Spektrum noch im C48M-Mutanten Spektrum zu finden ist.

Unbedeutende Verschiebungen und Intensitätsunterschiede gibt es in den Signalen im Bereich der 6-CF₃-Gruppe zwischen Wildtyp und der C48M-Mutante, im Gegensatz dazu zeigen die Mutanten-Spektren von C48A und C48S in diesem Bereich auffallend deutliche Veränderungen.

Das im Wildtyp Spektrum dominierende Signal bei 16,2 ppm ist in den beiden Mutanten-Spektren nur noch rudimentär im Rauschen des Spektrums erkennbar. Die C48S-Mutante hat dafür ein sehr intensives Signal bei 14,8 ppm mit einer Schulter bei 15,1 ppm, möglicherweise sind die beiden Signale, die im Wildtyp Spektrum separiert sind, zu einem Signal zusammengefallen und Hochfeld verschoben sind.

Im Mutanten Spektrum von C48A ist ein sehr intensiver Peak bei einer Verschiebung von 15,1 ppm zu erkennen, separiert von dem etwas kleineren Peak, der sich bei 14,14 ppm befindet, so dass diese beiden Signale durch die Mutation jeweils um ca. 1 ppm nach verglichen mit dem Wildtyp-Spektrum Hochfeld verschoben.

Im Bereich der 7-CF₃-Gruppe zeigen die beiden Hauptsignale, die im Wildtyp-Spektrum eine chemische Verschiebung von -5,3 und -6,4 ppm haben, kaum bzw. nur unbedeutende Verschiebungsänderungen (C48S -5,4 ppm und -6,4 ppm, C48A -5,7 und -6,4 ppm). Das Aufspaltungsmuster der Signale für die gebundenen 7-CF₃ Gruppe ist bei den Mutanten C48S und C48A vergleichbar.

Die Signale der C48M-Mutante zeigen in ihren chemischen Verschiebungen zum Wildtyp nur unbedeutende Unterschiede von höchstens 0,5 ppm, wobei die Form der Signale verändert ist, sie sind sehr breit und liegen teilweise aufgespaltet vor. Das eine Signal bei ca.-5 ppm ist deutlich zu drei Signalen aufgespaltet. Auch unter

dem Signal bei ca. -6,4 ppm verstecken sich drei Bindungsstellen. Eine Zuordnung zu N- bzw. C-terminaler Domäne ist nicht möglich.

Das S146A-Mutanten Spektrum zeigt im Bereich der 6-CF₃-Gruppe zwei unterschiedlich intensive Signale bei chemischen Verschiebungen von 17,0 ppm und 14,8 ppm, die deutlich schärfer als die Signale im Wildtyp Spektrum sind. Das sehr scharfe Signal bei 17,0 ppm ist um 4,8 ppm verglichen mit dem Signal der freien 6-CF₃-Gruppe Tieffeld verschoben.

Die Signale der 7-CF₃-Gruppe, die den Mutanten entsprechen, sind scharf und in der Intensität ähnlich bei -3,5 ppm, das ebenfalls um 4,8 ppm verglichen mit dem Signal der freien 7-CF₃-Gruppe Tieffeld verschoben wurde. Diese S146A-Mutation zeigt sowohl Einfluss auf die 6-CF₃ Gruppe als auch auf die 7-CF₃ Gruppe, die zu dieser relativ starken Tieffeldverschiebung der Signale führt.

Das S146C-Mutantenspektrum enthält sowohl im Verschiebungsbereich der 6-CF₃-Gruppe als auch der 7-CF₃-Gruppe jeweils ein zu einem Doppelsignal aufgespaltes Hauptsignal bei chemischen Verschiebungen von 15,2 und 14,9 ppm sowie -6,1 und -6,6 ppm von ungefähr gleicher Intensität. Die Signale entsprechen zwei Bindungsstellen mit sich nur wenig voneinander unterscheidenden chemischen Umgebungen, die zwar zur Aufspaltung der Signale aber nicht zur vollständigen Separierung der Signale führt. Die chemische Verschiebung dieses Doppelsignals entspricht ungefähr der Verschiebung des Signals bei 15,2 ppm bzw. -6,4 ppm im Wildtyp Spektrum. Die an das Protein gebundene 6-CF₃-Gruppe wird noch durch zwei weniger intensive Signale bei 16,7 sowie 16,2 ppm repräsentiert.

Ebenfalls führen die Ser146-Mutanten Spektren mit Epimer A in Bezug auf die Hauptsignale wie auch schon bei den Oxo-Experimenten gezeigt werden konnte.

Beim Vergleich aller Protein Spektren im Komplex mit Epimer A fällt auf, dass das Signal bei -3,6 ppm im Wildtyp Spektrum auf alle Fälle einer N-terminalen Bindungsstelle zugeordnet werden muß, da es bei allen Cys48-Mutanten verschoben oder unter einem anderen Signal verschwunden ist. Bei den Ser146-Mutanten ist das sehr scharfe Signal nur wenig verschoben (S146A) und das sehr breite Signal etwas stärker für beide Trifluormethylgruppen im Spektrum verschoben. Die anderen

Signale sind nicht so leicht einer Domäne zuzuordnen, da meist mehrere Signale übereinander liegen.

3.2 Untersuchung zur Riboflavinsynthese aus *M. jannaschii*

M. jannaschii gehört zum Zweig der Archaea, die erst 1977 entdeckt wurden (Bult *et al.* 1996). Archaea sind sehr kleine Organismen ($< 1\mu\text{m}$) von vielfältiger Gestalt. *M. jannaschii* besitzt eine runde Form (coccus). J.A. Leigh isolierte *M. jannaschii* aus einer Bodenprobe von der Meeresbodenoberfläche einer White-Smoker-Quelle in einer Tiefe von 2600 m im Ostpazifik. Das Genom ist 1,66 Mb groß. Der Großteil der Gene für die Energieproduktion, Zellteilung und Metabolismus zeigen Ähnlichkeiten zu solchen, die in Prokaryonten gefunden wurden. Dagegen sind die meisten Gene, welche in Transkription, Translation und Replikation involviert sind, ähnlicher zu denen, die in Eukaryonten gefunden wurden, gültig ist dieser Vergleich für *M. jannaschii* (Bult *et al.* 1996) als ersten Vertreter der Archaea, der komplett sequenziert wurde.

3.2.1 Klonierung

Die Expressionsplasmide pNCO113-MJ-RibC-WT und pNCO113-MJ-RibC-P46S entstanden in enger Kooperation mit Dr. Markus Fischer (TU München). Die Mutation P46S erfolgte aus der Klonierung der Wildtyp *M. jannaschii* RS.

Das Konstrukt MJ-RibC-WT ist 517 bp lang. Die aus 156 Aminosäuren bestehende Sequenz ergibt ein errechnetes Molekulargewicht von 17,494 kDa.

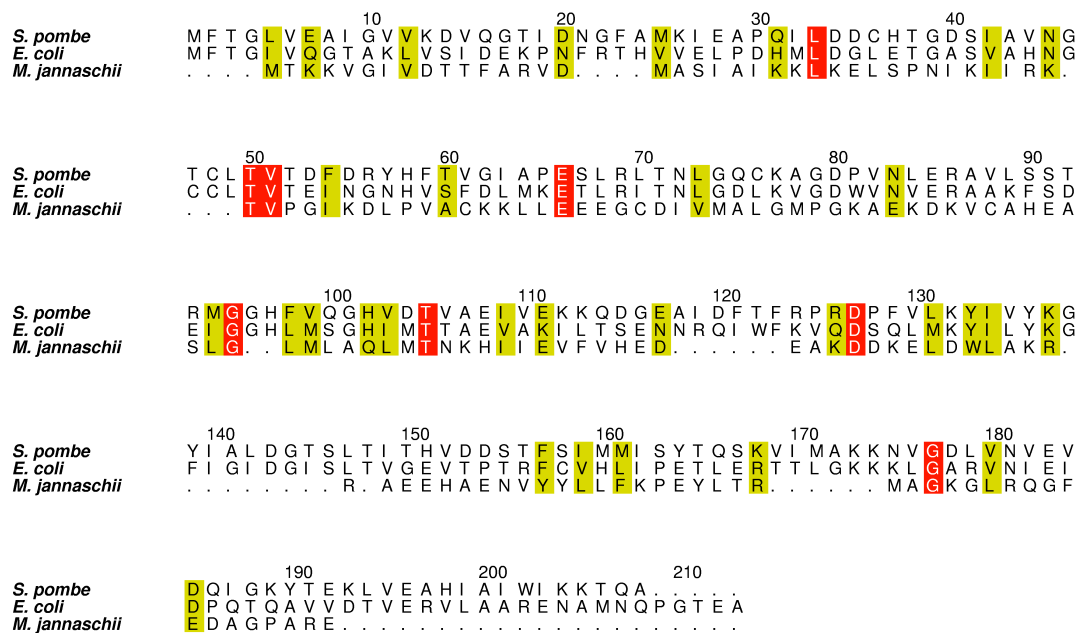


Abb. 3.14: Sequenzvergleich der Riboflavinsynthasen aus *S. pombe*, *E. coli* und *M. jannaschii*, ähnliche Reste sind gelb und identische Reste rot unterlegt. Die Nummerierung ist bezogen auf die RS aus *S. pombe*

Aus dem Aminosäuresequenzvergleich ist deutlich zu erkennen, dass die RS aus *M. jannaschii* nur eine sehr geringe Ähnlichkeit mit den anderen beiden RSen hat. Zwischen der RS aus *S. pombe* und der RS aus *E. coli* besteht eine Identität von 36%. Auch die charakteristische interne Sequenzhomologie ist bei der RS aus *M. jannaschii* nicht vorhanden. Auffällig ist auch die fehlende C-terminale Trimerisierungshelix bei der nur aus 156 Aminosäuren bestehenden RS aus *M. jannaschii*. Durch die Erkenntnisse aus der dreidimensionalen Röntgenstruktur der RS aus *S. pombe* in Bezug auf die bei der CEOL-Bindung beteiligten Aminosäuren ist zu bemerken, dass einige dieser wichtigen Aminosäuren bei der RS aus *M. jannaschii* nicht vorhanden oder durch nichthomologe Aminosäuren ausgetauscht sind. So z.B. die im N-terminalen $\hat{\alpha}$ -barrel vorhandenen Reste Ser41 und Cys48, und das im C-terminalen $\hat{\alpha}$ -barrel vorhandene Ser146. Diese neueren, unerwarteten Erkenntnisse waren Anlass für eine folgende biochemische und strukturelle Charakterisierung der RS aus *M. jannaschii*.

3.2.2 Expression und Reinigung der Wildtyp Riboflavinsynthase aus *M. jannaschii*

Eine optimierte Expression der RS aus *M. jannaschii* erfolgte im rekombinanten *E. coli* M15(pREP4) Stamm mit einer Induktionszeit von vier Stunden (wie in 2.8.2 beschrieben). In Vorversuchen wurde die Hitzestabilität der WT-RS aus *M. jannaschii* getestet. Dazu wurde die Enzymaktivität in einer Temperaturreihe von RT bis 90°C in 10°C-Schritten verfolgt. Dabei ergab sich, dass bei 80°C noch 88% der Aktivität vorhanden war, bei 90°C allerdings der Großteil des Proteins denaturierte. Dies ist in Abbildung 3.15 zu sehen. Es ist jeweils der Überstand der entsprechenden Temperaturbehandlungen aufgetragen.

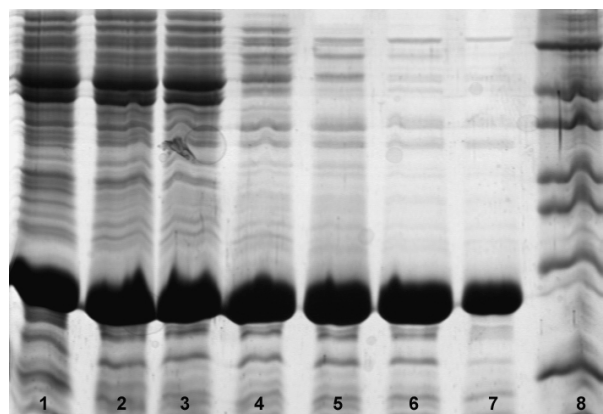


Abb. 3.15: SDS-PAGE-Analyse der Hitzefällung mit 200 µl Rohextrakt bei verschiedenen Temperaturen für jeweils 10 min in 100 mM K-P-Puffer, pH 7,2; Spur 1, Rohextrakt unbehandelt; Spur 2, Überstand von RE bei 40°C; Spur 3, Überstand von RE bei 50°C; Spur 4, Überstand von RE bei 60°C; Spur 5, Überstand von RE bei 70°C; Spur 6, Überstand von RE bei 80°C; Spur 7, Überstand von RE bei 90°C und Spur 8, Markerproteine mit den Molekulargewichtsstandards (von oben nach unten) 66, 45, 36, 29, 24, 20 und 14 kDa.

Für die Reinigung wurde die Proteinlösung auf 80°C erhitzt und die Temperatur für 5 min gehalten. Die weitere Reinigung der RS und gleichzeitige Abschätzung des nativen Molekulargewichtes erfolgte mittels einer kalibrierten Gelfiltrationssäule. Die gereinigte RS aus *M. jannaschii* war farblos im Gegensatz zur RS aus *S. pombe*.

Im Falle einer weiteren Verwendung in Kristallisationsansätzen erfolgte die Gelfiltrationschromatographie mit einem Puffer aus 50 mM Tris/HCl (pH 7,0), 100 mM KCl und 2 mM DTT.

Zur Veranschaulichung ist das Elutionsprofil des Gelfiltrationslaufes in der Abbildung 3.16 dargestellt.

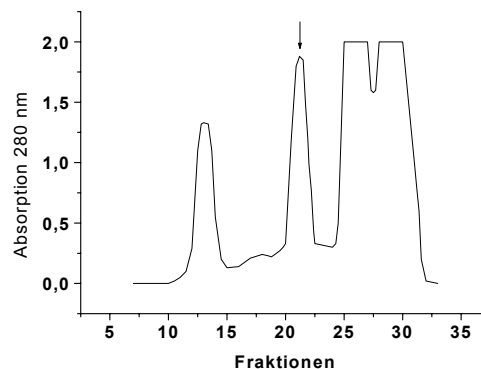


Abb. 3.16: Chromatographie der RS aus *M. jannaschii* an S200. Der Pfeil markiert denjenigen Peak, der die gereinigte RS aus *M. jannaschii* enthält.

Das reproduzierbare Retentionsvolumen von 205 ml, welches aus der Kalibriergeraden der verwendeten Gelfiltrationssäule einem Molekulargewicht von 70 kDa entspricht, war abweichend von der zu erwartenden Größe von 52 kDa, was einem Trimer entsprochen hätte, das sich aus dem berechneten monomeren Molekulargewicht von 17,5 kDa ergab. Bei bislang allen charakterisierten RS aus Hefen und Eubakterien wurde ein trimeres natives Molekulargewicht gefunden. Das Molekulargewicht von 70 kDa weist daher eindeutig auf eine höhere Oligomerisierung hin, die in diesem Fall genau der tetrameren Form (theoretisch berechnete Masse: 69,98 kDa) entsprechen würde. Allerdings ist dies nur ein Hinweis auf die mögliche native Masse, zur weiteren Charakterisierung wurden Sedimentationsgleichgewichtsläufe durchgeführt (siehe 3.2.3).

Die folgende Abbildung 3.17 zeigt mittels SDS-PAGE-Analyse den Reinigungseffekt durch die Hitzefällung und der anschließenden Gelfiltration.

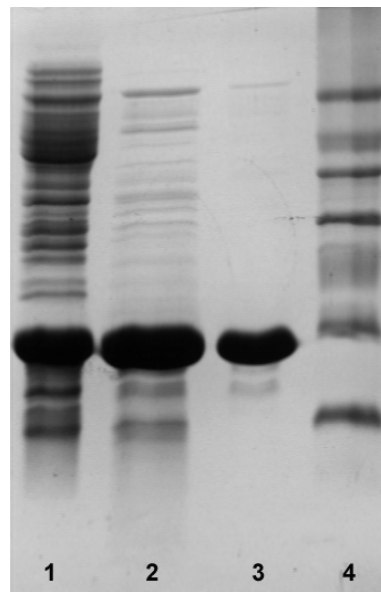


Abb. 3.17: SDS-PAGE-Analyse vom Reinigungsverlauf der WT-RS aus *M. jannaschii*. Spur 1, Rohextrakt M15 pRep4-MJ-RS-WT; Spur 2, WT-RS nach Hitzefällung; Spur 3, WT-RS nach Gelfiltrationssäule, Spur 4, Markerproteine mit den Molekulargewichtsstandards (von oben nach unten) 66, 45, 36, 29, 24, 20 und 14 kDa.

Zur weiteren Charakterisierung wurde die gereinigte WT-RS aus *M. jannaschii* auf einer PVDF-Membran immobilisiert und einer N-terminalen Sequenzanalyse unterzogen.

Die ersten 15 Aminosäuren (MTKKVGIVDTTFARV) der N-terminalen Sequenzanalyse identifizierten das gereinigte Protein zu 100% als WT-RS aus *M. jannaschii*. Die Analyse wurde freundlicherweise von PD Dr. Peter Köhler am Institut für Lebensmittelchemie durchgeführt.

3.2.2.1 Selenomethionin-Markierung der Wildtyp Riboflavinsynthase aus *M. jannaschii*

Das isolierte Plasmid pNCO113-MJ-RibC-WT wurde in *E. coli* B834 (DE3) Zellen transformiert.

Die WT-RS aus *M. jannaschii* wurde in einer 4 l *E. coli* Kultur mit einer Induktionszeit von fünf Stunden exprimiert. Die Ausbeute an SeMet-MJ-RS betrug etwa ein zehntel zur nativen Reinigung. Zusätzlich konnte eine Aggregation beobachtet werden, die trotz Zugabe von 5 mM DTT, 5% Glycerin und einer Salzkonzentration von 200 mM KCl nicht verhindert werden konnte. Auf der Gelfiltration konnten Aggregate im Bereich von 600-70 kDa gefunden werden. Die 70 kDa-Fraktion war als einzige enzymatisch aktiv und wurde auf 4 mg/ml aufkonzentriert.

3.2.3 Analytische Ultrazentrifugation

3.2.3.1 Sedimentationsgleichgewichtsanalyse

Zur Bestimmung des nativen Molekulargewichtes der RS aus *M. jannaschii* wurde eine Sedimentationsgleichgewichtsanalyse durchgeführt.

Die Auswertung erfolgte mit der Software XLA-Data-Analysis (siehe unter 2.8.6 in Material und Methoden) Eine Sedimentationsgleichgewichtsanalyse wurde mit Wildtyp und der Punktmutante P46S aus *M. jannaschii* durchgeführt.

Wie unter 2.8.6 beschrieben, wurde das partielle, spezifische Volumen der Wildtyp RS und der P46S-Punktmutante aus *M. jannaschii* nach Gleichung 3 und 4 bei 10°C berechnet. Dabei ergab sich ein Wert von 0,745 ml/g für die WT-RS und 0,744 ml/g für die P46S-Punktmutante.

Für den verwendeten 50 mM Tris/HCl-Puffer, 100 mM KCl, pH 7,0 ergab sich näherungsweise nach den Gleichungen 5-7 (siehe 2.8.6) eine Dichte bei 10°C von 1,0058 g/ml.

Tabelle 3.5 zeigt die Bedingungen und das Ergebnis der beiden Sedimentationsläufe.

Tabelle 3.5 Bedingungen des Sedimentations-Gleichgewichtslaufes

Parameter	WT	P46S
Temperatur [°C]	10	10
Zentrifugationsgeschwindigkeit [U/min]	11000	11000
Anfangsabsorption [280 nm]	0,33	0,34
Partielles spezifisches Volumen [ml/g]	0,745	0,744
Pufferdichte [g/ml]	1,0058	1,0058
Proteinkonzentration [mg/ml]	0,58	0,60
errechnete Masse [Da]	88252	86169

In Abbildung 3.18 sind die radiusabhängige Absorption der Enzymlösung und die Abweichung der Messpunkte von der approximierten Exponentialfunktion dargestellt.

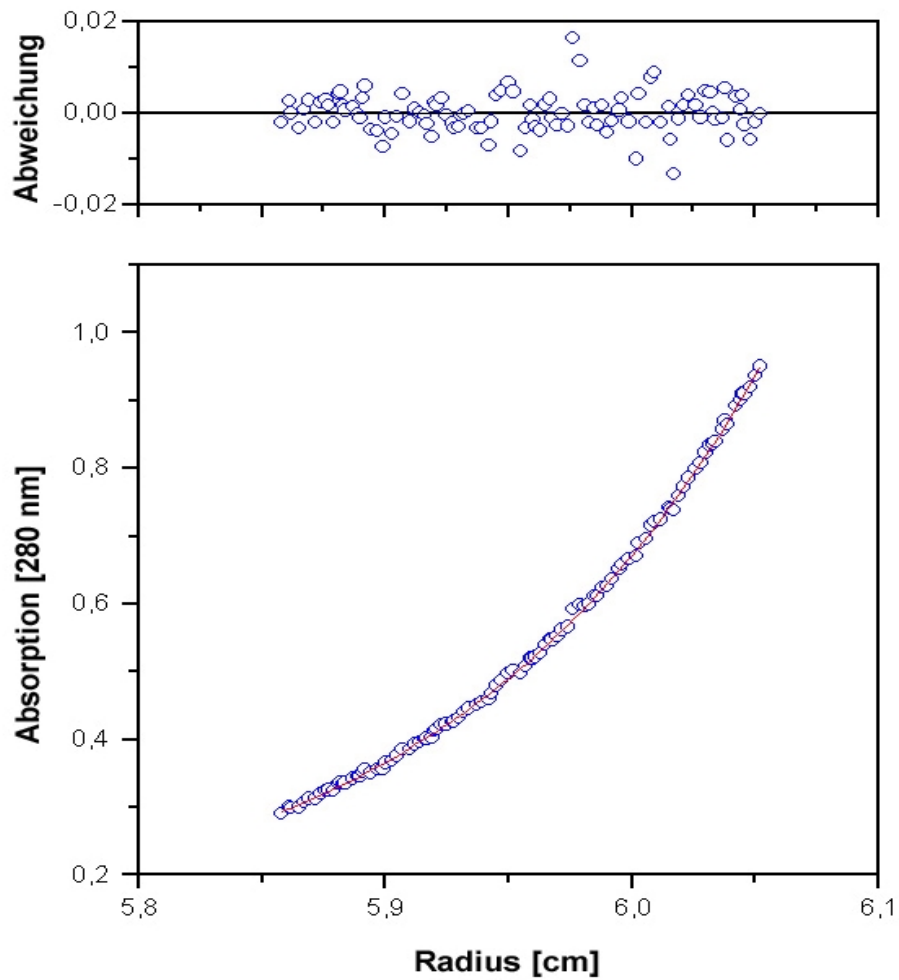


Abb. 3.18: Sedimentationsgleichgewichtsexperiment mit der Wildtyp Riboflavinsynthase aus *M. jannaschii*. Angegeben ist die Absorption der Lösung in Abhängigkeit vom Radius der Messzelle (unten) und die Abweichung der Messwerte von der approximierten Exponentialfunktion (oben).

Die Ergebnisse von 88,25 kDa für die Wildtyp RS aus *M. jannaschii* und 86,17 kDa für die Punktmutante P46S legen nahe, dass das Protein nativ als Pentamer vorliegt. Das theoretische Molekulargewicht für ein Pentamer liegt bei 87,47 kDa für die Wildtyp RS und 87,42 kDa für die Punktmutante. Damit liegen die experimentellen Ergebnisse sehr gut im Einklang mit den theoretisch berechneten.

Durch die Gelfiltration wurde zuvor ein tetrameres Molekulargewicht abgeschätzt. Aufgrund von verschiedenen Faktoren wie z.B. Salzeffekte, strukturellen Eigenschaften wie der Form können Laufanomalien auftauchen.

Des Weiteren ist auch zu erkennen, dass die Punktmutation keinen Einfluss auf die quartäre Struktur der RS aus *M. jannaschii* hat.

3.2.4 Kristallisation der Riboflavinsynthase aus *M. jannaschii*

3.2.4.1 Kristallisation der Punktmutante P46S aus *M. jannaschii*

Die gereinigte Punktmutante P46S der RS aus *M. jannaschii* wurde mit einer anfänglichen Konzentration von 9 mg/ml in 20 mM Tris/HCl pH 7.0, 100 mM KCl und 2 mM DTT in „Screening“-Experimenten unter Verwendung der „sitting drop“-Methode (siehe 2.9.1) eingesetzt. Die Cryschem-Platten wurden bei RT aufbewahrt. Nach vier Tagen konnten unter Bedingung 35 des Crystal Screen 2 von Hampton Research (0,1 M HEPES pH 7.5 und 70% (v/v) MPD) kleine Kristalle in Stäbchenform beobachtet werden. Die Optimierung der Parameter führte schließlich zu einer reproduzierbaren Kristallisationsbedingung: 2 µl RS (9 mg/ml) mit 2 µl Reservoirlösung (45 % (v/v) MPD, 0,1 M HEPES pH 7.5, 5 mM MgCl₂).

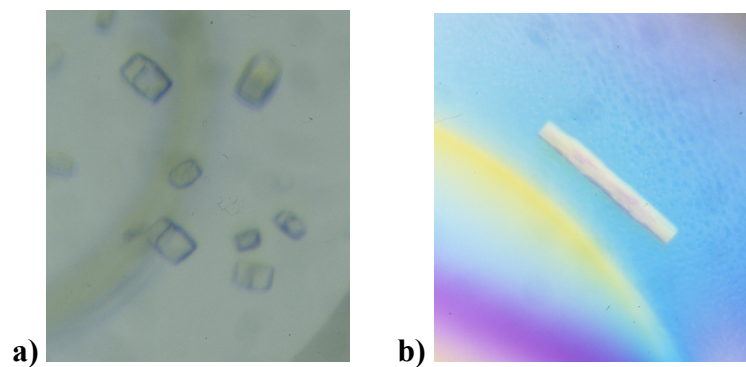


Abb. 3.19: Kristalle der Punktmutante P46S aus *M. jannaschii* in **a)** 45 % (v/v) MPD, 0,1 M HEPES pH 7.5 und 5 mM MgCl₂ **b)** 45 % (v/v) MPD, 0,1 M HEPES pH 7.5, 5 mM MgCl₂ und 0,1 M Na₂ATP

Diese initialen Kristalle wiesen allerdings in Diffraktionsexperimenten einen hohen Verzwilligungsgrad auf.

Weitere Versuche ergaben verbesserte Kristalle aus AdditivScreen 2 Bedingung A 5 (0,1 M Na₂ATP) (Abbildung 3.19 b). In Röntgenbeugungsexperimenten zeigte sich eine Streuleistung dieser Kristalle von bis zu 2,2 Å am Plattenrand und ergab eine Zuordnung der Raumgruppe P1.

Die Aufnahme der Datensätze wurde in enger Kooperation freundlicherweise von Dr. Stefan Gerhardt am MPI für Biochemie übernommen.

3.2.4.2 Kristallisation der Wildtyp Riboflavinsynthase aus *M. jannaschii*

Mit der gereinigten WT-RS aus *M. jannaschii* wurde mit einer anfänglichen Konzentration von 6 mg/ml in 20 mM Tris/HCl pH 7.0, 100 mM KCl und 2 mM DTT unter der Kristallisationsbedingung der Punktmutante P46S (45 % (v/v) MPD, 0,1 M HEPES pH 7.5, 5 mM MgCl₂) Kristallisationsansätze mit variierenden Tropfenverhältnissen pipettiert. Die Cryschem-Platten wurden ebenfalls bei RT aufbewahrt und nach 1-2 Tagen konnte eine Kristallisation beobachtet werden. Die Optimierung der Parameter führte schließlich zu folgender Kristallisationsbedingung: 4 µl WT-RS (6 mg/ml) mit 2 µl Reservoirlösung (40 % (v/v) MPD, 0,1 M HEPES pH 7.0). Einzelne Kristalle wuchsen innerhalb von zwei Tagen zu einer ausreichenden Größe (siehe Abbildung 3.20).

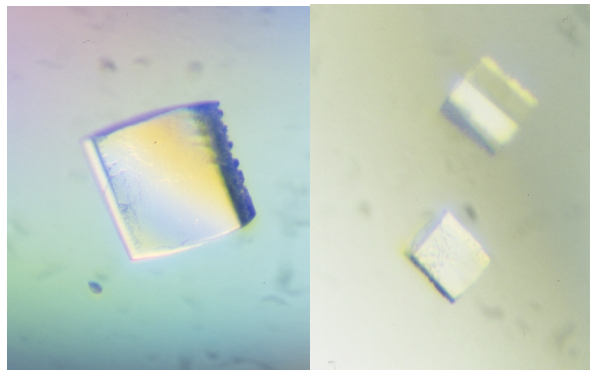


Abb. 3.20: Kristalle der WT-RS aus *M. jannaschii* in 40 % (v/v) MPD, 0,1 M HEPES pH 7.0.

In Röntgenbeugungsexperimenten, die freundlicherweise von Dr. Stefan Gerhardt am MPI für Biochemie durchgeführt wurden, zeigte sich eine Streuleistung der Kristalle von bis zu 2,3 Å am Plattenrand und ergab eine Zuordnung der Raumgruppe P1.

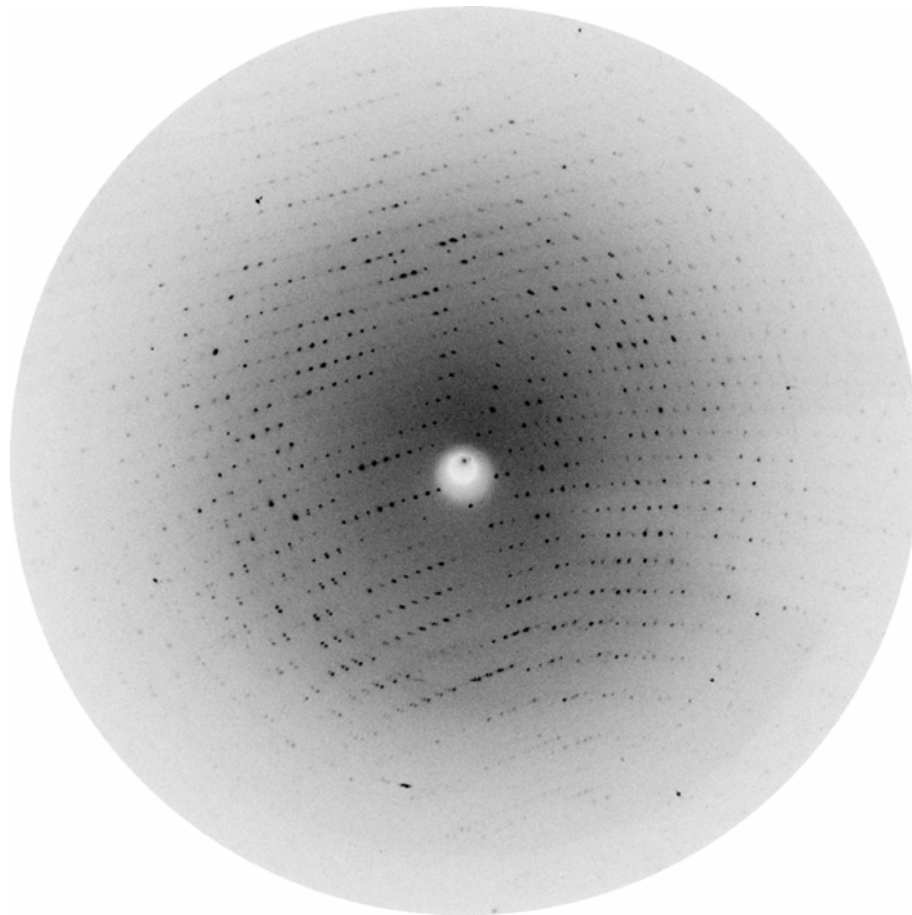


Abb. 3.21: Diffraktionsbild der Wildtyp Riboflavinsynthase aus *M. jannaschii*. Die maximale Auflösung am Plattenrand beträgt 2,3 Å

Die RS aus *M. jannaschii* zeigt nur eine geringe Homologie zu den anderen RS aus Hefen und Eubakterien, so dass eine Strukturlösung mit molekularem Ersatz nicht möglich war. Die Einheitszelle des nativen Datensatzes besitzt die Zellkonstanten $a = 41,9 \text{ \AA}$, $b = 72,9 \text{ \AA}$, $c = 72,90 \text{ \AA}$ und $\alpha = 68,9^\circ$, $\beta = 74,93^\circ$, $\gamma = 75,1^\circ$.

Daraus ergibt sich für die Annahme auf das Vorhandensein von fünf Molekülen (Pentamer) in der asymmetrischen Einheit einen Matthews Koeffizienten von 2,23 Å³/Da mit einem Solvensgehalt von ungefähr 45%.

Aus dem nativen Datensatz ohne Phaseninformation wurde nach vorhandener kristallographischer und nicht-kristallographischer Symmetrie gesucht. Es konnten fünf Monomere in der asymmetrischen Einheit gefunden werden, die annähernd oder sogar fast perfekt regelmäßig angeordnet sind, so dass die RS aus *M. jannaschii* im Kristall als Pentamer vorliegt. Diese Erkenntnisse aus den Selbstrotationsfunktionen stehen im Einklang mit den Ergebnissen der Sedimentationsgleichgewichtsanalyse.

Es wurden verschiedene Schwermetall-„Soaks“ getestet und gemessen (wurde freundlicherweise von Arne Ramsperger übernommen). Alle Metall-„Soaks“ mit Ausnahme von Gold („Soaking“-Zeit von einer Woche) waren sehr gut isomorph. Mit der Selenomethionin-markierten RS aus Wildtyp konnten Kristalle beobachtet werden, welche bislang noch nicht die ausreichende Größe zur Strukturanalyse durch Röntgenbeugung besitzen.

3.2.5 Metallabhängigkeit der Riboflavinsynthese aus *M. jannaschii*

Die Riboflavinsynthese aus *M. jannaschii* ist mit der aus *M. thermoautotrophicum* zu 66 % identisch. Untersuchungen zur letztgenannten Riboflavinsynthese wurde von Eberhardt *et al* 1997 durchgeführt. Im Gegensatz zu den bislang bekannten Riboflavinsynthasen aus Hefen und Eubakterien sind Mg-Ionen für die Riboflavinbildung aus 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin (Eberhardt *et al*, 1997) erforderlich.

3.2.5.1 Versuche zur Aktivierung der Riboflavinsynthese aus *M. jannaschii* durch Zugabe divalenter Kationen

Zur Aktivierung der RS aus *M. jannaschii* wurden verschiedene zweiwertige Metallionen getestet und wie unter 2.8.4.3 beschrieben, eingesetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Enzymlösung gestartet. Die Riboflavinbildung wurde bei 470 nm über 5 min gemessen und im Anschluss durch die Steigung die Anfangsgeschwindigkeit ermittelt, wobei die spezifische Aktivität der Messung von WT-RS mit 5 mM MgCl_2 als Standard auf 100% gesetzt wurde. Die Bildung von Riboflavin durch mögliche Spontanreaktion konnte durch die Messung eines Reaktionsansatzes ohne Enzym unter diesen Reaktionsbedingungen ausgeschlossen werden. Die Metallkonzentration von 5 mM wurde deshalb gewählt, weil sich für Mg^{2+} diese Konzentration als optimal erwies.

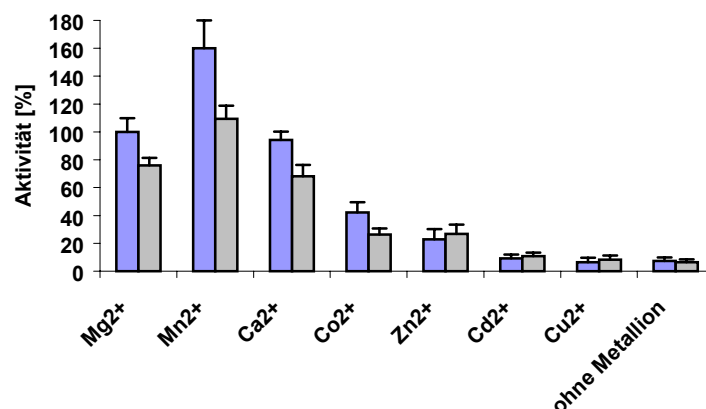


Abb. 3.22: Riboflavinbildung durch WT (blau) und P46S-Riboflavinsynthase (grau) aus *M. jannaschii* in Abhängigkeit von der Metallionenkonzentration

Wie deutlich zu erkennen ist, ist die Anwesenheit eines zweiwertigen Kations für die Aktivität der RS aus *M. jannaschii* erforderlich, wobei in absteigender Reihenfolge Mn^{2+} , Mg^{2+} und Ca^{2+} besonders gut geeignet sind. Durch Zugabe von Metallchelatoren wie z. B. EDTA zum Testansatz ohne Metallion konnte die Aktivität der RS aus *M. jannaschii* nicht weiter gesenkt werden.

3.2.5.2 Versuche zur temperaturabhängigen Aktivierung der Riboflavinsynthase aus *M. jannaschii*

Da es sich bei *M. jannaschii* um einen thermophilen Organismus handelt, wurde das Temperaturoptimum ermittelt. Die Wachstumsbedingungen liegen in einem Temperaturbereich von 48-95°C, das Temperaturoptimum befindet sich bei 85°C und einem Druck größer 200 atm (Bult *et al.* 1996). Diese Angaben sind gültig für den Organismus in seiner natürlichen Umgebung. Im Falle der RS aus *M. jannaschii* ist aber nur das isolierte Protein vorhanden, so dass das Temperaturoptimum in vitro unter Umständen bei tieferen Temperaturen ist. Es wurde eine Temperaturreihe von 10°C-90°C durchgeführt. Nachdem das Wasserbad die gewünschte Temperatur erreicht hatte, wurde fünf min gewartet und dann den Reaktionsansatz für fünf weitere Minuten ins temperierte Photometer gestellt, bevor die Enzymlösung (24µg/ml) zu gegeben wurde. Über die Steigung wurden die Anfangsgeschwindigkeiten berechnet (siehe in 2.8.4.3). In Abbildung 3.23 sind die Anfangsgeschwindigkeiten in Abhängigkeit von der Temperatur aufgetragen.

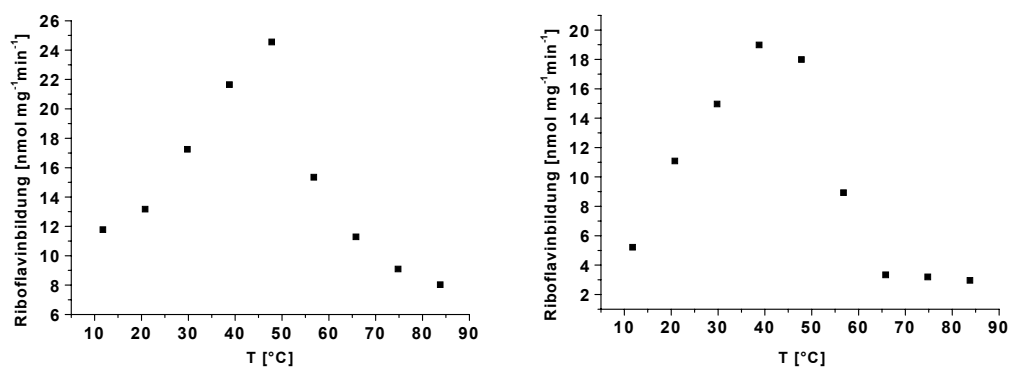


Abb. 3.23: Temperaturabhängigkeit der Riboflavinbildung von der WT-RS aus *M. jannaschii* (links) und der Punktmutante P46S (rechts).

Dabei ist zu erkennen, dass die WT-RS ein Temperaturoptimum bei etwa 50°C besitzt, die Punktmutante hingegen bei etwa 40°C. Der Kurvenabfall bei der Mutante erfolgt nach dem Temperaturoptimum auch wesentlich steiler, so dass durch den Austausch von Prolin zu Serin die Hitzestabilität des Proteins verringert wurde.

In den folgenden Abbildungen sind der Eyring- und Arrhenius-Plot dargestellt, aus diesen Daten lassen sich verschiedene thermodynamische Konstanten berechnen.

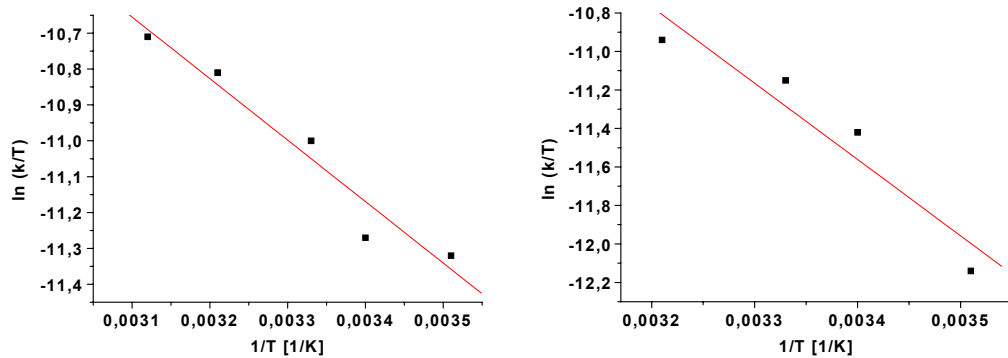


Abb 3.24: Eyring-Plot von WT-RS (links) und der Punktmutante P46S (rechts)

Zur Berechnung wurde folgende Gleichung angewendet:

$$\text{Eyring-Plot mit } \ln \frac{k}{T} = -\frac{\Delta H^*}{R} \cdot \frac{1}{T} + \frac{\Delta S^*}{R} - \ln \frac{h}{k_B}$$

Es wurden aus der Temperaturkurve nur diejenigen Werte bis zum Temperaturoptimum verwendet, 50°C bei WT-RS und 40°C bei P46S.

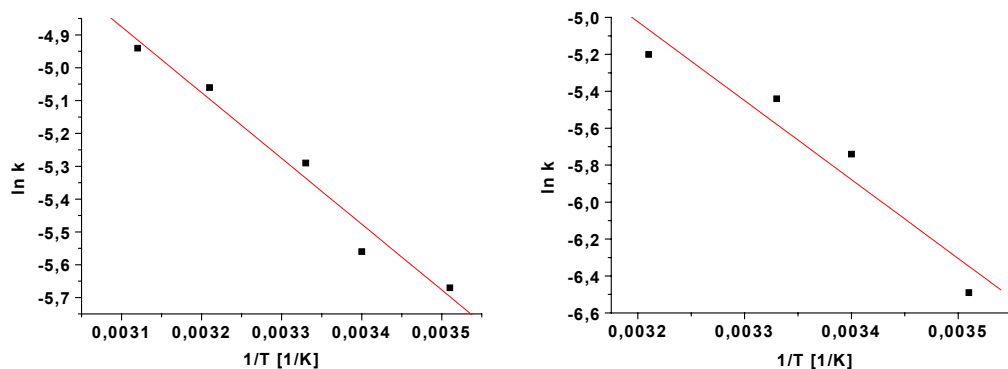


Abb. 3.25: Arrhenius-Plot von WT-RS (links) und der Punktmutante P46S (rechts)

Zur Berechnung wurde folgende Gleichung angewendet:

$$\text{Arrhenius-Plot mit } \ln k = -\frac{E_a}{R} \cdot \frac{1}{T} + \ln A$$

In der Tabelle 3.6 sind die thermodynamischen Parameter aus dem Arrhenius- und Eyring-Plot für Wildtyp und die Punktmutante aufgeführt.

Tabelle 3.6: Thermodynamische Parameter aus Arrhenius-Plot und Eyring-Plot

RS aus <i>M. jannaschii</i>	E_a [kJ/mol]	ΔG [kJ/mol]	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/molK]
WT	$16,6 \pm 1,3$	86,4	$14,1 \pm 1,3$	$-242,5 \pm 4,4$
P46S	$34,5 \pm 6,4$	87,1	$32,0 \pm 6,5$	$-185,0 \pm 2,8$

Auffällig sind die negativen Werte der Entropie, das bedeutet eine Zunahme der Entropie während der Reaktion. Zwischen den beiden Proteinen ist kein gravierender Unterschied in den thermodynamischen Parametern zu beobachten, so dass das Ersetzen von Prolin durch Serin kaum einen Einfluss hat.

3.2.6 Photometrische Bestimmung des kinetischen Verhaltens der Riboflavinsynthese aus *M. jannaschii*

Nach Optimierung der Bedingungen wurde, wie in 2.8.4.3 beschrieben, verfahren. Die Messungen erfolgten bei 40°C. In der Abbildung 3.26 sind Graphen der Wildtyp und P46S-Mutante gezeigt. Wie auch bei der RS aus *S. pombe* wurden die Daten der Kurve mit Hilfe der Hill-Funktion angepasst.

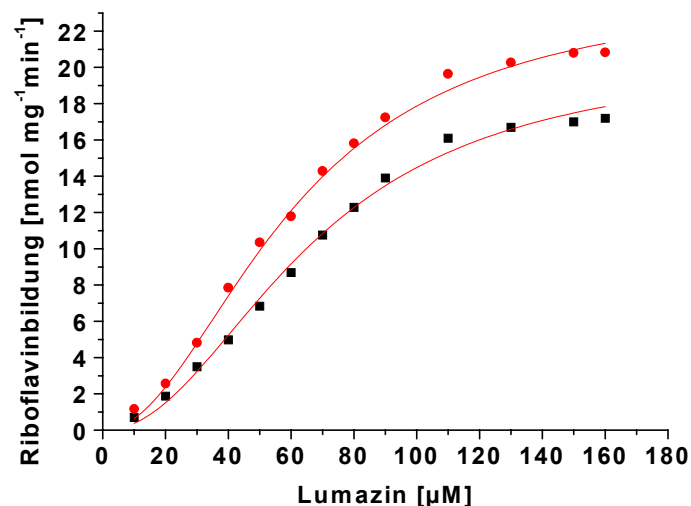


Abb. 3.26: Kinetik von den WT und P46S-Mutante der Riboflavinsynthase aus *M. jannaschii*: Bildung von Riboflavin aus 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin; ● Wildtyp; ■ P46S-Mutante

In der Tabelle 3.5 sind die kinetischen Eigenschaften der beiden RS aus *M. jannaschii* abgebildet.

Der Hill-Koeffizient ist für beide Proteine nahezu identisch, für WT-RS liegt er bei $n=2,1$, für die Punktmutante bei $n=2,3$. Die Punktmutante ist mit $19 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ nur geringfügig langsamer im Vergleich zur WT-RS mit $24 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Die Punktmutation hat somit keinen größeren Einfluss auf das kinetische Verhalten.

Tabelle 3.5: Kinetische Eigenschaften der RS aus *M. jannaschii* bei 40°C

Riboflavin Synthase aus <i>M. jannaschii</i>	V_{\max} [nmol mg ⁻¹ min ⁻¹]	K [μM]	Hill-Koeffizient n
Wildtyp	24 ± 0,8	57 ± 2,4	2,1 ± 0,1
P46S	19 ± 0,8	63 ± 2,9	2,3 ± 0,2

3.2.7 Untersuchung auf mögliche Flavokinaseaktivität

Bislang weisen keine Arbeiten an Riboflavinsynthasen darauf hin, dass weiterführend Riboflavin mit Hilfe von ATP und Mg^{2+} zu FMN umgesetzt werden kann und somit eine Flavokinaseaktivität auftritt. Ein Test auf Flavokinaseaktivität mittels HPLC mit den RSen aus *S. pombe* und *E. coli* zeigte keine Bildung von FMN. Für diese RSen gibt es allerdings in der Datenbank auch bekannte Flavokinasen. Die Struktur der monofunktionellen Flavokinase aus *S. pombe* wurde erst kürzlich in enger Zusammenarbeit mit dem MPI in Martinsried aufgeklärt (Bauer *et al.* 2003). *E. coli* besitzt ein bifunktionelles Enzym aus einer Flavokinase und FAD-Synthetase.

In der Datenbank konnte allerdings für *M. jannaschii* keine entsprechende Flavokinase gefunden werden. Ein Sequenzvergleich der RS aus *M. jannaschii* mit der Flavokinase aus *S. pombe* ergab eine Sequenzähnlichkeit von 13,41% im

Gegensatz zur RS aus *S. pombe* von nur 10,1%. Die vorhandene Metallabhängigkeit gab Anlass die RS aus *M. jannaschii* auf Kinaseaktivität zu untersuchen. Die Retentionszeiten der Referenzsubstanzen lagen für Lumazin zwischen 3-4 min, die für FMN bei 5-7 min und die für Riboflavin bei 15-20 min. Es wurden Tests mit Wildtyp RS und der Punktmutante P46S durchgeführt.

Im Rohextrakt konnte die Bildung von FMN durch die Wildtyp RS und P46S-Mutante aus *M. jannaschii* beobachtet werden, die nach den einzelnen Schritten der Reinigung stark abnahm. Nach der Hitzefällung waren nur noch etwa 50% der Aktivität im Vergleich zum Rohextrakt, nach der Gelfiltration nur etwa 10-20% vorhanden. Die Bildung von FMN konnte auf ungefähr 3 nmol/mg min quantifiziert werden. Da im Rohextrakt auch Wildtyp Flavokinase/FAD-Synthetase aus *E. coli* vorhanden ist, musste abgesichert werden, dass die gefundene Bildung von FMN auch durch die RS aus *M. jannaschii* katalysiert wird. Bei den anschließenden Versuchen wurde die gebildete Menge an FMN durch die in *E. coli* vorhandenen Wildtyp Flavokinase als Blindwert herangezogen. In Abwesenheit von Mg^{2+} , ATP und Lumazin im Testansatz waren minimale Mengen an Lumazin, FMN und Riboflavin zu detektieren, dies ist auch mit der gelblichen Farbe des Rohextraktes vereinbar. Durch Zugabe von Mg^{2+} konnte keine Veränderung des HPLC-Chromatogrammes beobachtet werden, auch nicht durch die Zugabe von ATP. Erst durch Zugabe von Lumazin konnte die Bildung von FMN um das 12fache bei der P46S-Mutante gesteigert werden. Dies konnte auch für Wildtyp gezeigt werden, allerdings etwa nur um das siebenfache. Für die Mg^{2+} -Konzentration im Bereich von 6-26 mM ergab sich für beide Proteine keinen Einfluss auf die Bildung von FMN. Auch mit Riboflavin als Substrat konnte eine vergleichbare Menge an FMN beobachtet werden. Riboflavin ist das eigentliche Substrat der Flavokinasen.

Um die gefundene Flavokinaseaktivität der RS aus *M. jannaschii* eindeutig zu verifizieren, wurde das Fusionskonstrukt pNCO113-MBP-H6-TB-MJ-*RibC*-WT konstruiert, welches zwischen dem N-terminalen Affinitätspartnern und der RS eine Thrombinschnittstelle (TB) besitzt. Der Vektor wurde von Dr. Markus Fischer (TU München) zur Verfügung gestellt.

Über das Maltose-Binde-Protein (MBP) und der 6x-Histidin-Region ist es möglich, das Fusionskonstrukt über zwei Affinitätschromatographien (Amylosesäule und Ni-

NTA-Säule) zu reinigen, durch die Thrombinschnittstelle kann der Fusionspartner nach erfolgreicher Reinigung abgespaltet werden und so die native RS erhalten werden. Diese zweistufige Reinigungsmethode wurde gezielt gewählt, um eine Isolierung einer Flavokinase als Verunreinigung auszuschliessen. Eine Überexpression mit dem isolierten Plasmid pNCO113-MBP-H6-TB-MJ-*RibC*-WT in X11-Blue Zellen, konnte erfolgreich in einer Übernachtskultur bei 37°C erreicht werden. Die Reinigung des Fusionskonstruktes erfolgte zuerst an einer Amylosesäule, von der das gebundene Konstrukt mit einer 10 mM Maltoselösung in einem scharfen Peak von der Säule eluiert werden konnte. Zur weiteren Reinigung wurde der gesammelte Peak auf eine zweite Affinitätssäule an der Ni-NTA aufgetragen. Die nachfolgende Elution des gewünschten Fusionskonstruktes erfolgte bei ca. 200 mM Imidazol. Der Gelfiltrationslauf diente zur Abschätzung des Molekulargewichtes. Im Rohextrakt konnte mittels HPLC Flavokinaseaktivität gefunden werden, die allerdings nach dem ersten Reinigungsschritt in der eluierten Fraktion nicht mehr vorhanden war, sondern nur noch im Durchlauf detektiert werden konnte. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die RS aus *M. jannaschii* keine Flavokinaseaktivität besitzt. Nach der Ni-NTA-Reinigung und sowie der Abspaltung der Fusionspartner mittels Thrombin (TB) konnte auch keine FMN-Bildung des gereinigten Proteins gefunden werden. So dass man zu dem Schluss kommen muss, dass bei der nativen Reinigung der RS aus *M. jannaschii* eine Flavokinase aus dem *E. coli* Wildtypzellextrakt mit gereinigt wurde.

3.2.8 ¹⁹F-NMR-Untersuchungen der Riboflavinsynthese aus *M. jannaschii* mit 6,7-Bis(trifluoromethyl)-8-ribityllumazinhydrat und 6-Trifluoromethyl-7-oxo-8-ribityllumazin

Im Gegensatz zu der RS aus *S. pombe* binden die Fluorliganden 6,7-Bis(trifluoromethyl)-8-ribityllumazinhydrat (Epimer A) und 6-Trifluoromethyl-7-oxo-8-ribityllumazin (Oxo) nicht an die WT-RS aus *M. jannaschii*. Die Experimente wurden bei verschiedenen Temperaturen (20°C und 50°C) durchgeführt, da bei Temperaturen tiefer 4°C das Protein ausfällt. Es ist in den Spektren keine Linienverbreiterung zu sehen. Die Epimer A Quartetts sind unverändert wie in

Abwesenheit von Protein. Die Ligandenkonzentration betrug 0,2 mM. Die Proteinkonzentration lag bei 19 mg/ml (1,09 mM pro Untereinheit).

3.3 Untersuchungen zu Yellow-Fluorescent-Protein aus *Vibrio fischeri*

Die Sequenzhomologie zu den RS macht die Untersuchung des Yellow-Fluorescent-Proteins (YFP) interessant, die Proteinstruktur ist bislang auch noch unbekannt. Als Liganden können sowohl Lumazin, Riboflavin wie auch FMN gebunden werden, eine katalytische Aktivität ist aber nicht vorhanden. Kristallisationsversuche des monomeren LumP aus *P. leiognathi*, welches freundlicherweise von Dr. Boris Illarionov (TU München) zur Verfügung gestellt wurde, waren bislang nicht erfolgreich. Es wurden „Screening“-Experimente mit der „sitting-drop“-Methode durchgeführt, sowohl mit dem Apoprotein als auch mit Lumazin als Liganden.

3.3.1 Klonierung

Die Expressionsplasmide pNCO113-VF-YFP, pNCO113-H6-VF-YFP und pNCO113-MBP-TB-VF-YFP wurden in enger Kooperation mit Dr. Markus Fischer (TU München) angefertigt. Das native Konstrukt VF-YFP ist 631 bp groß.

3.3.2 Expressionsversuche von Yellow-Fluorescent-Protein aus *V. fischeri*

Das Expressionsplasmid pNCO113-VF-YFP wurde in *E. coli* Xl-1 Blue-Zellen transformiert. Zur Optimierung der Expression erfolgte die Transformation in den rekombinanten *E. coli* M15(pREP4) Stamm. Trotz Veränderung der Anzuchtbedingungen der Hauptkultur im Temperaturbereich zwischen 18°C und 37°C konnte das YFP nur als Einschlusskörper exprimiert werden. Die Reinigung der Einschlusskörper (11 Anzucht bei 37°C) erfolgte in 100 mM Tris/HCl-Puffer und 10 mM Na₂SO₃, pH 8,0. Der Zellaufschluß mittels Ultraschall wurde zweimal wiederholt, wobei jeweils der Überstand verworfen wurde. Das Zellpellet war anschließend nahezu weiß und wurde mit einer 8 M Harnstoff-Lösung (ca 40 ml) resuspendiert und über Nacht bei RT in einem 50 ml Plastikröhrchen gerollt. Nach Zentrifugation wurde der Überstand in einen Dialyseschlauch überführt und gegen eine 4 M Harnstoff-Lösung (1l) mit Riboflavin versetzt dialysiert. Ca 60 % des unlöslichen Proteins konnte durch den Harnstoff nicht denaturiert werden und blieb

im Pellet. Eine Verbesserung mit einer 6 M Guanidinium-HCl-Lösung konnte nicht erreicht werden. Bei der langsamen Rückfaltung durch Dialyse gegen eine abnehmende Harnstoffkonzentration trübte sich die Proteinlösung im Dialyseschlauch. Die Trübung konnte auch nicht durch veränderte Harnstoffgradienten verhindert werden. Riboflavin erwies sich bei der Rückfaltung gegenüber FMN als der geeignete Ligand, da mehr Protein in Lösung blieb. Zur weiteren Reinigung und gleichzeitigen Abschätzung des nativen Molekulargewichtes erfolgte die Gelfiltrationschromatographie. Die Elution auf der kalibrierten Gelfiltrationssäule erfolgte nach ca. 125 ml (> 700 kDa), welches das Ausschlussvolumen der S200 darstellt. In der Literatur wird das YFP als Monomer oder auch Dimer beschrieben (Sirokman *et al.* 1995).

Es wurden verschiedene Pufferzusammensetzungen getestet, doch trotz Zugabe von 300 mM KCl, 5% Glyzerin, 5 mM DTT in den Aufschlusspuffer/Dialysepuffer konnte die Aggregation nicht verhindert, sondern nur vermindert werden. Es wurden mehrere Spezies unterschiedlicher Größe beobachtet. Doch die Menge der monomeren Fraktion war nach Aufkonzentrieren auf der SDS-PAGE-Analyse nicht sichtbar.

Alle Versuche zur Rekonstruktion schlugen somit fehl. Deshalb wurde eine andere Strategie verfolgt. Die Konstruktion von Fusionskonstrukten, gute Erfahrungen wurden bislang mit dem Maltose Binding Protein (MBP) und einem aus sechs Histidinen bestehenden Histidinrest gemacht.

3.3.2.1 Fusionskonstrukt von Yellow-Fluorescent-Protein aus *V. fischeri* mit Maltose Binding Protein

Das Fusionskonstrukt pNCO113-MBP-TB-VF-YFP enthält am N-Terminus das Maltose Binding Protein. Nach erfolgreicher Expression könnte das Fusionsprotein an einer Amylose-Säule gereinigt werden und mittels der eingebauten Thrombinschnittstelle (TB) vom Löslichkeitsvermittler abgetrennt und dann in gereinigter Form weiteren Untersuchungen unterworfen werden.

Die nach dem PCR-Screen (siehe 2.6.6.2) positiven Klone wurden in einer 25 ml Kultur über Nacht angezogen. Doch die SDS-PAGE-Analyse ergab auf der Höhe von 67 kDa keine Expressionsbande. Auch die Transformation in den rekombinanten *E. coli* M15(pREP4) Stamm brachte keine sichtbare Expression. Die Nukleotidsequenz des verwendeten Klons war korrekt. Trotzdem wurde eine 2l-Anzucht gestartet und der Rohextrakt in 25 ml PBS-Puffer, pH 7,0 auf eine Amylose-Säule (5 ml) aufgetragen, um eine mögliche Aufkonzentrierung des Fusionskonstruktes durch die Affinitätschromatographie zu erreichen. Dieser Versuch schlug ebenfalls fehl.

3.3.2.2 Fusionskonstrukt von Yellow-Fluorescent-Protein aus *V. fischeri* mit His-Schwanz

Das Fusionskonstrukt pNCO113-H6-VF-YFP enthält am N-Terminus einen His-Schwanz, der aus 6 Histidinen besteht. Nach erfolgreicher Expression könnte das Fusionsprotein unter denaturierenden Bedingungen an einer Ni-NTA-Säule gereinigt werden und dann in gereinigter Form weiteren Untersuchungen unterworfen werden.

Die nach dem PCR-Screen (siehe 2.6.6.2) positiven Klone wurden in einer 25 ml Kultur über Nacht angezogen. Die SDS-PAGE-Analyse ergab auf der Höhe von 23 kDa keine Expressionsbande.

3.4 Untersuchungen zur Dihydroneopterin Aldolase aus *Arabidopsis thaliana*

Aus der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* konnte das erste komplett sequenzierte Pflanzengenom aufgeklärt werden. Das Genom enthält 25.498 Gene, welche für 11.000 Proteinfamilien codieren. Eine ausgesprochene Redundanz im *A. thaliana* Genom ist auffallend, welche sich beispielsweise in vielen sequenzkonservativen Genen, die über das ganze Genom verstreut sind, zeigt. Für die große Anzahl an Genkopien in *A. thaliana* vergleichsweise zu den anderen sequenzierten Eukaryonten wie *C. elegans*, *D. melanogaster* gibt es mögliche Erklärungen. So könnten segmentale Duplikationen eine Folge von früheren Duplikationen und nachfolgender Umordnung des kompletten Genoms sein. Das Muster dieser Duplikationen lässt auf polyploide Vorfahren schließen, welche als Schlüssel in der Pflanzenevolution angenommen wird. Die duplizierten Regionen umfassen ca. 60% des Genoms. Durch Mutationsanalysen konnte festgestellt werden, dass einige dieser duplizierten Gene funktional überflüssig sind (Dennis *et al.* 2000).

3.4.1 Klonierung

Die Expressionsplasmide pNCO113-AT-FolB1 und pNCO113-AT-FolB2 wurden freundlicherweise von Dr. Markus Fischer (TU) zur Verfügung gestellt.

Die Dihydroneopterin Aldolase (DHNA) in *A. thaliana* liegt in drei Isoformen vor.

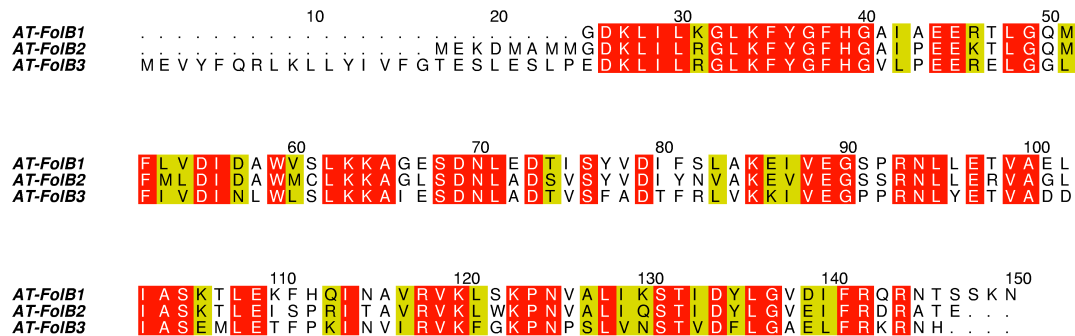


Abb. 3.27: Sequenzvergleich der drei isogenen Formen der *A. thaliana* Dihydroneopterin Aldolase, zur Unterscheidung wurden sie FolB1-3 benannt, die dazugehörigen „Accession“-Nummern sind AAF23191, NP_201103 und BAB02835 (NCBI). Die 64 identischen Aminosäuren sind rot, die 23 ähnlichen gelb unterlegt.

Die Isoformen besitzen auffallend unterschiedliche „Leader“-Sequenzen, AT-FolB1 wurde ohne „Leader“-Sequenz konstruiert und ist daher in der Abbildung 3.27 auch so dargestellt. Das Startmethionin zeigte sich in der Kristallstruktur als Glycin. Die eigentliche „Leader“-Sequenz dieser Isoform besteht aus den Aminosäuren MHSLETTAPATLERRESNL. AT-FolB2 dagegen wurde mit „Leader“-Sequenz konstruiert.

3.4.2 Expression und Reinigung der Dihydroneopterin Aldolase aus *A. thaliana*

Die Überexpression der beiden Isogene AT-FolB1 (DHNA-1) und AT-FolB2 (DHNA-2) erfolgte, wie in 2.8.3 beschrieben im Schüttelkolben bei 37°C. Die einzelnen Reinigungsschritte wurden durch SDS-PAGE-Analyse verfolgt (siehe Abbildung 3.29) und bis zur elektrophoretischen Homogenität aufgereinigt. Das Reinigungsprotokoll ist für beide Isoformen identisch und erfolgte wie in 2.8.3 beschrieben. Als chromatographische Reinigungsschritte diente hierbei als erstes eine Q-Sepharosesäule mit KCl-Gradienten, dann eine Fällung mit kaltgesättigter

Ammoniumsulfat-Lösung, ein Gelfiltrationslauf und abschliessend eine Red-Sepharose CL-6B Säule.

Die Abschätzung des nativen Molekulargewichtes durch die kalibrierte Gelfiltrationssäule ergab anhand des Retentionsvolumens von ca. 188 ml eine native Größe der DHNA-1 und DHNA-2 von ungefähr 110 kDa. Aus der berechneten molekularen Masse des Monomers von ca. 14 kDa ergibt sich für ein Homooktamer eine Größe von 112 kDa, was mit dem experimentell gefundenen Wert sehr gut im Einklang steht.

Bei der Reinigung der zweiten Isoform zeigte sich eine Aufspaltung der Expressionsbande in zwei unterschiedlich stark ausgeprägte Banden, dies war nach dem Q-Sepharose-Lauf mittels der SDS-PAGE-Analyse zu erkennen. Die eine Bande etwas unterhalb der 14 kDa Markerbande erwies sich als die stärkere, die andere oberhalb war nur sehr schwach ausgeprägt. Diese Aufspaltung war im Rohextrat nicht sichtbar, möglicherweise aufgrund der stark ausgeprägten Expressionsbande. FolB2 wurde mit „Leader“-Sequenz im Gegensatz zu FolB1 konstruiert, welches eine Größe von 14,685 kDa besitzt, ohne „Leader“-Sequenz aber nur noch 13,717 kDa groß ist, so dass beide Spezies vorhanden sind, und nur noch der kleinere Anteil mit „Leader“-Sequenz, weil diese durch Proteasen abgespalten wurde.

Die Elutionsprofile sind in Abbildung 3.28 dargestellt. Die Gradientenverläufe sind durch eine rote Linie eingezeichnet.

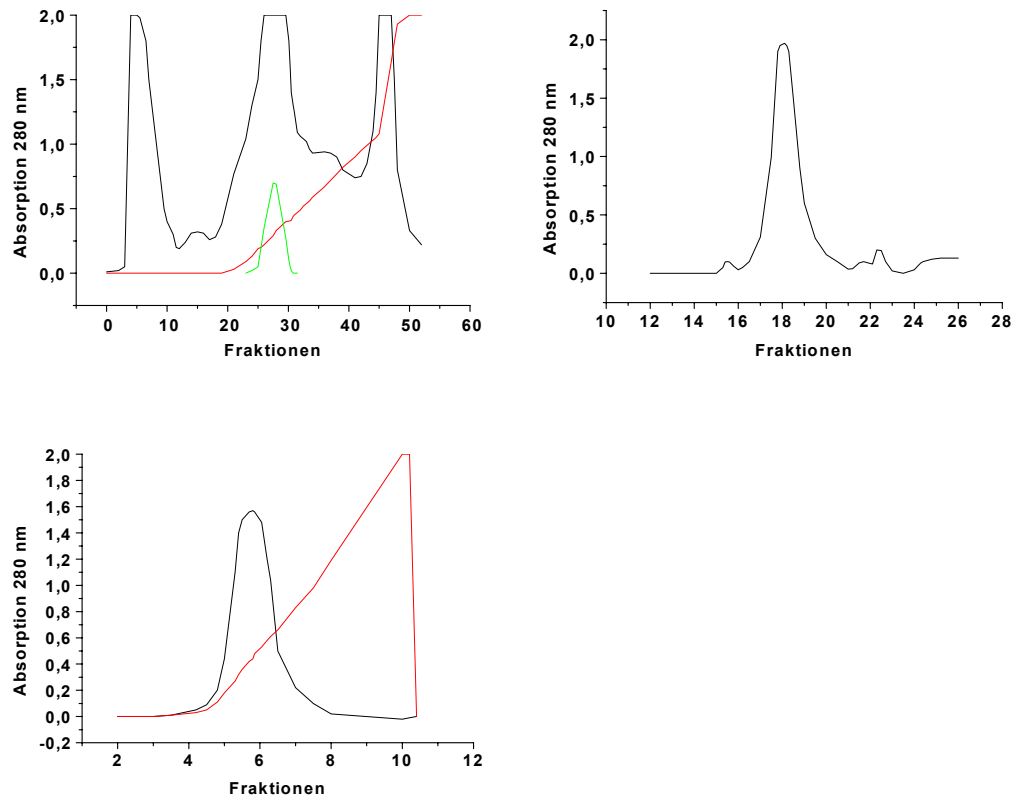


Abb. 3.28: Chromatographie der DHNA-1 aus *A. thaliana* von links oben an Q-Sepharose; rechts oben an S20 und links unten an Red-Sepharose.

Abbildung 3.29 zeigt die SDS-PAGE-Analyse des Reinigungsverlaufes der DHNA-1.

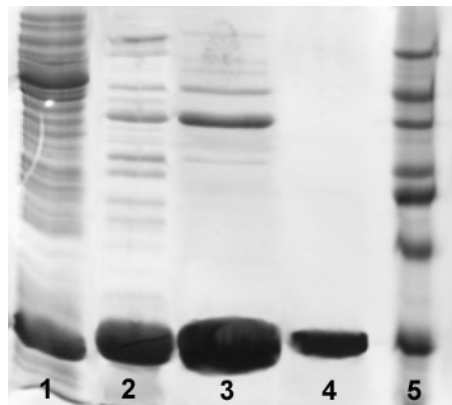


Abb. 3.29: SDS-PAGE Analyse vom Reinigungsverlauf der DHNA-1 aus *A. thaliana*. Spur 1, Rohextrakt M15 pRep4-AT-DHNA-1; Spur 2, DHNA-1 nach Q-Sepharose; Spur 3, DHNA-1 nach Gelfiltrationssäule, Spur 4, DHNA-1 nach Red-Sepharose; Spur 5, Markerproteine mit den Molekulargewichtsstandards (von oben nach unten) 66, 45, 36, 29, 24, 20 und 14 kDa.

3.4.3 Struktur der Dihydroneopterin Aldolase aus *A. thaliana*

3.4.3.1 Kristallisation der Dihydroneopterin Aldolase aus *A. thaliana*

Die gereinigte DHNA-1 aus *A. thaliana* wurde mit einer anfänglichen Konzentration von 17 mg/ml in 30 mM Tris/HCl pH 8,0, 100 mM KCl in „Screening“-Experimenten unter Verwendung der *sitting drop*-Methode (siehe 2.9.1) eingesetzt. Die Cryschem-Platten wurden bei 20°C aufbewahrt. Innerhalb von einem Tag waren unter mehreren Kristallisationsbedingungen des Hampton Research Screen 1 Kristallwachstum in unterschiedlichen Formen zu beobachten. Alle Bedingungen hatten PEG in Variation mit verschiedenen Salzen gemeinsam. Optimierte „Screening“-Versuche ergaben kryotaugliche Kristallisationsbedingung von 2 µl DHNA (11,5 mg/ml) mit 2 µl Reservoirlösung (0,1 M Tris/HCl, pH 7,2, 21% PEG 2000 MME (Monomethylether) und 115 mM C-HEGA-11 (Cyclohexylbutanoyl-N-hydroxyethylglukamid)).

In folgender Abbildung 3.30 sind repräsentative Kristalle dargestellt.

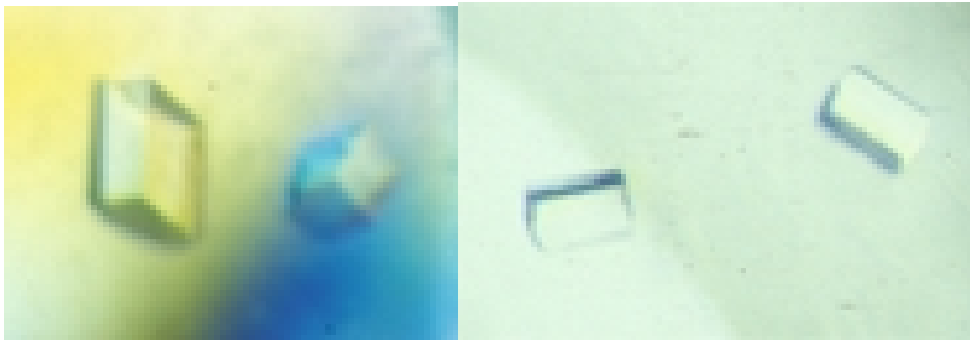


Abb. 3.30: Kristalle der WT-DHNA aus *A. thaliana* in 0,1 M Tris/HCl, pH 7,2, 21% PEG 2000 MME und 115 mM C-HEGA-11

Die Kristalle wuchsen innerhalb von 24 h bei 20°C zu einer ausreichenden Größe von ca. 80 x 80 x 80 μm^3 . Ein erster vollständiger Diffraktionsdatensatz eines DHNA-Kristalls dieser Kristallisationsbedingung wurde unter Kryo-Bedingungen, (30% PEG400 zum Kristallisationspuffer) bei 100 K mit einer *Image Plate* freundlicherweise von Frau Stefanie Bauer am Max-Planck-Institut für Biochemie auf einem Röntgendrehanodengenerator aufgenommen. Der Kristall beugte bis zu einer Auflösung von 2,2 Å. Die Kristalle gehören zur Raumgruppe P1. Die Einheitszelle besitzt die Zellkonstanten $a=63,5\text{Å}$, $b=84,2\text{Å}$, $c=89,1\text{Å}$ und $\alpha=90,14^\circ$, $\beta=89,9^\circ$, $\gamma=76,2^\circ$. Die asymmetrische Einheit beinhaltet zwei Oktamere von 114 kDa. Daraus ergibt sich einen Matthews Koeffizienten von 2,1 $\text{Å}^3/\text{Da}$ mit einem Solvensgehalt von ungefähr 42%.

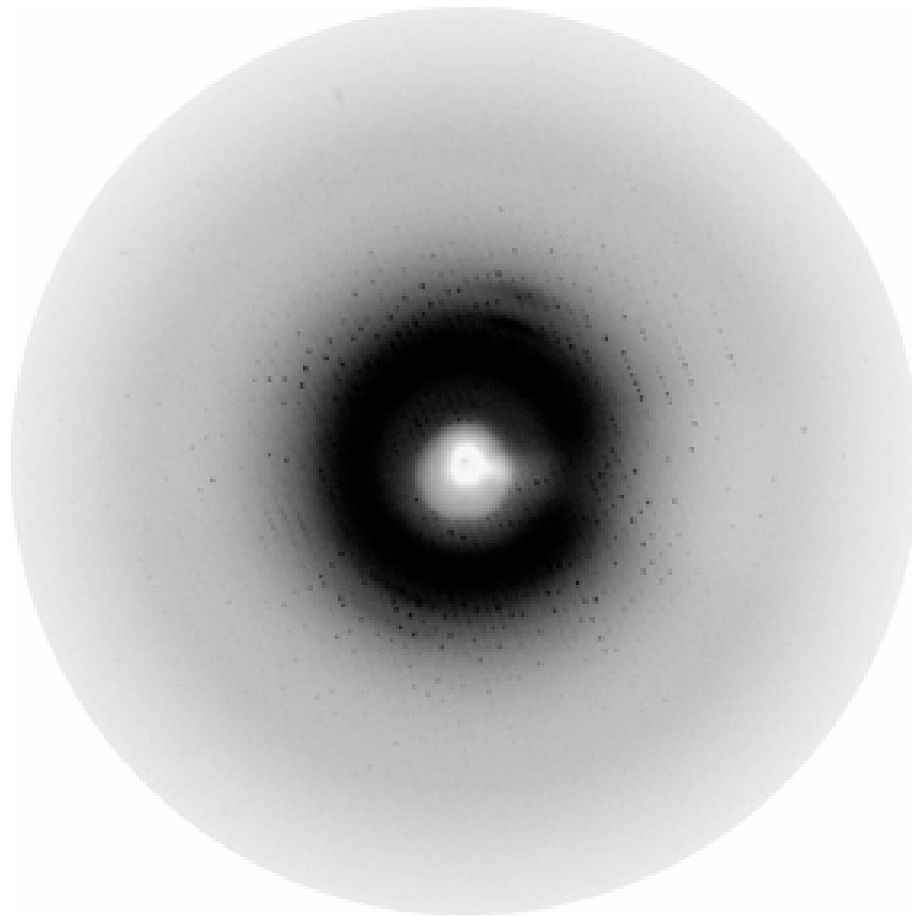


Abb. 3.31: Röntgenbeugungsbild der DHNA aus *A. thaliana* mit einer maximalen Auflösung von 2,2 Å, und einer Wellenlänge λ (CuK $_{\alpha}$) = 1,542 Å

Die Struktur der rekombinanten DHNA aus *A. thaliana* wurde mit Hilfe der *Patterson*-Suchmethode (molekularer Ersatz) gelöst. Als Suchmodell diente die Kristallstruktur der *S. aureus* DHNA von Hennig *et al.* 1998 (PDB-Eintrag 1DHN). Anschließend wurde das Modell bis zu einem R-Faktor von 21,8% (freier R-Faktor 27 %) bei einer maximalen Auflösung von 2,2 Å verfeinert. Die Monomere der DHNA aus *A. thaliana* bestehen aus 127 sehr gut definierten Resten mit Ausnahme der letzten fünf Aminosäuren. Der Großteil der Seitenketten waren eindeutig durch ihre Elektronendichte definiert, außer einige, die an der Oberfläche des Proteins lokalisiert sind. Das finale Modell der DHNA-Oktamers umfasst insgesamt 975 Aminosäuren. In allen Untereinheiten wurde im aktiven Zentrum ein Pterinring gefunden, obwohl weder „Soaken“ oder Co-Kristallisationsexperimente mit Dihydroneopterin oder 6-Hydroxymethyl-7,8-dihydropterin durchgeführt wurden.

3.4.3.2 Strukturbeschreibung der Dihydroneopterin Aldolase aus *A. thaliana*

In Übereinstimmung mit der Struktur und Topologie der *S. aureus* DHNA ist die Polypeptidkette der DHNA aus *A. thaliana* in eine einzelne Domäne gefaltet, die ein antiparalleles β -Faltblatt, das durch die die Stränge β_1 , β_2 , β_3 und β_4 gebildet wird, umfasst, sowie zwei langen α -Helices α_3 und α_4 . Die Loops verbinden β_1 , β_2 und β_2 , β_3 beinhalten zwei weitere kurze helikale Segmente α_1 und α_2 . Die Seitenketten der beiden langen α -Helices und dem β -Faltblatt bilden den hydrophoben Kern des Moleküls.

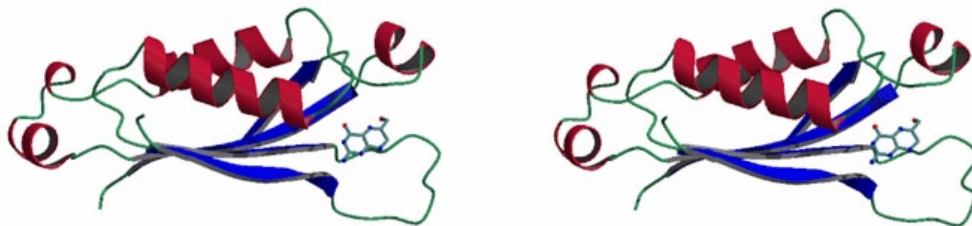


Abb. 3.32: Stereodarstellung des DHNA-Monomers aus *A. thaliana*. Der Pterinring ist als Kugel-und-Stab-Zeichnung im aktiven Zentrum eingezeichnet.

Die DHNA ist ein Oligomer mit acht identischen Untereinheiten. Die 16 antiparallelen β -Faltblätter von vier symmetrieverwandten Polypeptidketten sind zu einem Tetramer arrangiert, welches ein Ring formt mit einem durchgehenden Netzwerk aus β -Faltblatt-Wasserstoffbrückenbindungen. Der N-terminale β_1 -Strang macht sechs Backbone Wasserstoffbrücken mit dem C-terminalen β_4 -Strand der benachbarten Untereinheit. Zusätzlich eine Salzbrücke zwischen Asp3 und Arg119, die in den DHNA-Sequenzen invariant ist. Sie stabilisiert die Interaktionen benachbarter Untereinheiten im Tetramer.

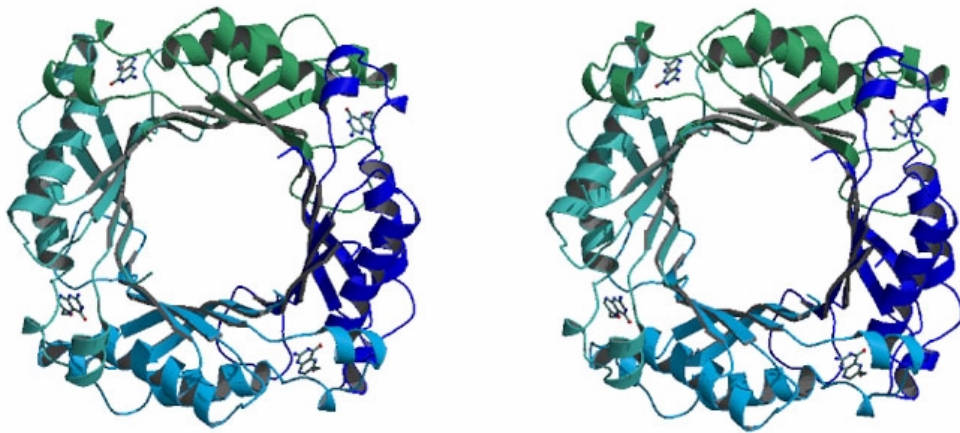


Abb. 3.33: Stereodarstellung des DHNA-Tetramers aus *A. thaliana*. Der Pterinring ist als Kugel-und-Stab-Zeichnung im aktiven Zentrum eingezeichnet.

Das Oktamer ist ein hohler Zylinder, der durch „head to head“ Anordnung von zwei dieser tetrameren Ringe geformt wird. Die Stabilisierung dieser Anordnung wird ausschließlich durch hydrophobe Interaktionen mit den Seitenketten erreicht. Die Interaktionen innerhalb des Tetramers scheinen im Vergleich stärker zu sein als die Anordnung der beiden Tetrameren zu dem funktionalen oktameren Molekül.

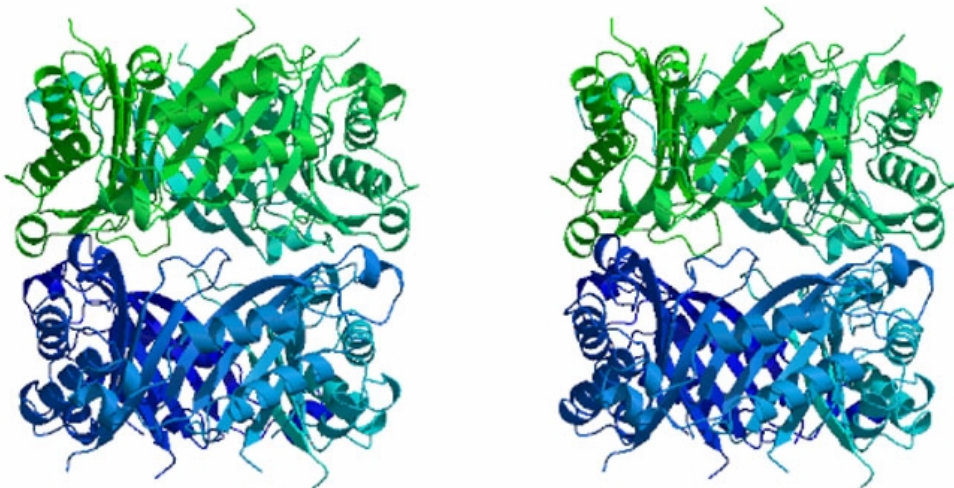


Abb. 3.34: Stereodarstellung des DHNA-Oktamers aus *A. thaliana*. Der eine Tetramerring ist in verschiedenen Grüntönen, der andere in verschiedenen Blautönen eingefärbt.

Die Hauptstabilisierung dieser Anordnung des Tetramers scheint durch ein hydrophobes Cluster erreicht zu werden, das durch die Seitenketten der Reste Leu25, Tyr13, Leu105 und Ala104 gebildet wird. Wegen der großen Symmetrie des Oktamers wiederholt sich dieses Cluster durch das ganze Interface.

3.4.3.2.1 Bindung von Dihydroneopterin und Reaktionsmechanismus

Die Substratbindestelle ist im Interface zwischen zwei benachbarten Untereinheiten lokalisiert. Dies wird sehr schön durch den Pterinring gezeigt, der in allen acht Untereinheiten gefunden werden konnte, obwohl keine „Soaking“- und Co-Kristallisationsexperimente gemacht wurden, durch das Vorhandensein des Pterinrings könnte angenommen werden, dass das Produkt 6-Hydroxymethyl-7,8-dihydropterin erst durch Zugabe des Substrates Dihydroneopterin aus der Bindungstasche entlassen wird. Die eine Untereinheit steuert folgende Reste bei, von α_1 (Glu22) und der Anfang von α_4 (Leu73 und Glu74), das Ende von β_3 (Lys100) und den Loop, der α_3 und α_4 (Asn71) verbindet. Die andere Untereinheit trägt mit dem Rest vom Anfang von α_3 (Tyr54) und einem Rest des Loops, der α_1 und α_2 (Ser53) verbindet. Die hydrophobe Tasche, in welcher der Pterinring von 6-Hydroxy-7, 8-dihydropterin liegt, besteht aus Val37, Leu39, Tyr54 und Val55 von der einen Untereinheit und Leu72, Leu73 von der anderen benachbarten Untereinheit. Abgesehen von Ser53 sind alle Reste streng konserviert in vergleichenden Aminosäuresequenzen.

In der folgenden Stereoabbildung (Abbildung 3.35) ist die Bindung des Pterinringes im aktiven Zentrum gezeigt und die dabei beteiligten Aminosäuren. Wasserstoffbrückenbindungen des Proteins zum Pterinring sind eingezeichnet.

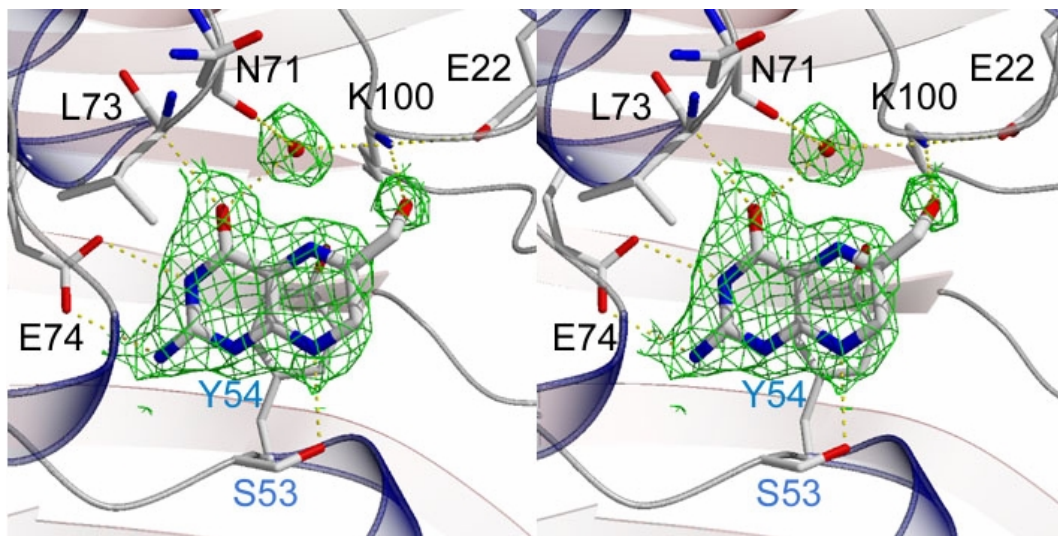


Abb. 3.35: Stereodarstellung des aktiven Zentrums der DHNA aus *A. thaliana*. ($2F_0$ - F_c -Elektronendichtekarte), die Reste der benachbarten Untereinheit sind blau eingezeichnet.

In Übereinstimmung mit dem vorgeschlagenen Reaktionsmechanismus von *S. aureus* DHNA (Hennig *et al.* 1998) ist die initiale Formation die Bildung eines Iminium-Komplexes, welcher die N5 protonierte Spezies von 7,8-Dihydroneopterin erfordert und einen ionisierbaren Rest wie Asp oder Glu im aktiven Zentrum benachbart zu dem N5-Atom. Da kein solcher Rest hier gefunden werden konnte, wird vermutet, dass das Proton durch ein gebundenes Wassermolekül zum N5 weitergeleitet wird.

3.4.4 Bestimmung der enzymatischen Aktivität der Dihydroneopterin Aldolase aus *A. thaliana* mittels HPLC

Wie in Abschnitt 2.10.4 beschrieben, wurde die Aktivität der DHNA-1 und DHNA-2 bestimmt. Als Substrat diente 7,8-Dihydroneopterin. Die Retentionszeit von 7,8-Dihydroneopterin betrug 3,59 min. Bei der Umsetzung des Substrates zu 6-Hydroxymethyl-Dihydropterin (Retentionszeit 5,09 min) war eine Aufspaltung des Substrat-Peaks zu beobachten (Retentionszeiten von 3,09 min und 3,76 min). Diese lassen sich dadurch erklären, dass neben der Aldolasereaktion noch die Epimerisierung von Dihydroneopterin (D-erythro-Form) am C2' der Seitenkette zu

Dihydromonapterin (L-threo-Form) stattfindet. Neben der Aldolase-Aktivität noch eine Epimerase-Aktivität zu beobachten ist. Diese Beobachtung war für beide Isoformen DHNA-1 und DHNA-2 gültig, wobei letztere im Vergleich nur etwa 50% der DHNA-1-Aktivität besaß. Die spezifische Aktivität der DHNA-1 aus *A. thaliana* beträgt bei 25°C 440 nmol/mg h im Vergleich zur *E. coli* DHNA mit 127 µmol/mg h, die allerdings bei 37°C durchgeführt wurden (Hausmann *et al.* 1998).

3.4.4.1 Temperaturabhängigkeit der Dihydroneopterin Aldolase aus *A. thaliana*

Die *E. coli* DHNA zeichnet sich durch eine sehr gute Hitzestabilität aus. Dies konnte allerdings nicht mit der *A. thaliana* DHNA gezeigt werden, wie in folgender Abbildung 3.36 zu sehen ist. Die Aktivität ohne Hitzebehandlung wurde auf 100 % gesetzt. Die katalytische Reaktion der DHNA aus *A. thaliana* wurde, wie in 2.4.8.5 beschrieben, durchgeführt.

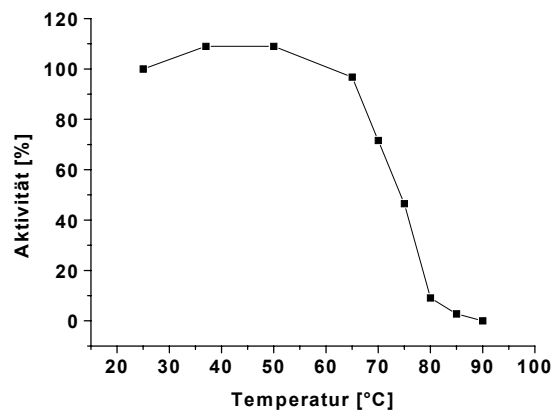


Abb. 3.36: Temperaturabhängigkeit der DHNA-1-Aktivität aus *A. thaliana*. Die Aktivität bei 25°C wurde als 100 % gesetzt.

Es ist deutlich zu erkennen, dass ab einer Temperatur von 65°C ein starker Abfall der Aktivität zu beobachten ist. Daher wurde eine Hitzefällung als Reinigungsschritt nicht herangezogen.

4 Diskussion

4.1 Riboflavinsynthese aus *S. pombe*

Die Kristallstruktur im Widerspruch zur nativen Struktur der Riboflavinsynthese aus *S. pombe* in Lösung

Die Analyse der Kristallstruktur der RS aus *S. pombe* widerspricht den vorliegenden biochemischen Daten durch ihre eindeutige monomere Struktur in der gefundenen Kristallisationsbedingung (65 % (v/v) MPD, 0,1 M Bicine pH 9.0).

Massenspektroskopische Experimente an der RS in Lösung bestätigen eine erwartete molekulare Masse von 22862,8 Da eines Monomeren. Die RS sedimentiert reproduzierbar in analytischen Ultrazentrifugationsexperimenten mit einer molekularen Masse von ca. 74 kDa. Diese biochemischen Daten belegen im Gegensatz zur Kristallstrukturanalyse einen trimeren Oligomerisierungsgrad der RS aus *S. pombe* in Lösung.

Die trimere RS wurde aus ihrer Lösung als CEOL-Komplexstruktur co-kristallisiert. Die Annahme, die Ligandierung des CEOL könnte durch sterische Konflikte benachbarter Monomere die native Trimerstruktur zerstören, wurde durch UZ-Experimente widerlegt. Unter den gewählten Bedingungen sedimentierte das Protein in Gegenwart von CEOL reproduzierbar als Trimer. Eine mögliche Erklärung ist, somit in der Kristallisationsbedingung selbst zu suchen.

Ein struktureller Vergleich zur kürzlich aufgeklärten trimeren Kristallstruktur der RS aus *E. coli* (Liao *et al.* 2001) zeigt, dass die Trimerisierung hauptsächlich über hydrophobe Kontakte benachbarter Valinreste der C-terminalen Helix der Monomere stabilisiert wird.

Eine kristallographische Analyse an der monomeren Struktur der RS aus *S. pombe* zeigt keinerlei Kontakte im Bereich der Trimerisierungshelix. Der hohe MPD-Gehalt (65 %) in den Kristallisationsbedingungen könnte diese relativ schwachen hydrophoben Valin-Trimerisierungskontakte verhindern und der Grund für die monomere Kristallstruktur sein.

Faktorielle „Screening“-Ansätze zur Auffindung einer neuen Kristallisationsbedingung ohne MPD, würden Möglichkeiten bieten die RS in ihrer nativen Trimerstruktur aufzuklären, allerdings waren diese Versuche bislang nicht erfolgreich. Aber über den Strukturvergleich zur *E. coli* RS kann die Trimerisierung sehr gut untersucht werden, weil die Aminosäuresequenzen mit 36% Übereinstimmung ausreichend homolog sind.

Charakterisierung der Ligandenbindung mit CEOL und die Kinetik der Riboflavinsynthase aus *S. pombe*

Die Röntgenstrukturanalyse der monomeren Ligand-Komplex-Struktur der *S. pombe* RS bringt erste genauere Hinweise auf die exakte Anordnung des aktiven Zentrums der RS.

Beide β -barrels der *S. pombe* RS binden je ein Molekül des Enzym-Inhibitors CEOL. Dabei ist die Konformation der Ligandenmoleküle nahezu identisch. Aktive Reste, die direkt für die Substratbindung verantwortlich sind, sind in den jeweiligen Domänen streng konserviert (siehe Abbildung 3.8). Der gravierendste Unterschied ist, im Austausch des Cystein-Restes an Position 48 in der N-terminalen Domäne durch Serin an Position 146 in der C-terminalen Domäne zu finden. Beide Aminosäuren sind absolut konserviert in vielen Riboflavinsynthasen verschiedener Organismen mit Ausnahme der RS aus *M. Jannaschii*.

Im Sequenzvergleich (siehe Abbildung 3.15) zeichnen sich *S. pombe* RS und *E. coli* RS durch eine hohe innere Sequenzhomologie beider β -barrels aus.

In weiterführenden Kinetikexperimenten zum Reaktionsmechanismus zeigt Wildtyp RS aus *S. pombe* eine sigmoidale Bindungskurve, die mit der Hill-Funktion beschrieben werden kann. Dadurch kann eine positive kooperative Wechselwirkung zwischen den Bindungsstellen angenommen werden, d.h. die Bindung eines Lumazinmoleküls erhöht die Affinität für die Bindung von weiteren Lumazinmolekülen.

Der Hill-Koeffizient n (für Wildtyp $n=1,8$) beschreibt den allgemeinen Grad der Kooperativität zwischen den gebundenen Liganden, er steht aber nicht unbedingt für

die Zahl der Untereinheiten. Die Hill-Gleichung ($y = V_{\max} \frac{x^n}{k^n \cdot x^n}$) beschreibt

ein Anpassungsverfahren und nicht ein bestimmtes Modell der Ligandenbindung. Im Falle der Riboflavinsynthase und den im folgenden diskutierten Reaktionsmechanismus steht dies in keinem Widerspruch, da die beschriebene Dynamik von der erleichterten Bindung eines weiteren Lumazinmoleküls profitiert.

Wird Ser146 der RS aus *S. pombe* durch Alanin ersetzt, ergibt sich daraus nur eine geringfügige Änderung im kinetischen Verhalten zum Wildtyp. Auch ein Austausch des Serins zu Cystein beeinflusst das kinetische Verhalten der RS nicht wesentlich.

Auffällig ist nur der Kurvenverlauf, der im Gegensatz zum Wildtyp einen Hill-Koeffizienten von $n=1,0$ ergibt und somit mit dem Michaelis-Menten-Modell beschrieben werden kann. Durch den größeren Cys-Rest geht die im Wildtyp beobachtete positive Kooperativität verloren. Sehr wahrscheinlich ist durch die größere Raumerfüllung des Cysteins eine erleichterte Bindung des zweiten Lumazinmoleküls eingeschränkt. Für diese Annahme würde auch der höhere K-Wert von $8,9 \mu\text{M}$ (Wildtyp = $5,7 \mu\text{M}$) sprechen. Zum Erreichen der halbmaximalen Geschwindigkeit ist bei einem gesteigerten K-Wert eine höhere Lumazinkonzentration erforderlich und somit ein schlechteres Bindungsverhalten der S146C Mutante zu erkennen.

Im Gegensatz dazu reduziert die Mutation C48S die Geschwindigkeit der Umsetzung durch das Protein etwa um den Faktor 6 und hat damit einen wesentlich größeren Einfluss auf die kinetischen Aktivitäten. Die Mutanten C48A und C48M zeigten keine detektierbare katalytische Aktivität. In den Arbeiten zu der RS aus *E. coli* konnten keine entsprechenden Mutanten C48S (A, M) charakterisiert werden (Illarionov *et al.* 2001). Für einen notwendigen strukturellen Vergleich dienen daher die entsprechenden Mutanten aus dem homologen Organismus *S. pombe*. Die Abstände des Seitenketten-Heteroatom von Cys48 und dem Ser146 zu den Atomen im Enzym gebundenen Inhibitor CEOL sind für die Thiolgruppe als nächster

Nachbar die 6 α -Methylengruppe des Liganden mit 3,7 Å, für Ser146 mit 4,0 Å (Gerhardt *et al.* 2002).

Bildung von Riboflavin – Mechanismus der Riboflavinsynthase

Der Benzenoid-Ring von Riboflavin (**IX** siehe Abbildung 1.2) entsteht in einer ungewöhnlichen Dismutations-Reaktion von zwei Pterinderivaten (6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin, **VIII**). In diesem letzten Schritt der Riboflavin Biosynthese wird von einem Lumazinmolekül (Donor) eine C₄-Einheit auf das zweite Lumazinmolekül (Akzeptor) übertragen. Für die enzymkatalysierte Reaktion ist kein organischer Kofaktor und Metallion erforderlich (Harvey *et al.* 1966) mit Ausnahme der RS aus *M. jannaschii*. Die Reaktion kann in Abwesenheit eines Katalyten in neutraler oder saurer wässriger Lösung stattfinden (Rowan *et al.* 1963, 1968, Beach *et al.* 1969). Dabei wird von einem nukleophilen Angriff eines Wassermoleküles auf den Pteridinring des Donor-Moleküles **VIII** ausgegangen. Das pentazyklische Lumazindimer erfüllt die Kriterien für ein kinetisch kompetentes Intermediat (Illarionov *et al.* 2001), welches durch die RS entweder in Riboflavin und das 5-Amino-ribitylamino-2,4-pyrimidindion, oder zwei Moleküle RS-Substrat umgesetzt wird.

Bei der enzymatischen Bildung von Riboflavin durch RS muss die Funktion des Nucleophils von einer Aminosäure im aktiven Zentrum übernommen werden. Durch die Aufklärung der CEOL-RS-Komplexstruktur können erstmals genauere Angaben über die Natur des Nucleophils gemacht werden. Im aktiven Zentrum der RS aus *S. pombe* kommen als mögliches Nucleophil die bereits erwähnten Aminosäuren in Betracht, Cys48 im N- β -barrel und Ser146 im C- β -barrel. Die Thiolgruppe von Cys48 und die Hydroxylgruppe von Ser146 stehen in nahezu identischem Abstand von 3,7 Å und 4,0 Å zur C6-Position des Liganden. Diese beiden Aminosäuren sind streng konserviert und auch in der RS aus *E. coli* an diesen Positionen zu finden. In der RS-Kristallstruktur aus *E. coli* wird noch eine weitere nukleophile Aminosäure vorgeschlagen, Ser41 im N- β -barrel. Ser41 steht allerdings in der RS-Komplexstruktur aus *S. pombe* in einem Abstand von 5,2 Å zum Pteridinring von CEOL.

In Abbildung 4.1 sind die detaillierteren Bindungsverhältnisse von CEOL (b), gemodelltem Substrat 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin (a) und dem pentazyklischen Intermediat (c) dargestellt.

Das pentazyklische Substratdimer wurde mit Hilfe der trimeren Koordinaten der *E. coli* RS in das mögliche aktive Zentrum der *S. pombe* RS gemodell.

Nach enzymatischer Trennung des Intermediates ergibt sich, dass Riboflavin an der N-terminalen Domäne gebildet und das Pyrimidindion an der C-terminalen Domäne als Substrat wieder freigesetzt werden kann. Das N-terminal gebundene Lumazin fungiert demnach als C4-Akzeptor und das Lumazin, welches an die C-terminale Domäne gebindet, als C4-Donor.

Die Thiolatgruppe von Cys48 agiert in der Reaktion möglicherweise als Base, welche das Proton von der 6 α -Methylengruppe des hypothetischen Intermediates 4 und/oder 5 in Abbildung 1.3 abstrahiert. Der Ser146-Rest agiert als das von Plaut *et al.* 1976 vorgeschlagene Nukleophil X.

Ebenfalls ist es möglich, dass die Nukleophil-Funktion von einem Wassermolekül übernommen werden kann, da die Reaktion auch ohne Enzym ablaufen kann. Dies würde auch die Beobachtung bestätigen, dass Ser146 mit nur einer minimalen Einschränkung der katalytischen Aktivität durch Alanin und Cystein ersetzt werden kann. Plaut und Beach schlugen einen eleganten hypothetischen Mechanismus vor, der die Hydroxylgruppe an Position 8 der Ribitylseitenkette von **2** (Abbildung 1.3) als Nukleophil die Position 7 des Pterinringes unter Bildung eines trizyklischen Intermediates angreift (Plaut *et al.* 1975). In der Tat konnte die Bildung der trizyklischen Anionenstruktur in Lösung gezeigt werden (Bown 1986, Beach *et al.* 1971 und Paterson *et al.* 1972). Die Kristallstruktur der *S. pombe* RS zeigt die Ribitylseitenkette beider Substrate in streng gebundener ausgedehnter Konformation. Dies scheint widersprüchlich mit dem vorgeschlagenen trizyklischen Substratanion. Die Seitenketten beider Moleküle scheinen während der gesamten komplexen Reaktion ihre Konformation beizubehalten.

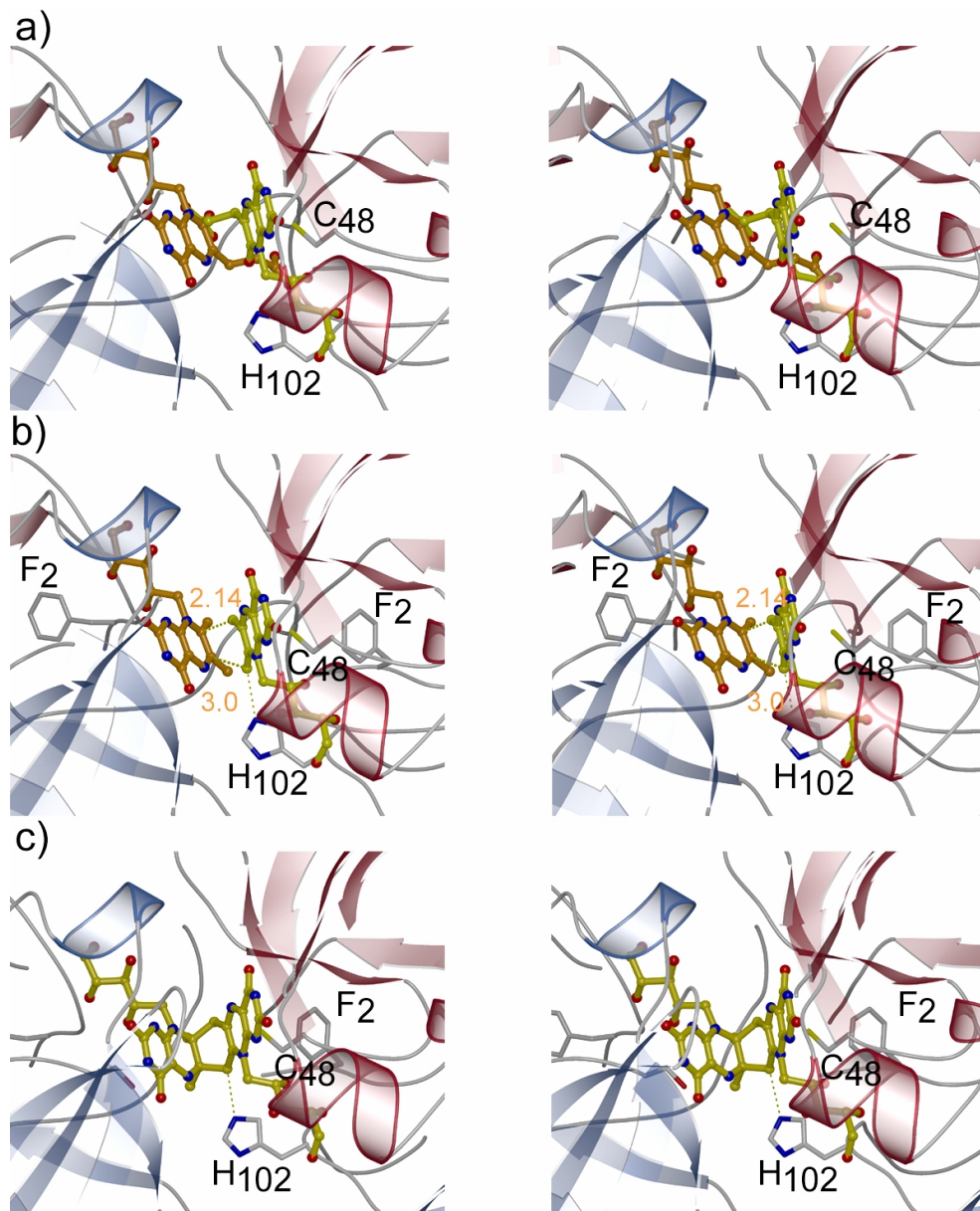


Abb. 4.1: Studien zum Reaktionsmechanismus. Stereoansicht des aktiven Zentrums, welches durch die Reste zweier benachbarter Untereinheiten des Monomers der Riboflavinsynthese aus *S. pombe* gebildet wird, **a)** mit gebundenem 6-Carboxyethyl-7-oxo-8-ribityllumazin. Der Ligand, der im N- β -barrel (rot) gebunden ist, ist gelb eingezeichnet, das 6-Carboxyethyl-7-oxo-8-ribityllumazin im benachbarten C- β -barrel (blau) ist in dunkelgelb eingezeichnet; **b)** vermutete Bindung von 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin im aktiven Zentrum, **c)** Modell des pentazyklischen Intermediats.

Bei der Umsetzung der Lumazinmoleküle zum Riboflavin wird von einer pentazyklischen Zwischenstufe der Reaktion ausgegangen. Cys48 im N-Fassmotiv und Ser146 im C-Fassmotiv bilden Hauptketten-Stickstoffatomwechselwirkung mit den N8-Stickstoffatomen des Pteridinringsystems. Durch diese Bindungsverhältnisse, die in beiden Bindungsstellen topologisch äquivalent sind, bedingt durch die große Anzahl konservierter Reste, ist eine Seite des CEOL vollständig vom Protein abgeschirmt. Die gegenüberliegende Seite ist damit solvensexponiert. Nur durch diese spezifische Bindung des Lumazins in der RS, in der eine Seite des Ringsystems für die Reaktion mit einem weiteren Lumazinmolekül zugänglich ist, wird die Annahme der pentazyklischen Zwischenstufe gestützt.

Strukturvergleich der Riboflavinsynthasen aus *S. pombe* und *E. coli*

Die topologische Faltung der RS aus *E. coli* und *S. pombe* ist sehr ähnlich, wie in Abbildung 4.2 gezeigt ist.

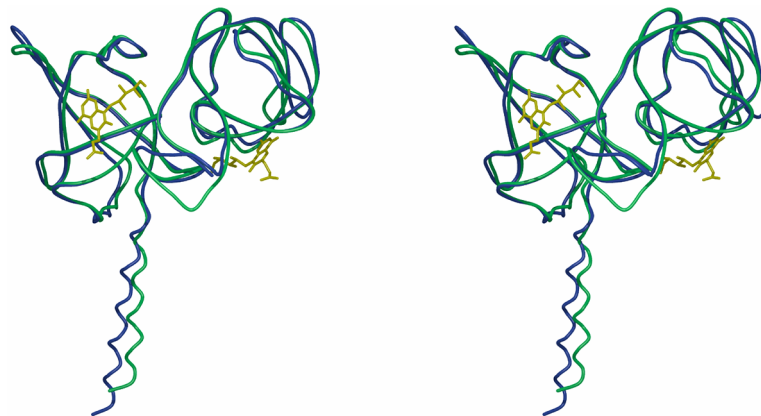


Abb. 4.2: Stereodarstellung des strukturellen Vergleichs von einer Untereinheit der Riboflavinsynthase von *E. coli* (blau) und *S. pombe* (grün).

Außerdem sind die Aminosäuren, die in direkten Kontakt zu dem gebundenen Liganden stehen, identisch oder sehr ähnlich in *E. coli* RS. Dies ist in folgender Abbildung noch mal deutlich zu erkennen.

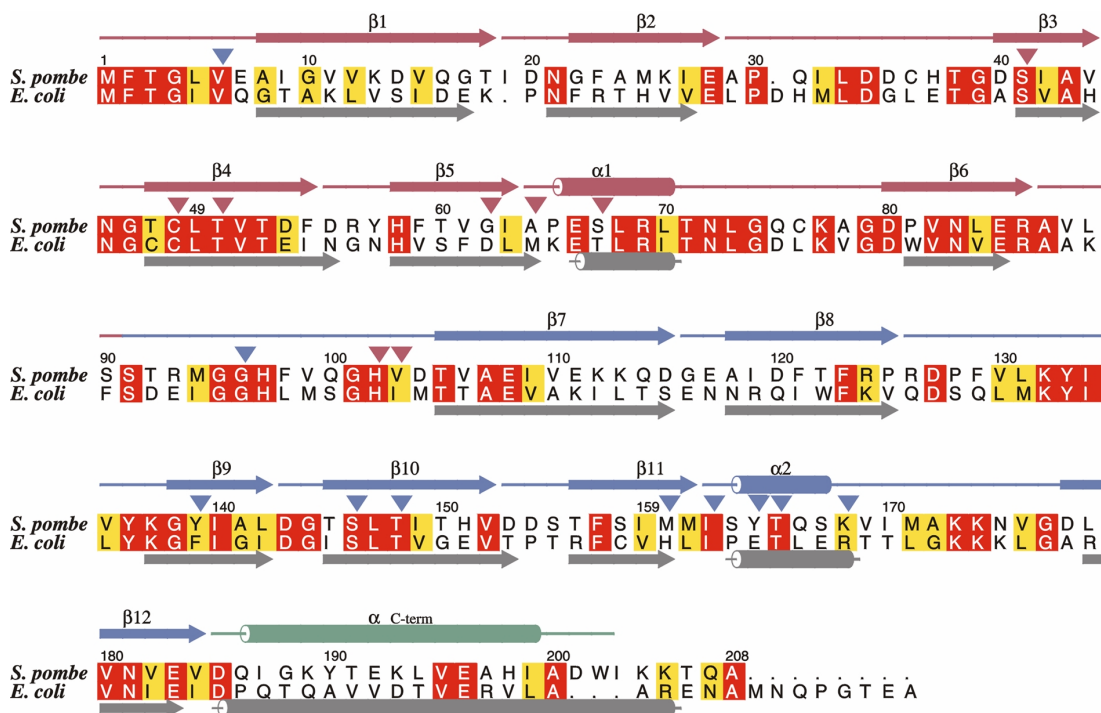


Abb. 4.3: Struktur-Sequenzvergleich der Riboflavinsynthase von *S. pombe* und *E. coli*. Die Nummerierung über dem Sequenzvergleich bezieht sich auf das Wildtyp Enzym von *S. pombe*. Die roten Pfeile zeigen die Reste, die in die 6-Carboxyethyl-7-oxo-8-ribityllumazin-Bindung im N-terminalen β -barrel. Die blauen Pfeile zeigen die Reste, die in die 6-Carboxyethyl-7-oxo-8-ribityllumazin-Bindung im C-terminalen β -barrel der *S. pombe* Riboflavinsynthase.

Die bei der Reaktion beteiligten Aminosäuren sind mit roten Pfeilen für die N-terminale Domäne und mit blauen Pfeilen für die C-terminale Domäne gekennzeichnet.

Deshalb konnte das Lumazinanaloge sehr leicht von der *S. pombe* Struktur in alle sechs Bindungsstellen des *E. coli* Enzyms modelliert werden. Dies ist in der Abbildung 4.4 gezeigt.

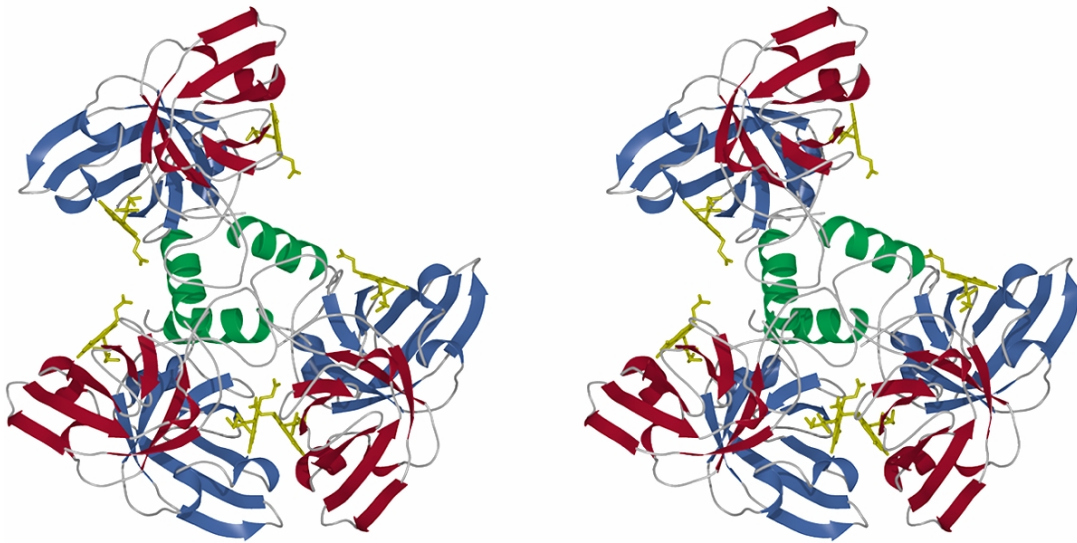


Abb. 4.4: Trimeres Modell der *S. pombe* Riboflavinsynthase mit gebundenem 6-Carboxyethyl-7-oxo-8-ribityllumazin (gelb).

Die *E. coli* RS besitzt keine trigonale Symmetrie (Liao *et al.* 2001). Trimerisierung entsteht über die C-terminalen Helices. Die N-terminale Domäne der einen Untereinheit hat nur ausgedehnten Kontakt mit der C-terminalen Domäne der zweiten Untereinheit. Nur in einem von drei potentiell aktiven Zentren formen zwei Untereinheiten in engem Kontakt ein aktives Zentrum mit Pseudo-*c*₂-Symmetrie, welche in Abbildung 4.5 zu sehen ist.

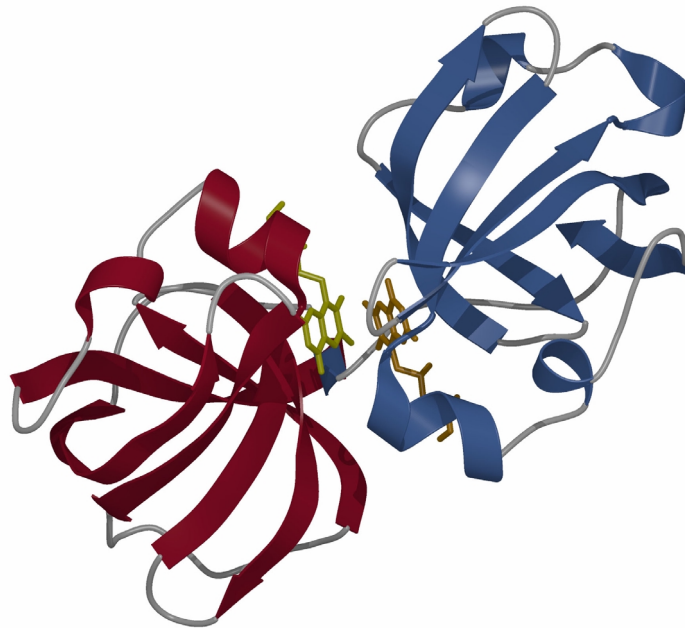


Abb. 4.5: Vorgeschlagenes aktives Zentrum des Riboflavinsynthase Dimers aus *S. pombe* mit modelliertem Substrat 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin. Ansicht entlang der Pseudo-*c*₂-Symmetrieachse der zwei β -barrels der benachbarten Untereinheiten.

Die beiden Substratmoleküle sind ideal für die Dismutationsreaktion positioniert. Indirekter Beweis für den nicht-symmetrischen Charakter der RS konnte schon durch frühere ¹⁹F-NMR-Untersuchung mit fluorinierten Liganden beobachtet werden (Cushman *et al.* 1992, 1993 und 1998, Illarionov *et al.* 2001). Es konnten multiple ¹⁹F-NMR-Signale für die Trifluoromethyl-Gruppen des enzymgebundenen Liganden beobachtet werden, welche man durch die Hypothese, dass die Ligandenmoleküle in unterschiedlichen Zuständen gebunden sind, am besten erklären kann.

Die beobachtete Asymmetrie der unligierten *E. coli* RS setzt sich also in der Anwesenheit der Liganden fort. Die ¹⁹F-NMR-Untersuchungen stehen im Einklang mit der Hypothese, dass große dynamische Bewegungen in dem homotrimeren Protein, welches N- und C-terminale Domänen verschiedener Untereinheiten in eine geeignete Beziehung zur Substrat-Dimerisierung bringen, stattfinden. Die Kristallstruktur der *E. coli* RS kann demnach als Momentaufnahme einer spezifischen Konformation betrachtet werden, welche durch die Kristallkontakte stabilisiert ist.

¹⁹F-NMR-Untersuchung verschiedener Riboflavinsynthasen im Vergleich

¹⁹F NMR Bindungsstudien mit RS aus *B. subtilis* (Cushman *et al.* 1991, 1992, 1993, Scheuring *et al.* 1996, Illarionov *et al.* 1994) und *E. coli* haben überraschenderweise eine starke Signalmultiplizität der an die Proteine gebundenen Liganden ergeben. Die Untersuchungen mit dem Intermediatanalogen 6-Trifluormethyl-7-oxo-8-ribityllumazin (Oxo) haben mindestens 4 unterschiedliche Bindungszustände ergeben, die durch unterschiedliche, stark linienverbreiterte ¹⁹F NMR Signale charakterisiert sind und deren chemische Verschiebungen sich über einen Bereich von etwa 9 ppm erstrecken. Das kovalente Hydrat des 6,7-Bis(trifluormethyl)-8-ribityllumazins (Epimer A) wurde dagegen nur in mindestens zwei unterschiedlichen Zuständen an die RS gebunden. Andererseits zeigten entsprechende Bindungsstudien mit LumazinProtein aus *P. phosphoreum*, einem monomeren Paralogen der RS ohne enzymatische Aktivität, nur ein einzelnes scharfes Signal für jede an das Enzym gebundene Trifluormethylgruppe (Scheuring *et al.* 1993, 1994). Auch die artifizielle N-terminale Domäne der *E. coli* RS, welches ein c₂-symmetrisches Homodimer bildet, zeigte einzelne scharfe Signale für jede an das Protein gebundene Trifluormethylgruppe der trifluormethylsubstituierten Lumazin Derivate (Eberhardt *et al.* 1996).

Die Abbildungen 4.6 und 4.7 zeigen vergleichend Protein Perturbationsstudien mit verschiedenen Orthologen und Paralogen der RS. Dabei handelt es sich um das LumazinProtein aus *P. leiognathi*, die rekombinante N-terminale Domäne der *E. coli* RS und die RS aus *B. subtilis*, *E. coli*, sowie aus *S. pombe*. Alle Spektren wurden unter identischen experimentellen Bedingungen durchgeführt. Der freie Ligand kann dem Signal bei der chemischen Verschiebung von 7,7 ppm zugeordnet werden und einer Linienverbreiterung von 56 Hz und ist als gestrichelte Linie in der Abbildung 4.6 eingezeichnet. Wohingegen die Signale des gebundenen Liganden in verschiedenen Zuständen eine Linienverbreiterung von 90 bis nahezu 540 Hz zeigten.

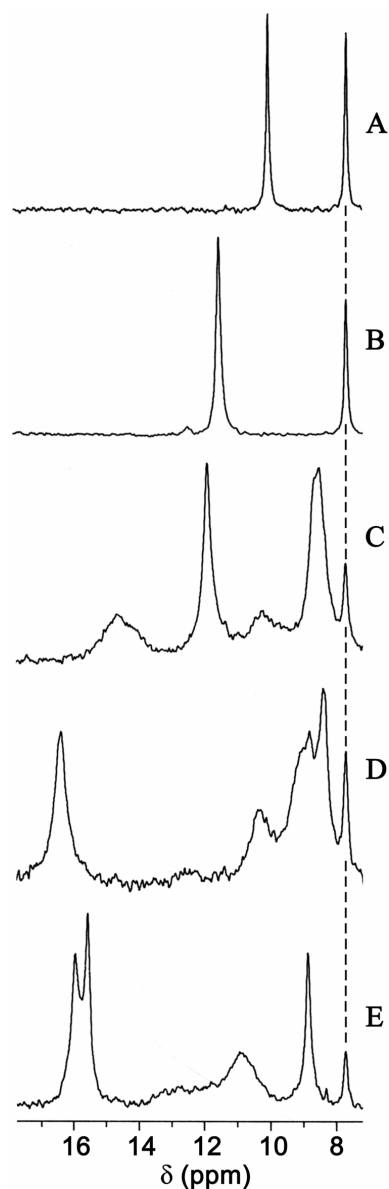


Abb. 4.6: Vergleich der ^{19}F NMR Spektren von 6-Trifluormethyl-7-oxo-8-ribityllumazin (Oxo) gebunden an: **A** Lumazin Protein aus *P. leiognathi* (0,39 mM; 0,25 mM Oxo); **B** rekombinante N-terminale Domäne der RS aus *E. coli* (1,6 mM; 0,98 mM Oxo); **C** RS aus *E. coli* (1,12 mM; 1,43 mM Oxo); **D** RS aus *B. subtilis* (0,30 mM; 0,75 mM Oxo); **E** RS aus *S. pombe* (0,84 mM; 1,22 mM Oxo). Alle Proben enthielten 20 mM Phosphat Puffer, 100 mM KCl und 10% D_2O bei pH 7. Die Signale des freien Liganden sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet. Die Spektren wurden mit einer Linienverbreiterung von 20 Hz transformiert.

Die Spektren aus *B. subtilis* (C) und *E. coli* (D) zeigen eine ähnliche Signalmultiplizität. Aber die chemischen Verschiebungen und Linienbreiten unterscheiden sich deutlich.

Aber im Unterschied dazu zeigen die Komplexe des Monotrifluormethylderivates mit LumazinProtein aus *P. leiognathi* (A) und die artifizielle c_2 symmetrische N-terminale Domäne der *E. coli* RS (B) nur einzelne und deutlich schärfere Signale für den proteingebundenen Liganden. Diese Ergebnisse zeigen, dass 6-Trifluormethyl-7-oxo-8-ribityllumazin (Oxo) an allen untersuchten RS in mehreren deutlich unterschiedlichen Zuständen bindet, während es nur einen einzigen gebundenen Zustand im LumazinProtein und in der artifiziellen N-terminalen Domäne gibt.

Mit dem Fluorliganden 6,7-Bis(trifluormethyl)-8-ribityllumazin (Epimer A) ist eine ähnliche Reihe an Experimenten durchgeführt worden. Die RS aus *S. pombe* bindet nur das Epimer A wie alle anderen bislang untersuchten RS (Cushman *et al.* 1991, Scheuring *et al.* 1993, 1994, Illarionov *et al.* 2001).

In Abbildung 4.7 sind die ^{19}F NMR Spektren von Epimer A gebunden an LumazinProtein aus *P. leiognathi* (A) sowie an die homodimere N-terminale Domäne der *E. coli* RS (B) zu sehen. Hier ist für jede gebundene Trifluormethylgruppe nur jeweils ein relativ scharfes Signal im Spektrum zu sehen. Wesentlich komplizierter zeigen sich die Spektren dagegen der RS aus *B. subtilis*, *E. coli* und *S. pombe* (C-E).

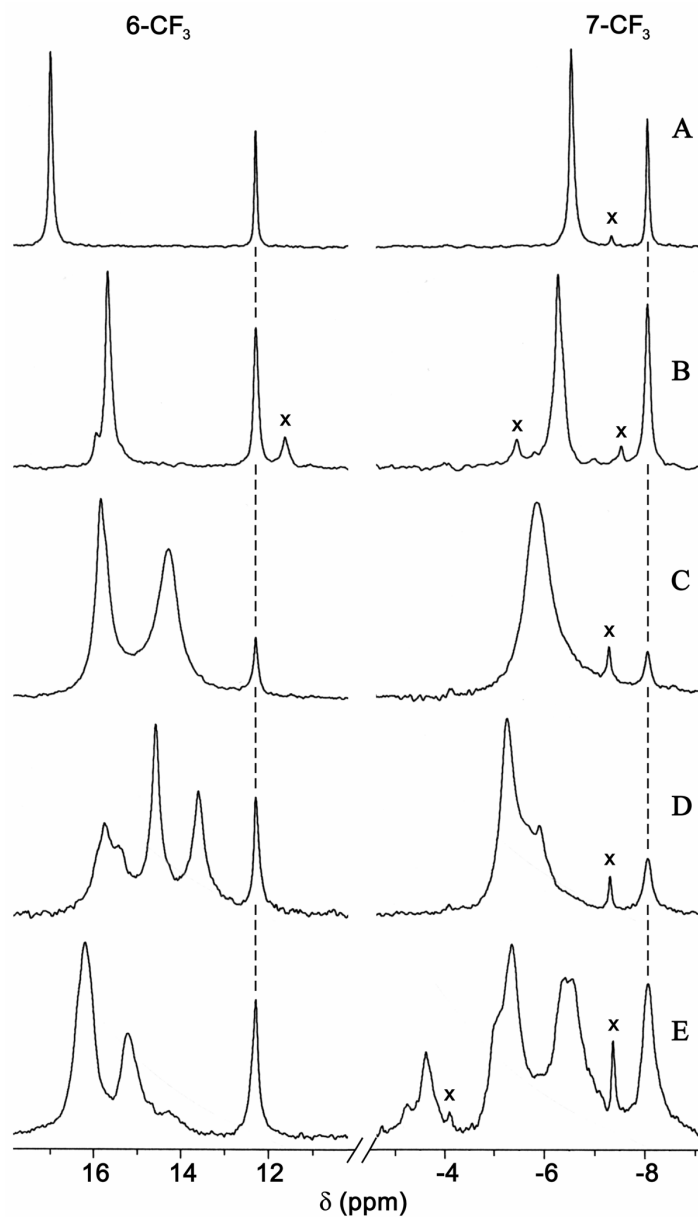


Abb. 4.7: Vergleich der ^{19}F NMR Spektren von 6,7-Bis(trifluormethyl)-8-ribityllumazin (Epimer A) gebunden an: **A** Lumazin Protein aus *P. leiognathi* (0,42 mM; 0,23 mM Epimer A); **B** rekombinante N-terminale Domäne der RS aus *E. coli* (1,5 mM; 0,56 mM Epimer A); **C** RS aus *E. coli* (1,5 mM; 3,34 mM Epimer A); **D** RS aus *B. subtilis* (0,40 mM; 0,41 mM Epimer A); **E** RS aus *S. pombe* (0,77 mM; 0,60 mM Epimer A). Alle Proben enthielten 20 mM Phosphat Puffer, 100 mM KCl und 10% D_2O bei pH 7. Die Signale des freien Liganden sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet. Die Spektren wurden mit einer Linienverbreiterung von 20 Hz transformiert.

Es sind multiple Signale des Protein gebundenen Liganden vorhanden, aber das Aufspaltungsmuster variiert für die verschiedenen Orthologen ausgesprochen. Besonders für die RS aus *S. pombe* ist ein vergleichsweise komplexeres Aufspaltungsmuster zu beobachten. Für die 7-Trifluormethylgruppe sind 3 Signale im Spektrum vorhanden (-3,6 ppm; -5,3 ppm; -6,5 ppm) und 2 Signale für 6-Trifluormethylgruppe zu erkennen (16,2 ppm und 15,2 ppm).

Die Signale des freien Epimer A erscheinen sind 80-100 Hz verbreitert, die Signale des gebundenen Liganden in den verschiedenen Zuständen hingegen mit einer Linienbreite von 170-300 Hz.

In früheren ^{19}F Protein Perturbationsstudien mit einer Reihe von *E. coli* Mutanten der RS waren allerdings keine Mutanten möglich, die den konservierten Rest Cys48 durch andere Aminosäuren ersetzen, denn dieses Cys48 ist in unmittelbarer Nähe des gebundenen Riboflavins in dem artifiziellen N-terminalen Domänendimer und eine katalytische Rolle für diesen Rest wurde vermutet (Truffault *et al.* 2001).

In dieser Arbeit gelang es nun mit der RS aus *S. pombe* lösliche Cys48-Mutanten zu exprimieren. Der Cys48-Rest wurde durch Alanin, Serin und Methionin ersetzt. Ebenfalls wurden Mutanten mit dem topologisch equivalenten S146-Rest in der C-terminalen Domäne exprimiert.

LumazinProteine sind Paraloge der RS, welche in biolumineszenten marinen Bakterien vorkommen. Sie dienen als optische Transponder, welche die Energie von bakterieller Luziferase durch Förstertransfer absorbieren; und induzieren durch Verstärken des Lumineszenzquantenfeldes sowie durch Modulation die Emissionsfrequenz (Gast *et al.* 1978, O'Kane *et al.* 1985). Im Gegensatz zu der trimeren RS, welche bis zu sechs Substratmoleküle binden kann, bindet LumazinProtein als Monomer nur ein Molekül 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin. Obwohl sie die Zwei-Domänen Architektur der RS-Untereinheit teilen, scheint, dass nur eine Domäne in der Ligandenbindung beteiligt ist. Bemerkenswert ist, dass alle RS sowie das LumazinProtein streng stereoselektiv sind und nur Epimer A binden nicht aber Epimer B, welches das Diastereomere 6,7 Bis(trifluoromethyl)-8-ribityllumazin Hydrat ist.

Weniger überraschend ist, dass nur ein einzelnes ^{19}F NMR Signal für jede Trifluormethyl-Gruppe der gebundenen fluorsubstituierten Liganden mit

LumazinProtein zu beobachten ist (Abbildung 4.6a u 4.7a), ähnlich wie das C2-symmetrische Dimer der artifiziellen N-terminalen Domäne der RS (Abbildung 4.6b und 4.7b). Da beide Domänen der RS Liganden binden können, würde man verschiedene Sets von Signalen des gebundenen Liganden für jede Domäne erwarten, in den Abbildungen 4.6c-e und 4.7c-e zeigen alle RS multiple Signale für jeden Liganden. Außerdem hängt das Signalmuster vom Protein/Ligand-Verhältnis in Lösung in unerwarteter Weise ab. Dies ist in Abbildung 3.11 durch die Titration der Wildtyp RS aus *S. pombe* mit dem Fluorliganden Oxo dargestellt.

Die Titration zeigt die komplexe Interaktion des Proteins mit dem Liganden. Das Protein/Ligand-Verhältnis beeinflusst nicht nur die Intensitäten und Linienbreiten der verschiedenen Banden, sondern auch die chemischen Verschiebungen einzelner Signale.

Das Ersetzen der Aminosäuren in der C-terminalen und N-terminalen Domäne Bindungsstelle (siehe Abbildungen 3.12 und 3.13) beeinflusst fast alle Signale, die dem gebundenen Liganden zugeordnet werden können. Es folgt daraus, dass die RS in Lösung keine C3-Symmetrie besitzt. Diese Asymmetrie wird auch durch die Röntgenstruktur der *E. coli* RS (Liao *et al.* 2001) gezeigt, und ist nicht nur auf Grund der Kristallkontakte so.

Reaktionsmechanismus der Riboflavinsynthese aus den Ergebnissen der ¹⁹F-NMR-Experimente

Basierend auf den NMR-Titrationsexperimenten mit der RS und deren Mutanten der *S. pombe* mit den beiden Fluorlumazinen Oxo und Epimer A konnten Schlussfolgerungen über den Mechanismus gemacht werden und mit Hilfe der Spektren der orthologen RS, sowie dem LumazinProtein aus *P. leiognathi* und der N-terminalen/C-terminalen Domänen eine Zuordnung der Signale gemacht werden.

Der Vergleich der Spektren in Abbildung 3.12 lassen vermuten, dass die ¹⁹F-Signale, welche Tieffeld verschoben sind, Ligandenmoleküle repräsentieren, die an die N-terminale Domäne gebunden sind und deshalb sind sie vorherrschend beeinflusst durch die Modifikationen von Cys48. Wohingegen die Hochfeld verschobenen Signale die Ligandenmoleküle repräsentieren, die an die C-terminale

Domäne gebunden sind und durch Modifikationen an Ser146 besonders anfällig sind.

Die Röntgenstruktur der *E. coli* RS lässt die Vermutung zu, dass ein direkter Kontakt nur zwischen den Ligandenbindungsstellen der einen N-terminalen Domäne und der C-terminalen Domäne der benachbarten Untereinheit besteht. Die Ligandenbindungsstellen von zwei C-terminalen und zwei N-terminalen Domänen sind dagegen solventexponiert und nicht zu einer benachbarten Proteinuntereinheit. Da einige Studien zeigten, dass die RS bestimmte Liganden in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:6 binden kann (Illarionov *et al.* 2001, Cushman *et al.* 1992 und Otto *et al.* 1981), wird vermutet, dass jede N-terminale und C-terminale Domäne an der Ligandenbindung teilnehmen kann.

Kleinen Modifikationen in der N-terminalen und C-terminalen Domäne haben Auswirkungen auf die ^{19}F -Signatur des gebundenen Liganden, so dass angenommen werden kann, dass das Paar der N-terminalen und C-terminalen Domäne im direkten Kontakt, wie in der Kristallstruktur beobachtet, nicht permanent assoziiert ist, sondern die Domänen von verschiedenen Untereinheiten zeitweise eine besondere Beziehung durch große Domänenbewegungen einnehmen. Dieses dynamische Modell würde die große Variation der Linienbreiten, die für die viele verschiedenen Protein gebundenen Zustände gefunden wurde, erklären, sowie die unerwartete Abhängigkeit der ^{19}F -Spektren von dem molaren Verhältnis, von Protein und Ligand (siehe Abbildung 3.11). Die Beobachtungen der Proteindynamik sind relevant für den Reaktionsmechanismus. Denkbar wäre eine Beladung der Ligandenbindungsstellen der N- und C-terminalen Domänen mit Substrat, während sie in keinem physikalischen Kontakt zueinander stehen. Für die Dismutationsreaktion formen die Domänen einen lokalen N-/C-terminalen Domänen-Komplex, indem sich das gesamte Protein bewegt. Die Produkte können abgeladen werden, nachdem sich das Domänenpaar durch größere Proteinbewegungen wieder getrennt hat und sich Kontakte zwischen den anderen Domänen bilden können, die wiederum in der Produktbildung resultieren, so dass alle sechs Domänen an der Dismutationsreaktion beteiligt sind, allerdings zu verschiedenen Zeiten. Die durch die Riboflavinsynthase katalysierte Reaktion ereignet sich innerhalb von Sekunden mit einer Umsatzzahl von 11 min^{-1} pro Trimer.

4.2 Riboflavinsynthase aus *M. jannaschii*

Die RS aus *M. jannaschii* fällt aus dem bislang bekannten Bild der RS aus Hefen und Eubakterien. Schon die geringe Aminosäuresequenzhomologie von ca. 10 % zu den RS aus Hefen und Eubakterien ergab erste Hinweise darauf, sowie auch die fehlende Eigenschaft interner Sequenzhomologie, durch die die RS gekennzeichnet sind. Es ist daher keine offensichtliche topologisch equivalente Domänenfaltung vorhanden. Mit 156 Aminosäuren ist die RS aus *M. jannaschii* im Durchschnitt auch um ca. 50 Aminosäuren kürzer. Weiter auffällig war die farblose Lösung der gereinigten RS aus *M. jannaschii* im Gegensatz zu den unterschiedlich intensiv gefärbten Lösungen der gereinigten RS aus *S. pombe* und *E. coli* sowie deren Mutanten. Durch Gelfiltrations-, Sedimentationsgleichgewichtsexperimente und die Raumgruppe der Kristalle von Wildtyp und der P46S-Punktmutante konnte eindeutig belegt werden, dass die RS aus *M. jannaschii* im Gegensatz zu denen aus Hefen und Eubakterien ein Homopentamer ist und kein Homotrimer. Außerdem konnte eine Abhängigkeit der katalytischen Aktivität der RS aus *M. jannaschii* von zweiwertigen Ionen beobachtet werden, Mn^{2+} , Mg^{2+} und Ca^{2+} sind in absteigender Reihenfolge besonders gut geeignet, dagegen ist kaum bzw. keine Aktivität mit Co^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} zu finden. Bei den bislang bekannten RS aus Hefen und Eubakterien ist diese Abhängigkeit nicht vorhanden, sie sind sogar in Anwesenheit von Chelatoren wie EDTA aktiv. Ebenfalls eine Abhängigkeit von zweiwertigen Metallionen (Mg^{2+}) konnte auch schon bei der RS aus *M. thermoautotrophicum* beobachtet werden (Eberhardt *et al.* 1997). Die 66%ige Aminosäuresequenzähnlichkeit dieser beiden Vertreter aus dem Zweig der Archaea ist ein Ausdruck für ihre biochemische Gemeinsamkeit. Es ist anzunehmen, dass sich die RS aus den Methanobakterien unabhängig von denen der Eubakterien entwickelten.

Die photometrisch gemessene Riboflavinbildung bei 40°C kann ebenfalls wie die RS aus *S. pombe* mit der Hill-Funktion angepasst werden. Auch in diesem Fall ist eine positive Kooperativität zu beobachten. Kaum einen Einfluss hat die Punktmutation P46S auf die katalytische Aktivität im Vergleich zur Wildtyp RS aus *M. jannaschii*. Die maximale Geschwindigkeit liegt bei $24 \pm 0,8 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ für

die Wildtyp RS und nur geringfügig langsamer mit $19 \pm 0,8 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ist die Punktmutante P46S. Der Hillkoeffizient ist mit $2,3 \pm 0,2$ nahezu identisch zum Wildtyp von $2,1 \pm 0,1$. Die rekombinant exprimierte RS aus *M. thermoautotrophicum* hat eine spezifische Aktivität von $32 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ bei einer Temperatur von 65°C , also unmerklich höher als bei Wildtyp RS *M. jannaschii*, wobei zu bemerken ist, dass diese Werte bei unterschiedlichen Temperaturen gemessen wurden. Die RS aus *M. jannaschii* hat ein Temperaturoptimum bei ca. 50°C , im Vergleich zur P46S-Mutante von ca. 40°C . Bei einer Temperatur von 65°C allerdings ist nur noch etwa die Hälfte bzw. ein Fünftel der spezifischen Aktivität vorhanden.

Eberhardt *et al.* (1997) untersuchten aufgrund der geringen spezifischen Aktivität, ob das 5'Phosphat von 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin als Substrat für die RS aus *M. thermoautotrophicum* dient, dabei sollte sich statt Riboflavin das Flavinmononukleotid bilden, doch es konnte gezeigt werden, dass das 5'Phosphat kein Substrat für die RS aus *M. thermoautotrophicum* ist.

Bei der Recherche in den Proteindatenbanken konnten keine explizit charakterisierten Flavokinasen oder auch FAD-Synthetasen für *M. jannaschii* gefunden werden, wie auch für andere Vertreter der Archaea. Diese Tatsache wie auch die Abhängigkeit der spezifischen Aktivität von Mg^{2+} und die Anwesenheit von ATP in der Kristallisationsbedingung veranlassten zur Vermutung, dass möglicherweise eine Kinaseaktivität vorhanden sein könnte. Die Aminosäuresequenzhomologie zur monofunktionellen Flavokinase aus *S. pombe* beträgt 13,4 % und liegt damit nur geringfügig höher als bei der RS aus *S. pombe* im Vergleich mit 10 %. Von der Anzahl der Aminosäuren ist die Flavokinase aus *S. pombe* mit 163 nur 7 Aminosäuren länger als die RS aus *M. jannaschii*. Erst vor kurzem konnte die Röntgenstruktur der Flavokinase aus *S. pombe* gelöst werden (Bauer *et al.* 2003), so dass die beteiligten Aminosäuren im aktiven Zentrum für die FMN- und ATP-Bindung charakterisiert werden konnten.

Nur in Anwesenheit von 2 mM ATP und Mg^{2+} konnte mittels HPLC nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 40°C die Bildung von FMN für die Wildtyp RS aus *M. jannaschii* sowie für die Punktmutante P46S detektiert werden. Als Substrat dienen sowohl 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin als auch Riboflavin. Im Verlauf der

Reinigung der RS aus dem Rohextrakt sinkt die FMN-Bildung auf ca. 10 % Restaktivität ab. Im Gegensatz dazu konnte bei den gereinigten RS aus *S. pombe* und *E. coli* keine Bildung von FMN durch Zugabe von Mg^{2+} und ATP beobachtet werden. Die beobachtete Flavokinaseaktivität konnte durch die Konstruktion eines Fusionsproteins, welches über zwei Affinitätschromatographien gereinigt wurde, nicht bestätigt werden. Die Flavokinaseaktivität konnte im Durchlauf bei der ersten Säulenreinigung über die Amylosesäule gefunden werden und eindeutig von der RS aus *M. jannaschii* abgetrennt werden.

Bislang ist es noch nicht gelungen die Kristallstruktur der RS aus *M. jannaschii* zu lösen. Verschiedene Versuche ergaben Kristalle, die eine Streuleistung von bis zu 2,3 Å am Plattenrand hatten. Aufgrund der geringen Aminosäuresequenzhomologie zu den bislang aufgeklärten RS aus *S. pombe* und *E. coli* war ein molekularer Ersatz nicht möglich. Metall-„Soaks“ ergaben keine Derivate, so dass keine Phasenverschiebung möglich war. Experimente mit Selenomethionin-markiertem Protein ergaben bis zu dem heutigen Tage keine ausreichend großen Kristalle.

Mit dem Homopentamer und der fehlenden internen Aminosäuresequenzhomologie sind entscheidende Elemente des bisher diskutierten Reaktionsmechanismus der RS aus Hefen und Eubakterien nicht vorhanden.

4.3 Dihydronepterin Aldolase aus *A. thaliana*

Strukturvergleich der Dihydronepterin Aldolase aus *A. thaliana* und *S. aureus*

Die Struktur der Pflanzen-Aldolase ähnelt sehr der von dem pathogenen Organismus *S. aureus*. In der folgenden Abbildung 4.8 ist das Struktur-Sequenzvergleich dieser beiden Aldolasen dargestellt.

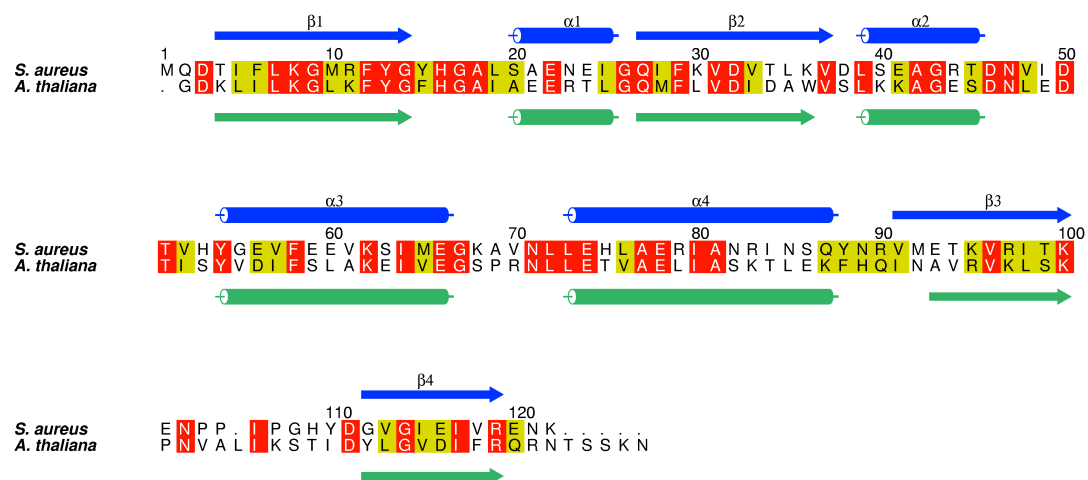


Abb. 4.8: Strukturvergleich der Dihydronepterin Aldolase aus *S. aureus* und *A. thaliana*. Die Strukturelemente sind für *S. aureus* in blau, für *A. thaliana* in grün eingezeichnet. Die identische Reste sind in rot, die ähnlichen in gelb dargestellt. Die Nummerierung der Aminosäuren bezieht sich auf die Dihydronepterin Aldolase aus *S. aureus*.

In der folgenden Stereodarstellung ist die Überlagerung beider Aldolasen abgebildet.

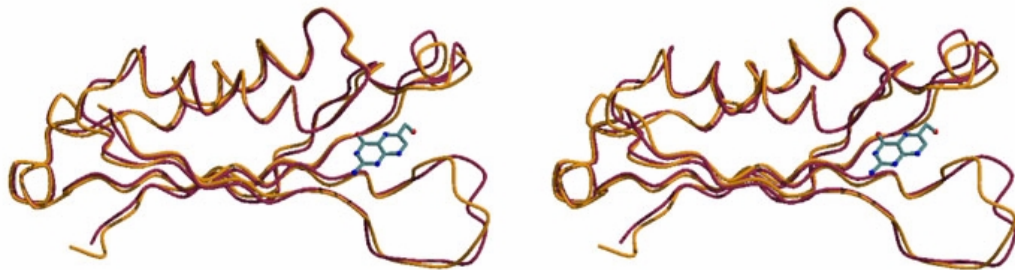


Abb. 4.9: Stereodarstellung der Überlagerung der Dihydroneopterin Aldolase aus *S. aureus* (blau) und *A. thaliana* (gelb). Im aktiven Zentrum ist der Pterinring in Kugel-und-Stab-Form eingezeichnet.

Die Sequenzähnlichkeit der beiden Dihydroneopterin Aldolasen aus *S. aureus* und *A. thaliana* liegt bei 36%. Es ist deutlich zu erkennen, dass kaum strukturelle Unterschiede vorhanden sind.

In Übereinstimmung mit dem vorgeschlagenen Reaktionsmechanismus von *S. aureus* DHNA (Hennig *et al.* 1998) ist die initiale Formation die Bildung eines Iminium-Komplexes, welcher die N5 protonierte Spezies von 7,8-Dihydroneopterin Aldolase erfordert und einen ionisierbaren Rest wie Asp oder Glu im aktiven Zentrum benachbart zu dem N5-Atom. Da kein solcher Rest hier gefunden werden konnte, wird vermutet, dass das Proton durch ein gebundenes Wassermolekül zum N5 weitergeleitet wird. Im aktiven Zentrum für die Bildung des initialen Iminium-Komplexes ist ein optimiertes Wasserstoffbrücken-Netzwerk vorhanden. Dafür ist an N5 von 7,8-Dihydroneopterin ein Proton erforderlich. Der von N5 für 7,8-Dihydroneopterin ist, wenn 7,8-Dihydrofolat gebunden, um 2.5 genau wie für 7,8-Dihydrobiopterin und 7,8-Dihydrofolat. Bei der DHFR gibt es einen pK_a Schift um 4 Einheiten (bedingt durch die Interaktionen mit den Proteinseitenketten) auf 6.5, was auch für 7,8-Dihydroneopterin vorstellbar ist. Bei der Beteiligung des protonierten N5 in der Reaktion wird weiter vermutet, dass weder das Neopterin noch das Tetrahydroneopterin als Substrat eingesetzt werden kann, da

Tetrahydroneopterin kein Imin enthält welches für die Reaktion notwendig wäre, die aromatische Natur des Neopterin würde das Imin durch die Delokalisation deaktivieren würde (Hennig *et al.* 1998). Mathis und Brown vermuteten, dass das Proton von der β -Hydroxygruppe einer allgemeinen Base abstrahiert wurde mit einem Rearrangement zu einem Enaminderivat (Mathis *et al.* 1980). Aber die Kristallstruktur des binären Komplexes lässt vermuten, dass Lys100 in der richtigen Position ist, um als Base zu agieren. Die essentielle Rolle von Lys100 konnte durch Mutagenese (K100A) gezeigt werden, wodurch die komplette Aktivität verloren ging, sowie die Fähigkeit Substrat zu binden (Hennig *et al.* 1998).

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Expression, Reinigung und röntgenkristallographische Untersuchung von Enzymen der Riboflavin- und Folsäurebiosynthese. Hemmstoffe für Enzyme dieser Biosynthesen könnten eine wichtige Rolle als potentielle Protein-Targets bei der Entwicklung neuer Wirkstoffe für die antimikrobielle Chemotherapie spielen, da zahlreiche humanpathogene Mikroorganismen z.B. auf die endogene Riboflavinbildung angewiesen sind. Durch strukturelle Kenntnisse und biochemische Charakterisierung der reaktiven Zentren können die Stoffwechselwege detaillierter beschrieben und der Reaktionsmechanismus aufgeklärt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen die Riboflavinsynthase (RS) aus *S. pombe* und die Dihydroneopterin Aldolase (DHNA) aus *A. thaliana* zu kristallisieren und somit die Grundlage zu deren Strukturanalyse zu legen. Des Weiteren konnte der Reaktionsmechanismus mit Hilfe von ^{19}F -NMR-Untersuchungen an Wildtyp RS und entsprechenden Mutanten genau charakterisiert werden.

Riboflavinsynthase aus *S. pombe*

Das *rib5*-Gen wurde aus der cDNA von *S. pombe* gewonnen und in *E. coli* überexprimiert. Das 627bp Fragment kodiert für ein Protein von 208 Aminosäuren mit einer Masse von 22,861 kDa, die mittels MALDI-MS-Bestimmung bestätigt werden konnte. Die N-terminale Aminosäuresequenzanalyse der ersten 20 Aminosäuren identifizierte das Protein zu 100% als Wildtyp Riboflavinsynthase aus *S. pombe*. Die native RS aus *S. pombe* sedimentiert als eine symmetrische Grenzschicht mit einer Sedimentationsgeschwindigkeit von $s_{20} = 4,0$ S. Sedimentationsgleichgewichtsläufe der RS aus *S. pombe* mit und ohne des substratanaloge 6-Carboxyethyl-7-oxo-8-ribityllumazin (CEOL) ergaben keine Zerstörung der nativen Struktur durch CEOL und sedimentierten als Trimer.

Die Wildtyp RS aus *S. pombe* besitzt eine spezifische Aktivität von $158 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

Die gereinigte RS aus *S. pombe* wurde in Gegenwart des substratanalogen Inhibitors CEOL kristallisiert. Die dreidimensionale Struktur der RS aus *S. pombe* konnte

durch Multiple Anomale Dispersion (MAD) an einem Hg-Schweratomderivatkristall in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Strukturforschung des Max-Planck-Institutes gelöst werden. Abweichend von der nativen trimeren Struktur der RS wurde das Enzym in den Kristallbedingungen als ein Monomer identifiziert. Diese erste Aufklärung einer RS-Komplexstruktur mit Liganden liefert genauere Informationen über die Substratbindungsstelle der RS aus *S. pombe*. Das pentazyklische Substratdimer (Illarionov et al. 2001) konnte durch Strukturvergleich in das postulierte aktive Zentrum der RS aus *S. pombe* gemodelliert werden und die strukturelle Grundlage für die Aufklärung eines Reaktionsmechanismus geben. Nach enzymatischer Trennung des Intermediates wird Riboflavin in der N-terminalen Domäne gebildet und das Pyrimidindion durch die C-terminalen Domäne als Substrat wieder freigesetzt somit fungiert das N-terminal gebundene Lumazin als C4-Akzeptor und das Lumazin, welches an die C-terminale Domäne bindet als C4-Donor.

¹⁹F-NMR-Titrationsexperimente wurden mit der Wildtyp RS aus *S. pombe* und verschiedenen Mutanten mit den Fluorliganden 6-Trifluoromethyl-7-oxo-8-ribityllumazin und 6,7-Bis(trifluoromethyl)-8-ribityllumazinhydrat (Epimer A) durchgeführt. Die ¹⁹F-NMR-Untersuchungen zeigen, dass die Bindungsstellen der homotrimeren RS aus *S. pombe* topologisch nicht äquivalent sind. Durch Veränderung der Konzentrationsverhältnisse von Protein/Ligand ergeben sich unterschiedliche Intensitäten und chemische Verschiebungen während der Titration, dadurch zeigt sich die starke Komplexität der Protein/Ligand Wechselwirkungen und belegt sehr deutlich die Dynamik, die hinter dieser Reaktion steckt. Im Vergleich zu anderen RS aus Eubakterien konnte mit der RS aus *S. pombe* ein vergleichsweise komplexeres Aufspaltungsmuster beobachtet werden. Mit dem Fluorliganden 6-Trifluoromethyl-7-oxo-8-ribityllumazin wurden mindestens vier unterschiedliche Bindungszustände gefunden. Für die Dismutationsreaktion formen die Domänen einen lokalen C-N-terminalen-Domänen-Komplex, in dem sich das ganze Protein bewegt. Alle sechs Domänen sind an der Dismutationsreaktion beteiligt sind, allerdings zu verschiedenen Zeiten.

Die detaillierte strukturelle und biochemische Charakterisierung des Reaktionsmechanismus kann zu neuen aufschlussreichen Einblicken für die Entwicklung von Mechanismus-basierenden Enzyminhibitoren, die für die therapeutische Applikation entwickelt werden, führen. Die Pseudo-C2-Symmetrie des aktiven Zentrums erlaubt das Design von Inhibitoren, die die Donor- und Akzeptor-Domänen mit einem einzelnen Inhibitor verbinden, eine neue Strategie für die Inhibitorentwicklung.

Riboflavinsynthase aus *M. jannaschii*

Die RS aus *M. jannaschii* stellt mit einer geringen Aminosäuresequenzhomologie von ca. 10% zu den Vertretern der Hefen und Eubakterien einen anders gearteten Typ der RS dar. Sequenzvergleiche ergaben keine offensichtlich topologisch äquivalente interne Domänenfaltung. Die RS aus *M. jannaschii* wurde in *E. coli* überexprimiert und konnte zur Homogenität gereinigt werden. Mit 156 Aminosäuren ist die Sequenz im Vergleich zu den RSen aus Hefe und Eubakterien deutlich kürzer. Das berechnete Molekulargewicht beträgt 17,494 kDa pro Untereinheit. Durch Sedimentationsgleichgewichtsexperimente belegten eindeutig, dass die RS aus *M. jannaschii* im Gegensatz zu denen aus Hefen und Eubakterien ein Homopentamer ist. Die RS aus *M. jannaschii* besitzt eine spezifische Aktivität von 24 nmol mg⁻¹ min⁻¹ und einen Hill-Koeffizienten von 2,1 und ist damit wesentlich weniger aktiv als die RS aus Hefen und Eubakterien und benötigt zweiwertige Metallkationen wie Mg²⁺. Durch Zugabe von ATP konnte mittels HPLC die Bildung von FMN beobachtet werden, was auf eine Kinaseaktivität hindeutete, die sich aber durch gezielte Reinigung über zwei Affinitätschromatographien mittels eines Fusionskonstruktes nicht bestätigte. Erste röntgenkristallographische Untersuchungen an Kristallen der Bedingung 40% (v/v) MPD, 0,1 M HEPES, pH 7,0, ergaben eine gute Streuleistung von bis zu 2,3 Å. Versuche zur Strukturlösung der RS aus *M. jannaschii* werden weiterführend in Zusammenarbeit mit dem Max-Planck-Institut, Abteilung Strukturforschung verfolgt.

Dihydroneopterin Aldolase aus *A. thaliana*

In der Datenbank konnten drei Isoformen der Dihydroneopterin Aldolase (DHNA) aus *A. thaliana* gefunden werden, die sich in den Leadersequenzen unterscheiden.

7,8-Dihydroneopterin Aldolase katalysiert die Formation des Tetrahydrofolat-Vorläufers, 6-Hydroxymethyl-7,8-dihydropterin und ist ein potentielles Target für antimikrobielle Chemotherapie. Es wurden zwei Isoformen der Dihydroneopterin Aldolase aus *A. thaliana* in *E. coli* überexprimiert und zur Homogenität aufgereinigt. Bei beiden Isoformen der DHNA konnte zusätzlich zur katalytischen Aktivität eine auffällige Epimerase-Aktivität nachgewiesen werden. Gelfiltrationsexperimente ergaben ein natives Molekulargewicht von ca. 110 kDa, welches einem Homooktamer entspricht. Durch Röntgenkristallographische Untersuchungen an Kristallen der Bedingung 0,1 M Tris/HCl, pH 7,2, 21% PEG 2000 MME und 115 mM C-HEGA-11 konnte die Kristallstruktur bei einer Auflösung von 2,2 Å gelöst werden und damit erstmalig die Kristallstruktur einer pflanzlichen Dihydroneopterin Aldolase beschrieben werden.

Die DHNA formt ein Oligomer mit acht identischen Untereinheiten. Vier Monomere sind zu einem Ring arrangiert und bilden mit einem benachbarten Ring einen Zylinder. Ein in der Struktur gebundener Pterinring in allen Untereinheiten identifiziert die Lokalisierung des aktiven Zentrums im Zwischraum zwei benachbarten Untereinheiten.

Veröffentlichungen, die Teile dieser Arbeit beinhalten:

Gerhardt, S., Schott, A. K., Kairies, N., Cushman, M., Illarionov, B., Eisenreich, W., Bacher, A., Huber, R., Steinbacher, S., und Fischer, M. (2002). Studies on the reaction mechanism of riboflavin synthase: X-ray crystal structure of a complex with 6-carboxyethyl-7-oxo-8-ribityllumazine. *Structure* **10**, 1371-81.

Markus Fischer, Ann-Kathrin Schott, Kristina Kemter, Richard Feicht, Gerald Richter, Boris Illarionov, Wolfgang Eisenreich, Stefan Gerhardt, Mark Cushman, Robert Huber und Adelbert Bacher. Riboflavin synthase of *Schizosaccharomyces pombe* Protein Dynamics revealed by ¹⁹F NMR Protein Perturbations Experiments, *eingereicht*.

S. Gerhardt, S. Steinbacher, N. Kairies, R. Huber, A.-K. Schott, B. Illarionov, W. Eisenreich, A. Bacher, M. Fischer, Mark Cushman. The crystal structure of riboflavin synthase of *Schizosaccharomyces pombe* in complex with 6-carboxyethyl-7-oxo-8-ribityllumazine reveals insights into the reaction mechanism. *Flavins and Flavoproteins* (S. Chapman, R. Perham, N. Scrutton, Eds.), Rudolf Weber Verlag, Berlin, 2002, pp. 45-50.

M. Fischer, A.-K. Schott, K. Kemter, R. Feicht, G. Richter, B. Illarionov, W. Eisenreich, A. Bacher, S. Gerhardt, S. Steinbacher, R. Huber, M. Cushman. ¹⁹F NMR ligand perturbation studies on the riboflavin synthase of *Schizosaccharomyces pombe*. *Flavins and Flavoproteins* (S. Chapman, R. Perham, N. Scrutton, Eds.), Rudolf Weber Verlag, Berlin, 2002, pp. 161-166.

6 Literatur

- Achari, A., Somers, D. O., Champness, J. N., Bryant, P. K., Rosemond, J., und Stammers, D. K. (1997). Crystal structure of the anti-bacterial sulfonamide drug target dihydropteroate synthase. *Nat Struct Biol* **4**, 490-7.
- Aaronson, S. und Rodriguez, E. (1958). Relationship between purines and folic acid-vitamins in the micrococcus. *J. Bacteriol.* **75**, 660-665.
- Bacher, A. (1991a). Biosynthesis of flavins. *Chem. Biochem. Flavoenzymes* **1**, 215-259.
- Bacher, A. (1991b). Riboflavin kinase and FAD-synthetase. In Müller, F. (Hrsg.), *Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes*, CRC Press, Boca Raton, FL, **1**, 349-370.
- Bacher, A., Eberhardt, S., und Richter, G. (1996). Biosynthesis of riboflavin. In „Escherichia and Salmonella“ (F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham, K. B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter, and H. E. Umbarger, Eds.), Vol. 1, pp. 657-664, Washington, D.C.
- Bacher, A., Eberhardt, S., Eisenreich, W., Fischer, M., Herz, S., Illarionov, B., Kis, K., und Richter, G. (2001). Biosynthesis of riboflavin. *Vitamins and Hormones* **61**, 1-49.
- Bacher, A., Eberhardt, S., Fischer, M., Kis, K., und Richter, G. (2000). Biosynthesis of vitamin B2 (Riboflavin). *Annu. Rev. Nutr.* **20**, 153-167.
- Bacher, A., Eisenreich, W., Kis, K., Ladenstein, R., Richter, G., Scheuring, J., und Weinkauff, S. (1993). Biosynthesis of flavins. In “Bioorganic Chemistry Frontiers” (H. Dugas and F. P. Schmidtchen, Eds.), Vol. 3, pp. 147-192. Springer, Berlin.

- Bacher, A., Eisenreich, W., Kis, K., Ladenstein, R., Richter, G., Scheuring, J., and Weinkauff, S. (1993). Biosynthesis of flavins. *Bioorg. Chem. Front.* **3**, 147-192.
- Bacher, A., Le Van, Q., Buehler, M., Keller, P. J., and Floss, H. G. (1983). Biosynthesis of riboflavin. Origin of the xylene ring. *Chem. Biol. Pteridines, Proc. Int. Symp. Pteridines Folic Acid Deriv.: Chem., Biol. Clin. Aspects*, *7th*, 699-703.
- Bacher, A., Ludwig, H. C., Schnepfle, H., and Ben Shaul, Y. (1986). Heavy riboflavin synthase from *Bacillus subtilis*. Quaternary structure and reaggregation. *J. Mol. Biol.* **187**, 75-86.
- Bacher, A., Schnepfle, H., Mailaender, B., Otto, M. K., and Ben-Shaul, Y. (1980). Structure and function of the riboflavin synthase complex of *Bacillus subtilis*. *Flavins Flavoproteins, Proc. Int. Symp.*, *6th*, 579-86.
- Baldwin, T. O., Treat, M. L., and Daubner, S. C. (1990). Cloning and expression of the luxY gene from *Vibrio fischeri* strain Y-1 in *Escherichia coli* and complete amino acid sequence of the yellow fluorescent protein. *Biochemistry* **29**, 5509-15.
- Bauer, S., Kemter, K., Bacher, A., Huber, R., Fischer, M. und Steinbacher, S. (2003). Crystal Structure of *Schizosaccharomyces pombe* riboflavin kinase reveals a novel ATP and riboflavin binding folding. *J. Mol. Biol.*, in press.
- Beach, R. L., and Plaut, G. W. (1970a). Stereospecificity of the enzymatic synthesis of the o-xylene ring of riboflavin. *J. Am. Chem. Soc.* **92**, 2913-2916.
- Beach, R. L., and Plaut, G. W. (1970b). Investigations of structures of substituted lumazines by deuterium exchange and nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* **9**, 760-70.

- Beach, R., und Plaut, G. W. (1969). The formation of riboflavin from 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine in acid media. *Tetrahedron Lett* **40**, 3489-92.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Brown, G. M., und Reynolds, J. J. (1963). Biogenesis of the water-soluble vitamins. *Annu. Rev. Biochem.* **32**, 419-462.
- Brown, G. M., und Williamson, J. M. (1982). Biosynthesis of riboflavin, folic acid, thiamine, and pantothenic acid. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **53**, 345-81.
- Budisa, N., Steipe, B., Demange, P., Eckerskorn, C., Kellermann, J., und Huber, R. (1995). High-level biosynthetic substitution of methionine in proteins by its analogs 2-aminohexanoic acid, selenomethionine, telluromethionine and ethionine in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* **230**, 788-96.
- Bujard, H., Gentz, R., Lanzer, M., Stueber, D., Mueller, M., Ibrahim, I., Haeuptle, M. T., und Dobberstein, B. (1987). A T5 promoter-based transcription-translation system for the analysis of proteins in vitro and in vivo. *Methods Enzymol* **155**, 416-33.
- Bullock, W. O., Fernandez, J. M., und Short, J. M. (1987). XL-blue: a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with β -galactosidase selection. *BioTechniques* **5**, 376-379.
- Bult, C. J., White, O., Olsen, G. J., Zhou, L., Fleischmann, R. D., Sutton, G. G., Blake, J. A., FitzGerald, L. M., Clayton, R. A., Gocayne, J. D., Kerlavage, A. R., Dougherty, B. A., Tomb, J. F., Adams, M. D., Reich, C. I., Overbeek, R., Kirkness, E. F., Weinstock, K. G., Merrick, J. M., Glodek, A., Scott, J. L., Geoghagen, N. S., und Venter, J. C. (1996). Complete genome sequence

- of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science* **273**, 1058-73.
- Carter, C. W., Jr., und Carter, C. W. (1979). Protein crystallization using incomplete factorial experiments. *J Biol Chem* **254**, 12219-23.
- Cho, K. W., Colepicolo, P. und Hastings, J. W. (1989). Autoinduction and aldehyde chainlength effects on the bioluminescent emission from yellow protein associated with luciferase in *Vibrio fischeri* strain Y-1b. *Photochem. Photobiol* **50**, 671-677.
- Clackson, D. A., and Ward, W. R. (1991). Farm tracks, stockman's herding and lameness in dairy cattle. *Vet Rec* **129**, 511-2.
- Cohn, E. J., and Edsall, J. T. (1943). "Proteins, amino acids and peptides as ions and dipolar ions." Reinhold, New York.
- Compton, S. J., und Jones, C. G. (1985). Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal Biochem* **151**, 369-74.
- Cresswell, R. M., und Wood, H. C. S. (1960). The biosynthesis of pteridines. I. The synthesis of riboflavine. *J. Chem. Soc.*, 4768-4775.
- Cushman, M., Patel, H. H., Patrick, D. A., Bacher, A., und Schott, K. (1990). Synthesis of fluorinated 8-ribityllumazines as fluorine-19 NMR probes and potential inhibitors of the light riboflavin synthase of *Bacillus subtilis*. *Chem. Biol. Pteridines, 1989 Proc. Int. Symp. Pteridines Folic Acid Deriv., 9th*, 249-54.
- Cushman, M., Patrick, D. A., Bacher, A., und Scheuring, J. (1991). Synthesis of epimeric 6,7-bis(trifluoromethyl)-8-ribityllumazine hydrates. Stereoselective interaction with the light riboflavin synthase of *Bacillus subtilis*. *J. Org. Chem.* **56**, 4603-8.

- Cushman, M., Patel, H. H., Scheuring, J., und Bacher, A. (1992). Fluorine-19 NMR studies on the mechanism of riboflavin synthase. Synthesis of 6-(trifluoromethyl)-7-oxo-8-(D-ribityl)lumazine and 6-(trifluoromethyl)-7-methyl-8-(D-ribityl)lumazine. *J. Org. Chem.* **57**, 5630-43.
- Cushman, M., Patel, H. H., Scheuring, J., and Bacher, A. (1993). Fluorine-19 NMR studies of the mechanism of riboflavin synthase. Synthesis of 6-(trifluoromethyl)-8-(D-ribityl)lumazine and derivatives. *J. Org. Chem.* **58**, 4033-42.
- Daubner, S. C., Astorga, A. M., Leisman, G. B., und Baldwin, T. O. (1987). Yellow light emission of *Vibrio fischeri* strain Y-1: purification and characterization of the energy-accepting yellow fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 8912-6.
- De Saizieu, A., Vankan, P., und van Loon, A. P. (1995). Enzymic characterization of *Bacillus subtilis* GTP cyclohydrolase I. Evidence for a chemical dephosphorylation of dihydroneopterin triphosphate. *Biochem J* **306**, 371-7.
- Dennis, C., und Surridge, C. (2000). *Arabidopsis thaliana* genome. Introduction. *Nature* **408**, 791.
- Doublet, S. (1997). Preparation of selenomethionyl proteins for phase determination. *Methods Enzymol* **276**, 523-30.
- Dower, W. J., Miller, J. F., und Ragsdale, C. W. (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* **16**, 6127-45.
- Eberhardt, S., Korn, S., Lottspeich, F., und Bacher, A. (1997). Biosynthesis of riboflavin: an unusual riboflavin synthase of *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *J. Bacteriol.* **179**, 2938-43.

- Eberhardt, S., Richter, G., Gimbel, W., Werner, T., und Bacher, A. (1996). Cloning, sequencing, mapping and hyperexpression of the ribC gene coding for riboflavin synthase of *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* **242**, 712-9.
- Eberhardt, S., Zingler, N., Kemter, K., Richter, G., Cushman, M., und Bacher, A. (2001). Domain structure of riboflavin synthase. *Eur. J. Biochem.* **268**, 4315-4323.
- Förster, T. (1948). *Ann. Phys.* **2**, 55-75.
- Gast, R., Neering, I. R., und Lee, J. (1978). Separation of a blue fluorescence protein from bacterial luciferase. *Biochem Biophys Res Commun* **80**, 14-21.
- Gerhardt, S., Haase, I., Steinbacher, S., Kaiser, J. T., Cushman, M., Bacher, A., Huber, R., and Fischer, M. (2002). The structural basis of riboflavin binding to *Schizosaccharomyces pombe* 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase. *J. Mol. Biol.* **318**, 1317-1329.
- Gibson, Q. H., und Hastings, J. W. (1962). *Biochem. J.* **83**, 368-377.
- Goodwin, T. W. und Horten, A. A. (1961). Biosynthesis of riboflavin in cell-free systems. *Nature* **191**, 772-774.
- Green, J. M., Nicholis, B. P., und Matthews, R. G. (1996). Folate biosynthesis, reduction, and polyglutamylation. In: Neidhard, F. (Hrsg): *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molekular Biology, Vol. I, 2nd Edition. *American Society for Microbiology*, Washington D.C., 665-673.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformations of *Escherichia Coli* with plasmids.; *J.Mol.Biol.*, **166**, 557-580.
- Harvey, R. A., und Plaut, G. W. E. (1966). Riboflavin synthase from yeast: Properties of complexes of the enzyme with lumazine derivatives and riboflavin. *J. Biol. Chem.* **241**, 2120-2136.

- Hausmann, C., Richter, G., Rohdich, F., Bacher, A., Gomez-Ortiz, M., Gruneberg, S., Auerbach, G., Ploom, T., and Huber, R. (1997). Dihydroneopterin aldolase: properties and preliminary crystallographic analysis. *Chem. Biol. Pteridines Folates 1997, Proc. Int. Symp. Pteridines Folates*, 651-654.
- Hausmann, C., Rohdich, F., Schmidt, E., Bacher, A., and Richter, G. (1998). Biosynthesis of pteridines in *Escherichia coli*. Structural and mechanistic similarity of dihydroneopterin-triphosphate epimerase and dihydroneopterin aldolase. *J Biol Chem* **273**, 17418-24.
- Heine, M. C., and Brown, G. M. (1975). Enzymatic epimerization of D-erythro-dihydroneopterin triphosphate to L- threo-dihydroneopterin triphosphate. *Biochim Biophys Acta* **411**, 236-49.
- Hennig, M., D'Arcy, A., Hampele, I. C., Page, M. G., Oefner, C., and Dale, G. E. (1998). Crystal structure and reaction mechanism of 7,8-dihydroneopterin aldolase from *Staphylococcus aureus*. *Nat Struct Biol* **5**, 357-62.
- Illarionov, B., Illarionova, V., Lee, J., van Dongen, W., and Vervoort, J. (1994). Expression and properties of the recombinant lumazine (riboflavin) protein from *Photobacterium leiognathi*. *Biochim Biophys Acta* **1201**, 251-8.
- Illarionov, B., Eisenreich, W., and Bacher, A. (2001). A pentacyclic reaction intermediate of riboflavin synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 7224-7229.
- Illarionov, B., Kemter, K., Eberhardt, S., Richter, G., Cushman, M., and Bacher, A. (2001). Riboflavin synthase of *Escherichia coli*. Effect of single amino acid substitutions on reaction rate and ligand binding properties. *J. Biol. Chem.* **276**, 11524-11530.

- Illarionova, V., Eisenreich, W., Fischer, M., Haussmann, C., Romisch, W., Richter, G., und Bacher, A. (2002). Biosynthesis of tetrahydrofolate. Stereochemistry of dihydroneopterin aldolase. *J Biol Chem* **277**, 28841-7.
- Jancarik, J., Scott, W. G., Milligan, D. L., Koshland, D. E., Jr., und Kim, S. H. (1991). Crystallization and preliminary X-ray diffraction study of the ligand-binding domain of the bacterial chemotaxis-mediating aspartate receptor of *Salmonella typhimurium*. *J Mol Biol* **221**, 31-4.
- Kabsch, W. (1988). Automatic indexing of rotation diffraction pattern. *J. Appl. Cryst.*, **21**, 67-71.
- Koka, P. und Lee, J. (1979). Separation and structure of the prosthetic group of the blue fluorescence protein from the bioluminescent bacterium *Photobacterium phosphoreum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 3068-3072.
- Ladenstein, R., Meyer, B., Huber, R., Labischinski, H., Bartels, K., Bartunik, H. D., Bachmann, L., Ludwig, H. C., and Bacher, A. (1986). Heavy riboflavin synthase from *Bacillus subtilis*. Particle dimensions, crystal packing and molecular symmetry. *J. Mol. Biol.* **187**, 87-100.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Leahy, D. J., Hendrickson, W. A., Aukhil, I., and Erickson, H. P. (1992). Structure of a fibronectin type III domain from tenascin phased by MAD analysis of the selenomethionyl protein. *Science* **258**, 987-91.
- Lee, J. (1982). *Photochem. Photobiol.* **36**, 689-697.
- Lee, J. (1993). Lumazine protein and the excitation mechanism in bacterial bioluminescence. *Biophys Chem* **48**, 149-58.

-
- Laue, T. M., Shah, B. D., Ridgeway, T. M., and Pelletier, S. L. (1992). "Computer-aided interpretation of analytical sedimentation data for proteins."
- Lee, J., O'Kane, D. J., and Gibson, B. G. (1989). Bioluminescence spectral and fluorescence dynamics study of the interaction of lumazine protein with the intermediates of bacterial luciferase bioluminescence. *Biochemistry* **28**, 4263-71.
- Lee, J., O'Kane, D. J., and Gibson, B. G. (1989). Bioluminescence spectral and fluorescence dynamics study of the interaction of lumazine protein with the intermediates of bacterial luciferase bioluminescence. *Biochemistry* **28**, 4263-71.
- Liao, D. I., Wawrzak, Z., Calabrese, J. C., Viitanen, P. V., and Jordan, D. B. (2001). Crystal structure of riboflavin synthase. *Structure (Camb)* **9**, 399-408.
- Mathis, J. B., and Brown, G. M. (1970). The biosynthesis of folic acid. XI. Purification and properties of dihydroneopterin aldolase. *J Biol Chem* **245**, 3015-25.
- Mathis, J. B., and Brown, G. M. (1980). Dihydroneopterin aldolase from *Escherichia coli*. *Methods Enzymol* **66**, 556-60.
- Matthews, B. W. (1968). Solvent content of protein crystals. *J. Mol. Biol.* **33**, 491-497.
- McPherson, A. (1985). Crystallization of macromolecules: general principles. *Methods Enzymol* **114**, 112-20.
- McPherson, A. (1990). Current approaches to macromolecular crystallization. *Eur J Biochem* **189**, 1-23.
- McPherson, A., Jr. (1976). Crystallization of proteins from polyethylene glycol. *J Biol Chem* **251**, 6300-3.

- Meining, W., Tibbelin, G., Ladenstein, R., Eberhardt, S., Fischer, M., und Bacher, A. (1998). Evidence for local 32 symmetry in homotrimeric riboflavin synthase of *Escherichia coli*. *J Struct Biol* **121**, 53-60.
- Müller, F., Ghisla, S., Bacher, A. (1988). Vitamin B₂ und natürliche Flavine. In: *Isler, O. et al. (Hrsg.) Vitamine II; Wasserlösliche Vitamine, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 50-159.*
- Mullis, K. B., und Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**, 335-50.
- Nar, H., Huber, R., Meining, W., Schmid, C., Weinkauf, S., und Bacher, A. (1995). Atomic structure of GTP cyclohydrolase I. *Structure* **3**, 459-66.
- O'Kane, D. J. und Lee, J. (1985). *Biochemistry*, **24**, 1484-1488.
- Otto, M. K., und Bacher, A. (1981). Ligand-binding studies on light riboflavin synthase from *Bacillus subtilis*. *Eur J Biochem* **115**, 511-7.
- Paterson, T., und Wood, H. C. (1972). The biosynthesis of pteridines. VI. Studies of the mechanism of riboflavin biosynthesis. *J Chem Soc [Perkin 1]* **8**, 1051-6.
- Petushkov, V. N., Gibson, B. G., und Lee, J. (1995). The yellow bioluminescence bacterium, *Vibrio fischeri* Y1, contains a bioluminescence active riboflavin protein in addition to the yellow fluorescence FMN protein. *Biochem Biophys Res Commun* **211**, 774-9.
- Petushkov, V. N., Gibson, B. G., und Lee, J. (1996). Direct measurement of excitation transfer in the protein complex of bacterial luciferase hydroxyflavin and the associated yellow fluorescence proteins from *Vibrio fischeri* Y1. *Biochemistry* **35**, 8413-8.
- Petushkov, V. N., Gibson, B. G., und Lee, J. (1996). Direct measurement of excitation transfer in the protein complex of bacterial luciferase

- hydroxyflavin and the associated yellow fluorescence proteins from *Vibrio fischeri* Y1. *Biochemistry* **35**, 8413-8.
- Petushkov, V. N., Ketelaars, M., Gibson, B. G., und Lee, J. (1996). Interaction of *Photobacterium leiognathi* and *Vibrio fischeri* Y1 luciferases with fluorescent (antenna) proteins: bioluminescence effects of the aliphatic additive. *Biochemistry* **35**, 12086-93.
- Pfleiderer, W. und Hutzenlaub, W. (1973). Synthesen und Eigenschaften von Lumazin N-Oxiden. *Chem Ber.* **106**, 3149-3174.
- Pieper, M., Betz, M., Budisa, N., Gomis-Ruth, F. X., Bode, W., und Tschesche, H. (1997). Expression, purification, characterization, and X-ray analysis of selenomethionine 215 variant of leukocyte collagenase. *J Protein Chem* **16**, 637-50.
- Plaut, G. W. E. (1960). Studies on the stoichiometry of the enzymatic conversion of 6,7 dimethyl-8-ribityllumazine to riboflavin. *J. Biol. Chem.* **235**, 41-42.
- Plaut, G. W. E. (1961). Water-soluble vitamins. II. (Folic acid, riboflavin, thiamine, vitamin B₁₂). *Annu. Rev. Biochem.* **30**, 409-446.
- Plaut, G. W. E. (1971). Metabolism of water-soluble vitamins: The biosynthesis of riboflavin. In: *Florkin, M., Stotz, E.H. (Hrsg.). Comprehensive Biochemistry, Elsevier, Amsterdam* **21**, 11-45.
- Plaut, G. W. E., und Harvey, R. A. (1971). The enzymatic synthesis of riboflavin. *Methods Enzymol.* **18**, 515-538.
- Plaut, G. W. E., Beach, R. L., und Aogaichi, T. (1970). Studies on the mechanism of elimination of protons from the methyl groups of 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine by riboflavin synthetase. *Biochemistry* **9**, 771-785.
- Plaut, G. W. E., Smith, C. M., und Alworth, W. (1974). Biosynthesis of water-soluble vitamins. *Annu. Rev. Biochem.* **43**, 899-922.

-
- Read, S. M., und Northcote, D. H. (1981). Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie blue G dye-binding assay for protein. *Anal Biochem* **116**, 53-64.
- Roland, S., Ferone, R., Harvey, R. J., Styles, V. L., und Morrison, R. W. (1979). The characteristics and significance of sulfonamides as substrates for *Escherichia coli* dihydropteroate synthase. *J Biol Chem* **254**, 10337-45.
- Rowan, T., und Wood, H. C. (1963). The biosynthesis of riboflavin. *Proc Chem Soc*, 21-22.
- Rowan, T., und Wood, H. C. (1968). The biosynthesis of pteridines. V. The synthesis of riboflavin from pteridine precursors. *J Chem Soc [Perkin 1]* **4**, 452-8.
- Ruby, E. G., und Nealson, K. H. (1977). A luminous bacterium that emits yellow light. *Science* **196**, 432-4.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., und Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350-4.
- Sanger, F., Niklen, S., und Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- Scheuring, J., Cushman, M., Oschkinat, H., und Bacher, A. (1994). 19F NMR studies on the mechanism of riboflavin synthase. *Flavins Flavoproteins 1993, Proc. Int. Symp., 11th*, 79-82.
- Scheuring, J., Fischer, M., Cushman, M., Lee, J., Bacher, A., und Oschkinat, H. (1996). NMR analysis of site-specific ligand binding in oligomeric proteins.

- Dynamic studies on the interaction of riboflavin synthase with trifluoromethyl-substituted intermediates. *Biochemistry* **35**, 9637-46.
- Scheuring, J., Lee, J., Cushman, M., Oschkinat, H., und Bacher, A. (1994). 19F NMR studies on lumazine protein from *Photobacterium phosphoreum*. *Flavins Flavoproteins 1993, Proc. Int. Symp., 11th*, 75-8.
- Scheuring, J., Lee, J., Cushman, M., Patel, H., Patrick, D. A., und Bacher, A. (1994). (Trifluoromethyl)lumazine derivatives as 19F NMR probes for lumazine protein. *Biochemistry* **33**, 7634-40.
- Schott, K., Kellermann, J., Lottspeich, F., und Bacher, A. (1990a). Riboflavin synthases of *Bacillus subtilis*. Purification and amino acid sequence of the alpha subunit. *J Biol Chem* **265**, 4204-9.
- Schott, K., Ladenstein, R., Koenig, A., und Bacher, A. (1990c). Structure of the lumazine synthase/riboflavin synthase complex of *Bacillus subtilis*: crystallization of hollow reconstituted beta 60 capsids. *Chem. Biol. Pteridines, 1989 Proc. Int. Symp. Pteridines Folic Acid Deriv., 9th*, 340-3.
- Schott, K., Ladenstein, R., König, A., und Bacher, A. (1990b). The lumazine synthase/riboflavin synthase complex of *Bacillus subtilis*. Crystallization of reconstituted icosahedral α subunit capsids. *J. Biol. Chem.* **265**, 12686-12689.
- Schweitzer, B. I., Dicker, A. P., und Bertino, J. R. (1990). Dihydrofolate reductase as a therapeutic target. *Faseb J* **4**, 2441-52.
- Sedlmaier, H., Müller, F., Keller, P. J., und Bacher, A. (1987). Enzymatic synthesis of riboflavin and FMN specifically labelled with ¹³C in the xylene ring. *Z. Naturforsch. C* **42**, 425-9.

-
- Singer, S., Elion, G. B., und Hitchings, G. H. (1966). Resistance to inhibitors of dihydrofolate reductase in strains of *Lactobacillus casei* and *Proteus vulgaris*. *J Gen Microbiol* **42**, 185-96.
- Sirokman, G., Wilson, T., und Hastings, J. W. (1995). A bacterial luciferase reaction with a negative temperature coefficient attributable to protein-protein interaction. *Biochemistry* **34**, 13074-81.
- Skold, O. (2000). Sulfonamide resistance: mechanisms and trends. *Drug Resist Updat* **3**, 155-160.
- Skold, O. (2001). Resistance to trimethoprim and sulfonamides. *Vet Res* **32**, 261-73.
- Studier, F.W. und Moffatt, B.A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes; *J.Mol.Biol.*, **189**, 113-130.
- Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J. und Dubenhoff, J.W. (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes; *Methods Enzymol.*, **185**, 60-89.
- Stüber, D., Matile, H., und Garotta, G. (1990). System for high level production in *E. coli* and rapid purification of recombinant proteins: application to epitope mapping, preparation of antibodies and structure function analysis. In *Immunological Methods*, IV (Lefkovits, I. und Pernis, P., eds), pp. 121-152.
- Suzuki, Y., und Brown, G. M. (1974). The biosynthesis of folic acid. XII. Purification and properties of dihydroneopterin triphosphate pyrophosphohydrolase. *J Biol Chem* **249**, 2405-10.
- Truffault, V., Coles, M., Diercks, T., Abelmann, K., Eberhardt, S., Luttgén, H., Bacher, A., und Kessler, H. (2001). The solution structure of the N-terminal domain of riboflavin synthase. *J. Mol. Biol.* **309**, 949-960.

- Volk, R., und Bacher, A. (1988). Biosynthesis of riboflavin. The structure of the four-carbon precursor. *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 3651-3653.
- Volk, R., und Bacher, A. (1990). Studies on the 4-carbon precursor in the biosynthesis of riboflavin. Purification and properties of L-3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase. *J. Biol. Chem.* **265**, 19479-19485.
- Wacker, H., Harvey, R. A., Winestock, C. H., und Plaut, G. W. E. (1964). 4-(1'-D-Ribitylamino)-5-amino-2,6,-dihydroxypyrimidine, the second product of the riboflavin synthetase reaction. *J. Biol. Chem.* **239**, 3493-3497.
- Weigand, F., Simon, H., Dahms, G., Waldschmid, M., Schliep, H. J., und Wacker, H. (1961). Über die Biogenese des Leucopterins. *Angew. Chem.* **73**, 402-407.
- Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream, M. A., Lyne, M., Lyne, R., Stewart, A., Sgouros, J., Peat, N., Hayles, J., Baker, S., Basham, D., Bowman, S., Brooks, K., Brown, D., Brown, S., Chillingworth, T., Churcher, C., Collins, M., Connor, R., Cronin, A., Davis, P., Feltwell, T., Fraser, A., Gentles, S., Goble, A., Hamlin, N., Harris, D., Hidalgo, J., Hodgson, G., Holroyd, S., Hornsby, T., Howarth, S., Huckle, E. J., Hunt, S., Jagels, K., James, K., Jones, L., Jones, M., Leather, S., McDonald, S., McLean, J., Mooney, P., Moule, S., Mungall, K., Murphy, L., Niblett, D., Odell, C., Oliver, K., O'Neil, S., Pearson, D., Quail, M. A., Rabinowitsch, E., Rutherford, K., Rutter, S., Saunders, D., Seeger, K., Sharp, S., Skelton, J., Simmonds, M., Squares, R., Squares, S., Stevens, K., Taylor, K., Taylor, R. G., Tivey, A., Walsh, S., Warren, T., Whitehead, S., Woodward, J., Volckaert, G., Aert, R., Robben, J., Grymonprez, B., Weltjens, I., Vanstreels, E., Rieger, M., Schafer, M., Muller-Auer, S., Gabel, C., Fuchs, M., Fritze, C., Holzer, E., Moestl, D., Hilbert, H., Borzym, K., Langer, I., Beck, A., Lehrach, H., Reinhardt, R., Pohl, T. M., Eger, P., Zimmermann, W., Wedler, H., Wambutt, R., Purnelle, B., Goffeau, A., Cadieu, E., Dreano, S., Gloux, S., Lelaure, V., et al. (2002). The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* **415**, 871-80.

Zamenhof, P. J., und Villarejo, M. (1972). Construction and properties of *Escherichia coli* strains exhibiting α -complementation of β -galactosidase fragments in vivo. *J. Bacteriol.* **110**, 171-178.

7 Anhang

Dr. Markus Fischer stellte freundlicherweise das Konstrukt pNCO-SSP-Rib5-WT zur Verfügung:

Tabelle 7.1: Primer für cDNA-Template von S. pombe

Bezeichnung	Restriktionsenzym	Primersequenz
SSP-Rib5-1	EcoRI	5' -ataatagaattcattaaagaggagaaattaacctg tttaccggctcttgttgaagccattggtggtg-3'
SSP-Rib5-2	BamHI	5' -tattatggatcctcaagcttggggttttcttaat ccagtc-3'

Tabelle 7.2: Primer für die Amplifikation der C-terminalen-Mutanten

Bezeichnung	Restriktionsenzym	Primersequenz
pNCO-Vo	EcoRI	5' -gtgagcggataacaatttcacacag-3'
mRNA5	-	5' -ctccatttttagcttccttagctcctg-3'

Dr. Boris Illarionov stellte freundlicherweise einige Mutanten der Riboflavin Synthese aus *S. pombe* zur Verfügung.

Tabelle 7.3: Primer für die site-directed Mutagenese

Mutation	Restriktionsenzym	Primersequenz
C48S	HpaI	5' -TCTGTCACTGTAAG agA AGTACCGTTaACGGCGATACT
C48A	HpaI	5' -TCTGTCACTGTAAG agc AGTACCGTTaACGGCGATACT
C48M	HpaI	5' -TCTGTCACTGTAAG cat AGTACCGTTaACGGCGATACT
S146A	KpnI	5' -ATAGCCCTGGACCGGTACc Tgt CTGACCATTACTCAT
S146C	KpnI	5' -ATAGCCCTGGACCGGTACc gCG CTGACCATTACTCAT
