

Max-Planck-Institut für Biochemie
Abteilung für Strukturforschung

Strukturanalyse der Riboflavin Synthase aus *Methanococcus jannaschii*

Arne Ramsperger

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

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ. - Prof. Dr. St. J. Glaser
Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. h. c. R. Huber
2. Univ. – Prof. Dr. W. Hiller

Die Dissertation wurde am 28.09.2005 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 05.12.2005 angenommen.

Teile dieser Arbeit sind zur Veröffentlichung eingereicht:

CRYSTAL STRUCTURE OF AN ARCHAEAL PENTAMERIC RIBOFLAVIN
SYNTHASECOMPLEX WITH A SUBSTRATE ANALOG INHIBITOR:
STEREOCHEMICAL IMPLICATIONS

Arne Ramsperger, Martin Augustin, Ann-Kathrin Schott, Stefan Gerhardt, Tobias
Krojer, Wolfgang Eisenreich, Boris Illarionov, Mark Cushman, Adelbert Bacher,
Robert Huber and Markus Fischer

bzw. sind bereits veröffentlicht:

Evolution of vitamin B-2 biosynthesis. A novel class of riboflavin synthase in
Archaea.

Fischer, M., Schott, A. K., Römisch, W., Ramsperger, A., Augustin, M., Fidler,
A., Bacher, A., Richter, G., Huber, R., and Eisenreich, W. (2004) *J. Mol. Biol.*
343, 267-278

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen:

Abb.	Abbildung
DMRL	6, 7-Dimethyl-8-Ribityllumazin
DORL	6, 7-Dioxo-8-Ribityllumazin
FAD	Flavinadenindinukleotid
FMN	Flavinmononukleotid
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulphonic acid]
HOMO	<i>highest occupied molecular orbital</i>
kDa	kilo dalton
LUMO	<i>lowest unoccupied molecular orbital</i>
LS	Lumazin-Synthase
<i>MJa</i>	<i>Methanococcus (Methanocaldococcus) jannaschii</i>
<i>MJaRS</i>	<i>Methanococcus jannaschii</i> Riboflavin-Synthase
MPD	2-Methyl-2, 4-pentandiol
MPI	Max-Planck Institute for Biochemistry (Martinsried, Deutschland)
OD	optical density
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PEG	Polyethylenglycol
RDL	6, 7-Dioxo-8-Ribityllumazine
RS	Riboflavin-Synthase
SDS	Sodiumdodecylsulphat
SeMet	Selenomethionin
Tab.	Tabelle
TRIS	Tris[hydroxymethyl]aminomethan

meinen Eltern

„Der Beginn aller Wissenschaft ist das Erkennen,
daß die Dinge so sind, wie sie sind.“ (Aristoteles)

„Die Naturwissenschaft braucht der Mensch zum Erkennen,
den Glauben zum Handeln.“ (Max-Planck)

„Willst du dich selber erkennen, so sieh, wie die andern es treiben;
Willst du die andern verstehen, blick` in dein eigenes Herz.“

(aus Schillers Distichon „Der Schlüssel“ aus den Votivtafeln)

1. Danksagung	- 1 -
2. Zusammenfassung	- 2 -
3. Einleitung	- 4 -
3.1 Molekulare Evolution	- 4 -
3.2 Biologische Bedeutung der Riboflavinsynthese	- 7 -
3.3 Die beiden terminalen Enzyme in der Riboflavin-Biosynthese	- 10 -
3.4 Die Riboflavin-Synthase aus dem Archaeum <i>Methanococcus jannaschii</i> -	13 -
3.5.1 Proteinkristallisation	- 14 -
3.5.2 Beugung von Röntgenstrahlen an Kristallen	- 15 -
3.5.3 Das Phasenproblem und die Phasenbestimmung	- 17 -
3.5.4 Modellbau und Verfeinerung	- 23 -
4. Material und Methoden	- 24 -
4.1. Proteinbiochemische Methoden	- 24 -
4.2 Kristallographische Methoden	- 27 -
4.2.1 Proteinkristallisation	- 27 -
4.2.2 Datensammlung und Datenreduktion	- 27 -
4.3 Phylogenetische Analyse	- 30 -
5. Ergebnisse	- 31 -
5.1 Strukturaufklärung der Riboflavin Synthase aus <i>M. jannaschii</i>	- 31 -
5.1.1 Kristallisation, Datensammlung und Strukturlösung	- 31 -
5.1.2 Phasierung, Modellbau und Verfeinerung	- 32 -
5.1.3 Strukturbeschreibung einer Untereinheit	- 35 -
5.1.4 Anordnung der Untereinheiten zum <i>MJa</i>RS-Pentamer	- 36 -
5.2 Lokalisation des aktiven Zentrums der <i>MJa</i>-Riboflavin-Synthase	- 37 -
6. Diskussion	- 44 -
6.1 Der Reaktionsmechanismus	- 44 -
6.2 Die Diels-Alder-Reaktion und Diels-Alderasen	- 49 -
6.3 Ionisch-nukleophiler Reaktionsmechanismus der Riboflavin-Synthase ..	- 56 -
6.5 Riboflavin-Synthase: Ein ionisch-nukleophiler Reaktionsmechanismus? -	63 -
6.6 Riboflavin-Synthase: Eine inverse Diels-Alderase?	- 64 -
6.7 Das pentacyclische Intermediat der Dismutationsreaktion	- 73 -
6.8 Evolution des Riboflavin-Stoffwechselweges	- 79 -
7. Referenzen	91 - 98

1. Danksagung

1. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von Oktober 2000 bis Juni 2005 in der Abteilung für Strukturforschung am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried unter der Anleitung von Prof. Dr. Robert Huber angefertigt.

Mein besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Robert Huber, der es mir ermöglicht hat, an diesen spannenden Projekten zu arbeiten und jederzeit mit Rat zur Seite stand.

Herrn Prof. Dr. Bacher und Dr. Markus Fischer danke ich für die gute und angenehme Zusammenarbeit. Besonders danken möchte ich auch Dr. Kathrin Schott für die stete Bereitstellung gereinigter Riboflavin Synthase.

Ein herzlicher Dank gilt auch Herrn Dr. Martin Augustin, Herrn Dr. Tobias Krojer und Herrn Dr. Michael Groll, welche mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen. Herrn Dr. Peter Sondermann danke ich für die vielen kreativen Anregungen im Diskurs.

Danke sagen möchte ich auch meinen Kollegen im Labor und Büro, die mir immer hilfreich zur Seite standen: Dr. Rainer Friedrich, Dr. Peter Goettig, Dr. John Reverter und Martin Locher. Mein Dank gilt auch Renate Rüller und Monika Schneider für ihre immer freundliche Unterstützung bei bürokratischen Erfordernissen. Herrn Werner Dersch und Ottmar Paul möchte ich für ihre Hilfe bei der Lösung technischer Probleme danken.

Für die Team-Arbeit und angenehme Arbeitsatmosphäre möchte ich auch Prof. Dr. Albrecht Messerschmidt, Herrn Dr. Werner Atzenhofer, Herrn Rasso Willkomm, Herrn Snezan Marinkovic, Herrn Dr. Peter Goettig, Herrn Dr. Otto Kyrieleis, Frau Dr. Irena Bonin, Herrn Dr. Tim Clausen, Herrn Dr. Jens Kaiser, Herrn Dr. Stefan Steinbacher, Herrn Dr. Hans Brandstetter und all den anderen danken, welche ich jetzt vergessen habe aufzuzählen.

Mein herzlicher und liebevoller Dank gilt meinen Eltern. Ohne deren fortwährende Unterstützung über die Jahre hinweg, wäre ich nie so weit gekommen. Danke für das in mich gesetzte Vertrauen.

2. Zusammenfassung

Riboflavin (Vitamin B₂) dient als Vorläufer-Metabolit für Flavinmononukleotid (FMN) und Flavinadenindinucleotid (FAD), welche als Cofaktoren verschiedener Oxido-reduktasen fungieren und unabdingbar in jeder lebenden Zelle benötigt werden. Riboflavin-Synthase katalysiert den terminalen Schritt in der Vitamin B₂-Biosynthese. In dieser, seit über 40 Jahren erforschten und immer noch nicht vollständig verstandenen, komplexen Dismutationsreaktion dient ein Lumazinmolekül (6,7-Dimethyl-8-(1/-D-Ribityl)-lumazin) als Donor einer C₄-Kohlenstoffeinheit gegenüber einem zweiten Lumazinmolekül. Hierbei entsteht Riboflavin und ein Pyrimidindion-Derivat, welches von der metabolisch in der Stoffwechsel-Kaskade eins weiter oben stehenden Lumazin-Synthase wieder recycelt werden kann.

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, daß die Riboflavin-Synthasen aus Hefen und Bakterien als Trimere in wäßriger Lösung vorliegen. Kristallographische Studien sowie Modelling-Studien legen nahe, daß diese Riboflavin-Synthasen als asymmetrische Trimere aufgefaßt werden können, und folglich immer nur ein katalytisches Zentrum des Trimers zu einem Zeitpunkt kompetent ist, die Reaktion zu katalysieren. Im Detail wurde vorgeschlagen, daß trimere Riboflavin-Synthasen umfangreiche Konformationsänderungen vollführen können, mit dem Resultat, daß das aktive Zentrum zwischen benachbarten Monomeren temporär eine pseudo-C₂-Symmetrie ausbildet. Nach diesem Modell erfolgt die Übertragung einer C₄-Kohlenstoffeinheit des Substrates, gebunden an der C-terminalen Domäne des einen Monomers, auf die N-terminale Domäne des dort befindlichen Substrates des benachbarten Monomers.

In der hier vorliegenden Kristallstruktur konnte einerseits gezeigt werden, daß archaeale Riboflavin-Synthasen - im Gegensatz zu den bisher bekannten (trimeren) Riboflavin-Synthasen - Homo-Pentamere darstellen, und andererseits, daß die Vitamin-B₂-Biosynthese in einer rigiden asymmetrischen Kavität erfolgt, welche von zwei benachbarten Monomeren des Pentamers generiert wird.

In der Komplexstruktur mit dem Substratanalogen liegen die beiden Moleküle in antiparalleler Orientierung und *endo*-Konformation zueinander vor, welches hauptsächlich durch ein Netzwerk von H-Brückenbindungen gewährleistet wird. Mit den Ergebnissen dieser Studie kann gezeigt werden, daß das Faltungsmuster gänzlich verschieden im Vergleich zu trimeren Riboflavin-Synthasen ist. Im wesentlichen entspricht das Faltungsmuster der dreidimensionalen Struktur der metabolisch in der Vitamin- B₂-Stoffwechselkaskade eins weiter oben stehenden Lumazin-Synthase. Diese weitgehend strukturelle Homologie erlaubt es uns, neue Hypothesen über die Evolution und Ursprung dieses Stoffwechselweges zu machen. Darüber hinaus können die verschiedenen - allesamt hypothetischen - Reaktionsmechanismen aufgrund der Topologie der Komplexstruktur in einer Art und Weise diskutiert werden, wie es bisher nicht möglich war; im Detail auch eine Reaktionssequenz, welche im ersten Schritt eine Diels-Alder-Reaktion darstellt. Die Geometrie der Komplexstruktur läßt den Diels-Alderase-Mechanismus als attraktives Modell erscheinen. Das Modell der Positionierung des pentacyclischen Reaktionsintermediats belegt, daß es nach Kenntnisstand der erste Präzedenzfall eines Enzyms (pentamere und trimere Riboflavin-Synthase) darstellt, daß mit zwei unterschiedlichen Faltungsmustern *via* zwei stereochemisch unterschiedlichen Intermediaten eine Reaktion im Stoffwechsel katalysiert.

Diese Resultate, bezüglich des jetzt möglichen Vergleichs der unterschiedlichen Kavitäten von Lumazin- und Riboflavin-Synthasen, sowie die jetzt mögliche Neubewertung der allesamt hypothetischen Reaktionsmechanismen, könnten von richtungweisender Bedeutung für die Entwicklung neuer Inhibitoren sein. Es ist zu hoffen, daß diese Ergebnisse eine Hilfestellung - obgleich es sich hier um eine archaeale Riboflavin-Synthase handelt - bieten, um die Entwicklung von Agentien gegen Lumazin- und Riboflavin-Synthasen aus pathogenen Organismen aus dieser Perspektive neu zu evaluieren.

Abstract

Riboflavin (vitamin B₂) serves as precursor for flavin mononucleotide (FMN) and flavin adenine dinucleotide (FAD), essential molecules which act as cofactors for several oxidoreductases that are indispensable in living cells. Riboflavin synthase catalyzes the terminal step in riboflavin biosynthesis. In this complex dismutation reaction (under research for more than four decades) one lumazine molecule (6, 7-dimethyl-8-(1/-D-ribityl)-lumazine) serves as donor of a C₄-carbon unit, which is transferred to a second lumazine molecule. This generates riboflavin and a pyrimidindione derivative, which can be recycled by the metabolic (one step) upwards standing lumazine synthase.

In the past years it could be shown, that riboflavin synthases from yeast and bacteria exist as trimers in solution. Crystallographic studies (and modelling studies) suggest that riboflavin synthases can be regarded as asymmetric trimers, consequently only one reaction centre is competent to catalyze the reaction at a given time. In detail it was proposed, that trimeric riboflavin synthases execute extensive conformational changes, which result in a temporary pseudo-C₂-symmetry between adjacent monomers. According to this model a C₄-carbon unit from one substrate, bound at the C-terminal domain is transferred to the substrate bound at the N-terminal domain of the adjacent monomer.

In this study it could be shown on the one hand that archaeal riboflavin synthases – contrary to the hitherto known trimeric riboflavin synthases - represent homo pentamers, and on the other hand that the riboflavin biosynthesis results in an rigid asymmetric cavity, generated by adjacent monomers of the pentamer.

In the complex structure both substrate analogon molecules show an anti-parallel *endo*-like conformation, which is mainly guaranteed by a network of hydrogen bonds. The results demonstrate a different folding pattern to trimeric riboflavin synthases. Essentially the folding pattern corresponds to the three dimensional structure of the metabolic (one step in riboflavin biosynthesis) upwards standing lumazine synthase.

This homology allows us to postulate a new hypothesis of the evolution and origin of this metabolic pathway. In addition (based on the topology of the complex structure), all the hypothetical reaction mechanisms can be discussed in a way that was previously not possible; in detail a reaction sequence, which represents an Diels-Alder-reaction. The geometry of the complex structure shows that this model is attractive.

The model of the positioning of the pentacyclic reaction intermediate verifies the postulate of the first reported case in metabolism that an enzyme (pentameric and trimeric riboflavin synthase, with two different folds) catalyzes a reaction *via* two different diastereomeric reaction intermediates.

The results, concerning the comparison of the cavities of lumazine and riboflavin synthases, and the (now) possible new evaluation of the different reaction models may be a guideline for the development of new inhibitors affecting lumazine and riboflavin synthases from pathogenic organisms.

3. Einleitung

3.1 Molekulare Evolution

Eine wichtige Aufgabe im Bereich der Biowissenschaften ist es, die rezenten Lebewesen zu beschreiben, zu benennen und systematisch zu klassifizieren. Die Phylogenie (Stammesgeschichte von Lebewesen) beschäftigt sich mit dem Studium evolutionärer Verwandtschaften. Die Verwandtschaften werden dabei gewöhnlich in Form von verästelten Bäumen dargestellt, den sog. *trees*. Diese *trees* werden sowohl für einzelne Moleküle (Proteine, DNA, RNA) als auch für ganze Organismen erstellt. Die Einführung dieses *tree*-Konzeptes für den Evolutionsverlauf geht auf Charles Darwin zurück [1]. Diese *trees* sind Ausdruck des fundamentalen Prinzips einer sich mit fortschreitender Zeit entwickelnden Biosphäre, in der wir, von „einfachen“ biologischen Systemen ausgehend, eine Entwicklung von zunehmend mehr und komplexeren Systemen betrachten können.

1975 wurde von Carl Woese, unter Verwendung von rRNA-Sequenzen, der kleinen ribosomalen Untereinheit, der sogenannte *universal tree* (Abb. 1) mit seiner Einteilung nach Urreichen oder Domänen in Archaea, Eukarya und Bacteria formuliert [2]. Die Verwendung von rRNA (Basensequenz) als Basis erwies sich deshalb als so geeignet, da die rRNA (16S-RNA bei Prokaryonten und 20S-RNA bei Eukaryonten) zum einen ubiquitär (auch in Organellen vorhanden) und zum anderen der Prozess der Proteinbiosynthese so fundamental für die Entwicklung des Lebens und auch „anfällig“ gegenüber Mutationen ist. Obwohl man dazu nur Sequenzen aus heute lebenden Organismen verwendet, weisen die Verzweigungen der Stammbäume bis auf einen ersten gemeinsamen Vorfahren aller Lebewesen hin. Eine Verifikation durch Basensequenzen aus fossilen Funden ist nicht möglich, jedoch geht man von der Annahme aus, daß Mutationen mit konstanter, kleiner Rate eingetreten sind, wodurch das Konzept eine zeitliche Dimension bekommt. Die Sequenzen dienen als molekulare Uhren (Chronometer), wobei je nach betrachtetem Bereich die Uhr schneller (hypervariabler Bereich) oder langsamer (konservativer Bereich) läuft. Die Besonderheit der rRNA-basierten *trees* ist die Berücksichtigung der Tatsache, daß in dieser funktionell wichtigen RNA die Struktur und nicht primär die Sequenz konserviert ist. Der Vollständigkeit halber sei erwähnt, daß man auch die Aminosäuresequenzen anderer universeller Proteine (z.B. RNA-

3. Einleitung

Polymerase) verwendet, um weit zurückliegende Stammbäume zu erstellen. Dabei wurden ähnliche, aber nicht immer dieselben Verzweigungspunkte gefunden. Eine nahe Verwandtschaft der Sequenzen von distinkten Genen muß daher nicht *a priori* eine nahe Verwandtschaft in der Phylogenie diverser Organismen reflektieren [3, 4].

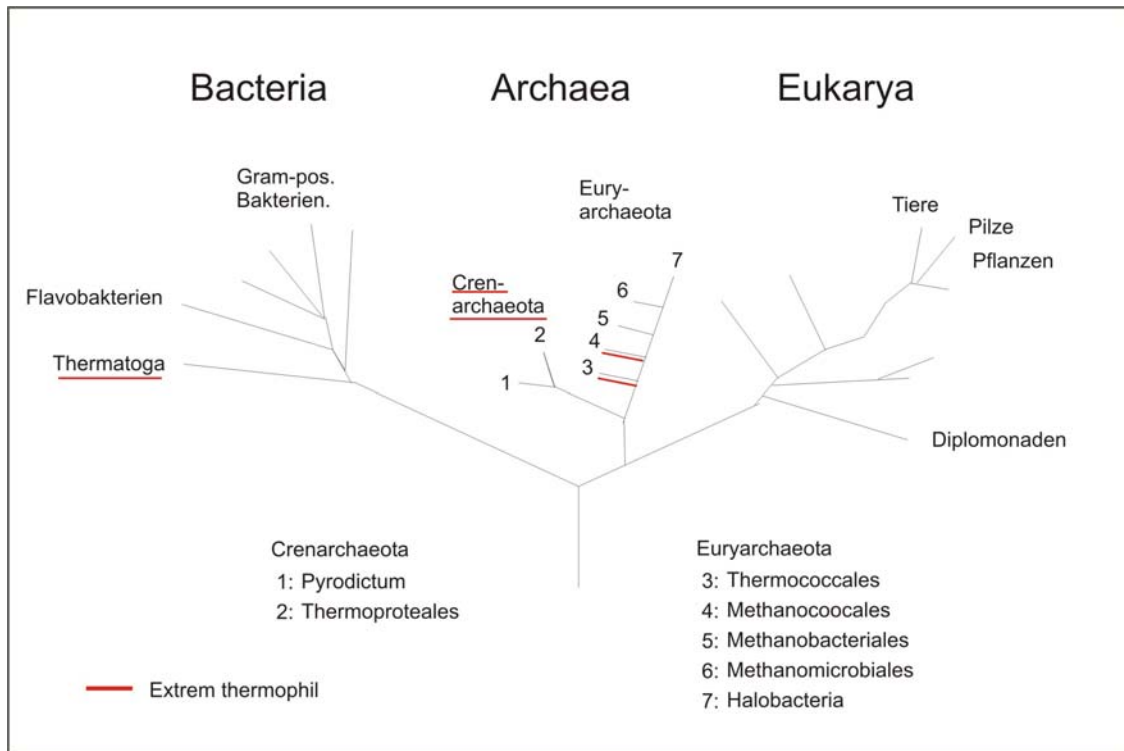


Abb. 1) Schematische Darstellung des phylogenetischen Stammbaums von Lebewesen aus Sequenzvergleichen der ribosomalen 16 S-RNA (bzw. 18 S-RNA), modifiziert nach Woese *et al.* [2]. Extreme Thermophile sind rot markiert.

Sehr interessant an der Grundstruktur des *universal tree* ist der Aspekt, daß die extrem thermophilen Bakterien und Archaea jeweils sehr tief im Stammbaum abzweigende Äste repräsentieren. Dies kann als Hinweis gewertet werden, daß die ersten Organismen thermophil waren und sich bereits entwickelt haben, als die Erde noch nicht abgekühlt war [5].

Wie es zur Entwicklung der ersten Lebewesen, der primären Biogenese kam, ist eine der grundlegendsten Fragen der Biologie, jedoch soll im Detail hier nur kurz auf einzelne Hypothesen über den Ursprung von Stoffwechselwegen eingegangen werden. Molekulare Evolution zusammen mit der chemischen Evolution beschreibt einen Prozeß, durch die erstmals Biomoleküle entstanden sind, aus denen dann selbstreproduzierende Organismen hervorgegangen sind. Ein plausibles Szenarium umfaßt zunächst eine

3. Einleitung

„chemische Evolution“, worunter man ganz allgemein die abiotische bzw. prebiotische Bildung und Derivatisierung organischer Moleküle (als Grundbausteine des Lebens) in einer Uratmosphäre versteht. Die vermutlich später stattfindende Entstehung der ersten Zellen bleibt ein Mysterium. Es wurde spekuliert, daß in einer RNA-Welt (*RNA-world*) RNA-Moleküle sowohl Träger der genetischen Information als auch Katalysatoren eines vorläufigen Stoffwechsels waren [6]. Wie bereits erwähnt, sind die hyperthermophilen Archaea im phylogenetischen Stammbaum sehr weit unten angesiedelt, was zu der Vermutung führte, daß es noch sehr heiß war, als die ersten Lebewesen und damit auch die ersten Stoffwechselwege sich entwickelten (siehe z. B. [7]).

Diese ursprünglichen Stoffwechselwege könnten durch Hitze teilweise oder gänzlich nicht-enzymatisch verlaufen sein, so daß sie als Nahrung für erste Organismen bereits zur Verfügung gestanden haben könnten [8]. Ebenso wird auch ein „kalter“ Ursprung des Lebens diskutiert. Beispielsweise konnte kürzlich aufgezeigt werden, daß im sog. „Eisreaktor“ Bedingungen vorliegen, unter welchen RNA-Mononukleotide in Eiskapillaren zu Polynukleotiden (200-300 Nukleotide) polymerisieren können und eine stabilisierende (kalte) Umgebung vorfinden (siehe z. B. [9 - 11]).

Die komplexen Stoffwechselvorgänge, wie sie sich heute präsentieren, haben sich erst nach einer Etablierung einer DNA/Protein-Welt etabliert und weiter differenziert. Sowohl auf molekularer als auch auf der Organismenebene kann man konvergente und divergente Evolution beobachten. Wenn ganz unterschiedliche Evolutionswege zu derselben Lösung führen, bezeichnet man dies als konvergente Evolution. Mit anderen Worten: Eine konvergente Evolution tritt ein, wenn ähnliche Umwelteinflüsse die Entwicklung ähnlicher Merkmale bei nicht verwandten Organismen begünstigen wie z.B. die Stromlinienform bei Fischen und Meeressäugetieren oder bei Enzymen mit ganz unterschiedlichen Sequenzen, die die gleiche Reaktion katalysieren. Oft sind bei diesen Enzymen (nur) die Aktivitätszentren bemerkenswert ähnlich (Analogie).

Bei einer divergenten Evolution entstehen aus einer Organismen- oder Proteinart zwei oder mehr Arten; d.h. sie stammen von einem gemeinsamen Vorfahren ab (Homologe). Homologe Moleküle oder Homologe kann man in zwei Klassen unterteilen: Paralogue sind Homologe, die innerhalb einer Art vorkommen; sie unterscheiden sich häufig in Einzelheiten ihrer biochemischen Funktion. Orthologe sind Homologe in verschiedenen

3. Einleitung

Arten; bei ihnen ist die biochemische Funktion sehr ähnlich oder identisch. Für die molekulare Divergenz werden Mechanismen wie z.B. Genduplikation und Akkumulation von Mutationen verantwortlich gemacht. Mutationen geschehen zwar auf der Ebene der Sequenz, ihre Auswirkungen machen sich jedoch auf der Ebene der Funktion bemerkbar, und die Funktion steht in direkter Beziehung zur Struktur. Da die dreidimensionale Struktur enger mit der Funktion eines Proteins in Zusammenhang steht als dessen Aminosäuresequenz, ist die Tertiärstruktur in der Evolution stärker konserviert worden als die Primärstruktur.

3.2 Biologische Bedeutung der Riboflavinsynthese

Für alle Organismen (und vermutlich auch für frühe Formen des Lebens) ist die Verfügbarkeit von Vitamin-B₂ (Riboflavin) eine unabdingbare Voraussetzung, um hiervon ausgehend die essentiellen Coenzyme FMN (Flavinmononukleotid) und FAD (Flavinadenindinukleotid) metabolisch generieren zu können (Abb. 2). FMN selber kann als Rudiment des Überganges einer früher existierenden RNA-Welt betrachtet werden, weil es RNA-Komponenten in seiner Molekülstruktur aufweist [12]. Ebenso kann von einer Interaktion von Flavo-Coenzymen mit Ribozymen in einer hypothetischen RNA-Welt ausgegangen werden, da bekannt ist, daß FMN an artifizielle RNA-Sequenzen (Aptamere) binden kann [13, 14].

Die Cofaktoren FMN und FAD dienen als prosthetische Gruppe in einer Vielzahl von Redoxenzymen und sind somit z.B. beim oxidativen Abbau von Pyruvat, Fett- und Aminosäuren sowie bei der Atmungskette beteiligt [15]. Ihre zentrale Rolle im aeroben Stoffwechsel resultiert einerseits aus der Fähigkeit, Zweielektronen-Dehydrogenierungen an einer großen Anzahl von Substraten auszuführen und andererseits in Form von Einelektronen-Übertragungen, auf verschiedene Metallzentren über freie Radikalzustände teilzunehmen [16].

Das eigentliche Redoxsystem von FMN und FAD stellt das Isoalloxazin-Ringsystem dar. Eine immanente Eigenschaft von Flavinen ist es, sowohl zwei aufeinanderfolgende Einelektronen-Transferprozesse als auch gleichzeitig den Transfer von zwei Elektronen, der den Semichinon-Zustand umgeht, ausüben zu können [16]. Flavine sind aufgrund ihrer chemischen Vielseitigkeit, beispielsweise die Varianz ihres Redoxpotentials, an

3. Einleitung

einer Vielzahl biologischer Vorgänge beteiligt. Oft sind sie Bestandteil von Enzymen mit Multi-Redoxzentren (z.B. NADH-Dehydrogenase und Xanthin-Oxidase).

Menschen und höhere Tiere können die Isoalloxazin-Komponente der Flavine nicht selber synthetisieren und müssen diese Substanzklasse z.B. in Form von Riboflavin mit der Nahrung aufnehmen. Pflanzen und viele Mikroorganismen hingegen sind in der Lage, Riboflavin in ihrem Metabolismus zu generieren. Die Tatsache, daß die Enzyme des Riboflavinstoffwechsels im Menschen nicht präsent sind, hat zu der These geführt, daß die Biosynthese von Riboflavin generell einen attraktiven Zielort für die Entwicklung von Antibiotika darstellen könnte [17-19]. Eine Vielzahl pathogener Mikroorganismen könnte demnach an diesem Stoffwechselweg durch Inhibitoren attackiert werden, mit dem Resultat einer bakteriziden oder fungiziden Wirkung.

Die Aufklärung des Biosyntheseweges, der zu Riboflavin führt, ist seit 40 Jahren Gegenstand intensiver Grundlagenforschung und in mehreren Übersichtsartikeln zusammengefasst (siehe z. B.[20, 21]). Ein Riboflavin-Molekül wird, ausgehend von einem Molekül GTP (3) und zwei Molekülen Ribulose-5'-phosphat, (1) synthetisiert (Abb. 3).

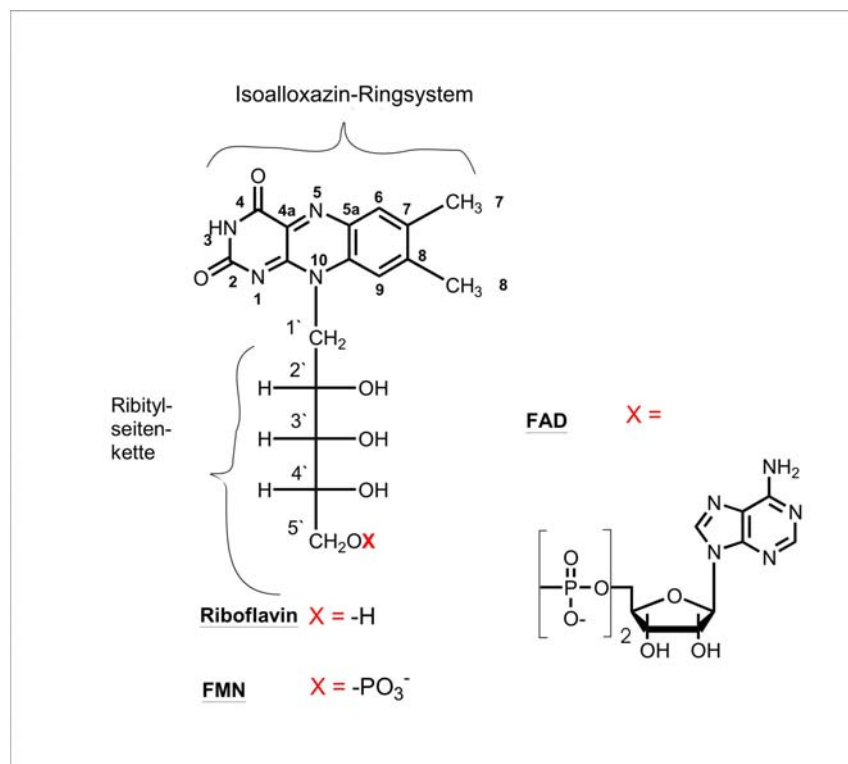


Abb. 2) Strukturformeln von Riboflavin, FMN und FAD.

3. Einleitung

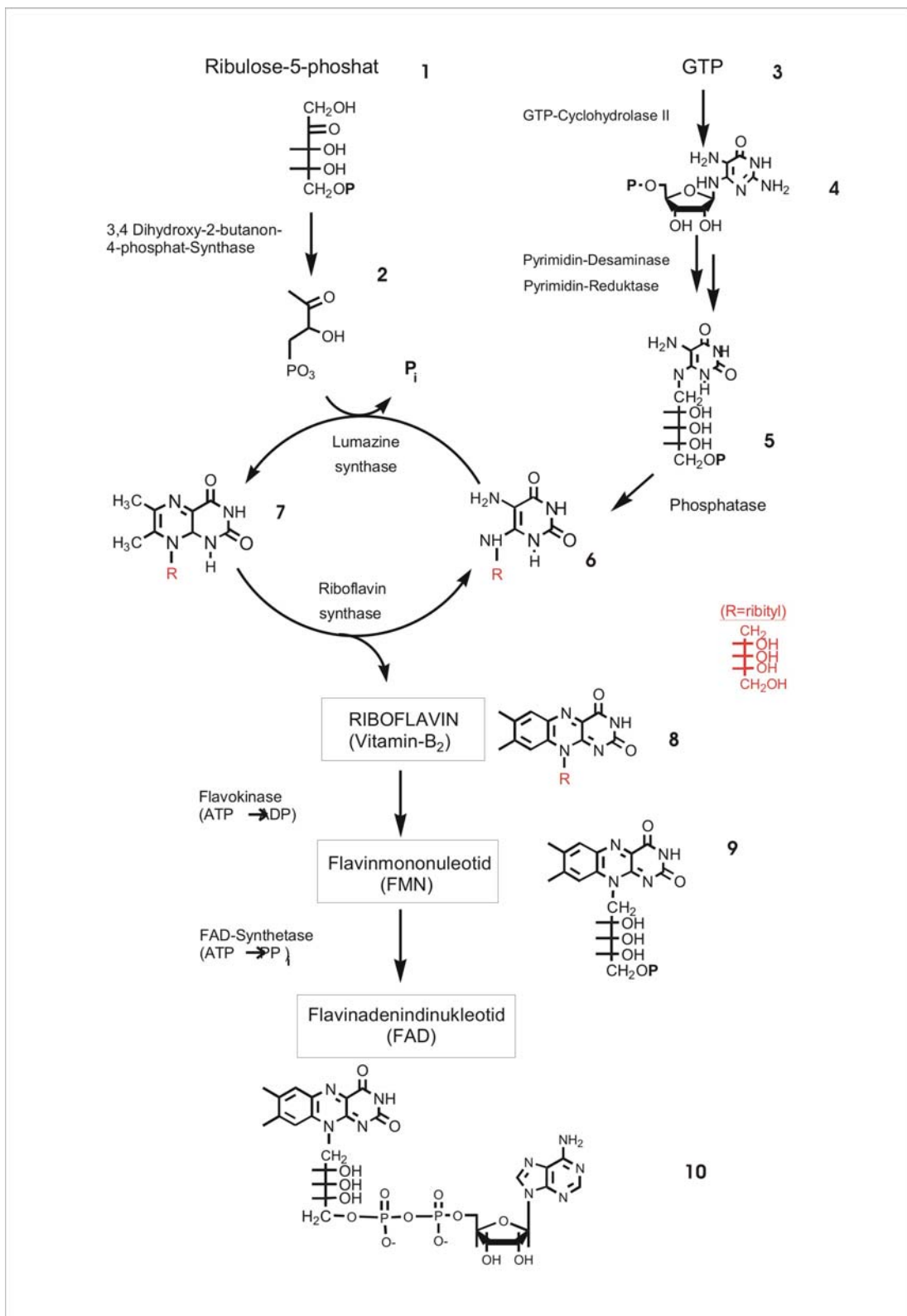


Abb. 3) Schematische Darstellung des anabolischen Stoffwechselweges von Riboflavin sowie der Folgeschritte, die zu FMN und FAD führen. Die Biosynthese von Riboflavin (8) beginnt mit der Umsetzung von GTP (3) zu 2,5-Diamino-6-ribosylamino-4(3H)-pyrimidindion-5'-phosphat (4) durch die GTP Cyclohydrolase II. Die nächsten beiden Schritte sind bei

3. Einleitung

Prokaryonten die Desaminierung von 2,5-Diamino-6-ribosylamino-4(3*H*)-pyrimidindion-5'-phosphat am C2-Kohlenstoffatom durch die Pyrimidin-Desaminase und nachfolgend die Reduktion der Ribitylseitenkette durch die Pyrimidin-Reduktase. Endprodukt beider Reaktionen ist 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*, 3*H*)-pyrimidindion-5'-phosphat (**5**). In Eukaryonten erfolgt die Reduktion des Zuckers vor der Desaminierung. Nach Dephosphorylierung dieser Verbindung (**3**), durch vermutlich unspezifische Phosphatasen, erfolgt durch die Lumazin-Synthase (DMRL-Synthase) die Kondensation von 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*, 3*H*)-pyrimidindion (**6**) mit 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat (**2**) zu 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin (DMRL) (**7**). Im nachfolgenden Schritt des Syntheseweges werden zwei DMRL-Moleküle (**7**) in einer komplexen Dismutationsreaktion zu Riboflavin (**8**) und dem Edukt (**6**) umgesetzt. Dieser letzte Schritt der Riboflavin-Biosynthese wird von der Riboflavin-Synthase (RS) katalysiert. Das bei dieser Reaktion zusätzlich entstehende 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*, 3*H*)-pyrimidindion (**6**) kann in den Biosyntheseweg wieder zurückgeführt werden. Das Enzym Flavokinase katalysiert die Bildung von FMN durch Phosphorylierung der 5'-OH-Gruppe des Riboflavins unter ATP-Verbrauch. Im anschließenden Schritt erfolgt die Umsetzung von FMN zu FAD durch Katalyse des Enzyms Flavinadeninindinukleotid-Synthetase unter Freisetzung von Pyrophosphat (siehe z. B.[20, 21]).

3.3 Die beiden terminalen Enzyme in der Riboflavin-Biosynthese

Die Wechselwirkung der beiden letzten konsekutiven Enzyme und Metaboliten im Riboflavin-Biosyntheseweg kann als anabolischer Cyclus dargestellt werden (Abb. 4). Das Enzym Riboflavin-Synthase (RS) katalysiert den finalen Schritt der Riboflavin-Biosynthese. In einer komplexen Dismutationsreaktion dient ein DMRL-Molekül (6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin) (**1**) als Donor einer C4-Kohlenstoffeinheit gegenüber einem zweiten DMRL-Molekül (Akzeptor). Diese Bisubstrat-Reaktion generiert Riboflavin (**2**) und als zweites Produkt der Reaktion 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*, 3*H*)-pyrimidindion (**3**) [22]. Das zweite Produkt dieser Reaktion stellt zugleich das Substrat des vorherigen enzymatischen Schrittes im Stoffwechselweg von Riboflavin dar und könnte wieder zu DMRL, dem Substrat von RS, recycelt werden. Lumazin-Synthase (LS; DMRL-Synthase) katalysiert die Kondensation von diesem Pyrimidindion (**3**) mit 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat (**4**). Beide Reaktionen sind thermodynamisch irreversibel [23, 24].

Die beiden terminalen Enzyme im Riboflavinstoffwechsel (LS und RS) wurden aus mehreren Organismen in den letzten Jahren strukturell und biochemisch detailliert charakterisiert. Lumazin-Synthasen können Homo-Pentamere (z.B. in *S. cerevisiae*) ausbilden, wohingegen in einer großen Anzahl anderer Organismen (z.B. in Pflanzen) Lumazin-Synthasen zu ikosahedralen Komplexen, bestehend aus 60 identischen Untereinheiten, assemblieren, die am anschaulichsten als Dodekamer von Pentameren aufge-

3. Einleitung

faßt werden können [25-27]. Die dreidimensionale Struktur dieser Untereinheiten (Monomer) von pentamerer und ikosaedrischer LS sind sehr ähnlich.

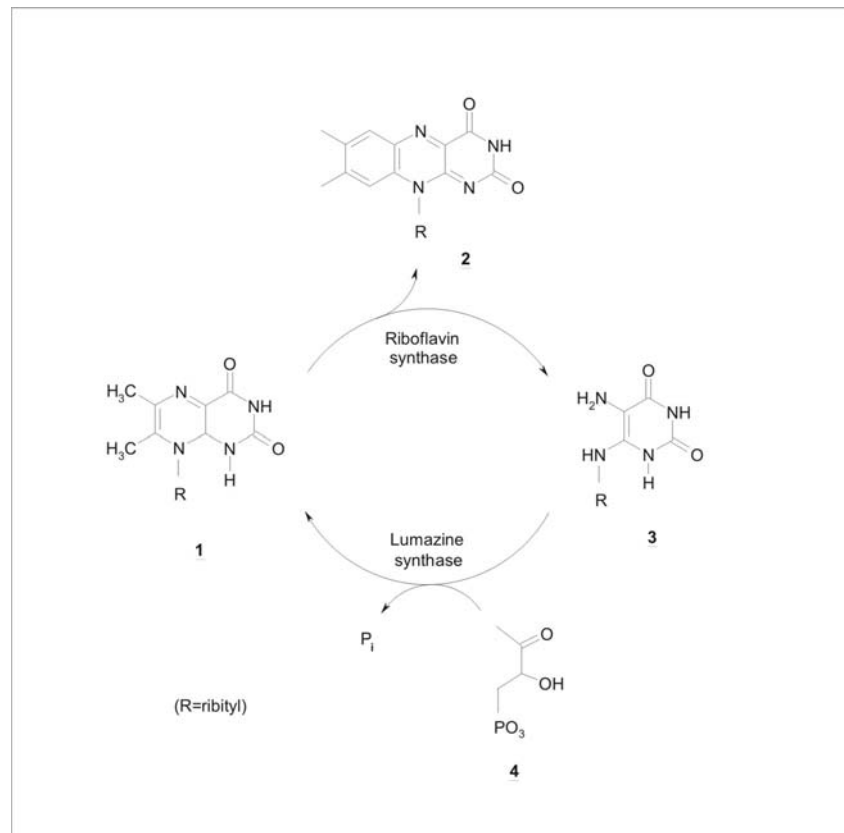


Abb. 4) **Die beiden terminalen Enzyme im Riboflavin-Stoffwechsel.** Riboflavin Synthase katalysiert eine ungewöhnliche Dismutationsreaktion von 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin (DMRL) (1), welche zur Bildung eines Äquivalentes Riboflavin (2) und einem Äquivalent 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1H, 3H)-pyrimidindion (3) führt. Lumazine Synthase kann dieses Pyrimidindion (3) in einer Kondensationsreaktion mit 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat (4) zu DMRL, dem Substrat von RS, umsetzen.

Die Monomer-Struktur besteht aus 150-200 Aminosäuren und weist eine 3-Schichten-Struktur ($\alpha\beta\alpha$) auf. Das aktive Zentrum ist zwischen benachbarten Untereinheiten lokalisiert [28]. Strukturelle Besonderheiten wurden in Bacilliacae, wo das ikosaedrale Capsid aus Lumazin-Synthasen ein RS-Trimer umschließt, sowie in *Brucella abortus* vorgefunden, wo die LS ein Dimer von Pentameren ausbildet [29].

Die Riboflavin-Synthasen aus Eubakterien und Hefen sind im nativen Zustand homotrimere Proteine mit einem Molekulargewicht von ungefähr 24 kDa pro Untereinheit. Die Aminosäuresequenzen der RS aus Eubakterien und Hefen sind durch eine interne Sequenzhomologie charakterisiert, was schon früh zu der Hypothese führte, daß jede Untereinheit in zwei topologisch ähnliche Domänen faltet, wobei jede Domäne die

3. Einleitung

Fähigkeit aufweisen könnte, je ein Molekül DMRL zu binden [30-33]. Die mittels Röntgenstrukturanalyse (bis zu einer Auflösung von 2,0 Å) erhaltene Struktur der *E. coli* RS bestätigte die starke Ähnlichkeit der Faltungseigenschaften von N- bzw. C-terminaler Domäne. Die Kristallstrukturanalyse zeigt, daß RS als asymmetrisches Trimer betrachtet werden kann. Über die Natur des aktiven Zentrums konnten in dieser Studie nur Vermutungen aufgestellt werden [28].

Vor kurzem konnte in unserer Arbeitsgruppe die Struktur der RS aus *S. pombe* im Komplex mit dem Inhibitor 6-Carboxyethyl-7-Oxo-8-Ribityllumazin aufgeklärt werden. Im kristallinen Zustand wurde, im Gegensatz zum nativen Homo-Trimer, ein Monomer vorgefunden. Homologiemodelling des Monomers in die Kristallstruktur der trimeren RS aus *E. coli* führte zu dem Befund, daß die Bildung eines aktiven Zentrums durch die Zusammenlagerung benachbarter Monomere zustande kommen könnte. In diesem Modell (Abb. 5) erfolgt die Übertragung der 4C-Kohlenstoffeinheit von dem am C-Terminus gebundenen DMRL-Molekül (Donorseite) auf das am N-Terminus gebundenen DMRL-Molekül des benachbarten Monomers, ebenfalls nach zueinander führen der beiden Domänen (pseudo-C₂-Symmetrie) [34].

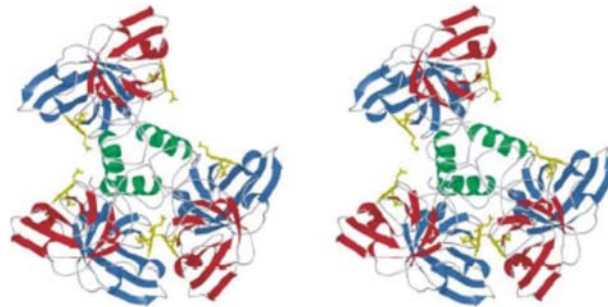


Abb. 5) **Modell der *S. pombe* Riboflavin-Synthase.** Stereodarstellung des Trimers mit gebundenem 6-Carboxyethyl-7-Oxo-8-Ribityllumazin (entnommen aus [34]).

3.4 Die Riboflavin-Synthase aus dem Archaeum *Methanococcus jannaschii*

Die Archaeobakterien verdanken den Namen ihrem weit zurückliegenden Ursprung. Sie bilden eine heterogene Gruppe mit wenigen Arten und besetzen vorwiegend ökologische Nischen.

Das Archaeum *Methanococcus jannaschii* (*MJa*) besitzt eine runde Form (*coccus*) und seine Flagellen sind nur auf einer Seite zu einem Bündel konzentriert. J.A. Leigh isolierte *MJa* aus einer Bodenprobe von der Meeresbodenoberfläche einer „*White-Smoker-Quelle*“ in einer Tiefe von 2600 m im Ostpazifik. Die idealen Wachstumsbedingungen liegen in einem Temperaturbereich von 48-95°C, mit einem Temperaturoptimum von 85°C und einem Druck größer 200 atm. *M. jannaschii* lebt streng anaerob unter Bildung von Methan als Energielieferant durch Reduktion von CO₂ mit H₂ [35].

Bis heute gibt es nur wenige Studien, welche die Enzyme des Riboflavinstoffwechsels aus Archaean charakterisiert haben [36-38]. Es konnte gezeigt werden, daß im Gegensatz zu den bislang bekannten trimeren Riboflavin-Synthasen, die entsprechenden Enzyme aus *M. thermoautotrophicum* und *M. jannaschii* Mg²⁺-Ionen brauchen, um die Riboflavinsynthese aus DMRL effizient zu gewährleisten [36, 38]. Die archaealen Riboflavin-Synthasen weisen außerdem keine Sequenzhomologie zu den bisher bekannten Vertretern aus Eubakterien, Pilzen oder Pflanzen auf. Eine interne Aminosäure-Sequenzhomologie, welche die Riboflavinsynthasen aus Hefe und Eubakterien auszeichnet, konnte ebenfalls nicht gefunden werden.

3.5 Röntgenstrukturanalyse von Proteinen

3.5.1 Proteinkristallisation

Genaue Kenntnisse über Wechselwirkungen zwischen Funktion und Struktur biologischer Moleküle sind für das Verständnis lebender Systeme, ebenso wie für die medizinische und pharmazeutische Forschung, von fundamentaler Bedeutung. Die zuverlässigste Methode zur Aufklärung dreidimensionaler Molekularstrukturen stellt die Röntgenstrukturanalyse dar. Grundvoraussetzung für die Anwendung dieses Verfahrens ist die Verfügbarkeit geeigneter Einkristalle des zu untersuchenden Materials. Die Kristalle müssen von ausreichender Größe (0,5-1 mm) und guter Qualität (keine Verwachsungen oder Gitterversetzungen) sein. Bei der Kristallisation von Proteinen hat man darauf zu achten, daß die Ausdrängung des Proteins aus der Lösung extrem langsam erfolgt, damit die Moleküle ausreichend Zeit finden, sich dreidimensional periodisch translatorisch zu einem Kristallverband zu ordnen. Die Kraftfelder um jedes einzelne Molekül sind stark anisotrop und die Kräfte oft entgegengesetzt ausgerichtet. Intermolekular werden die Gitterbausteine des Kristalls im wesentlichen durch Dispersionskräfte und Coulomb-Wechselwirkungen stabilisiert. Voraussagen über beste Kristallisationsbedingungen bei Proteinen lassen sich nicht machen, da jede Substanz ihre eigene spezifische Sequenz und Struktur aufweist. Die wichtigsten zu variierenden Parameter sind pH-Wert, Art der Pufferlösung, Proteinkonzentration, Art und Konzentration der Präzipitansverbindung, Ionenstärke (falls ein Salz als proteinausdrängendes Agens benutzt wird) und Temperatur. Außerdem ist ein höchstmöglicher Reinheitsgrad aller verwendeten Substanzen, insbesondere des zu kristallisierenden Proteins, Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Kristallzüchtung.

Die derzeit gängigste Methode für die Proteinkristallisation stellt die Dampfphasendiffusion dar. Hierzu wird die hochkonzentrierte Proteinlösung mit einem Fällungsmittel (Präzipitans) versetzt und diese Mischung über einem Reservoir mit höherer Konzentration des Fällungsmittels äquilibriert. Der Konzentrationsgradient zwischen Proteinlösung und Reservoir wird durch die Dampfphase ausgeglichen, was zu einem Aufkonzentrieren des Proteins bis zur Übersättigung führt.

Ein Kristall ist ein homogenes anisotropes Gebilde, das eine regelmäßige periodische Anordnung seiner Bausteine aufweist. Der Kristall kann durch die sog. Elementarzelle

3. Einleitung

(Einheitszelle) beschrieben werden, welche durch die Länge von drei - nicht komplanaren - Vektoren **a**, **b** und **c** aufgespanntes Parallelepiped und deren eingeschlossene Winkel α , β , und γ charakterisiert wird. Die Elementarzelle plus Inhalt ist der Baustein durch dessen Translationsrepetition der Kristall aufgebaut wird. Elementarzellen können eine interne Symmetrie aufweisen, d.h. die Wiederholung einer Anordnung, welche durch verschiedene Symmetrioperationen erfolgt. Deshalb wird die Elementarzelle durch eine kleinere sog. asymmetrische Einheit und den zugehörigen Symmetrioperationen beschrieben. Die asymmetrische Einheit ist demnach der kleinste Teil der Elementarzelle, aus der durch Anwendung aller Symmetrioperationen die Elementarzelle entsteht. Die Zahl der asymmetrischen Einheiten muß nicht mit der Zahl der Moleküle in der Elementarzelle übereinstimmen, so daß auch mehrere Moleküle in einer asymmetrischen Einheit vorliegen können. Für diese Moleküle gilt dann eine nicht-kristallographische Symmetrie (NCS).

Je nach Länge der Vektoren und nach Größe der drei intervektoriellen Winkel lassen sich sieben mögliche Kristallsysteme ableiten: triklin, monoklin, orthorhombisch, tetragonal, trigonal, hexagonal und kubisch. Unter Berücksichtigung aller möglichen Symmetrioperationen resultieren hieraus 230 Raumgruppen. Da die Bausteine von Biomolekülen chiral sind, können weder Spiegelebenen noch Inversionszentren auftreten, und die Anzahl der möglichen Raumgruppen für Proteinkristalle reduziert sich auf 65.

Durch ein räumliches Gitter lassen sich beliebig viele Netzebenen legen, welche mit Gitterpunkten besetzt sind. Solche Flächen schneiden auf den Achsen x , y und z des kristallographischen Koordinatensystems Abschnitte ab, welche in rationalen Zahlenverhältnissen zueinander stehen. Man bezeichnet die reziproken Maßzahlen $x = a/h$, $y = b/k$ und $z = c/l$ als die Indizes der Fläche [39]. In dieser Form bezeichnet man das Indextripel $(h\ k\ l)$ als Millerische Indizes der betreffenden Kristallfläche.

3.5.2 Beugung von Röntgenstrahlen an Kristallen

Für Streuexperimente an Kristallen ist es erforderlich, daß die verwendete Wellenlänge des Lichts mit den Teilchenabständen des Gitters ungefähr kommensurabel ist. Deshalb wird für Strukturaufklärungen überwiegend Röntgenstrahlung (Wellenlänge $\text{CuK}_\alpha = 1,541838\ \text{\AA}$ oder $\text{MoK}_\alpha = 0,71073\ \text{\AA}$) verwendet. Die Streuung erfolgt an den Elektronen der im Gitter befindlichen Atome. Trifft Röntgenstrahlung auf einen Kristall, regt

3. Einleitung

ihr oszillierendes elektrisches Feld die Elektronen der einzelnen Atome im Proteinkristall zu Schwingungen gleicher Frequenz an. Die Elektronen senden ihrerseits dann als oszillierende Dipole eine Sekundärstrahlung gleicher Frequenz aus, welche gegenüber der einfallenden Strahlung eine Phasenverschiebung von 180^0 aufweist (elastische Thompson-Streuung). Die einzelnen gebeugten Strahlen interferieren miteinander, wodurch es in Abhängigkeit ihrer Phasendifferenz zu destruktiver oder konstruktiver Interferenz kommt. Ein charakteristisches Interferenzbild entsteht und kann detektiert werden.

Formell kann die Röntgenstreuung als Reflexion des Strahls an beliebigen Netzebenen gemäß der Braggschen Gleichung $2d_{(hkl)}\sin\alpha_{(hkl)} = n\cdot\lambda$ aufgefaßt werden. Der Reflektionswinkel ist abhängig von der Wellenlänge λ des einfallenden Röntgenstrahls sowie von der Identitätsperiode d (kürzester Abstand von zwei streuenden, parallel liegenden Netzebenen) und von der Ordnung n des betreffenden Reflexes. Positive Interferenz tritt nur dann auf, wenn der Gangunterschied ($2d_{(hkl)}\sin\alpha_{(hkl)}$) ein ganzzahliges Vielfaches der Wellenlänge beträgt. Auf diese Weise kommen die punktförmigen Reflexe des Diffraktionsbildes zustande.

Diese Punkte mit konstruktiver Interferenz spannen ein Gitter auf, das mit dem realen Gitter im Kristall in einem reziproken Verhältnis steht (siehe weiter unten). Im reziproken Gitter repräsentieren diese Gitterpunkte die Interferenzmaxima des Beugungsbildes. Die Punkte des reziproken Gitters (und somit das Streubild eines Kristalls) hängen nur von der Elementarzelle, aber nicht vom Inhalt der Zelle ab. Die Information über den Zellinhalt (Protein) ist in den Intensitäten und Phasen der verschiedenen Reflexe enthalten. Das reale Gitter und das reziproke Gitter sind über eine Fouriertransformation miteinander verknüpft.

Durch Übertragung der Braggschen Reflektionsbedingung in den reziproken Raum entsteht die Ewald-Konstruktion [39] (Abb. 6). Um den Kristall wird an der Stelle K eine Kugel mit dem Radius $1/\lambda$ gelegt. Auf den Schnittpunkt O des ungestreuten Röntgenstrahls durch die Ewald-Kugel wird der Nullpunkt des reziproken Gitters gelegt. Jedem Reflex hkl ist ein Punkt im reziproken Gitter zugeordnet. Jeder dieser Punkte bildet einen Endpunkt des Vektors \mathbf{S} , der die Länge $1/d_{hkl}$ hat und senkrecht auf der Gitterebene hkl steht. Entsprechend läßt sich eine reziproke Zelle mit den Achsen \mathbf{a}^* , \mathbf{b}^* und \mathbf{c}^* konstruieren. Jede dieser Achsen (z.B. \mathbf{a}^*) steht senkrecht auf der Ebene, die von den

3. Einleitung

beiden anderen realen Achsen aufgespannt wird, und hat als Länge den reziproken Wert der entsprechenden realen Achse (z.B. $\mathbf{a}^*=1/\mathbf{a}$). Damit lassen sich die reziproken Gitterpunkte als Vektor $\mathbf{S} = h\mathbf{a}^* + k\mathbf{b}^* + l\mathbf{c}^*$ beschreiben.

Immer wenn ein reziproker Gitterpunkt auf dem Kreis bzw. auf der Kugeloberfläche zu liegen kommt, ist eine Reflektionsbedingung erfüllt, d.h. der reziproke Gitterpunkt P, der die Ewald-Kugel mit dem Radius $1/\lambda$ schneidet, erfüllt exakt die Reflektionsbedingung. Die Richtung des gebeugten Strahls ergibt sich aus der Verbindung des Kristallpunktes K mit dem die Kugel durchquerenden reziproken Gitterpunkt P.

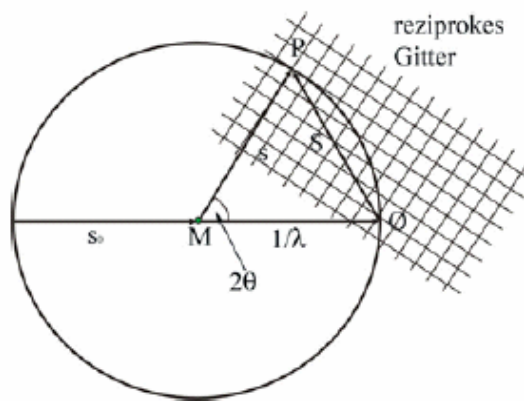


Abb. 6) **Die Ewald-Konstruktion.** Mit der Ewaldkonstruktion lässt sich die Richtung des gestreuten Strahls bestimmen. Die Kugel um den Kristall M besitzt den Radius $1/\lambda$. Der Ursprung des reziproken Gitters (reciprocal lattice) liegt in O. Die Richtung des einfallenden Strahls ist s_0 , die Richtung des gestreuten Strahls ist s und S ist ein reziproker Gittervektor. Die Bedingung für einen Reflex ist erfüllt, wenn sich ein Punkt (P) des reziproken Gitters auf dem Kreis befindet.

3.5.3 Das Phasenproblem und die Phasenbestimmung

Jeder einzelne Reflex im Diffraktionsbild ist das Ergebnis der Interferenz aller an den Elektronen der Atome gebeugten Röntgenstrahlen. Die Fouriertransformation beschreibt den mathematischen Zusammenhang zwischen einem Objekt und seinem Diffraktionsmuster. Die fundamentalen Gleichungen, die diesen Zusammenhang wiedergeben, sollen im folgenden kurz erläutert werden. Die Elektronendichte ρ , d.h. die Positionen von Atomen in der Elementarzelle, lässt sich durch das Fourier-Integral beschreiben:

3. Einleitung

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_{h=-\infty}^{\infty} \sum_{k=-\infty}^{\infty} \sum_{l=-\infty}^{\infty} F(hkl) \exp[-2\pi i(hx + ky + lz)]$$

Bezogen auf die Elementarzelle bedeutet dies, daß die Elektronendichte ρ an jedem beliebigen Punkt (Koordinaten x, y, z) der Zelle berechnet werden kann, sofern das Zellvolumen V sowie die Strukturamplitude \mathbf{F} nebst zugehörigen Phasen α (s. u) und Miller-Indizes h, k, l der einzelnen Reflexe bekannt sind. Die Integration (Summation) läuft über alle h , alle k und alle l der Miller-Indizes vorhandener Reflexe.

Die Phase α jedes einzelnen Reflexes geht bei der physikalischen Messung verloren und muß auf anderem Wege bestimmt werden und stellt das sog. Phasenproblem dar. Das Zellvolumen V läßt sich aus den 6 Gitterkonstanten $\mathbf{a}, \mathbf{b}, \mathbf{c}, \alpha, \beta, \gamma$, welche ihrerseits aus der geometrischen Lage der Reflexe zueinander bestimmt werden können, berechnen. Die Strukturamplitude $|\mathbf{F}(hkl)|$ jedes Reflexes mit den Miller-Indizes h, k, l ist einfach aus der Intensität I des Reflexes über die Beziehung $I = k \cdot |\mathbf{F}|^2$ zu ermitteln, wobei k einen Skalierungskonstante darstellt. Zur Berechnung der Elektronendichte ist die alleinige Kenntnis der Strukturamplituden $|\mathbf{F}(hkl)|$ der einzelnen Reflexe nicht ausreichend; es muß auch die jeweilige Phase α_{hkl} bekannt sein. Strukturamplitude und Phase eines Reflexes liefern dessen Strukturfaktor \mathbf{F} :

$$F(hkl) = |\mathbf{F}(hkl)| e^{i\alpha(hkl)}$$

Ein Strukturfaktor kann als Vektor \mathbf{F} in der Gaußschen Zahlenebene dargestellt werden (nicht gezeigt). Seine Lage ist durch die Phase α , seine Länge durch die Strukturamplitude $|\mathbf{F}|$ festgelegt. Je stärker die Intensität eines Reflexes, desto größer ist der Radius des Kreises.

Alle Punkte des reziproken Gitters besitzen ein Symmetrieelement, welches als Inversionszentrum bezeichnet wird. Der Ursache hierfür liegt darin begründet, daß jeder Reflex einer hkl -Ebene einen Reflex der entsprechenden $-h-k-l$ -Ebene verursacht. Die Intensität beider Reflexe ist äquivalent, und die Strukturfaktoren \mathbf{F}_{hkl} und \mathbf{F}_{-h-k-l} werden Friedel-Paare bezeichnet. \mathbf{F}_{-h-k-l} stellt das Spiegelbild von \mathbf{F}_{hkl} dar und weisen zueinander entgegengesetzte Phasen auf. Das Gesetz von Friedel kann z.B. durch Schwermetall-

3. Einleitung

Derivatisierung aufgehoben werden, was zur Lösung des Phasenproblems beitragen kann.

Jeder einzelne Reflex enthält durch seine individuelle Intensität die Aussage über sämtliche Atompositionen innerhalb der Elementarzelle. Jedes Atom hat eine festgelegte Streukraft und läßt sich ebenfalls vektoriell - analog dem Strukturfaktor - in der Gaußschen Zahlenebene darstellen und wird als Atomformfaktor f bezeichnet. Sein skalaren Wert, d. h. die Summation der Streukräfte der Atome j der Elementarzelle, führt zum Strukturfaktor F :

$$F_{hkl} = \sum_{j=1}^n f_j e^{2\pi i(hx_j + ky_j + lz_j)}$$

Der Strukturfaktor bezieht sich auf einen Reflex, d. h. auf eine Netzebene mit den Miller-Indizes hkl . Für eine Strukturaufklärung ist es erforderlich, die Intensitäten (Strukturamplituden) einiger hundert oder tausend Reflexe zu messen. Je höher die Anzahl an Atomen in der Elementarzelle, desto mehr Intensitäten müssen bekannt sein, um eine ausreichende Strukturgenauigkeit zu erhalten. Die durch solche Messungen nicht zugänglichen Phasen α können durch verschiedene Methoden erhalten werden:

- Die Methode des Isomorphen Ersatzes (MIR oder SIR, single isomorphous replacement) [40], bei denen Schwermetallatome an das Protein im Kristall spezifisch binden.
- Die Methode der Multiplen Anomalen Dispersion (MAD) [41], bei der die Messung bei unterschiedlichen Wellenlängen von anomalen Streuern (z.B. Zink, Selen, Quecksilber) durchgeführt wird.
- Die Methode des Molekularen Ersatzes (MR) [42], [43], [44], [45], bei der die Phaseninformation aus einer bekannten und hinreichend analogen Kristallstruktur erhalten werden kann.
- Direkte Methoden [46], die bei der Bestimmung bei Kleinmolekülstrukturen angewandt werden und bisher noch nicht auf Proteinstrukturen übertragbar sind.

Die Patterson-Methode kann zur Lösung des Phasenproblems von Proteinstrukturen herangezogen werden. Bei dieser Methode benutzt man modifizierte Fourier-Reihen, sog. Patterson-Reihen, bei denen die der Messung direkt zugänglichen Größen $|F(hkl)|^2$

3. Einleitung

(=Intensitäten) als Koeffizienten eingehen. Die Patterson-Reihen liefern im Gegensatz zu den Fourier-Reihen zwar nicht die gesuchte Elektronendichtefunktion $\rho(x,y,z)$, führen jedoch zu den Punktlagen der schwereren Atome in der Elementarzelle. Aus dieser Teilinformation können weitere Phasen ermittelt werden:

$$P(u, v, w) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |F_{hkl}^2| e^{-2\pi(hu+kv+lw)}$$

Der isomorphe Ersatz beruht auf einer lokalen Änderung in der Elektronendichteverteilung des Kristalls, wobei der Rest des Kristalls unverändert bleiben muß (Isomorphie als Grundvoraussetzung). Methodisch können einerseits Kristalle mit Schwermetallsalzen derivatisiert und andererseits Aminosäuren gegen Varianten, die ein schweres Atom enthalten, ausgetauscht werden. Weiterhin können sich bereits im Kristall befindliche Schweratome herausgelöst bzw. durch andere Ionen ersetzt werden.

Wie bereits weiter oben erwähnt, können die Positionen des Schwermetalls innerhalb des Proteins durch Patterson-Synthese ermittelt werden. Zwei in Frage kommende Strukturfaktoren bieten sich als Lösung an. Zwischen diesen beiden Möglichkeiten kann durch Eindiffusion einer zweiten Schwermetallatomsorte in den Proteinkristall unterschieden werden. Auf diese Weise lassen sich die Phasen α bestimmen und letztendlich mit dieser Information die Elektronendichteverteilung berechnen.

Die Strukturfaktoren des Gesamtmodells $\mathbf{F}_{\text{gesamt-hkl}}$ läßt sich als Summe der Strukturfaktoren der einzelnen Atome $\mathbf{F}_{i\text{-hkl}}$ darstellen, welche sich aus den Strukturfaktoren des Proteins \mathbf{F}_P und denen der Schweratome \mathbf{F}_H zusammensetzt ($\mathbf{F}_{\text{gesamt-hkl}} = \sum \mathbf{F}_{i\text{-hkl}} = \mathbf{F}_{P,\text{hkl}} + \mathbf{F}_{H,\text{hkl}}$). Hieraus können die Phasen aus den Koordinaten der zusätzlich eingebrachten Schweratome und den Strukturfaktoramplituden des nativen $|\mathbf{F}_P|$ und des veränderten Kristalls $|\mathbf{F}_{PH}|$ bestimmt werden ($|\mathbf{F}_H| = |\mathbf{F}_{PH}| - |\mathbf{F}_P|$). In guter Näherung kann davon ausgegangen werden, daß die Differenzen in den bestimmten Strukturfaktoramplituden ($\Delta|\mathbf{F}| = |\mathbf{F}_H|$) vom Protein (P) und Derivat (PH) allein auf Differenzen in den Strukturen zurückzuführen sind, also auf die vorhandenen Schwermetallatome im Derivat.

Eine aus den $(\Delta|\mathbf{F}|)$ berechnete Patterson-Synthese sollte also nur die interatomaren Distanzvektoren der Schweratome beinhalten und deshalb durch ein geeignetes Schweratommodell interpretierbar sein. Die initialen Phasenwinkel für die Proteinstrukturfaktoren

3. Einleitung

ren lassen sich also durch den Vergleich der nativen Differenzstrukturfaktoramplitude mit der Derivat- und der Differenzstrukturfaktoramplituden mit den komplexen Strukturfaktoren aus dem Schweratommodell bestimmen. Im günstigsten Fall reicht ein Derivat aus, um hinreichend genaue Phasen zu bestimmen (SIR), jedoch sind hierzu meistens zwei unabhängige Derivate nötig (MIR).

Bei der Bestimmung von Proteinphasen durch Multiple Anomale Dispersion (MAD) wird die Eigenschaft von Schweratomen als anomale Streuer in Proteinkristallen ausgenutzt. Normalerweise sind die Intensitäten zweier Reflexe I_{hkl} und I_{-h-k-l} (Friedel-Paar) identisch. Die Anwesenheit bestimmter Schweratome (z.B. Selen, Zink oder Quecksilber) führt dazu, daß sich die Intensitäten der Friedel-Paare unterscheiden. Dabei wird Röntgenstrahlung mit variabler Wellenlänge (Synchrotronstrahlung) an der spezifischen Absorptionskante des Schweratoms verwendet. Molekular betrachtet findet in der Nähe dieser Absorptionskante keine elastische Streuung der Elektronen mehr statt. Die Wechselwirkung der Synchrotronstrahlung mit dem Atomkern ruft eine Ionisation eines Elektrons aus der K-Schale hervor, was wiederum eine Phasenverschiebung bewirkt, die anomale Streuung oder Dispersion.

Diese Phasenverschiebung unterscheidet sich allerdings von jener der elastischen Streuung (180°). Dies alles hat zur Folge, daß die Strukturfaktoren \mathbf{F}_{hkl} und \mathbf{F}_{-h-k-l} keine komplex konjugierten Zahlen mehr sind und somit für die Phasierung verwendet werden können. Der Atomformfaktor eines anomal streuenden Atoms \mathbf{f}_{ano} läßt sich in einen von Wellenlängen abhängigen \mathbf{f}_λ und einen unabhängigen Anteil \mathbf{f}_0 darstellen, wobei der von Wellenlängen abhängige Teil \mathbf{f}_λ aus einem realen und einem imaginären Teil besteht ($\mathbf{f}_{\text{ano}} = \mathbf{f}_0 + \mathbf{f}_\lambda = \mathbf{f}_0 + \mathbf{f}'_\lambda + i\mathbf{f}''_\lambda$).

Diese Amplitudendifferenzen (Bijovet-Differenzen) der Reflexe ermöglichen die Berechnung einer Patterson-Dichte, aus der sich wiederum ein Modell der Atome erstellen läßt, welche bei einer bestimmten Wellenlänge anomal streuen.

Bei einem MAD-Experiment werden bei drei verschiedenen Wellenlängen jeweils komplette Datensätze von einem einzigen Kristall aufgenommen. Bei der Wellenlänge direkt am Absorptionsmaximum wird ein starkes anomales Signal gemessen, bei einer Wellenlänge knapp neben dem Absorptionsmaximum (ca. $0,001^\circ\text{A}$, inflection point) wird ein Datensatz erhalten, der isomorphe Differenzen zum dritten Datensatz ergibt.

3. Einleitung

Dieser dritte Datensatz (*remote*) wird bei ca. 0,1 °Å neben dem Absorptionsmaximum aufgenommen und dient als nativer Datensatz.

Die Multiple Anomale Dispersion (MAD) kann vereinfachend als spezieller Fall des Isomorphen Ersatzes betrachtet werden. Analog zum MIR-Fall können in einem MAD-Experiment durch eine Harker-Konstruktion initiale Proteinphasenwinkel bestimmt werden. Die MAD-Methode mit Selenatomen wird häufig bei rekombinanten Proteinen angewandt. Das Selen wird als Selenomethionin dem Kulturmedium von Methionin-auxotrophen *E. coli* Zellen zugesetzt, wodurch bei der Proteinbiosynthese das Selenomethionin anstelle von Methionin in das überexprimierte Protein eingebaut wird.

Die Methode des Molekularen Ersatzes (Molecular Replacement, MR) wird angewandt, falls bereits ein Atommodell einer bekannten Kristallstruktur mit hinreichender Ähnlichkeit zum untersuchenden Kristall vorliegt. Die notwendige Phaseninformation kann somit dadurch erhalten werden, indem das ähnliche Atommodell der bekannten Kristallstruktur in einer Patterson-Suche eingesetzt wird. Aus den Koordinaten der bekannten Struktur können die Strukturamplituden $|\mathbf{F}_{\text{calc}}|$ und die Phasen α_{calc} für die zu lösende Struktur berechnet werden. Aus den Modellphasen und den experimentell erhaltenen Strukturfaktoramplituden $|\mathbf{F}_{\text{obs}}|$ wird eine Elektronendichtekarte für die zu bestimmende Kristallstruktur errechnet. In der Regel unterscheiden sich sowohl die Raumgruppen als auch die Orientierung des Proteinmoleküls in der bekannten und in der unbekanntem Kristallstruktur. Deshalb wird das bekannte Strukturmodell erst korrekt in der neuen Kristallzelle positioniert und das sechsdimensionale Suchproblem wird in je drei Rotations- und drei Translationsvariablen aufgeteilt. Die Rotationsorientierung wird anhand der Patterson-Funktion ermittelt. Zunächst werden zwei Patterson-Funktionen berechnet: einerseits die Strukturfaktoramplituden ($|\mathbf{F}_{\text{obs}}|$) aus den gemessenen Beugungsintensitäten und andererseits die Strukturfaktoramplituden ($|\mathbf{F}_{\text{calc}}|$) aus den Atomkoordinaten des Suchmodells. Diese beiden Sätze an Patterson-Vektoren werden in einer Produktfunktion korreliert, wobei der eine Vektorsatz in einer Rotationsfunktion in kleinen Winkelschritten um alle drei Achsen gegen den anderen gedreht wird. Dabei werden die Vektoren innerhalb des Moleküls (Selbstvektoren) zur Deckung gebracht. Nach der korrekten Orientierung erfolgt die Positionierung durch eine Translationsfunktion in allen drei Raumrichtungen der Einheitszelle, wobei die Kreuzvektoren zwischen den verschiedenen Molekülen eingesetzt werden. Durch Fouriertransformation

3. Einleitung

lassen sich anschließend die Phasen berechnen. Erfahrungswerte zeigen, daß diese Methode zum Erfolg führt, wenn eine Homologie der beiden Proteine (ca.25% Identität) gegeben und die r.m.s. Abweichung der C_α-Positionen beider Strukturen < 1 °Å ist.

3.5.4 Modellbau und Verfeinerung

Die Interpretation einer Elektronendichteverteilung erfolgt anhand dreidimensionaler Darstellung auf Graphikstationen mit Stereodarstellung. Wenn ein atomares Modell vorliegt, gilt es, dieses mit Verfeinerungsalgorithmen an die experimentell ermittelten Strukturfaktoren anzupassen. Ein Maß für die Zuverlässigkeit und Qualität einer Strukturbestimmung ist der kristallographische R-Faktor. Hierbei werden die Absolutwerte der gemessenen Strukturamplituden |F_{obs}| jedes einzelnen Reflexes mit dem aus dem Modell berechneten |F_{calc}| verglichen. Ein Skalierungsfaktor k bringt beide auf eine einheitliche Skala. Der R-Faktor sollte für gut verfeinerte Modelle ca. 0,2 betragen (der R-Faktor einer „random structure“ ist 0,58).

$$R = \frac{\sum_{hkl} \left| |F_{obs}| - k|F_{calc}| \right|}{\sum_{hkl} |F_{obs}|}$$

Neben dem kristallographischen R-Faktor gibt es auch noch den freien R-Faktor als weiteren Maßstab zur Beurteilung der Modellqualität. Zur dessen Berechnung wird ein gewisser Prozentsatz der beobachteten Reflexe (5-10%) nicht in die Berechnungen für die Verfeinerung mit einbezogen. Die Übereinstimmung dieser Reflexe mit der aus dem Modell berechneten Partnern wird am Ende einer Verfeinerung als Kriterium gewertet, ob das erhaltene Modell wirklich besser an die Realität (Meßergebnis) angepaßt wurde, oder ob die Annäherung der |F_{calc}| an die |F_{obs}| eher aus einer besseren „Modellierung“ des Rauschens und der Meßfehler resultiert (Überverfeinerung). Die Differenz zwischen R und R_{free} sollte für ein gut verfeinertes Modelle 5% nicht übersteigen. Die geometrischen Parameter nach einer Verfeinerung sollten nahe an Idealwerten liegen; d.h. die mittleren quadratischen Abweichungen von Bindungslängen und Bindungswinkeln sollten ca. 0.01Å bzw. 2 Grad betragen.

4. Material und Methoden

4.1. Proteinbiochemische Methoden

SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

Das Enzym Riboflavin-Synthase wurde von Dr. Ann-Kathrin Schott (TU München, Arbeitskreis Prof. Dr. Bacher) exprimiert, isoliert, gereinigt und freundlicherweise zu Verfügung gestellt. Zur Analyse der Reinheit wurde ein SDS-PAGE durchgeführt. In einer diskontinuierlichen, denaturierenden Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden hierbei die Proteine im elektrischen Feld in distinkte Banden aufgetrennt. Die SDS-PAGE wurde mit einem 7-10%igen Sammelgel und einem 12-16%igen Trenngel durchgeführt.

Es wurden jeweils acht Gele (8,5x8cm²) in einer Gelgießkammer (Eigenbau, MPI Martinsried) gegossen. Die Trenngellösung wurde nach Zugabe von 90µl TEMED und 450µl (0,1gml⁻¹) APS in die vorbereitete Apparatur gegossen und mit 300µl Isopropanol überschichtet. Nach erfolgter Polymerisation wurde die Alkoholschicht entfernt, das Sammelgel mit 32µl TEMED und 300µl (0,1gml⁻¹) APS versetzt und in den Gießstand eingefüllt. Teflon-Kämme mit zehn bis 18 Geltaschen wurden luftblasenfrei in das Sammelgel eingesetzt und die polymerisierten Gele bis zur Verwendung bei 4°C gelagert. Für die Gelelektrophorese wurden die Proteinproben mit 2x-Probenpuffer versetzt und 2min bei 95°C inkubiert. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 30mA im SDS-Laufpuffer.

Komponente	Trenngel (12.5%)	Sammelgel (5%)
Puffer A	37.5 ml	-
Puffer B	-	2.5 ml
Acrylamide-Stock	40 ml	8.3 ml
H ₂ O	21 ml	38.4 ml
10% (w/v) SDS	1 ml	0.5 ml
TEMED	80 µl	40 µl
10% (w/v) APS	500 µl	250 µl
Pyronine G	-	0.5 ml

Tab. A: Zusammensetzung von Polyacrylamidgelen.

4. Material und Methoden

Puffer A: 1M TRIS/HCl
pH 8.8

Puffer B: 2.5 M TRIS/HCl
pH 6.8

Acrylamide-Stocklösung: 30 % (w/v) Acrylamide
0.8 % (w/v) Bisacrylamide

Probenpuffer: 1.25 ml 2 M TRIS/HCl, pH 6.8
0.8 g SDS
3.2 ml Glycerol (87%)
180 µl 2-Mercaptoethanol
+ eine Spatelspitze Bromophenolblau
Finales Volumen auf 10ml mit H₂O eingestellt

Laufpuffer: 25 mM TRIS/HCl
200 mM Glycin
0.1 % (w/v) SDS
pH 8.3

Coomassie-Färbung

Polyacrylamid-Gele wurden nach erfolgter Elektrophorese in einer Coomassie-Lösung gefärbt. Dazu wurden die Gele in der Färbelösung kurz erhitzt, 15min bei RT geschüttelt, danach in Entfärbelösung solange gewaschen, bis der Hintergrund farblos erschien.

Färbelösung:
2.5 g Coomassie Brilliant Blue R-250
250 ml Ethanol
80 ml Essigsäure
aufgefüllt mit H₂O zu einem finalen Volumen von 1 l

Entfärbelösung:
1.25 l Ethanol
0.4 l Essigsäure
aufgefüllt mit H₂O zu einem finalen Volumen von 1 l

4. Material und Methoden

Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford

Die Konzentration von Proteinen in Lösung wurde mit der Methode nach Bradford photometrisch bei 595nm bestimmt. Dazu wurde eine Eichgerade mit BSA in den Konzentrationen 0,1 bis 15µgml⁻¹ im Absorptionsbereich von 0 bis 1,2 erstellt. 200µl Bradfordreagenz (BioRad, München) wurden mit 1 bis 50µl Probenlösung versetzt und mit ddH₂O auf 1ml Volumen aufgefüllt. Nach 5min Inkubation bei RT wurde die Extinktion bei 595nm photometrisch bestimmt.

Konzentrationsbestimmung von Proteinen durch Absorption bei 280nm

Die Absorption einer Protein-Probe wurde bei 280nm in einem Beckman UV7500-Spektrometer in einer Quartz-Küvette gemessen. Eine Lösung, die den entsprechenden Puffer nur enthielt, wurde als Leerwert verwendet. Die Konzentration der Probe wird nach dem Lambert-Beerschen Gesetz bestimmt:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

A ist die Absorption bei 280nm, ist ε der molare Absorptionskoeffizient, c die molare Konzentration des Proteins in Lösung und d ist die Länge der Küvette. Der molare Absorptionskoeffizient der Riboflavin-Synthase wurde nach der Methode von Gill und Hippel [47] berechnet (9650 M⁻¹cm⁻¹).

N-terminale Ansequenzierung

Die N-terminale Ansequenzierung erfolgte nach dem Prinzip des Edman-Abbaus. Die Analyse wurde freundlicherweise in der Abteilung Proteinanalytik (im Hause) durch Dr. K.-H. Mann durchgeführt.

Chemikalien

Soweit nicht anders vermerkt, wurden alle Chemikalien von den Firmen Sigma, Bachem, Fluka, Aldrich, Merck und Roche Diagnostics bezogen.

4.2 Kristallographische Methoden

4.2.1 Proteinkristallisation

Die Kristallisationsansätze erfolgten bei 18°C nach der Dampfdiffusionsmethode im sitzenden Tropfen (*sitting drop*) in CrysChem Platten (Charles Supper Company), im hängenden Tropfen (*hanging drop*) in Limbro-Platten oder in Polystyroidosen von 3 cm Höhe und 7,5 cm Durchmesser auf 1,5 cm hohen Kunststoffbänkchen. Die CrysChem Platten wurden mit transparenter Klebefolie (CrystalClear, MancoInc., Avon, USA) verschlossen. Der Kristallisationsverlauf wurde über mehrere Monate verfolgt. Für das *screening* einer großen Anzahl von Kristallisationsbedingungen wurde das Prinzip des *sparse matrix sampling* angewandt. Dabei wurden jeweils 1µl (5,5 mgml⁻¹) Proteinlösung mit 1µl des Kristallisationspuffers vermischt und gegen 250-500µl Reservoirlösung äquilibriert. Initiale Kristallisationsbedingungen wurden durch Variation verschiedener Parameter (Konzentration von Protein, Präzipitanz sowie etwaiger Additive; Tropfenvolumen und Mischungsverhältnis; Temperatur; *screening* verschiedener Additive) optimiert.

4.2.2 Datensammlung und Datenreduktion

Zur Aufnahme von Röntgendiffraktionsdaten bei 291K wurden Kristalle in silanisierten Quarzkapillaren (0,5mm Ø, Mark-Röhrchen für röntgenographische Aufnahmen, W. Müller, Berlin) montiert. Beide Seiten der Kapillare wurden anschließend mit etwas Reservoirlösung gefüllt und mit Dentalwachs (Richter&Hoffmann Harvard Dental GmbH) verschlossen. Die Kapillaren wurden auf einem Goniometerkopf fixiert und die Datensätze als Serie von Rotationsaufnahmen auf einer Drehanode bei (50kV, 100mA) gesammelt. Die Messungen erfolgten mit Graphit-monochromatisierter CuK α -Strahlung ($\lambda=1,5418\text{\AA}$) auf einer MAR345 *Image Plate* (MAR Research, Hamburg). Alternativ wurden Cryo-Datensätze bei 100K aufgenommen. Dazu wurde ein Kristall in einer Nylon-Schleufe (Hampton Research) aufgenommen, in einem geeigneten Cryoprotektans äquilibriert und entweder in flüssigem Stickstoff oder im Stickstoffstrom bei 100 K schockgefroren. Die Bestimmung der Kristallorientierung, der Elementarzelle und der Raumgruppe sowie die Integration der Reflexintensitäten erfolgte mit MOSFLM, Version 6.01 – Version 6.11 [48] oder DENZO [49]. Die weitere Analyse der Daten wurde mit den Programmen des CCP4 *program package* [50] oder des HKL-Programmpakets

4. Material und Methoden

[49] durchgeführt. MAD-Daten der Riboflavin-Synthase aus *Methanococcus jannaschii* wurden an der *Beamline* BW6 (Wiggler-Beamline mit Toroidspiegel) am Synchrotron (DESY, Grenoble) aufgenommen. Dazu wurde Synchrotronstrahlung einer Wellenlänge von 0,949 bis 1,28 Å verwendet.

Die Kristallstruktur der Riboflavin-Synthase wurde mittels *Multiwavelength Anomalous Dispersion* (MAD) mit Selenomethionin als anomalem Streuer gelöst. Selen-Positionen wurden mit dem Programm SOLVE [51] lokalisiert und mit SHARP [52] verfeinert.

Die Komplexstruktur mit dem Substrat-Analogen von 6,7-Dioxo-8-Ribityllumazin wurde mittels *Molecular Replacement* mit dem Pentamer als Suchmodell gelöst. Atomare Proteinmodelle wurden auf einer SILICON GRAPICS *work station* mit dem Programm MAIN [53] in die Elektronendichte eingepaßt. Diese Atommodelle wurden mit CNS [54] oder REFMAC5.0 (COLLABORATIVE COMPUTATIONAL PROJECT NUMBER, 1994) verfeinert. Als Zielfunktion wurde der freie R-Faktor minimiert, wobei 5 % bzw. 10 % der Reflexe zufällig ausgewählt und als Test-Set nicht in die Verfeinerung einbezogen [54].

Analyse von Atommodellen

Die Molekülgeometrien wurde mit dem Programm PROCHECK [55] analysiert. Überlagerungen und *least-square-fits* von Koordinaten wurden mit TOP3D (COLLABORATIVE COMPUTATIONAL PROJECT NUMBER, 1994) oder MAIN [53] durchgeführt. Sekundärstrukturelemente wurden mit den Programmen STRIDE [56] und MOLSCRIPT [57, 58] automatisch zugeordnet und visuell überprüft und angepaßt.

Graphische Darstellungen und Sequenzvergleiche

Zur graphischen Darstellung von Molekülmodellen wurden die Programme MOLSCRIPT [57, 58] und PYMOL [59] benutzt. Moleküloberflächen wurden mit dem Programm GRASP [60] berechnet und in PYMOL dargestellt. Zur graphischen Darstellung von Sequenzvergleichen wurde das Programm CLUSTALW [61] verwendet.

Zur Nachbearbeitung von Bildern sowie zu deren Konvertierung kamen die Programme PHOTOSHOP (Adobe Systems Inc., USA), XV (J. Bradley, Pennsylvania, USA) und CorelDRAW (Corel Corporation Limited, 1998) zur Anwendung.

4. Material und Methoden

Proteinkristallisation

Wildtyp-Riboflavin-Synthase:

Kristalle der Wildtyp-Riboflavin-Synthase wurden bei 18⁰C nach der Dampfphasendiffusions-Methode gezüchtet. Hierzu wurden äquivalente Mengen der Protein-Lösung (6 mg Protein/ml, 100 mM Kaliumphosphat (pH 7.0), 2 mM DTT in 30 mM TRIS, pH 7.0) mit der Reservoir-Lösung (40% MPD, 0.1 M HEPES, pH 7.0) vermischt. Die kleinen Kristalle bildeten sich hierauf innerhalb weniger Tage und gehörten der Raumgruppe P1 an. Die Indizierung ergab folgende Zellkonstanten: $a=41.9\text{Å}$, $b=72.9\text{Å}$, $c=72.7\text{Å}$ und $\alpha=68.9^\circ$, $\beta=74.9^\circ$, $\gamma=75.1^\circ$, welches fünf Monomeren pro asymmetrischer Einheit entspricht.

Riboflavin-Synthase (SeMet):

Selenomethionin-substituierte RS wurde durch Vermengen äquivalenter Anteile der Proteinlösung (6mg/ml) mit der Reservoir-Lösung (0.1 M HEPES (pH 7.3), 0.1 M Ammoniumsulfate and 20% PEG 4000) bei 18⁰C kristallisiert. Diese Kristalle entsprachen der Raumgruppe P6₃, mit den Zellkonstanten $a=b=103.8\text{Å}$, $c=129.4\text{Å}$ und $\alpha=\beta=90^\circ$, $\gamma=120^\circ$ (und enthielten ebenso fünf Monomere pro asymmetrischer Einheit).

Riboflavin-Synthase mit dem Substratanalogon:

Der Protein-Inhibitor-Komplex mit dem Substrat-Analogon 6,7 Dioxoribityllumazin wurde durch Inkubation des nativen Kristalls mit einem Überschuß des Inhibitors (nach Zugabe) erhalten. Nach zwei Stunden Inkubationszeit wurde der Kristall in die Cryo-Lösung überführt, schockgefroren und im Hause vermessen.

Darstellung von Schweratomderivaten:

Kristalle der Riboflavin-Synthase wurden zur Derivatisierung mit Schwermetallatomen verwendet. Hierzu wurde das Schwermetallsalz in einer Lösung, die der Reservoir-Bedingung der Kristallisationsbedingung entspricht, gelöst. Um eine optimale Bedingung zu finden, wurden verschiedene Schwermetalle in verschiedenen Konzentrationen mit unterschiedlich langen Inkubationszeiten (aufgrund des empirischen Charakters) verwendet. Die folgenden Schweratom-Komponenten wurden getestet: K₂PtCl₄, HgCl₂, AgNO₃, AuCl₃, ErCl₃, Thiomersal, OsCl, IrCl, ReCl, OsO₄ im Konzentrationsbereich von 0.1 to 20 mM.

4.3 Phylogenetische Analyse

Für die in dieser Arbeit durchgeführte phylogenetische Analyse wurde das Programm GCG (*Wisconsin Sequence Analysis Package*) verwendet, um einen phylogenetischen *tree* zu erhalten [62]. Die phylogenetische Rekonstruktion erfolgte mit dem (Sub)Programm *Distances*, welches eine Matrix evolutionärer Distanzen in Form von Paaren generiert. Es muß hierbei beachtet werden, daß die Sequenzen zuvor sorgfältig in einem Aminosäure-*Alignment* verglichen worden sind. Ein *alignment* kann deshalb schon als eine Hypothese eines potentiellen Evolutionsablaufes betrachtet werden. Ein Dendrogramm ist keine exakte phylogenetische Rekonstruktion und stellt keinen phylogenetischen *tree* dar.

Einige allgemeine Richtlinien bei phylogenetischen Analysen umfassen unter anderem, daß eine Homologie der ausgewählten Regionen der Sequenzen vorliegen muß sowie, daß divergierende Anteile der Moleküle z.B. Überhänge am N- und C-Terminus (z.B. Signalpeptide) nach einem ersten *alignment* trunkiert werden müssen. Von besonderer Bedeutung ist ferner, daß alle enzymatischen, regulatorischen und strukturellen Elemente korrekt miteinander verglichen werden. Generell kann bei phylogenetischen Rekonstruktionen eine Analyse von Paralogen (Evolution durch Gen-Duplikation), um eine Phylogenie von Genen festzustellen oder eine Analyse von Orthologen durchgeführt werden (Evolution von einem gemeinsamen Urahn) mit dem Ziel, auch eine vermutete Phylogenie zwischen verschiedenen Organismen zu verifizieren.

Nach Evaluierung der Sequenzen und sorgfältigem *Alignment* wurde die sogenannte *uncorrected distance* zur Erstellung der Distanz-Matrix herangezogen. Diese Methode beinhaltet keine Korrektur für multiple Substitutionen (d.h. Mutationen die wieder zur selben DNA-Sequenz oder zum einem anderen Codon für dieselbe Aminosäure führt) und wird manchmal in der Literatur als *p-distance* oder auch als *Hamming distance* bezeichnet. Sie gibt die Anzahl unterschiedlicher Stellen zweier gleich langer Zahlenketten an.

Diese Methode liefert nur für sehr nah verwandte Sequenzen eine zuverlässige Abschätzung der evolutionären Divergenz. Die Ähnlichkeit S und die *uncorrected distance* D sind wie folgt definiert:

$S = \text{übereinstimmende Stellen} / (\text{Gesamtzahl der Stellen} + \text{gaps} * \text{gap penalty})$

$D = \text{uncorrected distance} = p\text{-distance} = 1 - S.$

5. Ergebnisse

5.1 Strukturaufklärung der Riboflavin Synthase aus *M. jannaschii*

5.1.1 Kristallisation, Datensammlung und Strukturlösung

Zu Beginn dieser Arbeit lag bereits eine initiale Kristallisations-Bedingung vor, welche von Dr. Anne-Kathrin-Schott und Dr. Stefan Gerhardt in unserem Labor etabliert wurde [32]. Hierzu wurden 4 μl WT-RS (6 mg/ml) mit 2 μl Reservoirlösung (40% MPD; 0,1 M HEPES pH 7.0) gemischt. Einzelne Kristalle wuchsen innerhalb von drei Wochen zu einer ausreichenden Größe (Abb. 7). Der Kristall beugte bis zu einer Auflösung von 2,3 \AA (Abb. 8) und ein vollständiger Datensatz konnte im Hause aufgenommen werden.

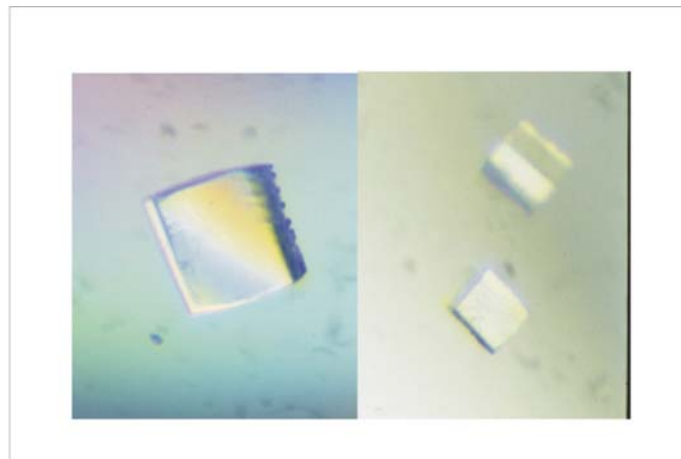


Abb. 7) Kristalle der WT-RS aus *M. jannaschii*.

Die Indizierung der Reflexe ergab eine monokline Einheitszelle mit den Zellkonstanten $a=41,8 \text{ \AA}$, $b=72,69 \text{ \AA}$, $c=72,7 \text{ \AA}$, $\alpha=68,5^\circ$, $\beta=74,6^\circ$ und $\gamma=74,9^\circ$. Die *MJaRS* sedimentiert in analytischen Ultrazentrifugationsexperimenten als eine einzelne Grenzschicht mit einer apparenten molekularen Masse von 88 kDa [32, 38]. Die biochemischen Hinweise auf ein Vorliegen der Wildtyp *MJaRS* als Tetramer oder bzw. als Homopentamer werden durch die kristallographischen Daten verifiziert. Das Volumen zu Massenverhältnis V_m beträgt für ein *MJaRS*-Pentamer pro asymmetrischer Einheit $2,23 \text{ \AA}^3/\text{Da}$ mit einem Solvensgehalt von ungefähr 45%.

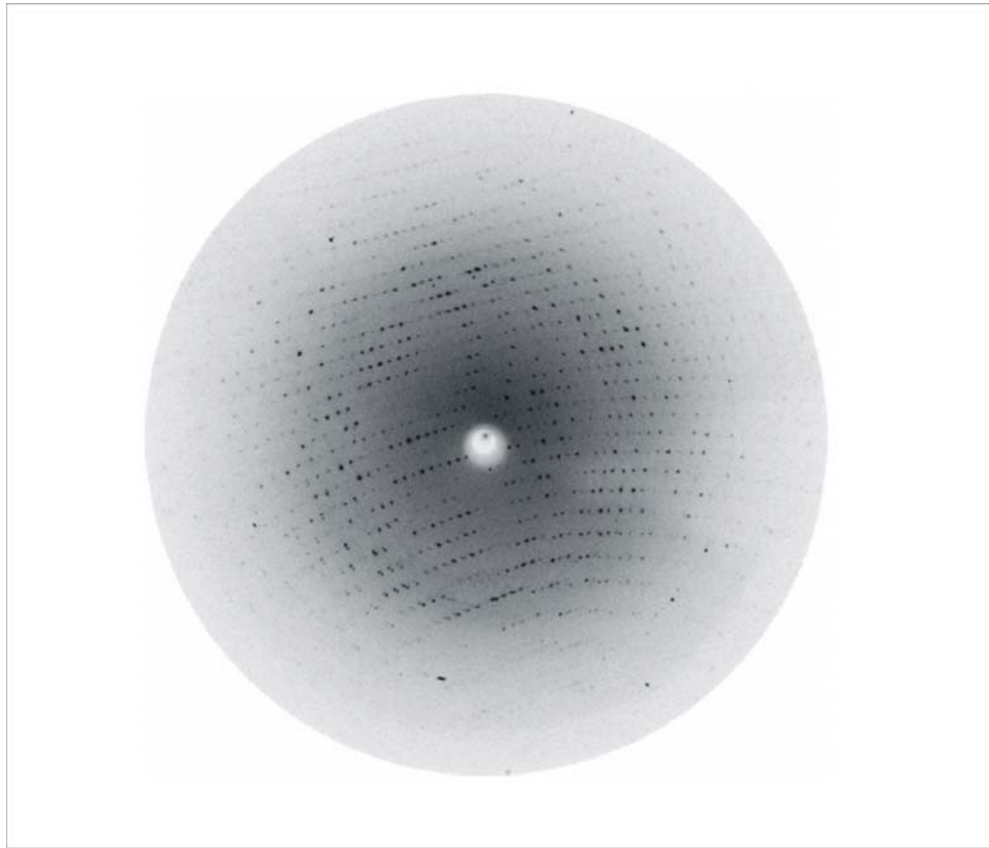


Abb. 8) **Röntgenbeugungsbild der Wildtyp RS aus *M. jannaschii***. Die maximale Auflösung am Plattenrand beträgt 2,3 Å.

5.1.2 Phasierung, Modellbau und Verfeinerung

Der Versuch, die Strukturlösung durch molekularen Ersatz mit dem Modellen der trimeren RS aus *E. coli* bzw. *S. pombe* durchzuführen, schlug fehl (Daten nicht gezeigt). Daher wurde zum einen mit verschiedenen Schwermetall-, „Soaks“ versucht, das Phasenproblem zu lösen (nicht gezeigt) und andererseits wurde parallel eine neue Kristallisations-Bedingung für die Se-Met-substituierte *MJaRS* gesucht. Letztere Methode führte zum Erfolg. Mit der Kristallisations-Bedingung HF30 aus den eigenen „Home-factorials“ wuchsen innerhalb 2 Wochen Kristalle ausreichender Größe heran. Am Synchrotron in Grenoble wurde freundlicherweise von Dr. Tobias Krojer ein kompletter Datensatz aufgenommen. Das SeMet-Protein kristallisierte in der Raumgruppe $P6_3$ und streute bis zu einer Auflösung von 3,2 Å. Ein initiales Modell konnte generiert werden, welches weiterhin als Modell für den Molekularen Ersatz des nativen Kristalls (höhere Auflösung) diene.

5. Ergebnisse

Die Orientierung und Positionierung des RS Pentameres erfolgte durch Rotationssuche und anschließender Translationsuche in der Raumgruppe P1 in einem Auflösungsbe-
reich von 50 bis 4,5 Å mit dem Programm MOLREP [50]. Das RS Pentamer konnte
eindeutig mit einem Korrelationswert von 0,379 und einem *R*-Faktor von 47% positio-
niert werden. Ein anschließendes *rigid body fitting* und *simulated annealing* des positio-
nierten Suchmodelles mit dem Programm CNS Version 1.0 [54] führte zu einem ersten
kristallographischen Arbeits-*R*-Faktor von 34%. Zur Berechnung des freien *R*-Faktors
wurden 10% der Reflexe verwendet.

Die erste Verfeinerung der einzelnen Atompositionen unter Verwendung der Parameter
von Engh und Huber [63] ließ den *R*-Faktor auf 28% sinken. Die aus diesen
Koordinaten erhaltene 2F_o-F_c-Elektronendichte war von guter Qualität und erlaubte den
manuellen Einbau der *MJaRS*-Aminosäuresequenz. Eine abschließende Verfeinerung
der Atompositionen ergab *R*-Faktoren von 20,7% (kristallographisch) bzw. 27,5%
(frei).

Die Prozessierung der Daten und die finale Verfeinerungsstatistik der Wildtyp-RS so-
wie des SeMet-Derivates ist in Tabelle 1 zusammengestellt. Beide Kristalle enthalten
identische Pentamere in ihrer asymmetrischen Einheitszelle, welches dem nativen Zu-
stand in Lösung entspricht.

Qualität des Atommodells:

Die Struktur der nativen RS und die Struktur im Komplex mit dem Substratanalogon
sind sehr gut in ihrer Elektronendichte definiert, mit Ausnahme einiger C-terminaler
Aminosäuren. Das Fehlen von Elektronendichte im C-terminalen Bereich in drei von
fünf Untereinheiten des nativen Datensatzes kann als hohe Beweglichkeit in diesem
Bereich interpretiert werden. Das endgültige Modell der pentameren RS im Komplex
mit dem Substratanalogon 6,7-dioxo-8-ribityllumazin umfasst 742 Reste. Abgesehen
von einigen auf der Oberfläche des RS-Pentameres lokalisierten Seitenketten sind alle
742 Aminosäuren sehr gut durch ihre Elektronendichte charakterisiert. Eine Geometrie-
Analyse des Ligand RS-Modells zeigt, daß 93,8% und 5,8% der Aminosäuren in dem
am meisten bevorzugten und den zusätzlich erlaubten Bereichen liegen. Die Analyse
zeigt ferner, daß nur 0,2% der Aminosäuren im weitläufig erlaubten Bereich liegen. Die
Parameter der Stereogeometrie der beschriebenen RS-Modelle sind in der Tabelle 1
vergleichend aufgeführt.

5. Ergebnisse

Structure	SeMet	Native	Inhibitor Complex
Crystal data			
Space group	P6 ₃	P1	P1
Cell constants	a = b = 103.83Å, c = 129.43Å α = β = 90°, γ = 120°	a = 41.77Å, b = 72.69Å, c = 72.70Å α = 68.47°, β = 74.61°, γ = 74.90°	a = 41.94 Å, b = 72.91 Å, c = 72.78Å α = 68.50°, β = 74.39°, γ = 74.53°
Data collection			
Wavelength (Å)			
Resolution range (Å) ¹	20.0 – 3.21	50.0 – 2.30 (2.38 – 2.30)	20.0 – 2.22 (2.31 - 2.22)
Completeness (%) ¹	91.7 (93.4) ²	96.0 (92.2)	90.9 (71.9)
Unique reflections	23438 ²	32165	34797
Redundancy ¹	2.2 (2.2) ²	1.9 (1.8)	3.4 (3.2)
I/σ ¹	14.1 (3.5)	12.2 (3.4)	7.9 (2.9)
R _{sym} (%) ¹	4.4 (21.1) ²	5.0 (24.5)	7.1(26.0)
Phasing			
Phasing power acentric	0.702	–	–
R _{culis}	0.899	–	–
Figure of merit			
SHARP	0.220	–	–
RESOLVE	0.485	–	–
Refinement			
Resolution range (Å)	–	20.0 – 2.30	20.0 – 2.22
R _{cryst} (%)	–	20.77	25.80
R _{free} (%) ³	–	27.56	29.57
R.m.s deviation			
bonds (Å)	–	0.010	0.007
angles (°)	–	1.233	1.337
Ramachandran plot⁴			
Most favoured (%)	–	92.3	93.8
Generously allowed (%)	–	6.9	5.8
Additionally allowed (%)	–	0.5	0.3
Disallowed (%)	–	0.3	0.2
Nonhydrogen protein atoms			
Solvent molecules	–	5342 294	5756 233
Average B values (Å²)			
Protein	–	33.7	29.8
Solvent	–	44.9	34.2
Inhibitor	–	–	37.83

¹Highest resolution bin in parenthesis.

²Friedel-mates treated as independent reflections.

³R_{free} is the crossvalidation R factor computed for a test set of 5% of unique reflections.

⁴Ramachandran statistics as defined by PROCHECK [55].

Tab. 1 **Statistik der Datenprozessierung und Verfeinerung**

5.1.3 Strukturbeschreibung einer Untereinheit

Das finale Modell der pentameren RS aus *M. jannaschii* besteht aus 725 Aminosäuren mit einer gut definierten Elektronendichte bezüglich der Hauptkette. Am C-Terminus ist die Elektronendichte bei drei Untereinheiten des Pentamers nur schwach definiert (Aminosäurereste 143 – 153), jedoch sind die meisten Seitenkettenreste klar definiert mit Ausnahme einiger zur Oberfläche hin exponierter Reste.

Das *MJaRS*-Monomer bildet eine Dreischichtenstruktur ($\alpha \beta \gamma$) mit einem viersträngigen parallelen β -Faltblatt flankiert von zwei α -Helices (Abb. 9). Die Topologie der Sekundärstruktur des Monomers ist $\beta_1 \alpha_1 \beta_2 \beta_3 \alpha_3 \beta_4 \alpha_4 \alpha_5 \beta_5 \beta_6$. Der Zwischenraum zwischen zweier Untereinheiten des Pentamers wird durch die Helices α_2 und α_3 , dem Faltblattstrang β_4 und β_2 einer benachbarter Untereinheiten generiert. Wie bereits in der Einleitung betont, impliziert die partielle Sequenzhomologie von LS aus verschiedenen Organismen mit der RS aus *M. jannaschii* eine ähnliche dreidimensionale Struktur. In der Tat sind Art und Charakter der Interaktionen, welche zur Bildung des Pentamers führen, der LS sehr ähnlich.

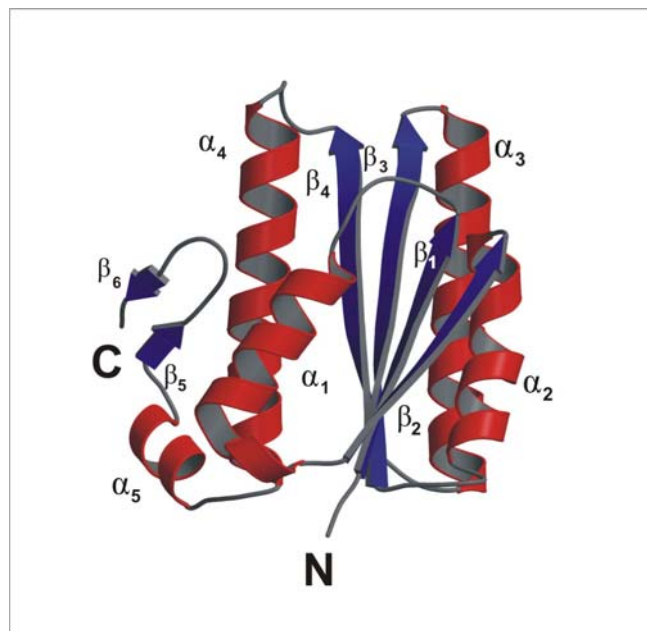


Abb. 9) Ribbondarstellung des Riboflavin-Synthase Monomers. β -Faltblattstrukturen sind blau und Helix-Motive sind rot dargestellt.

5.1.4 Anordnung der Untereinheiten zum *MJaRS*-Pentamer

Eine DALI-Datenbank-Recherche [64] ergab mehrere Proteinstrukturen mit einem DMRL-Faltungsmuster (SCOP 52121). Die besten Übereinstimmungen sind die Lumazin-Synthasen aus folgenden Organismen: *B. abortus* (protein data bank [PDB] code 1DIO-A, Z-score 18.4, rmsd für 132 C_{α} -Atome = 2.2, Sequenzidentität 14%) und *B. subtilis* (protein data bank [PDB] code 1RVV-1, Z-score 16.7, rmsd für 129 C_{α} -Atome = 2.1, Sequenzidentität 22%). Des Weiteren konnten auch strukturelle Homologien zu anderen Proteinen, wie z.B. zum D-Ribose bindenden Protein aus *E. coli* (protein data bank [PDB] code 2DRI, Z-score 11.1, rmsd für 121 C_{α} -Atome = 2.6, Sequenzidentität 13%) detektiert werden.

Gleichwohl *MJaRS* geringe Differenzen zu bekannten Strukturen der LS aufweist, liegt eine markante Verschiedenheit am C-Terminus der Struktur vor. In dieser Region weist *MJaRS* eine α -Helix und ein zweisträngiges anti-paralleles β -Faltblatt auf (Abb. 10). Das anti-parallele β -Faltblatt und die α -Helix sind an der Kontaktfläche zwischen benachbarten Untereinheiten lokalisiert. Wie später noch im Detail erörtert wird, resultiert hieraus eine engere Kavität im Vergleich zu Lumazin-Synthasen.

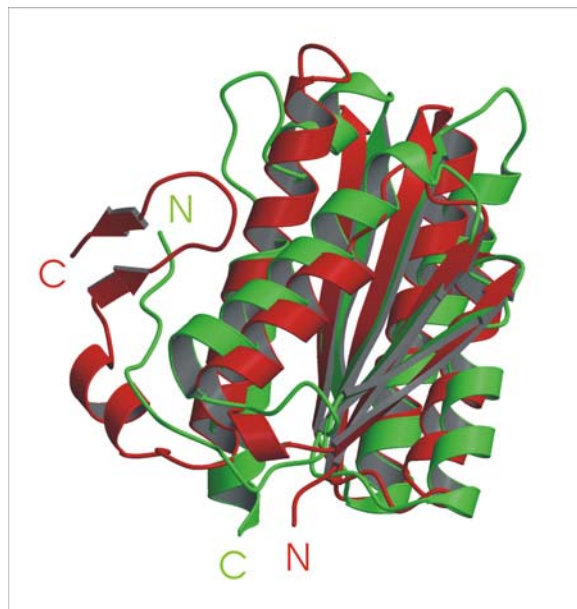


Abb. 10) **Strukturelle Superposition des Monomers von *MJaRS* (rot) mit pentamerer *S. pombe* LS** (grün; pdb-code 1KYZ).

5. Ergebnisse

Die Gesamtstruktur des Pentamers von *MJaRS*, entlang der 5-zähligen nicht kristallographischen Symmetrieachse ist in Abbildung 11 gezeigt.

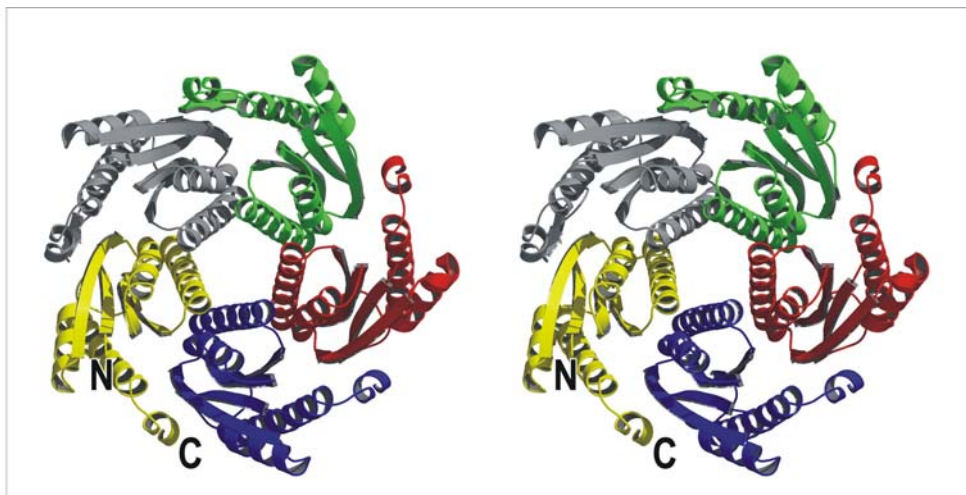


Abb. 11) **Stereo-Ribbondarstellung des *MJaRS*-Pentamers entlang der 5-zähligen nicht-kristallographischen Symmetrieachse.** Individuelle Untereinheiten sind in verschiedenen Farben gezeigt.

5.2 Lokalisation des aktiven Zentrums der *MJa*-Riboflavin-Synthase

Die in der wissenschaftlichen Fachliteratur bisher diskutierten Reaktionsmechanismen beruhen alle auf der Annahme eines ionisch-nukleophilen Reaktionsmechanismus als initialen Schritt der Riboflavin-Biosynthese. Diese Modelle postulieren, dass das Intermediat (**1**; Abb. 12) das Resultat eines nukleophilen Angriffs auf das C7-Kohlenstoffatom des an der Donator-Seite gebundenen DMRL-Moleküls ist. Dieses Intermediat kann z.B. durch die Verbindung 6,7-Bis(trifluormethyl)-8-ribityllumazin-7-hydrat (nur eines der beiden Epimere ist gezeigt) nachgeahmt werden. Die Ausgangssituation an der Akzeptor-Seite beinhaltet die Bildung eines Exomethylenanion (**2**; Abb. 12), welches durch Abstraktion des 7α -Protons von DMRL gewährleistet wird. Diese initiale Situation kann z. B. durch die Verbindung 6,7-Dioxo-8-ribityllumazin (**2a**) simuliert werden, welche an dieser Position eine 7-Carbonylgruppe aufweist. Die Strategie zeigt den Ansatz, die hypothetischen frühen Ausgangsintermediate an Akzeptor- bzw. Donor-Seite durch analoge Verbindungen zu simulieren [65, 66].

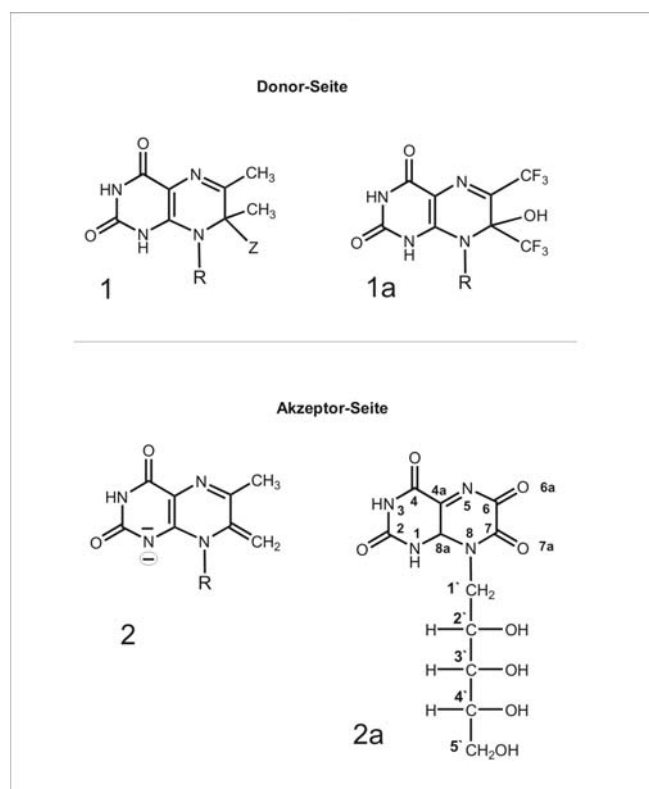


Abb. 12) **Initiale Molekül-Intermediate und Substrat-Analoga des hypothetischen ionisch-nukleophilen Reaktionsmechanismus.** Die Substratanaloga 6,7-Bis(trifluormethyl)-8-ribityllumazin-7-hydrat (**1a**) und 6,7-Dioxo-8-ribityllumazin (**2a**) simulieren die Situation an der Donor-Seite (**1**) bzw an der Akzeptor-Seite (**2**).

Um das aktive Zentrum der Dismutationsreaktion von *MJaRS* zu identifizieren, wurden Kristalle (P1) im *hanging-drop* mit einer kleinen Menge (ca.2mg) des Substrat-Analogons 6,7-Dioxo-8-ribityllumazin (**2a**, Abb. 12) versetzt und 3 Stunden lang *gesoakt*. Im Mikroskop ließ sich hierbei verfolgen, wie sich der zugegebene Feststoff langsam auflöste und der Kristall eine leichte gelbliche Färbung annahm. Der Kristall beugte bis zu einer Auflösung von 2,22 Å und ein vollständiger Datensatz konnte im Hause aufgenommen werden. Mit dem Atommodell des nativen Datensatzes (P1) wurde nach der Methode des *molecular replacement* vorgegangen. Die aus diesen Koordinaten erhaltene 2F_o-F_c-Elektronendichte war von guter Qualität und erlaubte den manuellen Einbau des Substratanalogons. Die Prozessierung der Daten und die finale Verfeinerungsstatistik des Inhibitor-Komplexes ist in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Eine abschließende Verfeinerung der Atompositionen des Inhibitor-Komplexes ergab *R*-Faktoren von 25,8% (kristallographisch) bzw. 29,57% (frei). Abbildung 13 zeigt, daß

5. Ergebnisse

die beiden Inhibitoren im aktiven Zentrum sehr gut durch ihre Elektronendichte charakterisiert sind. Die Komplexstruktur zeigt, daß die Bindung der zwei Inhibitoren an zwei unterschiedlichen Bindungsstellen zwischen zwei benachbarten Untereinheiten erfolgt. Von den 5 möglichen aktiven Zentren sind 4 Reaktionszentren mit jeweils zwei Inhibitoren besetzt. In einem der fünf aktiven Zentren konnte nur ein Inhibitor klar durch seine Elektronendichte charakterisiert werden. Die Inhibitor-Paare besetzen gleichermaßen die „Vorder“- und „Hintertür“ des aktiven Zentrums. Die Gesamtstruktur des Enzyms im Komplex mit dem Inhibitor ist identisch mit der Struktur ohne Substratanalogen.

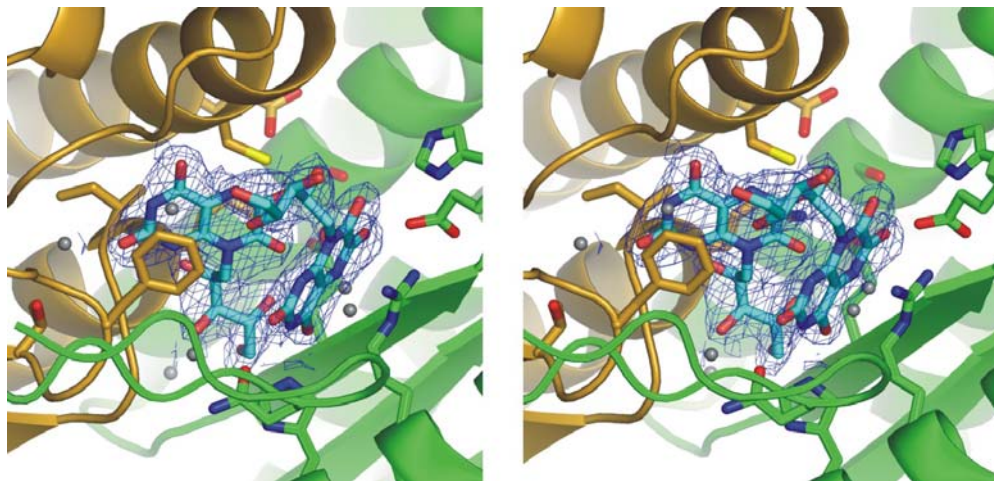


Abb. 13) **Stereodarstellung der finalen $2F_0-F_C$ -Elektronendichte der Komplexstruktur.** Die beiden Substratanaloga gebunden zwischen den Monomeren C (golden) und E (grün) sind gut durch die Elektronendichte charakterisiert (Konturierung bei 1.0σ). Wassermoleküle innerhalb der Kavität sind als graue Bälle dargestellt (innerhalb einer maximalen Distanz von 5 Å zu den Inhibitoren). Molekül **A** interagiert hauptsächlich mit Monomer C, wohingegen Molekül **B** hauptsächlich Interaktionen zum Monomer E aufweist.

5. Ergebnisse

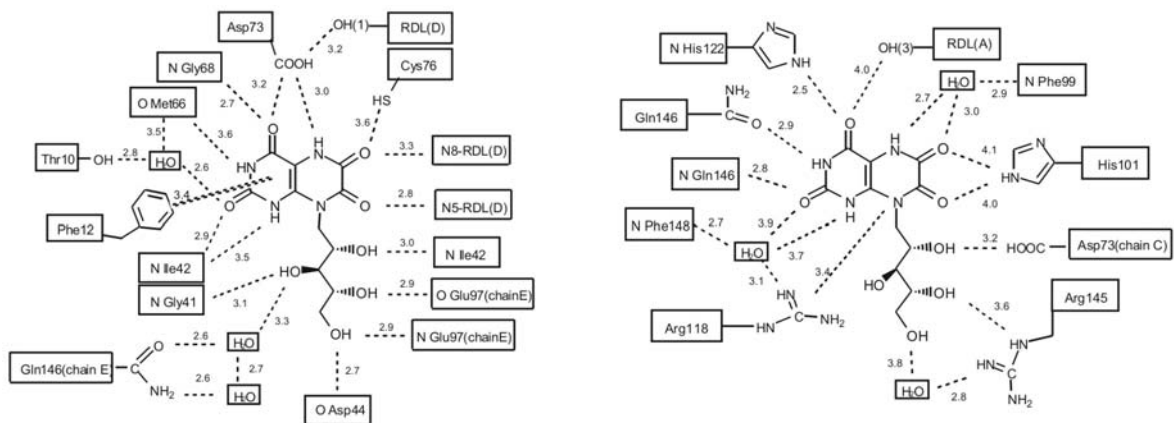


Abb. 14) **2D-Bindungstopologie von 6, 7-Dioxo-8-Ribityllumazin gebunden an *M. jannaschii* Riboflavin Synthase.** (linke Seite): Molekül **A** gebunden an Untereinheit C. (rechte Seite): Molekül **B**, dessen Ribityl-Rest zum Lösungsmittel hin exponiert ist, interagiert im wesentlichen mit der Untereinheit E.

In Analogie zu den Lumazin-Synthasen ist diese pentamere Riboflavin-Synthase ein weiteres Beispiel für die Generierung eines aktiven Zentrums durch Zusammenlagerung von Untereinheiten zu einem Pentamer [27, 67]. Die beiden Substratbindungsstellen weisen unterschiedliche hydrophile Seitenketten und Hauptketten-Interaktionen auf. Diese spezifischen Interaktionen scheinen essentiell für die korrekte topologische Orientierung der beiden Substratmoleküle zueinander zu sein. Darüber hinaus sollten diese beiden Substratbindungsstellen die Bedingungen schaffen, welche es erlaubt, eine Differenzierung zwischen Akzeptor- und Donator-Seite vorzunehmen. Die Verfeinerungsstatistiken der Komplexstruktur sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Die Bindung der Substrat-Analoga zeigt, daß ein Molekül (Molekül **A**) am Boden des aktiven Zentrums lokalisiert ist. Molekül **A** liegt in einem Netzwerk aus Wasserstoffbrücken-Bindungen, die sowohl seine Ribityl-Seitenkette als auch das Pteridin-Ringsystem umfaßt (Abb. 13 und 14). Die Ribityl-Seitenkette übt Wasserstoffbrückenbindungen zum Rückgrad der Hauptkette folgender Atome aus: N Gly-41, N Ile-42, O Asp-44, N Glu-97 (Untereinheit E). Die Hydroxyl-Gruppen OH₂, OH₃ der Ribityl-Seitenkette interagieren mit zwei Wassermolekülen. Zusätzlich ist das Pteridin-Ringsystem einerseits zwischen Phe-12 und andererseits zwischen Ile-42 und Cys-76 fixiert („sandwich“). Das Carbonyl-Sauerstoffatom O₂ übt eine Wasserstoffbrücken-Bindung zu einem Wassermolekül aus, welches seinerseits weitere Wasserstoffbrücken-Bindun-

5. Ergebnisse

gen zur Seitenkette von Thr-10 und zu dem Carbonyl-Sauerstoffatom von Gly-68 der Hauptkette ausübt. Die Amid-Gruppe von Ile-42 weist in Richtung des Carbonyl-Sauerstoffatoms O2, und eine ähnliche Wechselwirkung findet zwischen O4 und der Amidgruppe der Hauptkette von Gly-68 statt.

Diese rigide Fixierung von Molekül **A** resultiert in einer anti-parallelen Ausrichtung gegenüber dem zweiten Substrat-Analoga-Molekül **B**, welches an Untereinheit E gebunden ist. Beide Pteridin-Ringsysteme weisen eine *endo*-ähnliche Konstitution zueinander auf. Die Ribityl-Seitenkette ist in Richtung des Lösungsmittels hin exponiert und die Hydroxyl-Gruppen OH1 und OH4 interagieren mit den Seitenketten-Resten von Asp-73 (Monomer C) und einem Wassermolekül. Die Hydroxyl-Gruppe OH3 ist hin zur Seitenkette von Arg-145 ausgerichtet. Die Seitenkette von Arg-118, welche eine Salzbrücke mit Glu-104 bildet, liegt koplanar zum Pteridin-Ringsystem. Die ϵ -NH1-Gruppe von Arg-118 und das δ -O-Atom von Glu-104 weisen eine Distanz von 3,5 Å zum N8 des Pteridin-Ringsystems auf. Zusätzliche Wasserstoffbrücken-Bindungen liegen zwischen dem Carbonyl-Sauerstoffatom O4 und der Seitenkette von His-122 vor. Das Carbonyl-Sauerstoffatom O2 übt Wasserstoffbrücken-Bindungen zur Amid-Gruppe von Gln-146 und zu einem Wassermolekül aus, welches seinerseits durch O Gln-97, N Phe-99 und N1 des Pteridin-Ringsystems koordiniert ist.

Superposition der vier Inhibitor-Paare, welche gut durch die Elektronendichte definiert sind, zeigen keine signifikanten Unterschiede in der Koordination und Geometrie auf (Daten nicht gezeigt). Die beiden Pteridin-Ringsysteme sind in einem Winkel von ca. 60° zueinander orientiert. In der Komplex-Struktur ist das 7-Carbonyl-Sauerstoffatom (sowie das 6-Carbonylsauerstoffatom) von Molekül **A** in Richtung des N5 (N8) von Molekül **B** orientiert und weist eine Distanz von 2,8 Å (3,3 Å) auf. Die unterschiedliche Topologie der beiden Bindungsstellen impliziert eine festere Bindung des Moleküls **A**.

Die Reste, die das Inhibitor-Paar umgeben, sind in potentiellen archaealen Riboflavin-Synthasen hochgradig konserviert (Abb. 15). In allen, derzeit in der Datenbank erhältlichen Sequenzen, ist der aromatische Rest Phenylalanin, welcher zum Molekül **A** eine *stacking*-Interaktion ausübt, in einer Position präsent, der zum Phe-12 des *MJa*-Enzym korrespondiert. Der Aminosäurerest Ile-42 ist ebenso hochgradig konserviert.

5. Ergebnisse

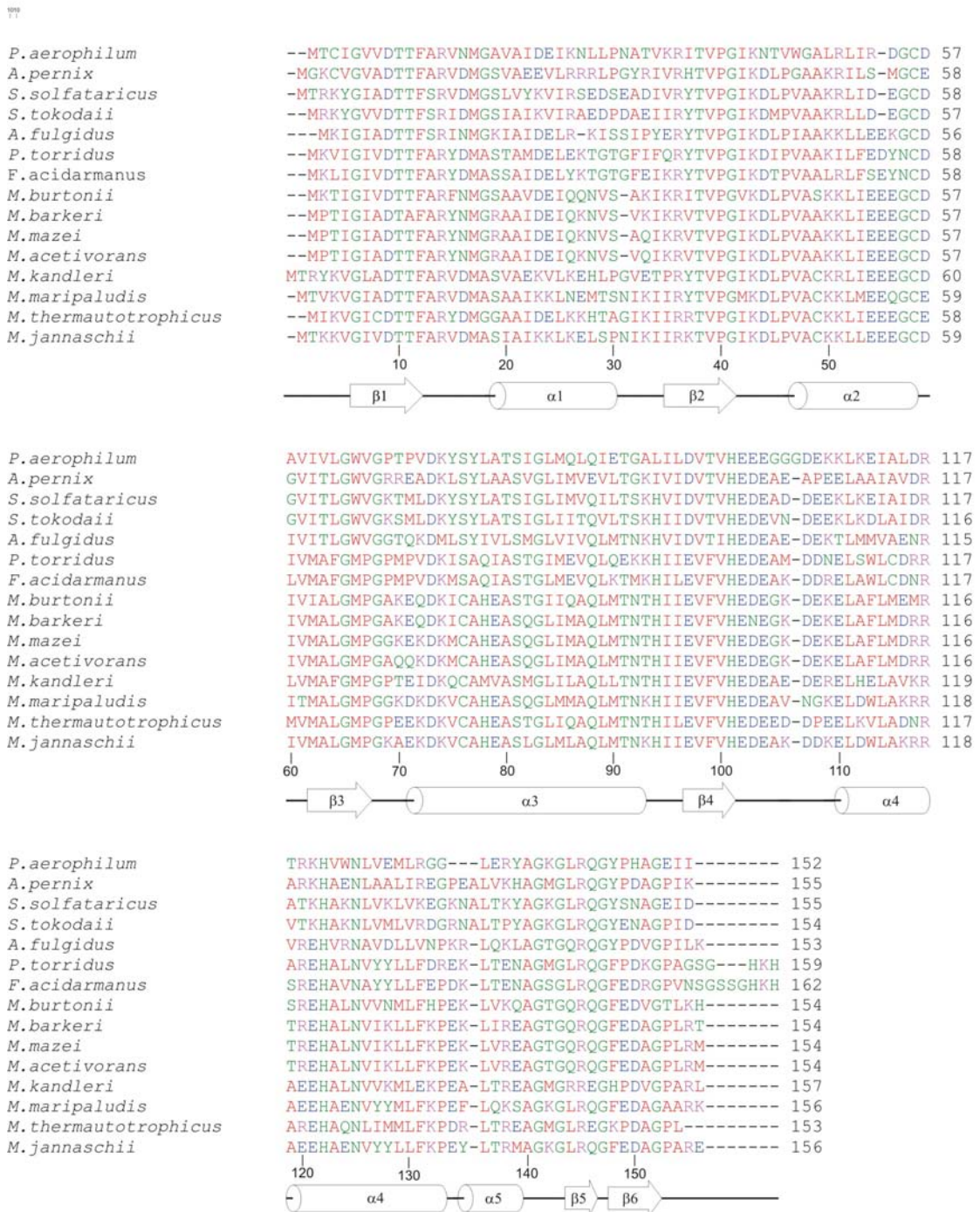


Abb 15) Aminosäuresequenzvergleich von 15 archaealen Riboflavin-Synthasen. Lücken wurden eingeführt (als – gekennzeichnet), um ein optimales Alignment zu erhalten. Die Sekundärstrukturelemente von *MJaRS* sind als Zylinder für Helices und als Pfeile für Falblattstränge dargestellt. Die Zahlen entsprechen den Nummern der einzelnen verglichenen Sequenzen und die unten liegenden Zahlen entsprechen der Sequenzposition der *MJaRS*. Der Aminosäuresequenzvergleich wurde mit dem Programm CLUSTALW durchgeführt (<http://www.ebi.ac.uk>). Saure, basische, neutrale und aliphatische, zusammen mit den aromatischen Aminosäureresten, sind blau, pink, grün bzw. rot charakterisiert. Die Organismen und die Datenbanknummern (in Klammern) lauten: *Aeropyrum Pernix* K1 (NP_147650);

5. Ergebnisse

Archaeoglobus fulgidus DSM 4304 (NP_070245); *Ferroplasma acidarmanus* (ZP_00306970); *Methanocaldococcus jannaschii* DSM 2661 (NP_248178); *Methanococcus maripaludis* S2 (NP_987300); *Methanopyrus kandleri* AV19 (NP_613646); *Methanosarcina acetivorans* C2A (NP_616743); *Methanococcoides burtonii* DSM 6242 (ZP_00148893); *Methanosarcina barkeri* str. *fusaro* (ZP_00296068); *Methanosarcina mazei* Goe I (NP_632269); *Methanothermobacter thermautotrophicus* str. *delta H* (NP_275277); *Picrophilus torridus* DSM 9790 (YP_023491); *pyrobaculum aerophilum* str. *IM2* (NP_559706); *Sulfolobus solfataricus* *P2* (NP_341940); *Sulfolobus tokodaii* str. *7*

An Position 76 des *MJa*-Enzym weisen archaeale Riboflavin-Synthasen entweder ein Serin oder Cystein auf. Eine ähnliche Situation liegt auch für die zweite Bindungsstelle (von Molekül **B**) vor. Die Aminosäurereste Phe-12, Asp-73, Arg-118, His-101, His-122 und Arg-145 sind invariant in potentiellen archaealen Riboflavin-Synthasen.

6. Diskussion

6.1 Der Reaktionsmechanismus

In der hier vorliegenden Arbeit wird einerseits erstmalig die Kristallstruktur einer pentameren Riboflavin-Synthase aus einem Archaeum beschrieben, und andererseits neue Hypothesen über den frühen Ursprung des Riboflavin-Stoffwechsels vorgestellt (Abschnitt 6.8). Darüber hinaus kann anhand der Komplexstruktur mit einem Substrat-Analogon der Reaktionsmechanismus in einer Weise diskutiert werden, wie es bisher nicht möglich war (Abschnitt 6.4 - 6.6). Frühere Studien waren im wesentlichen auf Interpretationen von NMR-Daten (kombiniert mit Bindungsstudien von Substrat-Analoga) und Modelling (von Kristallstrukturen) der als flexibel betrachteten trimeren Riboflavin-Synthasen angewiesen, leisteten aber ein enormes Grundverständnis zu dieser ungewöhnlich komplexen und einzigartigen Reaktion im Metabolismus (siehe Einleitung).

Die bisher in Fachzeitschriften zugänglichen, vorgeschlagenen Reaktionsmechanismen bezüglich des Reaktionsweges zur Adduktbildung sind bis heute allesamt hypothetisch. Daher leistet die hier vorgestellte Komplexstruktur einen enormen Beitrag zur Diskussion des immer noch nicht verstandenen Reaktionsmechanismus. Im Detail kann auch ein hypothetischer Diels-Alderase-Mechanismus als attraktives Modell erörtert werden (Abschnitt 6.6). Es muß jedoch betont werden, daß die Existenz von Enzymen in der Natur, welche fähig sind, eine Diels-Alderase Reaktion zu katalysieren, sehr umstritten ist (Abschnitt 6.2). Es ist eine immanente Eigenschaft dieser Enzymklasse, daß nur im Ausschlußverfahren gegenüber einem alternativen Mechanismus (z.B. ionisch-nukleophiler Mechanismus) Hinweise gesammelt werden können, die einen der beiden Mechanismen als plausibler erscheinen lassen.

Klassische Punktmutations-studien aufgrund einer bekannten Struktur helfen hier nur bedingt weiter, da eine Diels-Alder-Reaktion auch in Abwesenheit eines Bio-Katalysators (Enzym) abläuft, und der entropische Beitrag des Enzyms - und nicht bestimmte Aminosäurereste - maßgeblich sein könnten. Hingegen kann die Existenz katalytischer Antikörper („künstlich“ hergestellt), welche in der Lage sind, Diels-Alder-Reaktionen zu katalysieren, als weitgehend akzeptiert angesehen werden. Die detaillierte Analyse des Reaktionsmechanismus könnte Hinweise für die Entwicklung

6. Diskussion

von Inhibitoren geben, die eventuell ein therapeutisches Potential aufweisen könnten [65].

Trotz immenser Fortschritte innerhalb eines Zeitraumes von nunmehr über 40 Jahren konnte der genaue Mechanismus der komplexen Dismutationsreaktion immer noch nicht vollständig aufgeklärt werden.

Bei dieser ungewöhnlichen Dismutationsreaktion (zweier DMRL-Moleküle) werden 4 C-Atome von einem Lumazin-Donor auf einen Lumazin-Akzeptor übertragen. Der Einbau dieser C4-Kohlenstoffeinheit in den Xylol-Ring des Vitamins verläuft unter umgekehrter „Polarität“ [68, 69]. Vor 35 Jahren wurde deshalb eine antiparallele Orientierung der beiden identischen Substratmoleküle als Ausgangstopologie vorgeschlagen. Erstaunlicherweise gelingt eine nicht-enzymatische Synthese von Riboflavin ebenso aus dem Kochen einer wässrigen Lösungen des enzymatischen Ausgangssubstrates (DMRL), sowohl im Säuren als auch im neutralem Milieu, ohne die Anwesenheit eines Katalysators [68, 70-72]. Diese durch Hitze induzierte nicht-enzymatische Dismutationsreaktion verläuft, bezüglich des entstehenden Produktes Riboflavin, mit identischer Regiochemie wie die von trimeren und pentameren Riboflavin-Synthasen katalysierte Reaktion ab (s.Abb. 16) [38, 73].

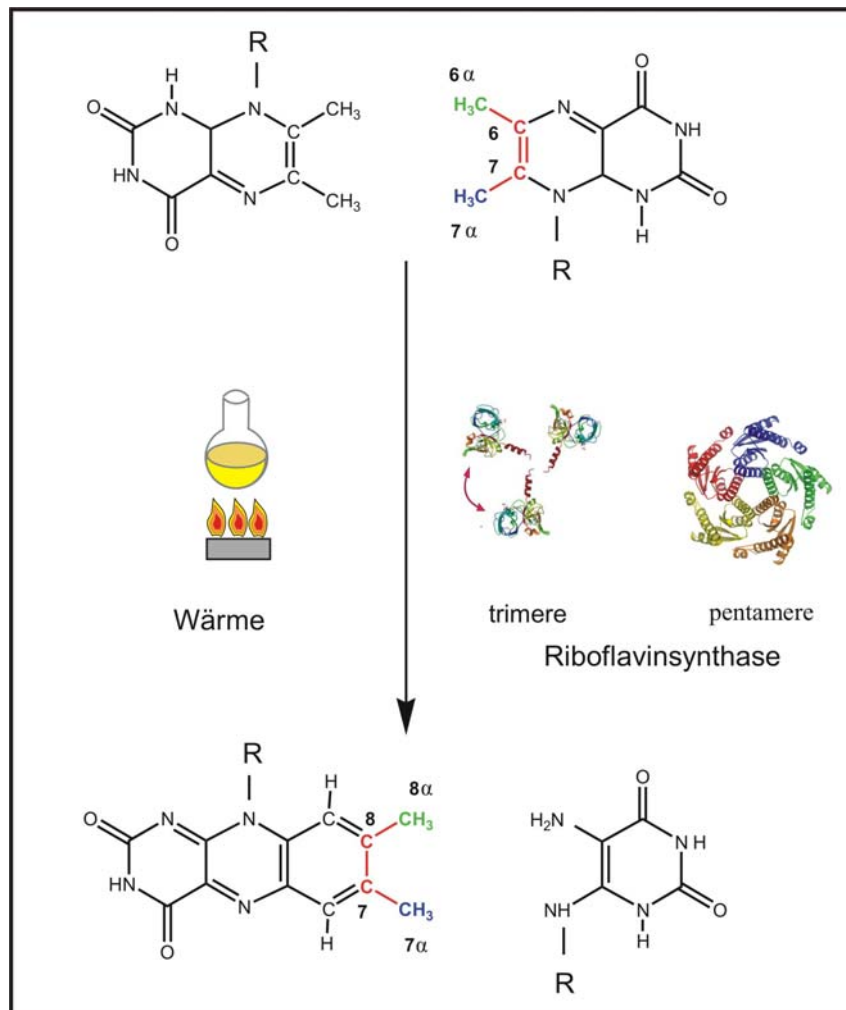
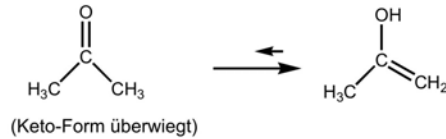


Abb. 16) **Die nicht-enzymatische und enzymatische Riboflavin-Synthese** (von trimerer und pentamerer RS) verlaufen unter identischer Regiochemie, indem die 4 Kohlenstoffatome mit umgekehrter Polarität in den entstehenden Xylol-Ring des Vitamins eingebaut werden.

Auf den folgenden zwei Seiten sind die Grundlagen organischer Reaktionsmechanismen, die für das Verständnis der Diskussion der verschiedenen hypothetischen Reaktionsmechanismen erforderlich sind, zusammengestellt (vgl. Lehrbücher der Org. Chemie).

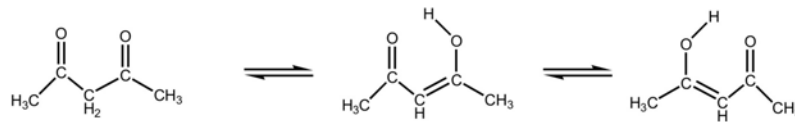
6. Diskussion

Beispiele:



Im Gegensatz dazu enthalten 1,2 - und 1,3 - Dicarbonyl-Verbindungen im Gleichgewicht mit der Dicarbonyl-Form oft eine große Menge der Enol-Form.

Bsp:



wässrige Lsg.: 84 %

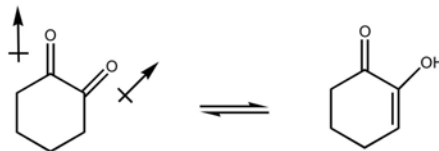
16 %

Hexan - Lsg.: 8 %

92 %

Das Ausmaß der Enolisierung ist vom Lösungsmittel, der Konzentration und der Temperatur abhängig und die Gleichgewichtseinstellung wird durch Säuren und Basen beschleunigt. Cyclische 1,2-Diketone liegen hauptsächlich in der Enol-Form vor. Treibende Kraft für die Enolisierung ist hauptsächlich das Nachlassen der elektrophilen Abstoßung, die auftritt, wenn zwei elektrophile Carbonyl-Gruppen benachbart sind.

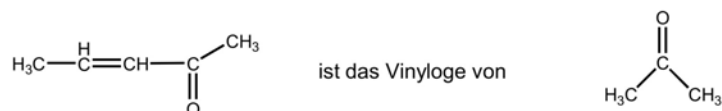
Bsp:



Vinyloge (Vinylogie-Prinzip)

Vinyloge oder Vinyl-Homologe unterscheiden sich durch das Vorhandensein einer -CH=CH- Einheit in einer Kette voneinander. Immer wenn zwei funktionelle Gruppen durch eine Doppelbindung verbunden sind, besitzt das Molekül Eigenschaften, die denen der Verbindung ohne Doppelbindung ähnlich sind.

Bsp:



6.2 Die Diels-Alder-Reaktion und Diels-Alderasen

Für die Riboflavin-Synthese wurde von Truffault [74] eine inverse Diels-Alder-Reaktion als initialer Schritt der Enzymkatalyse vorgeschlagen. Wie im Abschnitt 6.6 noch ausführlich diskutiert wird, erscheint aufgrund der Geometrie der Komplexstruktur mit dem gebundenen Substratanalogon dies als plausibler und attraktiver Mechanismus. Im folgenden soll daher auf die Grundlagen der Diels-Alder-Reaktion eingegangen werden.

Die Diels-Alder-Reaktion wurde 1928 von Otto Diels und Kurt Alder (1950 Nobelpreis für Chemie) entdeckt [75]. Der Mechanismus der Diels-Alder-Reaktion ist eingehend untersucht worden [76], und es scheint so zu sein, daß ein konzertierter, einstufiger Cycloadditionsprozeß vorliegt, der den Regeln pericyclischer Reaktionen gehorcht und die Mehrzahl der Diels-Alder-Reaktionen am besten beschreibt. Die Diels-Alder-Reaktion gehört zur Gruppe der [4+2]-Cycloaddition, bei der ein konjugiertes Dien (4 π -Elektronen) mit einem Dienophil (2 π -Elektronen) reagiert. In einem Schritt werden dabei über einen hoch geordneten (aromatischen) Übergangszustand zwei neue σ -Bindungen in einem Cyclohexenyl-System ausgebildet [77-79]. Der Ringschluß ist stereospezifisch und die Reaktionsgeschwindigkeit nahezu unabhängig vom Lösungsmittel.

Ein Charakteristikum pericyclischer Reaktionen ist ihr streng stereospezifischer Reaktionsverlauf. Bei einer Diels-Alder-Reaktion entsteht nur das Produkt einer *syn*-Addition, wie in Abbildung 17 illustriert (s. nächste Seite). Bei unsymmetrisch substituierten Dienen und Dienophilen ist eine regiospezifische Reaktion möglich, die auf zwei unterscheidbaren Orientierungen eines Eduktes basiert. Die beiden unterschiedlichen Orientierungen der Moleküle zueinander werden häufig als Kopf-an-Kopf und Kopf-an-Schwanz-Orientierung bezeichnet.

Die relative räumliche Orientierung der Edukte in einer Diels-Alder-Reaktion ist durch die Symmetrie der beteiligten Atomorbitale determiniert (s. weiter unten). Bei der Verwendung cyclischer Diene (als sterisch eindeutig definiertes Edukt) und unsymmetrisch substituierten Dienophilen tritt eine weitere stereochemische Besonderheit auf. Im Reaktionsverlauf können im Prinzip zwei verschiedene Addukte entstehen, die als „*endo*-Addukt“ (breitere Seite unterhalb des Dienophils) und „*exo*-Addukt“ (kleinerer Teil unterhalb des Dienophils) unterschieden werden. Cyclische Diene folgen in der

6. Diskussion

Regel dem *endo*-Prinzip. Unter gewöhnlichen Bedingungen entsteht meist das *endo*-Produkt, obschon es in der Regel weniger thermodynamisch stabil ist. Die Reaktion bietet damit ein Beispiel einer kinetisch gesteuerten Reaktion: Der Übergangszustand, der zum *endo*-Produkt führt, ist energieärmer, weil hier die π -Elektronen-Systeme der Reaktanten in engere Wechselwirkung treten können. Bei höheren Temperaturen erhält man aber das thermodynamisch stabilere Produkt *exo*-Addukt.

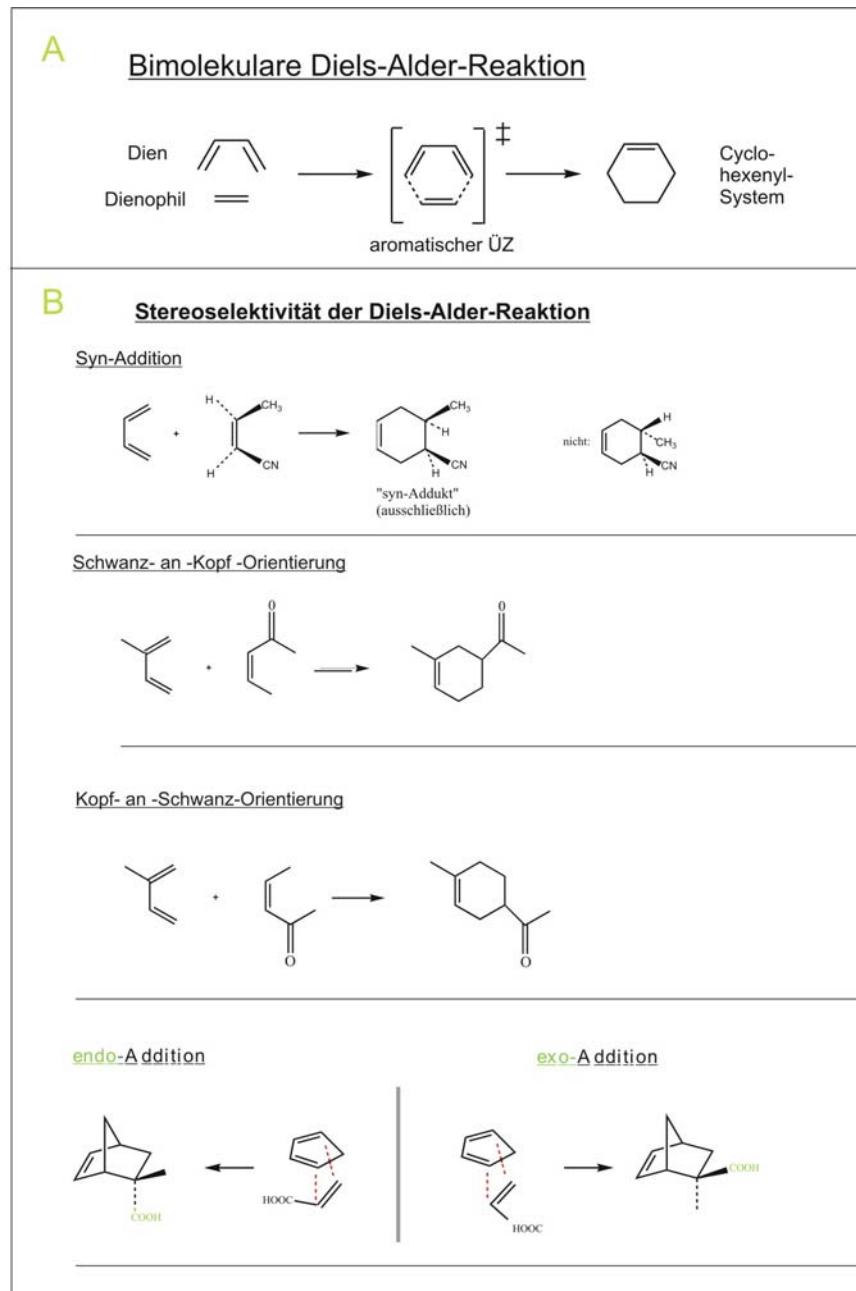


Abb. 17) **Übersicht zur Diels-Alder-Reaktion.** (A) Bimolekulare Diels-Alder-Reaktion eines Diens mit einem Dienophil verläuft über einen quasi-aromatischen Übergangszustand zu einem Cyclohexenyl-System. (B) Die Reaktion verläuft streng stereospezifisch unter "syn-Addition". Bei unsymmetrisch substituierten Komponenten entscheidet die relative Lage der Komponenten zueinander die Produktentstehung.

6. Diskussion

Diels-Alder-Reaktionen benötigen keine große Aktivierungsenergie, d.h. Wärme, Licht und Katalysatoren haben keinen großen Einfluß auf die Reaktionsgeschwindigkeit; in einigen Fällen, an denen Dienophile mit C=O- oder C=N-Gruppen beteiligt sind, katalysieren Lewis-Säuren die Reaktion. Wie bereits einleitend erwähnt, ist die Reaktionsgeschwindigkeit von Diels-Alder-Reaktionen nahezu unabhängig vom Lösungsmittel. Detaillierte Studien haben jedoch gezeigt, daß in wäßriger Lösung oft Diels-Alder-Reaktionen beschleunigt sind. Dies ist möglicherweise durch Wasserstoffbrückenbindung des Wassers zum Dienophil im Übergangszustand interpretierbar [80-82].

Zur Abschätzung der Reaktivität und Stereoselektivität ist es am einfachsten, sich der Grenzorbitalmethode (HOMO-LUMO-Methode) zu bedienen. In diesem Modell werden die Grenzorbitale (HOMO: *highest occupied molecular orbital* und LUMO: *lowest unoccupied molecular orbital*) der jeweiligen Reaktanten betrachtet, die wesentlich die Reaktivität und ihre Stereoselektivität bestimmen. Entscheidend ist die Wechselwirkung des höchsten besetzten Molekülorbitals (HOMO) mit dem tiefsten nicht besetzten Molekülorbital (LUMO) des anderen Reaktionspartners. Voraussetzung für die Überlappung der Orbitale ist eine ähnliche Symmetrie und ein entsprechendes Vorzeichen der Grenzorbitale („Prinzip der Erhaltung der Orbitalsymmetrie“; sog. Woodward-Hoffman-Regeln). Die Wechselwirkung ist um so größer, je kleiner die Energiedifferenz zwischen den betreffenden Orbitalen ist. Je nach relativer Lage der Grenzorbitale unterscheidet man zwischen Reaktionen mit „normalem“- , „neutralem“ und „inversem“-Elektronenbedarf (Abb. 18).

Bei der Diels-Alder-Reaktion mit normalem Elektronenbedarf bestimmt die Wechselwirkung zwischen dem LUMO des Dienophils und dem HOMO des Diens die Reaktivität. Bei der neutralen Diels-Alder-Reaktion sind beide HOMO-LUMO-Abstände ungefähr gleich groß, so daß beide Wechselwirkungen berücksichtigt werden müssen (nicht gezeigt). Bei der inversen Diels-Alder-Reaktion liegt genau der umgekehrte Fall vor: hier bestimmt der Abstand vom LUMO des Diens zum HOMO des Dienophils die Wechselwirkung.

Die relativen Lagen der Energien von HOMO und LUMO der Reaktionspartner, im Vergleich zu unsubstituierten homoatomaren Systemen, können durch Einbau von Heteroatomen bzw. Substituenten verändert werden. Elektronen ziehende Substituenten senken die Energien von HOMO und LUMO ab, während elektronenschiebende

6. Diskussion

Substituenten den gegenteiligen Effekt bewirken. Beim Einbau von Substituenten, die zur Konjugation fähig sind (z.B. Vinyl-, Phenyl-), erfährt das HOMO eine Energieanhebung und das LUMO eine Energieabsenkung (vgl. auch Lehrbücher der Organischen Chemie).

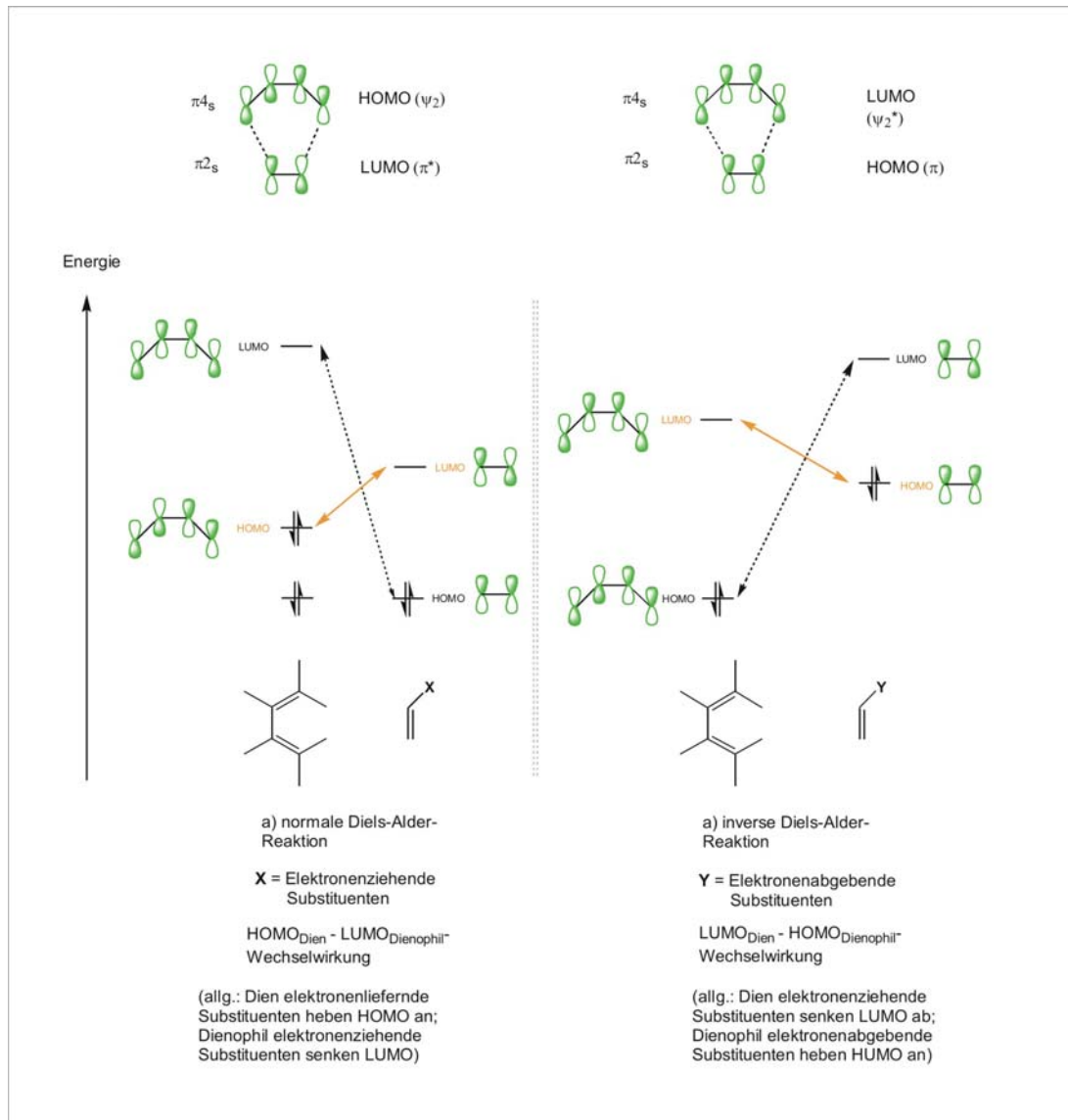


Abb. 18) **Relative Lage der Grenzorbitale der verschiedenen Diels-Alder-Reaktionen:** Die Regioselektivität, wie auch der Einfluß von Substituenten auf die Reaktionsgeschwindigkeit der Diels-Alder-Reaktion und die Richtung der Addition, kann mit Hilfe einer Molekülorbital-Betrachtung vorhergesagt werden (nach Falbe, Regnitz (Hrsg.) - Römpp Lexikon Chemie, Bände 1-6).

6. Diskussion

Enzymkatalysierte Diels-Alder-Reaktionen

Enzyme katalysieren im allgemeinen Reaktionen, indem sie die Topologie und Ladung des entstehenden Übergangszustandes stabilisieren. Während des Reaktionsverlaufes weisen Substrat und Produkt gegenüber dem Übergangszustand signifikante strukturelle Unterschiede auf. Sowohl das Produkt als auch das Substrat müssen an das Enzym mit geringerer Affinität binden. Der Übergangszustand einer Diels-Alder-Reaktion entspricht einem hoch geordneten Zustand (der Substrate) und ähnelt der Struktur des entstehenden Produktes. Mit anderen Worten: Ein Enzym, dessen Funktion es ist, die Struktur des Übergangszustandes der Diels-Alder-Reaktion zu stabilisieren, sollte folglich durch das Reaktionsprodukt (feste Bindung durch strukturelle Ähnlichkeit) inhibiert werden [76].

Eine andere mechanistische Möglichkeit der Wirkungsweise solcher Enzyme könnte darin liegen, daß sie die freie Aktivierungsenthalpie der Reaktion herabsetzen, indem sie die relativen Lagen der Energien von HOMO und LUMO der Reaktionspartner beeinflussen. Diels-Alderasen könnten dies durch topologische Fixierung der Dien- und Dienophil-Komponente in einer definierten elektronischen Umgebung erreichen [83].

Erst in den letzten Jahren konnte nachgewiesen werden, daß es Proteine gibt, welche Diels-Alderasen darstellen. *Hilvert et al.* [84] berichteten im Jahre 1989 von einem monoklonalen Antikörper, welcher eine *exo*-Diels-Alder-Reaktion katalysiert (Abb. 19). Das Hapten (1 bzw. 6) stellt (mimt) den Übergangszustand der Reaktion zwischen Tetrachlorophendioxid (3) und N-Ethylmaleimide (4) dar. Der oben angesprochene Aspekt der prinzipiellen Produktinhibition konnte bei dieser Modellreaktion umgangen werden, da SO₂ eliminiert wird und so die Substratbindung (topologisch) durch das Produkt nicht verhindert werden kann.

Seit der Entdeckung katalytischer Antikörper war es lange Zeit unklar, ob es auch Diels-Alder katalysierende Enzyme (Diels-Alderase) in der Natur vorkommen. Einen ersten Hinweis, daß es eine Diels-Alderase geben könnte, lieferten Untersuchungen mit zellfreien Extrakten des Pilzes *Alternaria solani*. Die Cyclisierung von Prosolanapyron III zu den Solanopyranen A (**X**, *exo*) und D (**X**, *endo*) erfolgt in Gegenwart des zellfreien Extraktes mit größerer *exo*-Selektivität als bei Kontrollexperimenten ohne Extrakt oder mit denaturiertem Extrakt [85].

6. Diskussion

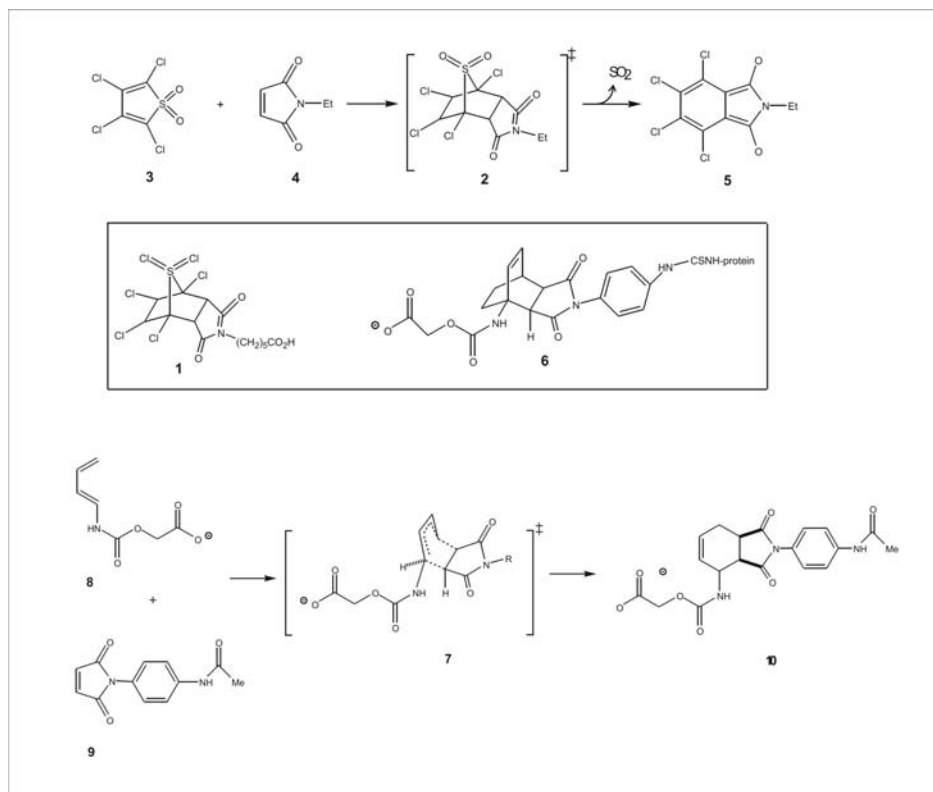


Abb. 19) Antikörperkatalyse von Diels-Alder-Reaktionen [84, 86]

Das erste Enzym, dem eine Diels-Alderase-Eigenschaft zugeschrieben wurde, konnte aus dem Pilz *Aspergillus terreus* isoliert werden. Das von diesem Pilz produzierte Nonaketid Lovastatin (**3**, Abb.20) entsteht durch Umwandlung des Triens (intramolekular) in ein Decalin-System. Untersuchungen zur Biosynthese ergeben, daß Lovastatin über einen Polyketid-Biosyntheseweg entsteht, mit den Hexaketiden (**1**) und (**2**) als Intermediaten, wobei (**2**) durch Diels-Alder-Cyclisierung aus (**1**) entsteht. Es konnte ein Protein isoliert werden, die sog. Lovastatin Nonaketide Synthase (LNKS), das die Diels-Alder Reaktion eines synthetisch hergestellten Thioesters katalysiert [87].

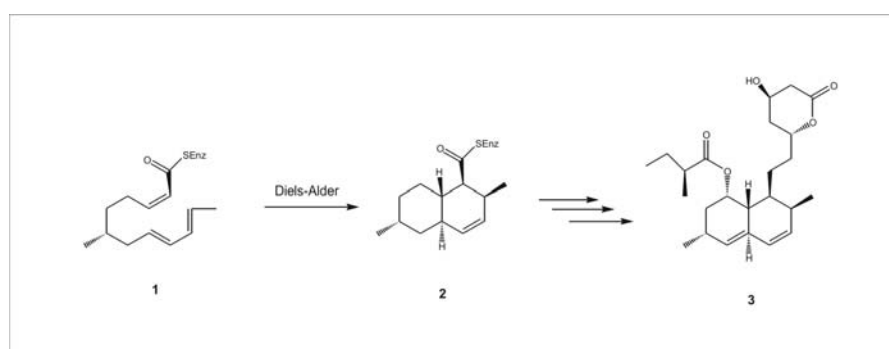


Abb. 20) Intermediate der Biosynthese von Lovastatin (3).

6. Diskussion

Macrophomate-Synthase ist ein weiteres Enzym, von denen man annimmt, daß sie eine perizyklische Reaktion katalysieren können. Das Enzym ist bisher nur von dem Pilz *Macrophoma commelinae* bekannt und auch nach diesem benannt. Es besteht aus 339 Aminosäuren und ist nur aktiv in Gegenwart von Magnesium (2+). Das Produkt der durch dieses Enzym katalysierten Reaktion aus Oxalacetat und einem substituierten 2-Pyron ist nach zweimaliger Abspaltung von Kohlendioxid das sog. Macrophomat. Es handelt sich hierbei um ein mehrfach substituiertes Benzoesäure-Derivat [88-94].

Kürzlich wurde die erste Kristallstruktur dieser mutmaßlichen natürlichen Diels-Alderase publiziert [95], und in einer anderen Studie (auf quantenmechanischer Basis: *QM/MM simulations*) der Diels-Alder-Mechanismus der Macrophomat-Synthase angezweifelt [96].

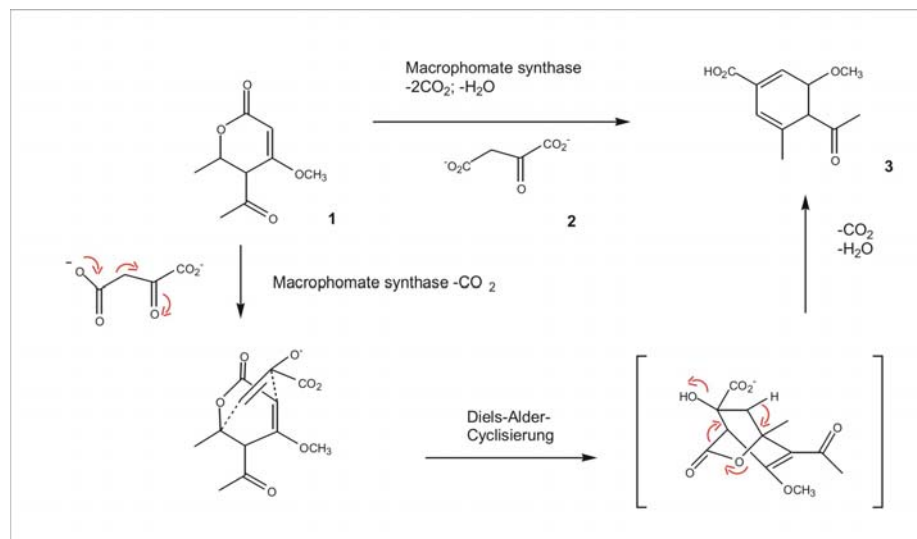


Abb. 21) **Postulierter Reaktionsmechanismus der Macrophomat Synthase** (entnommen aus: [97]).

6.3 Ionisch-nukleophiler Reaktionsmechanismus der Riboflavin-Synthase

Das erste grundlegende Modell des enzymatischen Reaktionsmechanismus beruht im wesentlichen auf den Arbeiten von Beach und Plaut [69]. Im Detail erlaubt das Modell eine Zuordnung der beiden Substrate zu distinkten Milieus des Enzyms (als Akzeptor- und Donor-Seite definiert) und schlägt andererseits einen ionisch-nukleophilen Reaktionsmechanismus begünstigt durch das Enzym vor.

Grundlegend sind hierbei Aspekte prinzipieller, chemischer Eigenschaften des DMRL-Moleküls (sowie Studien mit Derivaten von DMRL), die sich als Komponenten im initialen Schritt der Reaktionssequenz wiederfinden. Die 7-Methylgruppe im DMRL-Molekül ist mit einem pK_A -Wert von 8,5 ungewöhnlich azide [98], so daß eine Deprotonierung an dieser Stelle leicht zur Bildung eines Exomethylanions führt (s. Abb. 22). Es konnte gezeigt werden, daß diese Protonen der 7-Methylgruppe mit Wasser ausgetauscht werden können, wobei eine erhöhte Austauschrate im Säuren oder bei einem basischem pH-Wert erfolgt. Im Gegensatz dazu weisen die Protonen der 6-Methylgruppe keine Substituierbarkeit in diesen Milieus auf. Unter Verwendung deuterierter/tritierter Derivate des DMRL-Moleküls konnte durch kinetische Analyse ein Isotopeneffekt der 6-Methylgruppe nachgewiesen werden. So zeigte die Deuterierung der 6-Methylgruppe eine um den Faktor 5 verlangsamte Riboflavin-Syntheserate. Die Austauschrate der Protonen in der 7-Methylgruppe wurde hierbei jedoch nicht beeinflusst [99].

In Gegenwart des (trimeren) Hefe-Enzyms konnte bei Verwendung von 6-Methyl-7-tritiomethyl-8-ribityllumazin eine geringe Steigerung (ca. Faktor 2 - 3) des Protonaustausches im Vergleich zur Geschwindigkeit der Austauschreaktion in Wasser beobachtet werden (nicht-enzymatisch), jedoch zeigten die Experimente auch einen enormen Einfluß des verwendeten Reaktionspuffers. Bei der nicht-enzymatischen Austauschreaktion (keine Riboflavin-Synthese) beeinflusste der Reaktionspuffer die Rate um den Faktor 28 [99].

Eine weitere Konsequenz dieser Azidität der 7-Methyl-Gruppe ist die Zugänglichkeit gegenüber einem nukleophilen Angriff nach erfolgter Deprotonierung. Beispielsweise kann die Hydroxylgruppe der Ribityl-Seitenkette intramolekular als Nukleophil agieren worauf cyclische Ether entstehen [100].

6. Diskussion

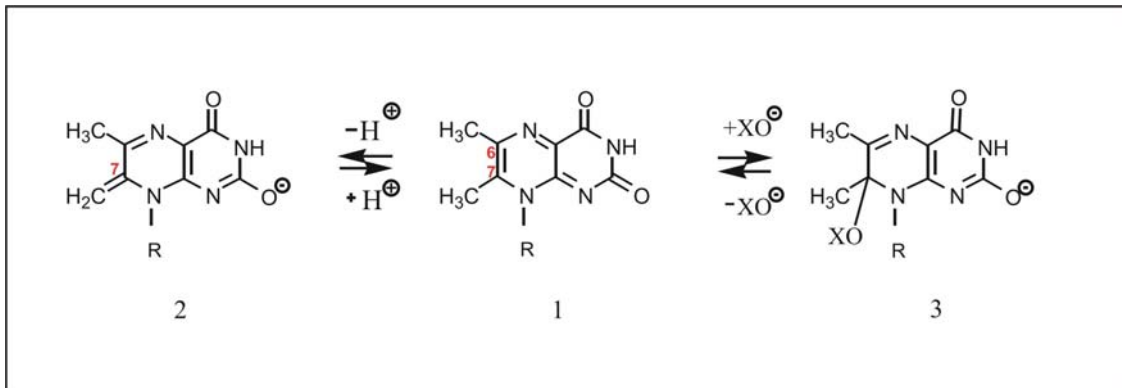


Abb. 22) **Chemische Eigenschaften von DMRL** (Abb. modifiziert nach [74]). Die 7-Methylgruppe von DMRL (1) weist eine ungewöhnliche Azidität auf und es entsteht das Exomethylianion (2). Substituierte Formen (3) erfolgen nach nukleophilen Angriff auf das C7-Atom (XO^- =Nukleophil).

Diese Moleküleigenschaften sind das chemische Fundament des hypothetischen enzymatischen Reaktionsmechanismus von Beach und Plaut (1970): als initialer Schritt findet eine reversible Deprotonierung der 7-Methylgruppe am Akzeptor-Molekül statt. Durch eine Elektronenumlagerung entsteht ein Exomethylianion, welches an seiner 2-Oxo-Gruppe durch eine Wasserstoffbrücke mit einer Amid-Gruppe an der Akzeptor-Seite des Enzyms (Akzeptor-Seite) stabilisiert werden könnte. Simultan erfolgt ein nukleophiler Angriff (symbolisiert mit Z) auf der Donor-Seite an der C7-Position des zweiten DMRL-Moleküls. Es wurde aufgrund der Inhibierung des Hefe-Enzyms durch Sulfhydryl-Reagenzien vorgeschlagen, daß der nukleophile Angriff durch ein Cystein erfolgen könnte [99, 100]. Als weiterer Kandidat für ein Nukleophil wurde ein Wassermolekül oder die intramolekulare Reaktion mit der Ribitylseitenkette vorgeschlagen [28, 34, 101].

Das so entstandene Addukt der Donor-Seite wird nun vom zweiten DMRL-Molekül - gebunden an der Akzeptor-Seite - nukleophil angegriffen, und es entsteht als erstes Zwischenprodukt der Reaktion ein durch eine Methylen-Einheit verknüpftes Lumazindimer. Es wurde eine anti-parallele Orientierung der beiden Substrate zueinander als Ausgangstopologie im Enzym postuliert (Abb. 23).

Dieser mittlerweile über 30 Jahre alte Mechanismus wird heute nur noch bezüglich des initialen Schrittes der Riboflavin-Biosynthese diskutiert. Die hypothetische Reaktionssequenz wurde erst vor kurzem von Illarionov *et al.* revidiert [102]. Ein pentacyclisches Intermediat der Dismutationsreaktion von *E. coli* RS, welches die beiden DMRL-Moleküle in einer Kopf- zu Schwanz-Orientierung verknüpft zeigt,

6. Diskussion

nukleophiler Angriff (Z=Nukleophil) auf das C6-Atom des zweiten DMRL-Moleküls. Hierbei üben Y-H und X-H stabilisierende Wasserstoff-Brückenbindungen zu den postulierten Ausgangsintermediaten dar. Nach Bildung des ersten Zwischenproduktes der Reaktion - ein durch eine Methylen-Einheit verknüpftes Lumazin-Dimer (3) - folgen mehrere Reaktionschritte (nicht gezeigt) bis zu den Endprodukten.

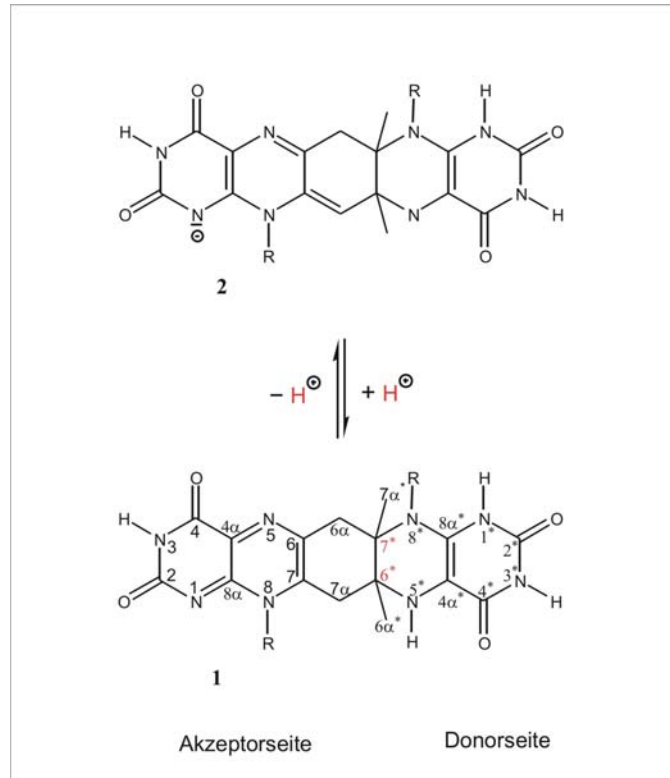


Abb. 24) **Pentacyclisches Intermediat der Riboflavin-Synthase**, modifiziert nach [102]. Die Stereochemie des Intermediates konnte nicht absolut verifiziert werden. Das Intermediat besitzt zwei zusätzliche chirale Zentren (6^* ; 7^*) und weist folglich 4 neue Stereoisomere als potentielle Intermediate der Reaktionssequenz aus: (6R; 7S), (6S; 7R), (6R; 7R) und (6S; 7S). Die Diastereomerenpaare (RR) und (SS) sowie (RS) und (SR) können als optische Antipoden betrachtet werden und besitzen daher (nahezu) äquivalente Energien.

Illarionov *et al.* [102] postulierten aufgrund des Nachweises dieses Intermediates einen modifizierten Reaktionsmechanismus. Die Bildung des ersten Lumazin-Dimer erfolgt nach einem nukleophilen Angriff des in der Position 7 deprotonierten DMRL-Moleküls auf das C-6-Atom des Adduktes an der Donor-Seite, welches kovalent an der Akzeptor-Seite des Proteins gebunden ist [34, 102]. Der Unterschied zum Reaktionsmodell von Beach und Plaut besteht in den Folgeschritten nach der Bildung des (ersten) Dimerisierungsproduktes (s. Abb. 23, **3**; Abb. 25, **3**), um mechanistisch die Bildung des Intermediates zu erklären.

Tautomerisierung der Komponente (**4**) ergibt Komponente (**5**), welche nach nukleophiler Substitution auf der Akzeptor-Seite in das nachgewiesene Intermediat (**6**)

6. Diskussion

übergeht. Vinyloge Eliminierung an der N-5-Position von Intermediat (6) ergibt das Intermediat (7). Gefolgt von einer erneuten vinylogenen Eliminierung an der N-8*-Position, ergibt unter Aromatisierung Riboflavin (8) und 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*, 3*H*)-pyrimidindion (9).

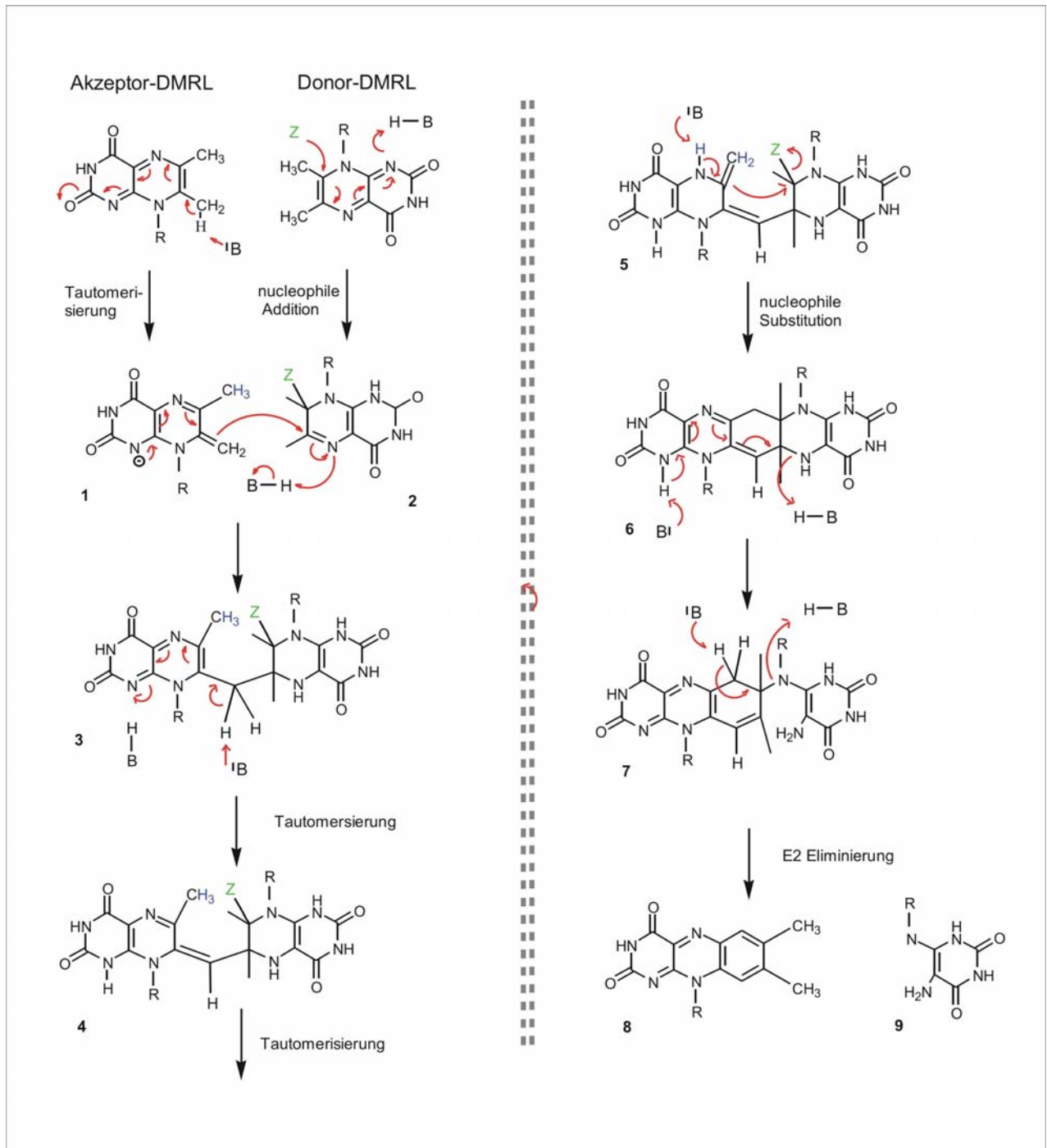


Abb. 25) **Hypothetischer Reaktionsmechanismus der Riboflavin-Bildung postuliert nach Illarionov et al.** [102] durch (trimer) Riboflavin-Synthasen (X = unbekanntes Nukleophil, R = Ribityl-Rest). Z repräsentiert Ser146 oder ein Wassermolekül [34]. Modifiziert dargestellt ist die reversible Protonierung: B fungiert als Säure/Base-System.

Die Regiochemie der enzymkatalysierten Reaktion weist auf eine gleichzeitige Bindung zweier Substratmoleküle in antiparalleler Orientierung als Ausgangstopologie der Dismutationsreaktion hin. Ligandenbindungsstudien an trimeren Riboflavin-Synthasen haben gezeigt, daß jede Untereinheit des Trimers zwei Substrat-Analoga binden kann [103].

Weitere Bindungsstudien haben außerdem für Substratanaloga eine entsprechende Bindungsstöchiometrie gezeigt, und für das Produkt Riboflavin wurden je 3 Moleküle pro Trimer gebunden [104]. Diese Resultate sind im Einklang mit dem Vorschlag von Beach und Plaut einer distinkten Akzeptor- und einer Donorbindungsstelle im Enzym.

Vor kurzem konnte in unserem Labor die Struktur der Riboflavin-Synthase aus *S. pombe* im Komplex mit dem Inhibitor 6-Carboxyethyl-7-Oxo-8-Ribityllumazin aufgeklärt werden [34]. Im kristallinen Zustand wurde - im Gegensatz zum nativen Trimer in Lösung - ein Monomer vorgefunden, welches als (katalytisch inkompetentes) asymmetrisches Trimer betrachtet werden kann. Durch *molecular modelling* können 2 Untereinheiten derart zusammengeführt werden, so daß sich eine pseudo-C₂-Symmetrie der beiden Domänen und damit dazwischen das aktive Zentrum ausbildet. Das Zueinanderführen der beiden Untereinheiten erfolgt derart, daß die beiden DMRL-Moleküle eine antiparallele Orientierung aufweisen, die zum cis-Addukt des pentacyclischen Intermediates führen könnte. Das Intermediat läßt sich ebenso in das so entstandene aktive Zentrum positionieren. Nach diesem Modell erfolgt die Übertragung der C₄-Kohlenstoffeinheit von dem am C-Terminus gebundenen DMRL-Molekül (Donorseite) auf das am N-Terminus gebundenen DMRL-Moleküls des benachbarten Monomers.

6.4 Die Akzeptor-Seite: Ort der Riboflavinbildung

In Übereinstimmung mit der Eigenschaft von Lumazin-Synthasen ist diese pentamere Riboflavin-Synthase ein weiteres Beispiel für die Generierung eines aktiven Zentrums durch Zusammenlagerung zweier Untereinheiten des Pentamers [27, 67]. Die beiden Substratbindungsstellen weisen unterschiedliche hydrophile Seitenketten und Hauptketten-Interaktionen auf. Diese spezifischen Interaktionen scheinen essentiell für die korrekte topologische Orientierung der beiden Substratmoleküle zueinander zu sein. Darüber hinaus sollten diese beiden Substratbindungsstellen die Bedingung schaffen,

6. Diskussion

welche es erlaubt, eine Differenzierung zwischen Akzeptor- und Donator-Seite vorzunehmen.

Die Komplex-Struktur der Lumazin-Synthase aus *S. pombe* [105] mit gebundenem Riboflavin gibt Hinweise auf die Bindungsstelle des Produktes in der archaealen Riboflavin-Synthase (Abb. 26). Wie die Superposition mit der Komplexstruktur mit dem Substrat-Analogon zeigt, weist das Pteridin-Ringsystem von Molekül **A** eine coplanare Orientierung zum Isoalloxazin-Ringsystem von Riboflavin auf. Ebenso weisen beide Ribityl-Seitenketten eine ähnliche Orientierung bezüglich der Position und Konformation im aktiven Zentrum auf. Daher sollte Riboflavin an der Bindungsstelle von Molekül **A** gebildet werden und die Akzeptor-Seite darstellen, wohingegen Molekül **B** der Komplexstruktur als Donor-Molekül aufgefaßt werden sollte. Diese Schlußfolgerung ist zentral für die weitere Bewertung und Diskussion der in der Fachliteratur postulierten Reaktionsmechanismen.

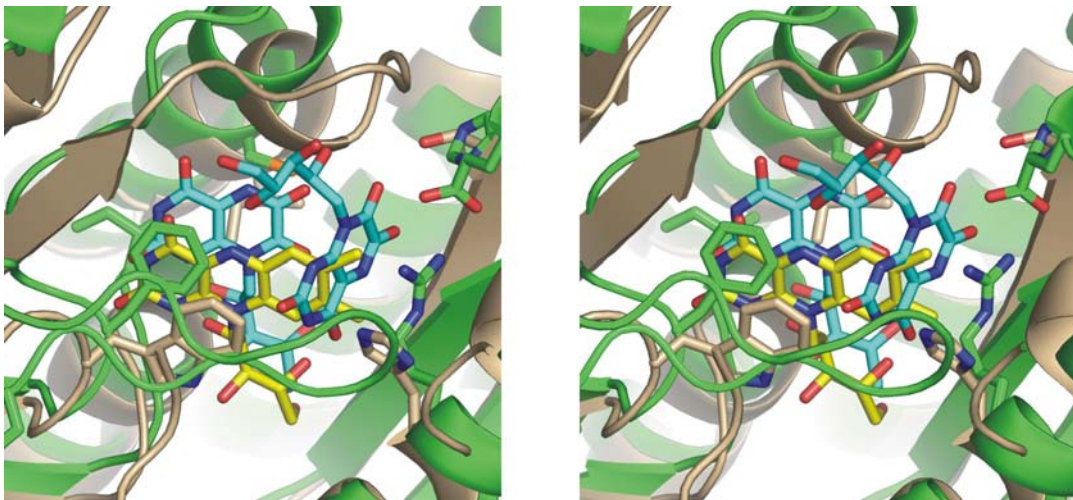


Abb. 26) **Stereoabbildung der Superposition von *S. pombe* LS mit Riboflavin und *M. jannaschii* RS mit dem Inhibitorpaar.** Die Untereinheiten von LS sind grau und die Kohlenstoffatome von Riboflavin gelb dargestellt. Die Untereinheiten von RS sind grün markiert. Die Kohlenstoffatome der beiden Inhibitoren sind in hellblauer Farbe charakterisiert. Die Positionen Phe-12 (*MJa*) und Trp-22 (*S. pombe*) korrespondieren topologisch. Für Trp-22 wurde eine *stacking*-Interaktion zu Riboflavin vorgeschlagen [105].

6.5 Riboflavin-Synthase: Ein ionisch-nukleophiler Reaktionsmechanismus?

Die Evaluierung des ionisch-nukleophilen Reaktionsmechanismus (von Beach und Plaut), bezogen auf die zu beobachtende Geometrie und Bindungssituation in der Komplexstruktur, läßt Cys-76 die Rolle als Proton abstrahierende Base (A) zukommen. Ferner bietet die Komplexstruktur keine Erklärung für die Identität eines potentiellen Nukleophils Z für Molekül **B**. Innerhalb eines Radius von 4,5Å des zu nukleophil anzugreifenden Kohlenstoffatoms befindet sich kein Kandidat der hierfür in Frage käme. Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß ein Wassermolekül diese Funktion übernehmen könnte. Für die trimeren RS wurde ebenfalls als Nukleophil ein Wassermolekül vorgeschlagen [28, 34].

Ein weiteres Postulat von Beach und Plaut umfaßt eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen einer NH-Gruppe der Peptidbindung der Hauptkette des Enzyms (mit HX bzw. HY in Abb. 23) zu der 2-Oxo-Gruppe des DMRL-Moleküls als ein Mechanismus, um die anionische Form an der Akzeptor-Seite zu stabilisieren. In Abbildung 13 u. 14 ist dargestellt, daß die 2-Oxo-Gruppe der Akzeptor-Seite eine Wasserstoffbrückenbindung zu einem Wassermolekül und zur NH-Gruppe von Ile-42 der Hauptkette ausübt. Daher könnte die Bildung eines Exomethylanions als attraktive Arbeitshypothese betrachtet werden. Jedoch befindet sich zum einem Molekül (**A**) in einer komplett elektronenreichen Umgebung und andererseits, befindet sich direkt an dieser Position Phe-12, welches ein *Stacking* zum Pteridin-Ringsystem ausübt. Aufgrund dieses Faktums scheint die Annahme der Bildung und Stabilisierung dieses Anions an dieser Stelle der Kavität wenig attraktiv.

Im Detail soll hier noch auf den modifizierten ionisch-nukleophilen Reaktionsmechanismus nach Illarionov *et al.* eingegangen werden [102]. Wie bereits weiter oben erwähnt wurde, unterscheiden sich die beiden Mechanismen nachdem sich das erste Lumazin-Dimer gebildet hat. Während Beach und Plaut die Entstehung eines Exomethylanion favorisierten, postulierten Illarionov *et al.* die Entstehung einer negativen Ladung am N1-Atom (Abb. 25; **1**). Im weiteren Verlauf findet am N1-Atom eine reversible Protonierung statt (Intermediat **4** und **6**). Die Komplexstruktur zeigt jedoch, daß kein geeignetes Säure/Base-System oder Wasser-Molekül in der Nähe ist (in Nachbarschaft zur Ribityl-Gruppe), um in dieser Kavität die Protonierung/Deprotonierung, wie von der Reaktionssequenz erfordert, durchzuführen. Es

6. Diskussion

kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß Protonen durch freie Diffusion dies bewerkstelligen könnten.

Des weiteren läßt sich feststellen, daß die postulierte Reaktionssequenz eine ungewöhnliche Tautomerisierung von Intermediat **4** zu **5** erfordert. Die intramolekulare Protonenwanderung (Prototopie) ausgehend von der 6-Methylgruppe hin zum benachbarten N5-Atom (durch blaue H-Atome symbolisiert) erscheint energetisch ungünstig zu sein. Zum einem ist eine Resonanzstabilisierung des Ringsystems durch Bildung der endständigen Alken-Gruppe (Methylen-Einheit) nicht mehr gegeben und zum anderen weisen solche Methyl-Gruppen einen extrem hohen pK_A -Wert auf, so daß davon ausgegangen werden kann, daß im dynamischen Gleichgewicht - wenn überhaupt - diese Komponente nur in geringen Konzentrationen vorliegt (s. Abschnitt 6.1). Natürlich muß an dieser Stelle betont werden, daß das Ausmaß einer solchen Tautomerisierung von mehreren Faktoren abhängig ist und in einer Protein-Umgebung völlig anders sein kann.

6.6 Riboflavin-Synthase: Eine inverse Diels-Alderase?

Die Evaluierung des ionisch-nukleophilen Reaktionsmechanismus, bezogen auf die Bindungssituation in der Komplexstruktur, veranlaßte uns, ein alternatives Szenario für den Beginn der Dismutationsreaktion in Erwägung zu ziehen. Truffault [74] postulierte in seiner Doktorarbeit eine inverse Diels-Alder-Reaktion als den ersten Schritt der Riboflavin-Biosynthese. Entsprechend unserer Hypothese beginnt die Dismutationsreaktion mit einer rigiden topologischen Fixierung der beiden DMRL-Moleküle in *endo*-Konformation, und wir interpretieren die Komplex-Struktur als „Schnappschuß“ nahe am Übergangszustand einer potentiellen Diels-Alder-Reaktion. Riboflavin-Synthase bindet die beiden Substrat-Moleküle in anti-paralleler Orientierung und reduziert hiermit den Freiheitsgrad von Translations- und Rotationsbewegung der Ausgangsstoffe. An der Donorseite erfährt das LUMO des Diens eine Energieabsenkung, während an der Akzeptorseite das HOMO eine Energieanhebung erfährt, welches zu einer (wenn auch geringen) Steigerung der Umsatzrate gegenüber der nicht-enzymatischen katalysierten Reaktion führt. Das aktive Zentrum kann daher als Entropiefalle der [4+2]-Cyclo-Addition betrachtet werden, welches zudem zwei unterschiedliche elektronische Umgebungen für die beiden Substrat-Moleküle generiert. Die

6. Diskussion

inverse Elektronenverteilung als Grundvoraussetzung für diesen hypothetischen Mechanismus sollte vom Enzym dahingehend unterstützt werden, als daß das Dienophil an der Akzeptor-Seite eine elektronenreiche Umgebung sowie gleichzeitig die En-Komponente eine elektronenarme Umgebung vorfindet. Der hypothetische Diels-Alder-Mechanismus – im Detail die Stereochemie von pentameren Riboflavin-Synthasen - ist in Abbildung 27 dargestellt.

Die Komplex-Struktur zeigt, daß Cys-76 - nach Drehung der Seitenkette - ideal positioniert ist, um einen nukleophilen Angriff auf das C-4 α -Atom ausführen zu können (Distanz 3,4 Å). Der Aminosäure Phe-12 könnte daher die Funktion zukommen, durch *stacking*-Interaktion das Pteridin-Ringsystem für den nukleophilen Angriff zu fixieren.

Als Resultat ergibt sich eine elektronenreiche Variante des DMRL-Moleküls (Dienophil) an der Akzeptor-Seite. An der Donor-Seite befindet sich das zweite DMRL-Molekül ebenfalls in einem Netzwerk von Wasserstoffbrückenbindungen, und der Ribityl-Rest schließt das aktive Zentrum (Abb. 13. 27,28). Die elektronenarme mesomere Form von DMRL (Dien) könnte hauptsächlich durch die Seitenketten der Aminosäuren His-122, Gln-146 stabilisiert werden. Die extreme Oberflächenladung des aktiven Zentrums ist in Abbildung 28 dargestellt.

Der zweite Schritt des hypothetischen Reaktionsmechanismus erfordert eine Base, um mit der 6-Methyl-Gruppe (**3**) reagieren zu können (Abstraktion des Protons; Hoffmann-Eliminierung). Die Topologie der Komplexstruktur legt nahe, daß nur das weiter oben bereits erwähnte Cys-76 in der Nähe ist, um diese Funktion erfüllen zu können. Da diese Protonen in der Reaktion bei deuterierten Derivaten mit *E. coli* RS nicht austauschbar sind, erfordert diese Reaktion einen spezifischen Mechanismus. Unter der Voraussetzung, daß ein entsprechendes Verhalten auch bei *MJaRS* zu erwarten ist, wäre nur Cys76 in der Nähe, um diese Funktion topologisch übernehmen zu können. Obwohl Cystein nicht als typische Base betrachtet werden kann, wäre es in diesem Modus basisch genug, um die 6-Methylgruppe in der Nähe des positiv geladenen quaternären Stickstoffs zu gewährleisten.

Diese Reaktionssequenz könnte das Intermediat **4** ergeben und die negative Ladung am Carbonyl-Sauerstoff (O4; Oxy-Anionform) könnte durch Asp-73 und NH-Gly-68 stabilisiert werden (Intermediat **4** und **6**).

6. Diskussion

Cys-76 seinerseits ist Lys-43 und Glu-79 benachbart, welche ihrerseits mit (mindestens) zwei Wassermolekülen zusammen zahlreiche Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb des aktiven Zentrums ausbilden (nicht gezeigt). Diese Aminosäuren und das Wassermolekül könnten vermutlich auch zu den letzten Schritten der Reaktion beitragen. Ein Proton der 7-Methyl-Gruppe der Akzeptor-Seite (**5**) muß zum N-5-Stickstoff der Donor-Seite (**6**) transferiert werden. Wie bereits weiter oben erwähnt, weist diese Methyl-Gruppe eine bemerkenswerte Azidität auf, so daß diese Deprotonierung funktionell von Cys-76 (oder einem Wasser-Molekül) übernommen werden könnte. Auf der Donor-Seite befindet sich His-101 und es ist sowohl nahe genug der 7-Methyl-Gruppe, als auch dem N5-Stickstoff und wir vermuten, daß das protonierte Histidin entsprechend einer „flip-Rotation“ das Proton - eventuell über ein Wassermolekül – dem N5-Stickstoff zukommen läßt. Hierdurch könnte sich das pentacyclische Intermediat (**7**) nach einer Aldol-Addition bilden.

Die letzten Schritte des hypothetischen Reaktionsmechanismus umfassen gut charakterisierte organische Reaktionen, welche keine besondere (bzw. eine, vgl. [106]) Unterstützung durch das Enzym erfordern [74]. Die erneute Deprotonierung an der C7 α -Position des Intermediates **7** könnte Intermediat **8** ergeben. Die komplexe Dismutationsreaktion endet mit einer retro-Michael-Addition (**9**), welche nach Eliminierung und Aromatisierung die Reaktionsprodukte ergibt (**10** und **11**). Eventuell katalysiert *MJaRS* die stereospezifische Deprotonierung des *pro-S*-Wasserstoffs von Intermediat **7** (bzw. des *pro-R*-Wasserstoff von Intermediat **9**).

6. Diskussion

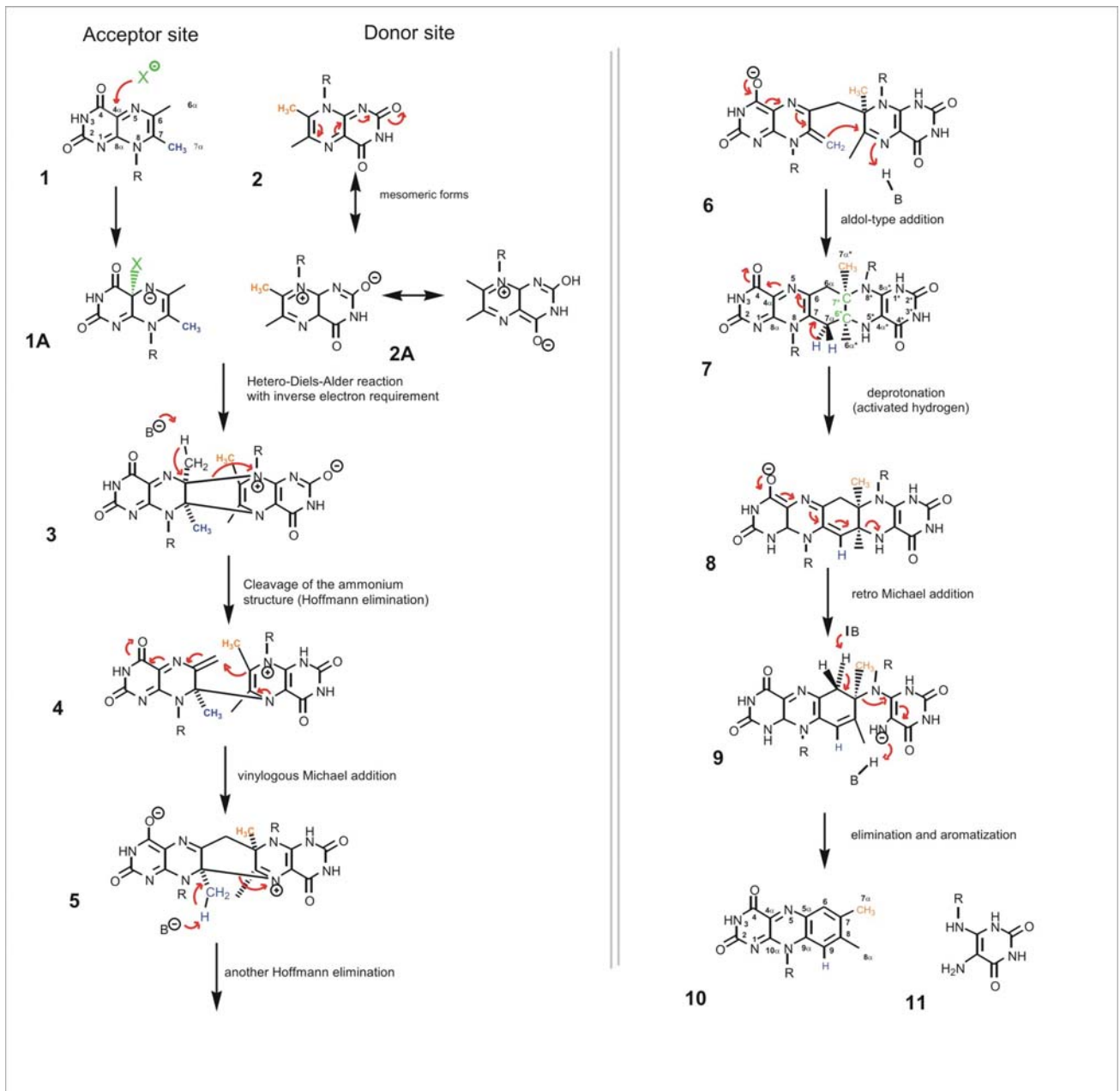


Abb. 27) **Hypothetischer Reaktionsmechanismus der Riboflavinbildung mit einer Diels-Alder-Reaktion als initialen Schritt, modifiziert nach Truffault [74].** X repräsentiert ein Nukleophil (Cys-76) (grün), welches sich an der Akzeptor-Seite befindet und B eine Base. Die Regiospezifität der Reaktion ist durch rote und orange Markierung der 7 α -Methylgruppe von DMRL charakterisiert. Die hypothetische Stereochemie von *MjaRS*, welche das cis-pentacyclische Intermediate **7** (6S7R) generiert, ist angedeutet (6*- und 7*- Kohlenstoffatome sind grün dargestellt). Die stereospezifische Deprotonierung von Intermediat **7** und **9** ist indiziert.

Der ionisch-nukleophilen Reaktionsmechanismus (von Beach und Plaut) erfordert initial eine Interaktion, die einerseits durch Bildung eines Exomethylen-Anions an der Akzeptor-Seite und andererseits durch einen nukleophilen Angriff gegenüber dem

6. Diskussion

zweiten DMRL-Molekül an der Donor-Seite gekennzeichnet ist. Dieses Nukleophil (als Z symbolisiert, s. Abb. 27) könnte vermutlich ein Cystein-Rest darstellen, welches durch Inhibierung des Hefeenzym durch Sulfhydryl-Bindungsreagenzien impliziert wurde [99]. Dieser Umstand könnte jedoch auch sterische Ursachen haben. In der aktuellen Komplexstruktur haben wir der Akzeptor-Seite die Eigenschaft zugewiesen, das Nukleophil (Cys-76) zu beherbergen – im Gegensatz zu andern Modellen, welche ein Wasser-Molekül hierzu in Betracht ziehen (außer dem Modell von Zheng *et al.*, [107]). Daher sollte Riboflavin an der Akzeptor-Seite gebildet werden. Wie die Superposition der Komplex-Struktur mit der Lumazin-Synthase aus *S. pombe* mit gebundenem Riboflavin zeigt, wird in der Tat die Hypothese des Diels-Alder-Mechanismus dadurch unterstützt (Abb. 26).

Wie aus dem Aminosäure-Sequenzvergleich (Abb. 33) zu erkennen ist, präsentieren archaeale Lumazin-Synthasen an dieser Position ein Valin oder Alanin. Einige putative Riboflavin-Synthasen besitzen an dieser Position ein Serin an Stelle eines Cysteins, welches diese nukleophile Funktion übernehmen könnte. Selbstverständlich muß an dieser Stelle betont werden, daß momentan die experimentelle Datenlage nicht ausreicht, Cys-76 eine nukleophile Funktion in der Katalyse zuzuweisen. Als neuer Befund ist anzufügen, daß die Aktivität durch Mutation von Cys-76 nur geringfügig verändert wird – ähnlich wie bei der RS aus Hefe, wo der Ersatz von Cys-48 auch nur eine geringfügige Absenkung der Aktivität bewirkt - und es ist daher nicht zulässig zu behaupten, daß das Thiol eine wichtige mechanistische Rolle spielt [108].

Daher kann z.B. angenommen werden, daß hierauf ein Wassermolekül in dieser Mutante einen nukleophilen Angriff an der Akzeptor-Seite durchführt (wie beim ionisch-nukleophilen Mechanismus an der Donor-Seite; siehe Abschnitt 6.3 und 6.5). Andererseits könnte im Einklang mit den neuen biochemischen Befunden in dieser Hinsicht eine hypothetische Diels-Alder-Reaktion ebenso ausgehend von den Komponenten **1** und **2b** (Abb. 27) formuliert werden, bei der überhaupt kein Nukleophil für die Katalyse benötigt wird. Ähnlich wie bei der Macrophomat-Synthase [96] sollten detaillierte quantenmechanische Analysen Hinweise geben, ob prinzipiell der ionisch-nukleophile Reaktionsmechanismus oder der Diels-Alderase-Mechanismus (bzw. ohne Nukleophil) „chemisch“ plausibel sind.

6. Diskussion

Wie bereits weiter oben erwähnt (Abschnitt 6.2), kann zudem nicht ausgeschlossen werden, daß der entropische Beitrag des Enzyms maßgeblich - und nicht primär bestimmte Aminosäureseitenkettenreste im aktiven Zentrum - für die Steigerung der Riboflavin-Syntheserate gegenüber der nicht-enzymatischen Reaktion ist. (Bemerkenswerterweise kann die Syntheserate des trimeren Hefe-Enzyms durch Zugabe reduzierender Agentien (z.B. Mercaptoethanol oder N-Acetylcysteine) um 20 – 40% gesteigert werden [24].)

Trotz der guten Übereinstimmung der hier vorgelegten kristallographischen Studie mit dem von Truffault postulierten initialen inversen Diels-Alderase-Mechanismus und den Folgeschritten, muß betont werden, daß eine sichere Schlußfolgerung aufgrund der restringierten Datenlage biochemischer Experimente bisher nicht abschließend vollzogen werden kann. Es ist eine immanente Eigenschaft der Diels-Alder-Reaktion, daß diese Reaktion keiner Katalyse bedarf, und es wurde daher vorgeschlagen, daß die Steigerung der Umsatzrate von Diels-Alderasen hauptsächlich durch Stabilisierung des Substrates durch Wasserstoffbrückenbindungen erreicht werden könnte, begleitet von einer Verringerung der Entropie der Reaktion [90]. Die Indizienbeweise für einen potentiellen Diels-Alderase-Mechanismus sind: Der Umstand, daß kein katalytischer (Aminosäure-) Rest und nur eine effiziente Interaktion von π -Orbitalen zwischen zwei Substratmolekülen erforderlich ist, und damit einhergehend die hohe Stereospezifität der Reaktion sowie die Absenz Intermediate mit nur einer C-C-Kohlenstoff-Einfachbindung [74].

In der Tat, wie später im Detail noch ausführlich diskutiert wird, verläuft die komplexe Dismutations-Reaktion von DMRL spontan in kochender wäßriger Lösung in Abwesenheit eines Enzyms (bzw. Katalysators). Die vom Enzym katalysierte Reaktion (sowohl trimere als auch pentameren Riboflavin-Synthasen) und die nicht-katalysierte Reaktion verlaufen mit identischer Regiochemie des Produktes Riboflavin. Bemerkenswerterweise haben Illarionov *et al.* [109] herausgefunden, daß die (trimere) Riboflavin-Synthase aus *E. coli* hauptsächlich ihr katalytisches Potential vielleicht aus der Fähigkeit erlangt, eine günstige topologische Beziehung zwischen den beiden DMRL-Molekülen zu etablieren. Dieser Befund basiert auf der kinetischen Analyse von verschiedenen Punktmutanten, welche nur einen geringen Einfluß auf die Umsatzrate der Riboflavin-Synthese aufwiesen. Im Detail konnte keine spezifische Aminosäure

6. Diskussion

identifiziert werden (außer Phe2, invariant in trimeren RS), die eine maßgebliche Rolle in der Katalyse spielt [109] (vgl. auch Abschnitt 6.7). Daher können (trimere) Riboflavin-Synthasen als kinetische Maschinen betrachtet werden [108], und überraschenderweise wird ein solches charakteristisches Merkmal auch für die metabolisch in der Stoffwechselkaskade eins weiter unten stehende Lumazin-Synthase angenommen [110]. Wie bereits weiter oben erwähnt, kann die Kavität von pentameren Riboflavin-Synthasen (welches ein strukturelles Homolog zu Lumazin-Synthasen repräsentiert) daher als Entropiefalle betrachtet werden (Abb. 28).

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, benötigen die pentameren Riboflavin-Synthasen aus *M. jannaschii* und *M. thermoautotrophicum* Magnesiumionen, um die Riboflavinsynthese effektiv zu gewährleisten. Aufgrund der limitierten Auflösung von 2.22Å konnte eine Magnesium-Bindungsstelle nicht identifiziert werden. Weitere strukturelle Studien sind erforderlich, um die Bindungsstelle zu ermitteln und um eine potentielle Rolle des Metallions in der Katalyse zu verifizieren. Als Möglichkeit kann z.B. eine Lewis-Säure-katalysierte Diels-Alder-Reaktion in Betracht gezogen werden. Bemerkenswerterweise beschleunigen Metallionen die nicht-enzymatische Synthese von Riboflavin [72].

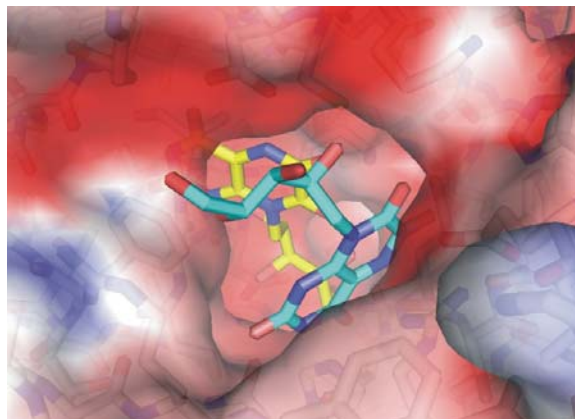


Abb. 28) **Elektrostatisches Oberflächenpotential der Substratbindungsstelle**, generiert mit dem Programm GRASP [60]. Blau und rot indizieren positive und negative Potentiale. Der Blick ist von oben auf die asymmetrische Kavität gerichtet (Kohlenstoffatome von Molekül A sind gelb, die von Molekül B in hellblau dargestellt).

6. Diskussion

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß alle bisher publizierten Reaktionsmechanismen zur Riboflavinsynthese als hypothetisch angesehen werden müssen. Trotz immenser Fortschritte in den letzten Jahrzehnten liegt ein umfassendes und genaues Bild der komplexen Dismutationsreaktion immer noch nicht vor. Postulate aus einer Zeit (1970), in der sich erst fundamentale Prinzipien der Organischen Chemie wie die Woodward-Hoffmann-Regeln [111] etablierten, müssen heute als fragwürdig erscheinen, da sie nicht zur Evaluation des Reaktionsmechanismus zur Verfügung standen. Die Komplexstruktur erlaubt es nun, diese frühen Postulate zu evaluieren, wie es zuvor noch nicht möglich war. Der inspirierende Aspekt des vorgeschlagenen Diels-Alder-Mechanismus liegt in der Vorstellung begründet, ein und dasselbe Molekül in zwei verschiedenen tautomeren Formen vorliegen zu sehen, dessen Entstehung durch verschiedene elektronische Umgebungen des Enzyms gefördert wird. Wie die Komplexstruktur der pentameren RS zeigt, ist dies aufgrund der Geometrie und Koordination der beiden Substrat-Analoga-Moleküle in der asymmetrischen Kavität als attraktive Hypothese einzustufen.

Obgleich der postulierte Reaktionsmechanismus von Truffault [74] im Einklang mit den Ergebnissen dieser kristallographischen Studie steht, muß natürlich betont werden, daß der initiale Diels-Alderase-Mechanismus als hypothetisch betrachtet werden muß. Ebenso ist nicht zwingend, von einer gleichzeitigen Elektronenverschiebung im Falle einer Diels-Alder-Reaktion auszugehen (Synchronreaktion), da in der Fachliteratur auch asynchrone Abläufe von Diels-Alder-Reaktionen diskutiert werden [112, 113].

Gemäß unserer Hypothese verlaufen die Reaktionsschritte 1 – 7 in *endo*-Orientierung (Abb. 27), die das pentacyclische Intermediat (6S; 7R) ergeben (s. Abschnitt 6.7), und somit die geringste Bewegung von beiden DMRL-Molekülen erfordert, um diese komplexe Dismutationsreaktion zu bewerkstelligen. Obgleich die Geometrie der Komplex-Struktur in sehr guter Übereinstimmung mit dem postulierten initialen Diels-Alderase-Mechanismus und den darauf folgenden Schritten ist, sind weitere Experimente erforderlich, um einen ionisch-nukleophilen Reaktionsmechanismus auszuschließen. Es sollte daher in Analogie zur Macrophomat-Synthase und anderen Enzymen vorgegangen werden, denen die Eigenschaft zugeschrieben wird, eine pericyclische Reaktion zu katalysieren [76, 95, 96]. Das Prinzip der geringsten Bewegung zur Ermittlung günstiger Reaktionswege [114], sollte basierend auf der Komplex-Struktur von

6. Diskussion

MJa, in Analogie zur Vorgehensweise bei der Macrophomat-Synthase, Hinweise auf einen chemisch plausiblen Mechanismus geben. Der Diels-Alderase Mechanismus für die Riboflavin-Synthese sollte daher in Zukunft als attraktives Arbeitsmodell dienen.

6.7 Das pentacyclische Intermediat der Dismutationsreaktion

Wie bereits erwähnt, führte die Entdeckung eines pentacyclischen Intermediates zur Modifizierung der Reaktionssequenz nach Bildung des ersten Zwischenproduktes [102]. Die exakte Stereochemie des pentacyclischen Intermediates konnte bei seiner Entdeckung experimentell nicht eindeutig verifiziert werden. Dieses Intermediat weist zwei zusätzliche chirale Zentren (gegenüber den Ausgangssubstraten) und folglich vier weitere mögliche Stereoisomere der Dismutationsreaktion auf: zwei trans-verknüpfte Intermediate (6R; 7R) und (6S; 7S) sowie zwei cis-verknüpfte Intermediate (6R; 7S) und (6S; 7R) (Abb. 29; vgl. auch Abb. 24).

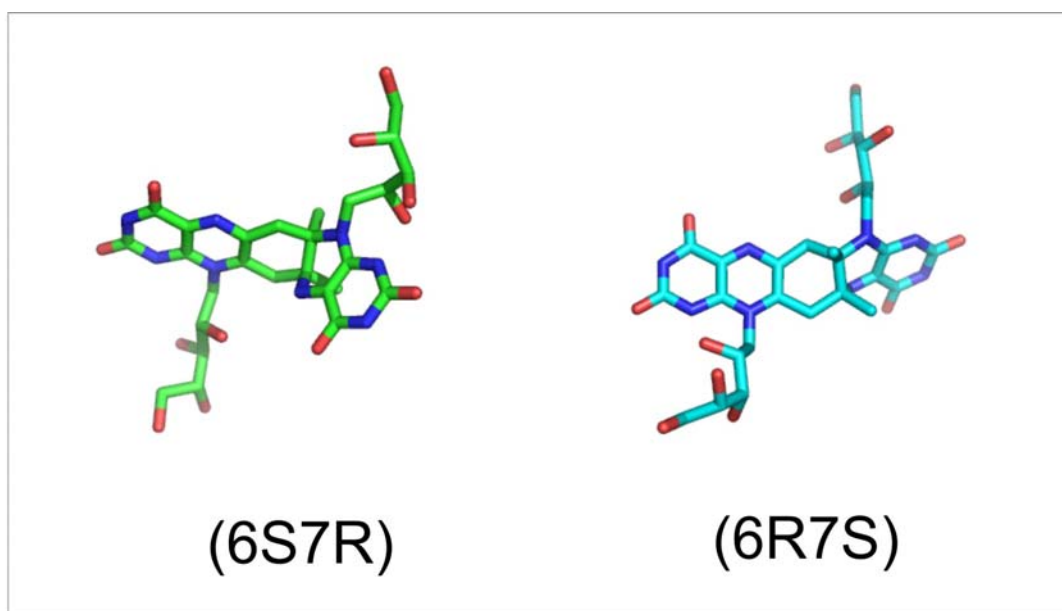


Abb. 29) **Cis-verknüpfte Reaktionsintermediate. (6S; 7R) und (6R; 7S)** sowie (6S; 7S) und (6R; 7R) können als Diastereomere betrachtet werden. Diastereomere weisen keine Spiegelbild-Symmetrie zueinander auf. Bei den Diastereomeren-Paaren (RR) und (SS) bzw. (RS) und (SR) kann formal eine Spiegellebene gelegt werden, wenn zuvor die beiden Ribityl-Reste jeweils durch eine achirale Gruppe ersetzt werden (Akzeptor-Seite des pentacyclischen Intermediates und die achirale Gruppe kann dann in die Spiegelebene positioniert werden). Die Moleküle wurden mit dem Programm SYBYLL (s. Material u. Methoden) energieminiert und mit dem Graphikprogramm PYMOL dargestellt.

Die Überprüfung der vier potentiellen Intermediate bezüglich der hier vorliegenden pentameren Riboflavin-Synthase zeigt, daß nur die cis-pentacyclischen Intermediate (6R; 7S) und (6S; 7R) genügend Platz in der asymmetrischen Kavität haben. Die Platzierung der beiden trans-Isomeren (6R; 7R) und (6S; 7S) in die Kavität zeigt, daß dieser

6. Diskussion

Vorgang zu einem geringen Zusammenstoß mit dem Enzym führen können (Daten nicht gezeigt). Die Positionierung des cis-Intermediates (6R; 7S) in das aktive Zentrum zeigt, daß die „rechte Hälfte“ des Pentacyclus, welches von der Donor-Seite stammt, in umgekehrter Richtung - im Vergleich zu der Orientierung des Substrat-Analogen-Moleküls (Molekül **B**) (zu Beginn der Reaktion) – vorliegt (Abb. 30). Des weiteren zeigt nur das Stereoisomer (6S; 7R) eine günstige Topologie entsprechend der postulierten Reaktionssequenz auf, so daß die C7 α -Methyl-Gruppe und die C6 α -Methyl-Gruppe auf derselben Seite wie Cys-76, His-101 oder einem Wasser-Molekül liegen, um eine spezifische Protonierung/Deprotonierung zu gewährleisten (Abb. 27).

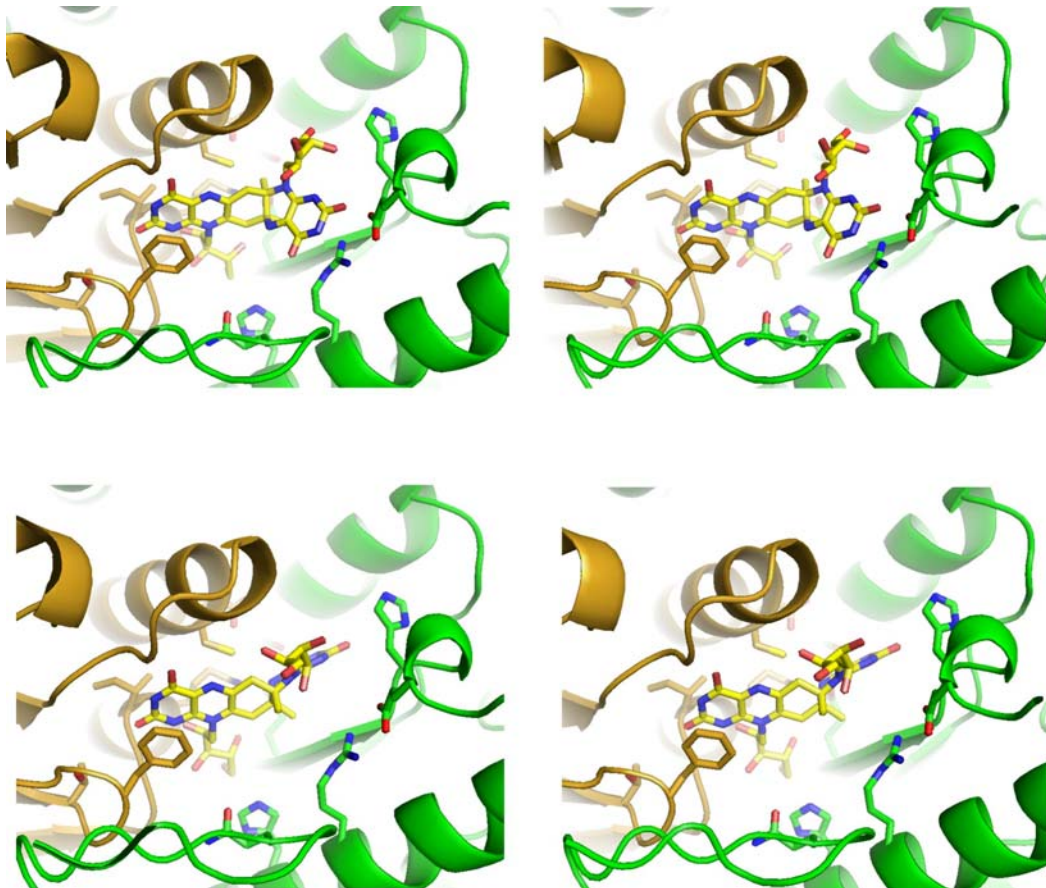


Abb. 30): **Modell der cis-pentacyclischen Intermediate (6S7R) (oben) und (6R7S) (unten) in der asymmetrischen Kavität.** Das Intermediat-Molekül wurde mit dem Programm SYBYLL [115] energieminiert und in die Kavität positioniert. Die Positionierung erfolgte in Anlehnung an die Position von Molekül A (Komplexstruktur) als potentielle Akzeptor-Seite.

Die stereochemischen Aspekte von dem pentacyclischen Intermediat wurden bereits in einer Studie auf der Grundlage der Strukturen der Riboflavin-Synthase aus *E. coli* und

6. Diskussion

S. pombe diskutiert. Wie die Röntgenstrukturanalyse des *E. coli*-Enzyms zeigt, liegt Riboflavin-Synthase als asymmetrisches Homo-Trimer vor [28], wohingegen das *S. pombe*-Enzym als Monomer kristallisierte und keine Topologie seiner Domänen aufwies, welche zur Addukt-Bildung führen kann. Durch Homologie-Modelling der Komplexstruktur (mit dem Inhibitor 6-Carboxyethyl-7-oxo-8-Ribityllumazine) des *S. pombe*-Enzyms in die trimere Struktur des *E. coli*-Enzyms wurde offensichtlich, daß nur durch zueinanderführen zweier Monomer-Einheiten des Trimers ein aktives Zentrum gebildet werden kann. Dieser Befund führte zu der Anschauung, daß die Übertragung der C4-Kohlenstoffeinheit von dem am N-Terminus gebundenen DMRL-Moleküls (Donorseite) auf das am C-Terminus gebundenen DMRL-Molekül des benachbarten Monomers (pseudo-C₂-Symmetrie) erfolgt [34]. Des weiteren wurde, aufgrund dieser „modelling-Topologie“, eine cis-Verknüpfung der beiden Substrat-Moleküle (cis-pentacyclisches Addukt) postuliert. Nach diesem Modell entsteht das cis-pentacyclische Intermediat (6R; 7S) bei trimeren Riboflavin-Synthasen [34].

In Analogie zur Identifizierung des pentacyclischen Adduktes von trimerer RS konnte kürzlich auch das entsprechende Intermediat der *MJaRS* biochemisch näher charakterisiert werden. Alle biochemischen Daten (UV/VIS, ¹³C-NMR, CDR) indizieren, daß die jeweiligen Intermediate des *MJa*- und *E. coli*-Enzyms als Diastereomere zu bezeichnen sind [106]. Die implementierende Komplexstruktur der *MJaRS* steht im Einklang mit diesen Daten, welche auch aufzeigen, daß nur das jeweils entsprechende cis-Intermediat von trimerer (Addukt (6R; 7S)) bzw. pentamerer RS (Addukt (6S; 7R)) als katalytisch kompetentes Molekül akzeptiert werden kann, aber nicht im umgekehrten Falle. Mit anderen Worten: Bei Verwendung des Adduktes (6R; 7S) für die archaeale pentamere RS konnte keine Bildung von den Produkten Riboflavin und dem Pyrimidindion mehr detektiert werden. Die beiden pentacyclischen Ringsysteme sind jeweils cis-verknüpft und sind durch „Spiegelbildsymmetrie“ zueinander korreliert [106].

Interessanterweise postulierte eine andere Gruppe die Entstehung eines trans-Intermediates im Reaktionsverlauf für trimere Riboflavin-Synthasen ebenfalls basierend auf molecular modelling [107]. Die Autoren dieser Studie kamen zu dem Schluß, daß das trans-Intermediat (6S, 7S) gegenüber dem cis-pentacyclischen Addukt eine (geringfügige) energetische Stabilisierung von 3,3 kcal/mol aufweist. Alle 4 möglichen

6. Diskussion

Reaktionsintermediate können in das durch Modelling erhaltene aktive Zentrum positioniert werden. Die weitere Evaluierung des cis- und trans-Intermediates zeigte ferner, so die Autoren dieser Studie, daß nur im Falle des trans-Intermediates hochkonservierte Aminosäurereste, von denen vermutet wird, eine entscheidende Rolle in der Katalyse des ionisch-nukleophilen Reaktionsmechanismus zu spielen, in der Nähe des Intermediates sind und damit zur Verfügung stehen (Abb. 31).

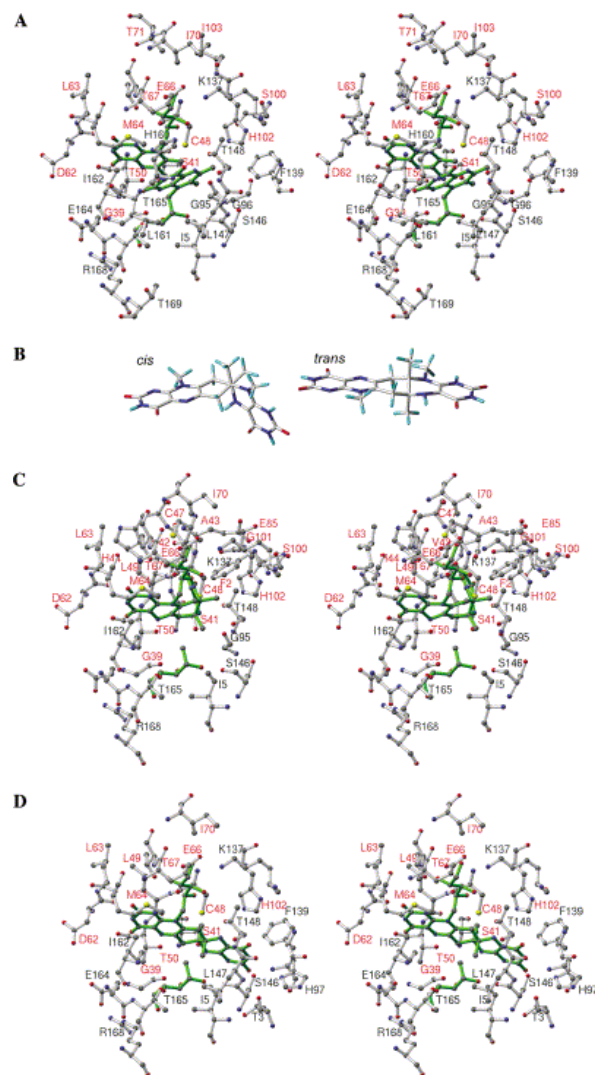


Abb. 31) **Modelle der Substrate und Reaktionsintermediate** (entnommen aus [107]). A) Modell der zwei DMRL-Moleküle im aktiven Zentrum (DMRL ist grün) [107]. B) Kalkulierte Modelle der Reaktionsintermediate nach Energieminimierung (die Ribityl- wurde zu Methyl-Gruppe trunziert). C) Modell des cis-Intermediates (6S; 7R). D) Modell des trans-Intermediates (6S; 7S).

6. Diskussion

Ausgehend hiervon wurde ein molekulares Modell des ionisch-nukleophilen Reaktionsmechanismus diskutiert. Im Detail wurde das Modell von Illarionov *et al.* in einem geringfügig modifizierten Schema diskutiert (Abb. 32). Als wesentlich muß betrachtet werden, daß die Kavität des Apo-Enzyms die Positionierung aller 4 möglichen Reaktionsintermediate erlaubt. Die Autoren betonten auch gleichzeitig, daß diese Modellierung-Studie kein angemessener Ausgangspunkt zur Evaluierung des Mechanismus bietet. Gleichwohl lieferten sie ein interessantes Modell möglicher Funktionen bestimmter Aminosäurereste, insbesondere von Cys-48. Im Gegensatz zu Meinig *et al.* und Gerhardt *et al.* wurde postuliert, daß Cys-48 als Nukleophil fungiert. Dieser Vorschlag sei konsistent mit allen biochemisch verfügbaren Daten des Hefe-Enzyms: Die Mutante Cys48Ser weist eine 5x geringere Aktivität gegenüber dem Wildtyp-Enzym auf und die Cys48Ala-Mutante ist katalytisch inaktiv [116].

Es sollte betont werden, daß Punktmutanten des *E. coli*-Enzyms von Cys-48, die der Aminosäure Cys-48 des *S. pombe*-Enzyms entsprechen, nicht mehr rekombinant in *E. coli*-Stämmen exprimiert werden können [109]. Dieser Umstand wurde dahingehend interpretiert, daß eventuell Cys-48 in der Faltung eine maßgebliche Rolle spielen könnte [109, 116]. Andererseits wurde geschlußfolgert, im Einklang mit der Komplexstruktur von *S. pombe* (Substrat-Analogon ist in der Nähe der Thiolgruppe von Cystein), daß Cys-48 in der Katalyse eine zentrale Rolle spielt [117]. Grundlegend ist zunächst der Unterschied, daß Meinig *et al.* [118] Cys48 die Position an der Akzeptor-Seite und nicht an der Donor-Seite zugewiesen haben. Ser146 könnte in diesem Modell die Rolle des Nukleophils übernehmen. Die Mutante Ser146Gly besitzt 10% der WT-Enzymaktivität.

Ferner wurden in der Modelingstudie von Zheng *et al.* folgende weitere Möglichkeiten erörtert: Es wurde eine His-102/Thr-148 Dyade als generelles Säure/Base-System vorgeschlagen. Jedoch bieten die Autoren dieser Studie kein molekulares Modell für die Wirkung der Ser41Ala-Mutante, welche zur Akkumulation und Entdeckung des pentacyclischen Intermediates führte. Für die Trunkationsmutante, welcher Met1 und Phe2 (die Sequenz MFXG ist invariant in trimeren RS) fehlt und keine enzymatisch detektierte Aktivität mehr aufweist, wurde vorgeschlagen, daß Phe2 topologisch Cys-48 in einer reaktiven Position hält. Das Modell von Gerhardt *et al.* zeigt keinen direkten Kontakt von Phe-2 zu den Substrat-Analoga [119]; die visuelle Inspektion läßt aber auch im Modell von Zheng *et al.* keine Interaktion erkennen.

6. Diskussion

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß eine sichere Schlußfolgerung auf der Basis von Simulationen der Molekularen Dynamik der als flexibel betrachteten trimeren Riboflavin-Synthasen, gefolgt von der Methode des Molecular Modelling, mit einer immanenten Unsicherheit behaftet sind. Die sichere Zuordnung distinkter Funktionen einzelner Aminosäuren in dem durch Modeling generierten aktiven Zentrum muß als spekulativ angesehen werden. Jedoch bleibt der (stereochemische) Aspekt bestehen, daß es nach Kenntnisstand der erste Präzedenzfall eines Enzyms darstellt, daß mit zwei unterschiedlichen Faltungsmustern *via* zwei stereochemisch unterschiedlichen Intermediaten eine Reaktion im Stoffwechsel katalysiert wird. Die biochemischen Daten weisen eindeutig zwei verschiedene Zwischenprodukte der Reaktionssequenz von trimeren und pentameren Riboflavin-Synthasen aus [106].

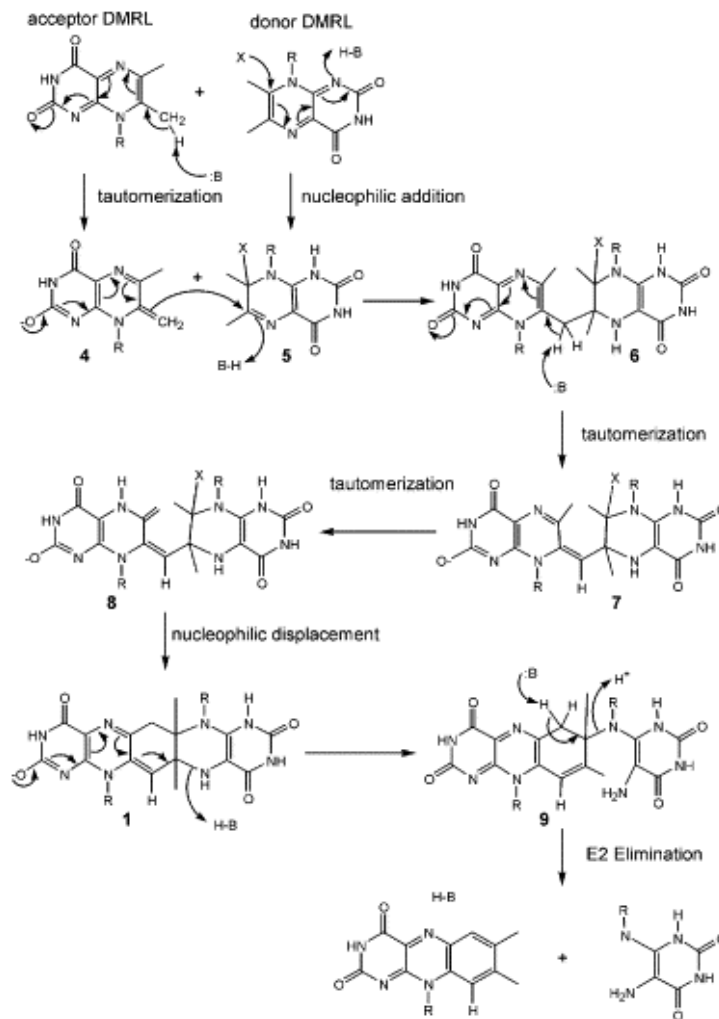


Abb. 32) **Hypothetischer Reaktionsmechanismus der trimeren Riboflavinsynthese** postuliert von Zheng *et al.* (Abbildung wurde entnommen aus [107]). X repräsentiert entweder Cys-48 oder ein Wassermolekül, B ein Säure/Base-System und R die Ribityl-Seitenkette.

6.8 Evolution des Riboflavin-Stoffwechselweges

Biosynthetische Stoffwechselwege, welche die Synthese von Coenzymen gewährleisten, müssen sich sehr früh in der Evolution etabliert haben, womöglich bevor Enzyme vorhanden waren, um deren Synthese zu bewerkstelligen [120]. Die meisten Diskussionen über den Ursprung von Stoffwechselwegen basieren auf der Extrapolation rezenter Stoffwechselwege hin zu dem letzten (daran partizipierenden) gemeinsamen Vorläufer-Enzym, welches dem Phylum der bakteriellen und archaealen Domäne sehr nahe zu liegen scheint. Aufgrund der Tatsache, daß die meisten fundamentalen Stoffwechselwege kleiner Moleküle, wie z.B. von Aminosäuren und Nukleinsäuren, zwischen Bakterien und Archaea (enzymatisch) konserviert sind, führte zu der Anschauung, daß diese Stoffwechselwege von einem gemeinsamen Vorläufer abstammen [9].

Die Analyse genomischer Sequenzen von Methanoarchaea offenbarte die Absenz vieler Gene, von denen bekannt ist, daß sie für die Synthese von Coenzymen verantwortlich sind. Insbesondere gilt dies für Enzyme, welche die Synthese von Riboflavin und FAD bewerkstelligen. Graupner und Mitarbeiter haben aufzeigen können, daß von acht Genen, welche die Biosynthese von Riboflavin in *E. coli* gewährleisten, nur fünf hiervon eine Homologie zu Vertretern aus Methanoarchaea aufweisen. Die Autoren dieser Studie legten daher die Vermutung nahe, daß der Metabolismus, welcher zu FAD führte, sich im Laufe der Evolution mehr als nur einmal etabliert haben könnte [121]. Aus einem Dendrogramm wurde geschlossen, daß die Enzyme LS und RS einen gemeinsamen Vorläufer in einem frühen Stadium der Evolution hatten (Paralog-Beziehung); dies zeigt sich z.B. in einer hohen Sequenzhomologie im N-terminalen Bereich. Manche Archaea weisen eubakterielle RS in ihrem Genom vor, was einfach durch lateralen Gentransfer erklärt werden kann [38].

Generell kann bei phylogenetischen Rekonstruktionen eine Analyse von Paralogen (Evolution durch Gen-Duplikation) erfolgen, um eine Phylogenie von Genen festzustellen oder eine Analyse von Orthologen durchgeführt werden (Evolution von einem gemeinsamen Urahn) mit dem Ziel, auch eine vermutete Phylogenie zwischen verschiedenen Organismen zu verifizieren.

Für die phylogenetische Analyse hier wurden einerseits nur putative Lumazin-Synthasen und Riboflavin-Synthasen von Archaea berücksichtigt und andererseits auf-

6. Diskussion

grund der ausgeprägten strukturellen Homologie die komplett kodierenden Bereiche (bis auf kurze Überhänge am N - und C - terminalen Bereich) verwendet (siehe Aminosäure-Sequenzvergleich Abb. 33). Die Evaluierung der Sequenzen erfolgte durch eine BLAST-Suche komplett durch sequenzierten Archaean (genomischer BLAST; NCBI). Es konnten 13 homologe Sequenzen beider Enzyme in archaealen Vertretern identifiziert werden. In manchen Archaean, wie z.B. *Pyrococcus horikoshii* OT3, *Pyrococcus abyssi* GE5, *Thermoplasma volcanium* GSS1 und, *Thermoplasma acidophilum* DSM 1728 konnten keine homologen Vertreter von LS oder RS identifiziert werden. Des weiteren konnte in *Pyrococcus furiosus* DSM 3638 und in *Nanoarchaeum equitans* Kin4-M ein homologes LS-Enzym, aber kein Homolog der pentameren RS identifiziert werden. Die Präsenz eubakterieller RS in zwei Archaea-Bakterien (*Pyrococcus furiosus* DSM 3638 and *Halobacterium* sp. NRC-1) könnte, wie bereits oben erwähnt, durch lateralen Gentransfer erklärt werden.

Das elementare Bild, was sich aus diesem Phylogramm ergibt, ist, daß Lumazin-Synthasen und Riboflavin-Synthasen von Archaean sich aus einem gemeinsamen Vorläufer-Enzym durch Gen-Duplikation entwickelt haben. Des weiteren läßt sich ein (partielles) separates Clustern von Lumazin-Synthasen und Riboflavin-Synthasen in Crenarchaeota und Euryarchaeota aufzeigen. Gleichwohl ist diese „Paralog-Beziehung“ nicht ausreichend, um hieraus eine phylogenetische Einteilung in Crenarchaeota und Euryarchaeota zu deduzieren, da eine hohe Sequenzähnlichkeit (von Genen) nicht notwendigerweise eine nahe Verwandtschaft in der Phylogenie reflektiert [3, 4]. Inwieweit Enzyme des Riboflavin-Stoffwechsels oder generell Enzyme, die essentielle Cofaktoren synthetisieren, geeignet sind (wie z.B. das universelle Protein RNA-Polymerase), molekulare Verwandtschaften verschiedener Organismen aufzuzeigen, sollte durch detaillierte phylogenetische Studien verifiziert werden (Riboflavin-Synthasen als molekulare Chronometer).

6. Diskussion

```

Ae.pe-LS MCSRVFGLLEAVS CGDKIRIAIVVSEFN YDVT RVMEEKAI DHARFLGAEVSLVARS PGTFFD 60
Py.ae-LS -----MVR LAIVVAEFNYDITQLMLQKAVEHAKFLGAEITYIVKTPGVYD 45
Su.so-LS -----MQEKSIRLGLVVAEFNYDITQLMLQKALSHARFLNVEVVKVVPVGTFFD 49
Su.to-LS -----MKMPDQSI NLAIVVAEFNYDITYLMLQRAIAHAKFLGANVVKVVPVGSYD 51
Me.mr-LS -----MVNLGFVIAEFNRDLTFMMEKMAEEHAEFLGANVSHKIMVPGSFD 45
Me.ja-LS -----MVL MVNLGFVIAEFNRDLTFMMEKVAEEHAEFLGATVKYKIVVPGVFD 48
Me.ma-LS -----MTISLGFVVAEFNRDLTYQMELLGREHAEFLGATVKETILVPGVFD 46
Me.ac-LS -----MTISLGFVIAEFNRDLTYQMELLGREHAEFLGATVKETILVPGVFD 46
Me.ba-LS -----MELLGREHAEFLGATVKETILVPGVFD 27
Ar.fu-LS -----MEKVKLGMVVAEFNRDLTYMMEILGKEHAEFLGAEVSEVIRVPGTFFD 47
Me.th-LS -----MKKVRIGAVVAEFNYDITHMMLELAKEHARFLDAEITRIVAVPGVFD 47
Me.ka-LS -----MSEIRLGLVVTEFNREITYAMEELAVQHAKDLGAKVVERVLPVGSFE 47
Fe.ac-LS -----MKIGHVVAEFNYDITMMMV ERAKDYADFLGAEYK-ILKVPGTFFD 43

Su.so-RS -----MTRKYG IADTTFSR--VDMGSLVYKVI RSEDSEADIVRYTVPGIKD 44
Su.to-RS -----MRKYGVVDTTFSR--IDMGSI AIKVIRAEDPDAEII RYTVPGIKD 43
Ae.pe-RS -----MGKCVGVADTTFSR--VDMGSVAEEVLRRLPGYRIVRHTVPGIKD 44
Py.ae-RS -----MTCIGVVDTTFSR--VNMGVAVIDEIKNLLPNATVVKRITVPGIKN 43
Ar.fu-RS -----MKIGIADTTFSR--INMGKIAIDELR-KISSI PYERYTVPGIKD 41
Me.ma-RS -----MPTIGIADTTFSR--YNMGRAAID EIQKNVS-AQIKRVTVPGIKD 42
Me.ac-RS -----MPTIGIADTTFSR--YNMGRAAID EIQKNVS-VQIKRVTVPGIKD 42
Me.mr-RS -----MDEIQKNVS-VKIKRVTVPGIKD 22
Me.mr-RS -----MTVVKVGIADTTFSR--VDMASAAIKKLNEMTSNIKIIRYTVPGMKD 44
Me.th-RS -----MIKVGICDTTFSR--YDMGGAAIDELKKHTAGIKIIRRTVPGIKD 43
Me.ka-RS -----MTRYKVG IADTTFSR--VDMASVAEKVLKEHLPVGETPRYTVPGIKD 45
Fe.ac-RS -----MKKIGIVDTTFSR--YDMASAI DELYKTGTGFETIKRVTVPGIKD 43
Me.ja-RS -----MTKKVGIADTTFSR--VDMASIAIKKLLKELSPNIKIIRKTVPGIKD 44

Ae.pe-LS TPFIVSRLLATHSEVD AVAVLGA VIKGDTKHDE VVAHQAA RKKLLDLSIEY GKPVTLG IIG 120
Py.ae-LS IPMLLKELVAK-EEVD AVATLGA VIOGATK HDELVA TQAARKILDIAVESG KPIITLGIIG 104
Su.so-LS MPLAIKKLLEK-DFID AVVTLGA VIKGETKH DELVASQTARKI VDLSTEFNK PVTLG IIG 108
Su.to-LS MAIAVKKELLKR-DDID AVVTLGA VIKGETKH DEIVATQ TARKILDLSVEY GKPVTLG IIG 110
Me.mr-LS MPLAIKTL LQK-DDIDA IVTIGCVIEGETE HDEIVVQNAARKIADLSD FPKPVALGIAG 104
Me.ja-LS MPLAVKKLLEK-DDVD AVVTIGCVIEGETE HDEIVVHNAARKIADLALQYDKPVTLG IIG 107
Me.ma-LS MPLAIKKLCQR-EDID AVVTIGSVIEGETE DHDQVVMQHAARKIMDLSLEFNK PVTLG IIG 105
Me.ac-LS MPLAIKKLCQR-EDID AVVTIGSVIEGETE DHDQVVMQHAARKIMDLSLEFNK PVTLG IIG 105
Me.ba-LS MPLAIKKLCQR-DDID AVVTIGSVIEGETE DHDQVVMQHAARKIMDLSLEFNK PVTLG IIG 86
Ar.fu-LS IPIAVKKMLLEK-GRVD AVVAIGCVIEGETE HDEIVAQHAARKIMDLSLEYG KPVTLG IIG 106
Me.th-LS MPLAVKKLLE-DEID AVITLGA VIEGATDHDQIVVQHASR KIIDLALDYDKPVALGIIG 106
Me.ka-LS VPLAVRKLLE-DDID AVVTLGA VIKGDTDHDQIAIQQA FRKIQDLMV EY GKPVALGIIG 106
Fe.ac-LS IPLGIKKLLKI-DDIDGIIAIGAVIKGETDHHRIIMENAARKITDLSLEYG KPPVALGIIG 102

Su.so-RS LPVAAKRLID--EGCDG VITLG--WVGKTM LDKYSYLATS IGLIMVQILTSK HVIDVTVH 100
Su.to-RS MPVAAKRLID--EGCDG VITLG--WVGKSM LDKYSYLATS IGLIITQV LTSKHIIDVTVH 99
Ae.pe-RS LPGAAKRILS--MGCEG VITLG--WVGRREADKLSYLAASVGLIMVEVLTGK IVIDVTVH 100
Py.ae-RS TVWGA LRILR--DGCDA VIVL G--WVGTPPV DKYSYLATS IGLMQLQIETGAL ILDVTVH 99
Ar.fu-RS LPVAAKLLLE-EGCDI VITLG--WVGGTQK DMSYIVLSMGLVIVQLM TNKHVIDVTH 98
Me.ma-RS LPVAAKLLIE-EGCDI VMA LG--MPGQK EKDKMCAHEASQGLLMAQLM TNTHIEVFVH 99
Me.ac-RS LPVAAKLLIE-EGCDI VMA LG--MPGAQQK DKMCAHEASQGLLMAQLM TNTHIEVFVH 99
Me.ba-RS LPVAAKLLIE-EGCDI VMA LG--MPGAQEK DKMCAHEASQGLLMAQLM TNTHIEVFVH 79
Me.mr-RS LPVACKKLMEE-QGCEI TMA LG--MPGGKDK DKVCAHEASQGLLMAQLM TNKHIIEVFVH 101
Me.th-RS LPVACKKLLIE-EGCEM VMA LG--MPGPEEK DKVCAHEASTGLIQAQLM TNTHIEVFVH 100
Me.ka-RS LPVACKRLLIE-EGCDL VMAFG--MPGPTEI DKQCAMVASMGLI LAQLM TNTHIEVFVH 102
Fe.ac-RS TPVAALR L FSE-YNCDL VMAFG--MPGMPV DKMSAQIASTGLMEVQLKTMKHIIEVFVH 100
Me.ja-RS LPVACKKLLIE-EGCDI VMA LG--MPGKA EKDKVCAHEASLGLMLAQLM TNKHIIEVFVH 101

Ae.pe-LS PGASRL EAIERAE EYARRAVESAVK LARRSKEL-----SGEC----- 157
Py.ae-LS HGANR IQALERVEEYARRAVEAAVKMARRKKALRE- AKYNGSTVYID----- 150
Su.so-LS HGATHEQAVERIEEYATRAVEAAIKLVQRT RKLDELKEI-KETVIE----- 154
Su.to-LS HGVTHEQAVERIEEYSTRAVEAAIKLAKRLR ELRKKIQT LN EEMVVI E----- 157
Me.mr-LS PGMTRMQAEDRID-YGKNVAEAAVKMVRRLKEIQ----- 137
Me.ja-LS PGMTRLQAQERVD-YGKRAVEAAVKMVRRLKALEE----- 141
Me.ma-LS PGMTRMAAHERVD-YAKRAVEAAVKLVRRRL----- 134
Me.ac-RS PGMTRMAAHERVD-YAKRAVEAAVKLVRRRL----- 134
Me.ba-LS PGMTRMAAHERVD-YAKRAVEAAVKLVRRRL----- 115
Ar.fu-LS PGMGR IAAATERVD-YAKRAVEAAVKLVKRLK EYDAEGS----- 143
Me.th-LS PGMTRLEAHRVD-YAKRAVEAAVKMYRRLKEDI----- 139
Me.ka-LS PGMTRMEALERVH-YAKRAVEAAVKMVRRLRELEGE----- 141
Fe.ac-LS PGESRLQAEARID-MAKEALESCKVMKVS LNNL----- 134

Su.so-RS EDEAD-DEEKLK EIAIDRATKHAKNVLVKLVKEGKNALTKYAGKGLRQGYSNAGEID---- 155
Su.to-RS EDEVN-DEEKLKDLAIDRVTKHAKNVLVLRDGRNALTPYAGKGLRQGYENAGPID---- 154
Ae.pe-RS EDEAE-APEELAAI AVDRARKHAENLAALIREGPEALVKHAGMGLRQGYPDAGPIK---- 155
Py.ae-RS EEEGGGDEK LK EIALDRTRHVNLVEMLRGG--LERYAGKGLRQGYPHAGEII---- 152
Ar.fu-RS EDEAE-DEKTLMMVAENRVRHVRNAVDDL VNPKR-LQKLAGTQRQGYPDVGPILK---- 153
Me.ma-RS EDEGK-DEKELAF LMDRRRTREHALNVKLLFPKPEK-LVREAGTQRQGYPDAGPLRM-- 154
Me.ac-RS EDEGK-DEKELAF LMDRRRTREHALNVKLLFPKPEK-LVREAGTQRQGYPDAGPLRM-- 154
Me.ba-RS ENEGK-DEKELAF LMDRRRTREHALNVKLLFPKPEK-LIREAGTQRQGYPDAGPLRM-- 134
Me.mr-RS EDEAV-NGKELD WLAKRRAEEHAENVYMLFPKPEF-LQKSA GGLRQGYPDAGAAARK-- 156
Me.th-RS EDEED-DPEELKVLADNRAAREHAQNLMMLFPKDDR-LTREAGMGLRREGKPDAGPL-- 153
Me.ka-RS EDEAE-DERELHELAVKRAEEHALNVKMLKPEA-LTREAGMGRREGKHPDGPAPL-- 157
Fe.ac-RS EDEAK-DDRELAWL CDRRSREHAVNAYLLFEPDK-LTENAGSGLRQGYPDAGPVMGSS 158
Me.ja-RS EDEAK-DDKELD WLAKRRAEEHAENVYLLFPKPEY-LTRMAGKGLRQGYPDAGPARE-- 156

```

Abb. 33) Sequenzvergleich von putativen Lumazin- und Riboflavin-Synthasen aus Archaea. Die Nummern resultieren aus dem Sequenzvergleich, welcher mit Standardalgorithmen des Programms CLUSTALW [61]; EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk>) durchgeführt wurde. Saure, basische, neutrale und aliphatische/aromatische Aminosäuren sind blau, pink, grün und rot charakterisiert. Die Abkürzungen der Organismen sind in der Legende von Abb. 34 beschrieben. (Datenbankcode verwendeter Lumazin- und Riboflavin-Synthasen)

6. Diskussion

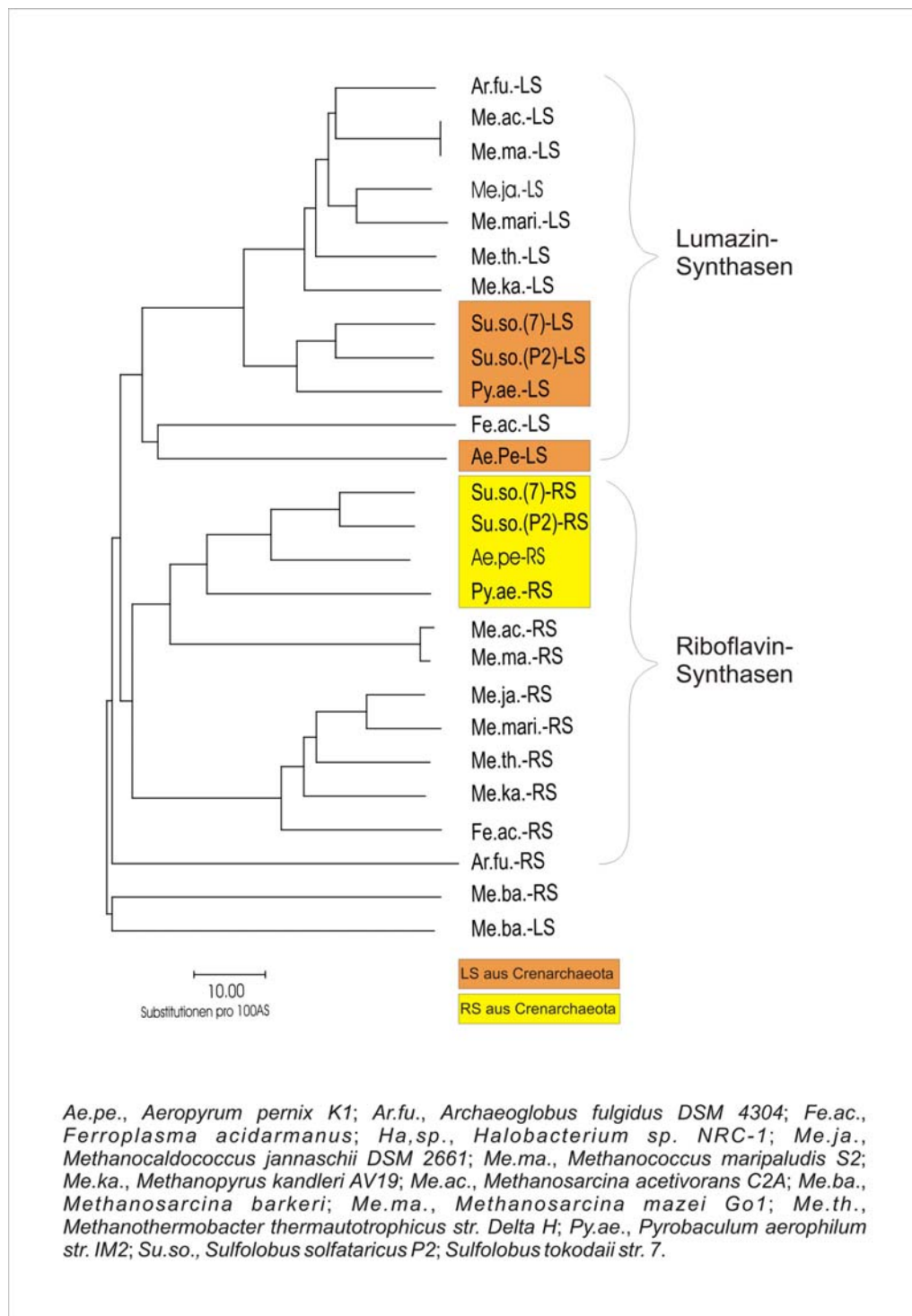


Abb. 34) **Phylogramm archaealer Lumazin- und Riboflavin-Synthasen.** Homologe Regionen entsprechend dem Aminosäure-Sequenzvergleich wurden bis auf kurze Trunkationen von Überhängen des N- und C-Terminus verwendet, um das Phylogramm zu rekonstruieren (p-distance). Die phylogenetische Analyse wurde mit dem Programm GCG (Wisconsin Package Version 10.3, Accelrys (GCG), San Diego, CA) durchgeführt. Der Balken entspricht 10 Substitutionen pro 100 Aminosäuren.

6. Diskussion

In einer kürzlich erschienen Studie, in welcher Sequenz-Struktur-Eigenschaften und Phylogenetik kombiniert analysiert wurden, konnte aufgezeigt werden, daß Lumazin-Synthasen in zwei strukturelle Cluster – nicht-ikosaedrisch (pentamer) und ikosaedrisch – eingeteilt werden können. Darüber hinaus konnten einzelnen Aminosäuren strukturelle Restriktionen zugewiesen werden, welche maßgeblich für die ikosaedrale / nicht-ikosaedrische Assemblierung verantwortlich sind. Die Autoren dieser Studie machten ferner eine Tendenz aus, daß archaeale LS hauptsächlich in der nicht-ikosaedrischen Form assemblieren [29].

Auf der Ebene des Metabolismus wurden einige Theorien entwickelt, um den Ursprung und die Entwicklung von Stoffwechselwegen und der daran beteiligten Enzyme zu erklären. Im folgenden soll hauptsächlich auf zwei Modelle eingegangen werden, die primär in vergangenen Studien herangezogen wurden, um die Evolution von Stoffwechselwegen und der daran beteiligter Enzyme zu erklären. Im retrograden Modell der Stoffwechsel-Evolution, postuliert von Horowitz [122], evolvieren Enzyme rückwärts gerichtet von einem Protein aus, welches die Synthese eines finalen Produktes eines anfänglichen (und vorläufigen) Stoffwechselweges katalysiert.

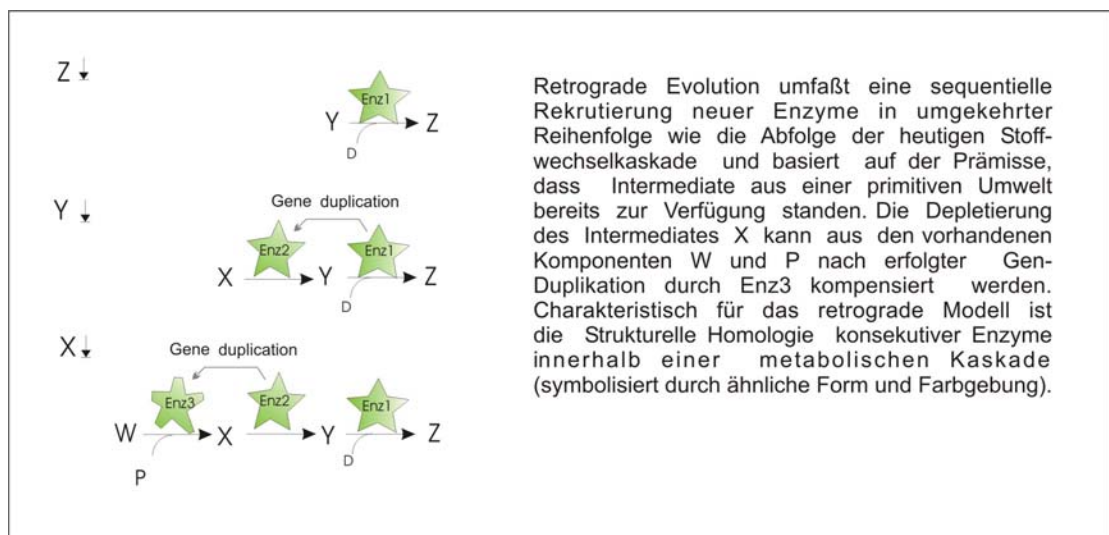


Abb. 35) **Retrograde Evolution – Horowitz Modell** (modifiziert nach Rison *et al*, in *Current opinion in Structural biology* 2002, 12; 374-382)

Die Evolution erfolgt durch Gen-Duplikation des Enzyms innerhalb dieses metabolischen Stoffwechselwegs. Nachdem das Gen eines solchen Enzyms dupliziert

6. Diskussion

wurde, kann das zweite Genprodukt die bereits vorhandene Bindungsstelle für das Substrat weiter nutzen, aber auch die Fähigkeit entwickeln, das Produkt aus anderen Komponenten seiner Umwelt zu generieren. Das Endprodukt kann auf diese Weise von immer weiter „entfernteren“ Metaboliten dargestellt werden und durch Repetition des Vorganges entwickelt sich der Stoffwechselweg rückwärts gerichtet. Folglich wurde das Substrat des terminalen Enzyms ein Intermediat eines sich entwickelnden Stoffwechselweges.

Im Gegensatz hierzu, gemäß der sogenannten *patchwork*-Theorie, entwickelten sich metabolische Enzyme ausgehend von einem System wenig spezifischer Enzyme. Ausgehend von diesen multifunktionalen Enzymen könnte sich ein Stoffwechselweg durch Genduplikation und Spezialisierung dieser Vorläuferenzyme entwickelt haben. Jensen [123] wies darauf hin, daß die Rekrutierung von Enzymen aus Stoffwechselwegen (ebenfalls) durch Gen-Duplikation erfolgt, wobei diese ihre katalytische Funktion beibehielten, jedoch verschiedene Substratspezifitäten entwickelten. Diese Genduplikation, gefolgt von Spezialisierung des Enzyms wäre das Fundament und verantwortlich für die heute existierenden Stoffwechselwege.

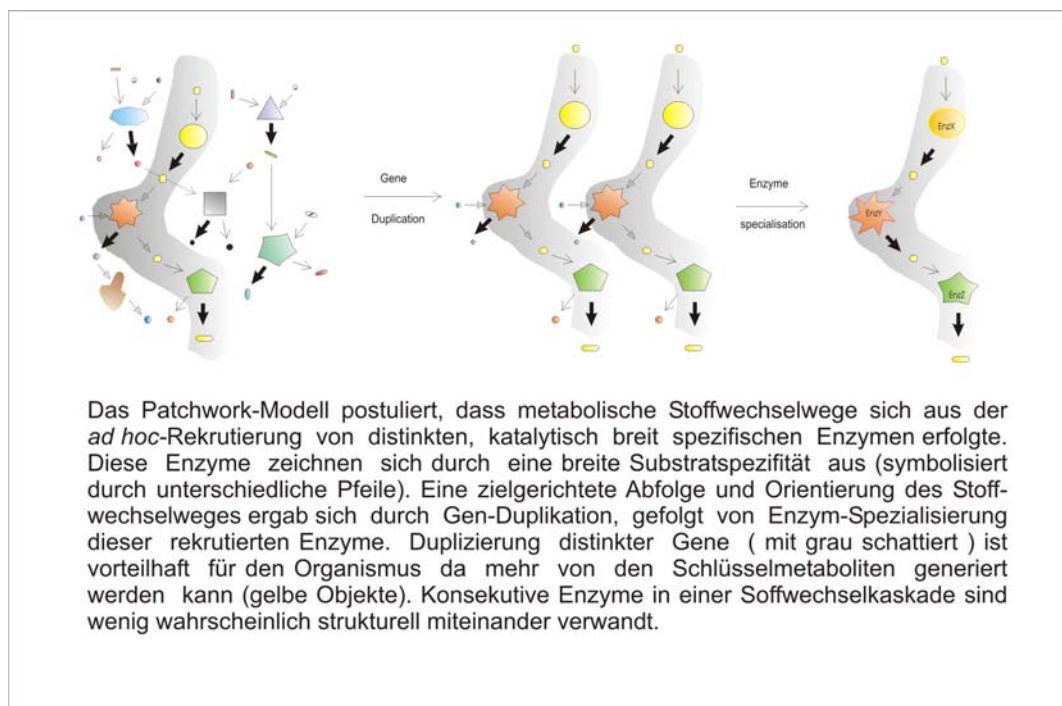


Abb. 35) **Patchwork-Modell der Evolution von Stoffwechselwegen** (modifiziert nach Rison et al, in *Current opinion in Structural biology* 2002, 12; 374-382)

6. Diskussion

Die beiden oben genannten Modelle der Stoffwechsel-Evolution sollten jedoch nicht als grundsätzlich verschieden und konkurrierend zueinander betrachtet werden, da beide Modelle auf der *ad hoc* Rekrutierung von Enzymen basieren. Der wesentliche Unterschied liegt darin begründet, daß dem retrograden Modell eine Substrat getriebene Funktion (d.h. Enzyme agieren wahrscheinlicher an ähnlichen chemischen Motiven) und dem *patchwork*-Modell eine auf der Chemie basierende (d.h. Enzyme wurden wegen ihre katalytischen Potentials ausgewählt) Rekrutierung zugeordnet wurde [124]. Studien der letzten Jahre über den Metabolismus von *E. coli* indizieren, daß die retrograde Evolution eine eher untergeordnete Rolle spielt, wohingegen das patchwork-Modell den dominanten Prozess der metabolischen Enzymevolution darstellt [125].

Was kann über das Auftreten und die Evolution des Stoffwechselweges des essentiellen Metaboliten Riboflavin ausgesagt werden? Könnte es Riboflavin oder ein entsprechendes Isoalloxazin-Derivat vor der Evolution der Enzymkatalyse gegeben haben [23]?

Die Resultate der Strukturaufklärung sind grundsätzlich konsistent mit der Hypothese retrograder Evolution. Strukturelle Homologie konsekutiver Enzyme in einem Stoffwechselweg ist der am besten geeignete Weg, um entfernte evolutionäre Beziehungen aufzuzeigen [124]. Die Strukturanalyse zeigt, daß diese Bedingung erfüllt ist. Horowitz manifestierte, daß der Ausgangspunkt retrograder Evolution der terminal depletierende Metabolit ist. Daher kann die Frage aufgeworfen werden ob DMRL oder Riboflavin diesen terminalen Metaboliten darstellt. Vielmehr läßt sich eine noch fundamentalere Frage stellen: Gab es eine frühe *Lumazine-world* [38] [126] – implizierend, daß die Funktion von Riboflavin durch Lumazin und dessen Derivaten als frühe Coenzym-Analoga substituiert werden konnte?

Betrachtet man die chemischen Eigenschaften des Lumazin-Moleküls, so ist eine Redox-Chemie des Lumazin-Moleküls oder dessen Derivaten prinzipiell denkbar. Die beiden tautomeren Formen von Lumazin (Oxo- und Hydroxy) können analog als elektronen-defizientes Quinon oder Dihydrochinon aufgefaßt werden [127]. Wie bereits schon diskutiert [38] ist ein Enzym, welches Lumazin oder dessen Derivate in einer ähnlichen Weise wie Flavo-Coenzyme verwendet, derzeit nicht bekannt. Jedoch kann Lumazin als Cofaktor bestimmter lumineszierender Proteine (aus marinen Bakterien)

6. Diskussion

dienen. Diese Lumazin bindenden Proteine weisen keine enzymatische Aktivität auf, und vermutlich fungieren diese Proteine als optische Transponder für die Biolumineszenz [38]. Ein grenzwertiger Fall ist die bovine Xanthin-Oxidase, welche Lumazin (2,6-Dihydroxypteridine) zu Violapterin (2,6,7-Trihydroxypteridine) umwandeln kann (Abb. 36) [128]. Das Produkt der enzymatischen Umsetzung, Violapterin, bildet einen Charge-Transfer-Komplex mit dem reduzierten Molybdäniumion des aktiven Zentrums, jedoch handelt es sich bei dieser Reaktion um ein Modells substrat.

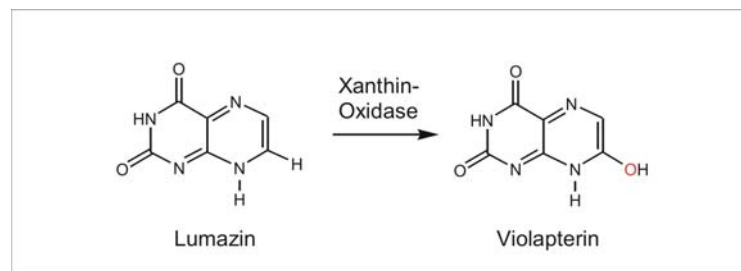


Abb. 36) Reaktion der Xanthin-Oxidase mit dem Modells substrat Lumazin.

Ein weiteres mögliches evolutionäres Szenario könnte der Aspekt sein, daß die retrograde Evolution der Riboflavin-Biosynthese mit dem vorletzten Enzym des Stoffwechselweges begann, welches auch für ein anderes Enzym in der Tryptophan-Biosynthese diskutiert wurde [129]. In dieser Hinsicht ist die *semi*-enzymatische Theorie über den Ursprung des Metabolismus, postuliert von Lazcano und Miller [9], welche ähnlich der Horowitz-Hypothese ist, ein attraktives Modell für die terminale Reaktion der Riboflavin-Biosynthese innerhalb einer frühen Periode der Evolution. Diese Hypothese erfordert, daß die meisten Reaktionen von primitiven, aus mehreren Schritten bestehenden Stoffwechselwegen ursprünglich nicht-enzymatisch verliefen, bis Biokatalysatoren sich entwickelt hatten, um die Effizienz solcher Umsetzungen zu steigern. Experimentell wurde diese Hypothese durch den Aspekt untermauert, daß die Stoffwechselwege von Quinolin- und Nikotin-Säure aus der nicht-enzymatischen Reaktion von Dihydroxyacetonphosphat und Asparaginsäure resultieren können [120].

Von einigen enzymatischen Reaktionen des Metabolismus ist bekannt, daß sie auch nicht-enzymatisch verlaufen können, jedoch sind keine metabolischen Umsetzungen bekannt, die einen ganzen Stoffwechselweg umfassen. Bemerkenswerterweise können

6. Diskussion

die beiden letzten Schritte der Riboflavin-Biosynthese auch nicht-enzymatisch verlaufen [23].

Pattersson und Wood haben herausgefunden, daß die komplexe Dismutationsreaktion auch nicht-enzymatisch durch Kochen von DMRL in einem Rückflußkühler, bei einem pH-Wert von 7,3 (Phosphat-Puffer) ablaufen kann. Es konnte gezeigt werden, daß die enzymatische und nicht-enzymatische Synthese von Riboflavin mit der gleichen Regiochemie bezüglich des Produktes Riboflavin verläuft; sowohl im Neutralen als auch im sauren Milieu [68, 71-73, 130]. Kürzlich konnte außerdem gezeigt werden, daß der Vorläufer-Metabolit DMRL aus Ribulose-1,5-Bisphosphat und dem entsprechenden Pyrimidin nicht-enzymatisch dargestellt werden kann [131]. Eine nicht-enzymatische von DMRL gelingt aus den Ausgangssubstraten (der Lumazin-Synthase) schon bei Raumtemperatur [23].

Es sollte an dieser Stelle betont werden, daß es einen bedeutsamen Unterschied zwischen prebiotischer Synthese und frühen Stoffwechselwegen besteht. Frühe Stoffwechselwege könnten metabolische Komponenten verwendet haben, welche nicht prebiotisch synthetisiert wurden, aber bereits durch andere schon existierende Pfade des Stoffwechsels zur Verfügung gestellt werden konnten. Cleaves und Miller haben deshalb den Aspekt hervorgehoben, daß die ersten Stoffwechselwege wahrscheinlich teilweise oder vollständig nicht-enzymatisch abgelaufen sind [9]. Evaluiert man die nicht-enzymatische Synthese von Komponenten des Riboflavin-Stoffwechsels, so läßt sich die Frage aufwerfen inwiefern thermoadaptive Prozesse eine Rolle bei der Entwicklung dieses metabolischen Pfades gespielt haben könnten, aufgrund der Tatsache, daß die nicht-enzymatische Synthese von DMRL und Riboflavin thermodynamisch irreversibel sind [23, 24]. Dieser bemerkenswerte Umstand, der durch Hitze induzierten nicht-enzymatischen Synthese von Riboflavin, könnte einen Pool an Riboflavin in einer frühen thermophilen Umwelt generiert haben.

Es sollte betont werden, daß das Substrat für die LS 5-Amino-6-Ribitylamino-2,2,4(1H,3H)pyrimidion ebenso in der Biosynthese von F_0 (7,8-Dimethyl-6-Hydroxy-5-Deazariboflavin) ein Motiv des Coenzym F_{420} (Hydridtransfer-Reagenz analog zu NADH) verwendet wird [121]. Dieser Umstand, daß das Substrat der LS ein Verzweigungspunkt zur Synthese von DMRL und F_0 darstellt, könnte die Tendenz einer durch Substrat getriebenen Rekrutierung widerspiegeln, wie von Horowitz postuliert.

6. Diskussion

Unter der Voraussetzung, daß einerseits Komponenten des Riboflavin-Stoffwechsels innerhalb einer Zelle oder in der Umgebung existiert haben und andererseits, daß dieser Stoffwechselweg einen einfachen und vorläufigen Metabolismus in Archaean darstellte, ist es attraktiv, die *semi*-enzymatische Theorie als Arbeitshypothese für ein frühe evolutionäre Periode der Riboflavin-Biosynthese zu betrachten. Ferner läßt sich spekulieren, daß das frühe Vorläuferenzym von LS und RS ein bifunktionelles Enzym war und die beiden terminalen Reaktionen der Riboflavin-Synthese katalysieren konnte. Bemerkenswerterweise zeigt die LS aus *S. pombe* die Eigenschaft, Riboflavin mit hoher Affinität zu binden. Es wurde spekuliert, dass diese Tatsache als Mechanismus einer *feedback*-Regulation *in vivo* gesehen werden kann [105]. Im Hinblick auf die Evolution dieses Enzyms könnte dieses Faktum als ein Relikt des gemeinsamen evolutionären Vorläuferenzym betrachtet werden. Ein Feedback-Mechanismus, der auf das letzte Enzym wirkt, würde aber tendenziell die Anhäufung von Vorstufen fördern, und gerade bei den Riboflavinorstufen würde das vermutlich oxidativen Stress auslösen (die Hegen sind fakultativ aerob, s. [108]).

Das Modell von Horowitz bietet keine Erklärung für den Ursprung regulatorischer Mechanismen im Metabolismus. Ein weiteres Postulat von Horowitz besagt, daß sukzessive Schritte in Stoffwechselwegen ähnliche chemische Transformationen umfassen. Formal katalysiert LS auch den Transfer einer C4-Kohlenstoffeinheit (n. Phosphat-Abspaltung) wie RS, jedoch existiert kein Reaktionsmechanismus für die LS, welche einen Diels-Alderase-Schritt vorschlägt.

Das frühe evolutionäre Szenario des Ursprungs und der Entwicklung des Riboflavin-Stoffwechsels in Archaean kann nur im Zusammenhang mit der restringierten Datenlage bezüglich prebiotischer Synthese und nicht-enzymatischer Reaktionen metabolischer Intermediate gesehen und postuliert werden. Weitere phylogenetische Studien sind daher essentiell, um die hier vorgestellten Hypothesen zu verifizieren. Gleichwohl konnte eine Rekrutierung einer urtümlichen LS/RS erst nach Auftreten einer DNA/Protein-Welt erfolgen.

Es ist eine vernünftige Annahme, daß die Riboflavin-Biosynthese sich in einem frühen Stadium der Entwicklung des Lebens etablierte, weil Riboflavin essentiell für die Bildung von FMN und FAD ist. FMN selber kann als Überbleibsel des Überganges einer früher existierenden RNA-Welt betrachtet werden, weil es RNA-Komponenten in

6. Diskussion

seiner Molekülstruktur aufweist [132]. Ebenso kann von einer Interaktion von Flavocoenzymen mit Ribozymen in einer hypothetischen RNA-Welt ausgegangen werden, da bekannt ist, daß FMN an artifizielle RNA-Sequenzen (Aptamere) binden kann [13, 14]. In Bacillaceae resultiert aus der Wechselwirkung von FMN mit mRNA eine Verminderung der Transkription des Riboflavin-Operons [133]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß FMN in der Lage ist, das Selbst-Splicen von RNA (eine neue Klasse von Gruppe-I-Intron-Splicing-Inhibitoren) zu inhibieren. Der Umstand, daß FMN und analoge Coenzyme (die das Alloxazin-Ringsystem enthalten) in der Lage sind, den ersten Schritt des Selbst-Splicen zu verhindern, ließ die Autoren dieser Studie postulieren, daß Struktur-Funktions-Studien eine Basis für die Entwicklung potentiell pharmakologisch aktiver Agentien gegen RNA-Pathogene darstellen werden [132]. Daher ist es auch plausibel anzunehmen, daß Inhibitoren der LS und RS, welche das Isoalloxazin-Ringsystem enthalten, als potentielle pharmazeutische Agentien gegen RNA-Pathogene eingesetzt werden könnten.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß zukünftige Forschung zur archaealen Riboflavin-Biosynthese ein detaillierteres Bild abliefern wird, wie die molekulare Evolution die Anpassung der daran beteiligten Enzyme widerspiegelt. Die Analyse hier impliziert, daß die Natur anscheinend zwei Lösungen für die enzymatische Riboflavin-Biosynthese entwickelt hat. Identische Reaktionen können durch nicht-orthologe Enzyme katalysiert werden (non-orthologous gene displacement), die strukturell keine Beziehung zueinander haben. Dieses Phänomen scheint weit verbreitet zu sein [134]. Man spricht in einem solchen Falle auch von analogen Enzymen, bzw. funktioneller Konvergenz. Bei derartigen Enzymen handelt es sich um unabhängige evolutionäre Lösungen für die Katalyse identischer Reaktionen. Bei „niederen“ Temperaturen erfolgt die Riboflavin-Biosynthese durch flexible trimere Riboflavin-Synthasen (dynamische Lösung der Kavitätbildung; - *endo*-Kontrolle bzw. *exo*-Kontrolle), wohingegen bei hohen Temperaturen eine rigide Kavität (präsentiert durch pentamere Riboflavin-Synthasen) erforderlich ist, um die korrekte topologische Orientierung der beiden Substrat-Moleküle zueinander zu gewährleisten (rigide Lösung der Kavitätbildung bzw. *endo*-Kontrolle). Wie das Modell des cis-pentacyclischen Intermediats von trimeren Riboflavin-Synthase zeigt, wird beiden Ribityl-Seitenketten eine ausgestreckte Konformation während des Reaktionsverlaufs zugeschrieben, wohingegen bei der archaealen Riboflavin-Synthase – wie die Komplexstruktur impliziert – die Positionierung des

6. Diskussion

zweiten Substratmoleküls (nach Bindung des ersten Moleküls) aus sterischen Gründen in *endo*-Konformation erfolgen muß. Der Ribityl-Seitenkette an der zweiten Substratbindungsstelle (Molekül **B**) könnte zusätzlich die Funktion der Abschottung („Schließens“) des aktiven Zentrums zugeschrieben werden. Die Topologie der Komplexstruktur zeigt zudem eine Interaktion der Ribityl-Seitenkette (Molekül **B**) mit dem Pteridin-Ring-System von Molekül **A** auf. Eventuell könnte eine solche Interaktion auch eine Rolle bei der nicht-enzymatischen Synthese spielen.

Im aktiven Zentrum trimerer und pentamerer Riboflavin-Synthasen befinden sich identische Aminosäuren, obgleich die Enzyme eine unterschiedliche dreidimensionale Struktur besitzen. Aufgrund der beiden verschiedenen Enzymstrategien – über zwei verschiedene Reaktionsintermediate – die Riboflavinsynthese sicher zu stellen, kann dies als Sonderfall konvergenter Evolution eines Stoffwechsellenzym betrachtet werden.

Es wurde spekuliert, daß die ersten Stoffwechsellenzyme in einem frühen Stadium der Evolution die Chemie von prebiotischen Synthesereaktionen noch einmal prinzipiell wiederholten [9]. In der Tat weisen die oben angeführten Indizien darauf hin, daß es sich bei der archaealen RS aus *M. jannaschii* um den ersten Kandidaten handelt von dem hinreichend vermutet werden kann, als erstes Enzym betrachtet zu werden, welches eine prebiotische Synthesechemie im Lauf der Evolution rekapituliert hatte.

7. Referenzen

1. Darwin, C., *On the Origin of Species by Means of Natural Selection*. 1859.
2. Woese, C.R., et al., *Conservation of Primary Structure in 16s Ribosomal-RNA*. *Nature*, 1975. 254(5495): p. 83-86.
3. Ridley, M., *Evolution*. Blackwell Science, Inc., 1996.
4. Jensen, R., *Orthologs and paralogs - we need to get it right*. *Genome Biol.*; 2(8):INTERACTIONS1002. Epub 2001 Aug 3. 2001.
5. Schwartzman, D.W. and C.H. Lineweaver, *The hyperthermophilic origin of life revisited*. *Biochemical Society Transactions*, 2004. 32: p. 168-171.
6. Gilbert, W., *Origin of Life - the RNA World*. *Nature*, 1986. 319(6055): p. 618-618.
7. Islas, S., et al., *Hyperthermophily and the origin and earliest evolution of life*. *International Microbiology*, 2003. 6(2): p. 87-94
8. Lazcano, A. and S.L. Miller, *On the origin of metabolic pathways*. *Journal of Molecular Evolution*, 1999. 49(4): p. 424-431.
9. Hauke Trinks, W.S., *EIS UND DIE ENTSTEHUNG DES LEBENS (ICE AND THE ORIGIN OF LIFE)*.
www.et1.tu-harburg.de/downloads_et1/ep/publikationen/Eis_und_die_Entstehung_des_Lebens.pdf, 200 (Max-Planck-Institut Göttingen).
10. Vlassov, A.V., et al., *Ligation activity of fragmented ribozymes in frozen solution: implications for the RNA world*. *Nucleic Acids Research*, 2004. 32(9): p. 2966-2974.
11. Monnard, P.A., *Catalysis in abiotic structured media: an approach to selective synthesis of biopolymers*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2005. 62(5): p. 520-534.
12. White, H.B., *Coenzymes as Fossils of an Earlier Metabolic State*. *Journal of Molecular Evolution*, 1976. 7(2): p. 101-104.
13. Schneider, C. and J. Suhnel, *A molecular dynamics simulation of the flavin mononucleotide-RNA aptamer complex*. *Biopolymers*, 1999. 50(3): p. 287-302.
14. Roychowdhury-Saha, M., et al., *Flavin recognition by an RNA aptamer targeted toward FAD*. *Biochemistry*, 2002. 41(8): p. 2492-2499.
15. Müller, F., *Nuclear magnetic resonance studies on flavoproteins*. In: *Chemistry and biochemistry of flavoenzymes*. CRC Press, Boca Raton, FL, 3, 557-595., (1992).
16. Massey, V., *The chemical and biological versatility of riboflavin*. *Biochemical Society Transactions*, 2000. 28: p. 283-296.
17. Cushman, M., et al., *Design, synthesis, and evaluation of 9-D-ribityl-1,3,7-trihydro-2,6,8-purinetriene, a potent inhibitor of riboflavin synthase and lumazine synthase*. *Journal of Organic Chemistry*, 2001. 66(25): p. 8320-8327.
18. Smith, E.E., O'Kane, D. J., and Meighen, E., *Bioluminescence and Chemiluminescence: Fundamentals and Applied Aspects*. *Proceedings of the International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence*, (1994). (Campbell, A. K. K., Larry J.; Stanley, Philip E, ed), pp. 568-571, Wiley, Chichester, UK.
19. Al-Hassan SS, K.R., Livingstone DB, Suckling CJ, Wood HCS, Wrigglesworth R, Ferone R., *Specific enzyme inhibitors in vitamin*

- biosynthesis. Part 3. The synthesis and inhibitory properties of some substrate and transition state analogs of riboflavin synthase. J Chem Soc Perkin Trans I, 2645-2656, 1980.*
20. Fischer, M., et al., *Structures and reaction mechanisms of riboflavin synthases of eubacterial and archaeal origin. Biochemical Society Transactions, 2005. 33: p. 780-784.*
 21. Fischer M, B.A., *Biosynthesis of flavocoenzymes. Nat Prod Rep., 2005. 22(3):324-50.*
 22. Wacker, H., et al., *4-(1 -D-Ribitylamino)-5-Amino-2,6-Dihydroxypyrimidine, Second Product of Riboflavin Synthetase Reaction. Journal of Biological Chemistry, 1964. 239(10): p. 3493-&.*
 23. Kis, K., K. Kugelbrey, and A. Bacher, *Biosynthesis of riboflavin. The reaction catalyzed by 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase can proceed without enzymatic catalysis under physiological conditions. Journal of Organic Chemistry, 2001. 66(8): p. 2555-2559.*
 24. Plaut, G.W.E., *Studies on Nature of Enzymic Conversion of 6,7-Dimethyl-8-Ribityllumazine to Riboflavin. Journal of Biological Chemistry, 1963. 238(6): p. 2225-&.*
 25. Ladenstein, R., et al., *Heavy Riboflavin Synthase from Bacillus-Subtilis - Crystal-Structure Analysis of the Icosahedral-Beta-60 Capsid at 3.3-Å Resolution. Journal of Molecular Biology, 1988. 203(4): p. 1045-1070.*
 26. Ladenstein, R., et al., *The Lumazine Synthase Riboflavin Synthase Complex of Bacillus-Subtilis - X-Ray Structure-Analysis of Hollow Reconstituted Beta-Subunit Capsids. European Journal of Biochemistry, 1994. 223(3): p. 1007-1017.*
 27. Ritsert, K., et al., *Studies on the Lumazine Synthase/Riboflavin Synthase Complex of Bacillus-Subtilis - Crystal-Structure Analysis of Reconstituted, Icosahedral Beta-Subunit Capsids with Bound Substrate-Analog Inhibitor at 2.4 Å Resolution. Journal of Molecular Biology, 1995. 253(1): p. 151-167.*
 28. Liao, D.I., et al., *Crystal structure of riboflavin synthase. Structure, 2001. 9(5): p. 399-408.*
 29. Zylberman, V., et al., *High order quaternary arrangement confers increased structural stability to Brucella sp lumazine synthase. Journal of Biological Chemistry, 2004. 279(9): p. 8093-8101.*
 30. Schott, K., et al., *The Lumazine Synthase-Riboflavin Synthase Complex of Bacillus-Subtilis - Crystallization of Reconstituted Icosahedral Beta-Subunit Capsids. Journal of Biological Chemistry, 1990. 265(21): p. 12686-12689.*
 31. Schott, K., et al., *Riboflavin Synthases of Bacillus-Subtilis - Purification and Amino-Acid-Sequence of the Alpha-Subunit. Journal of Biological Chemistry, 1990. 265(8): p. 4204-4209.*
 32. Schott, A.-K., *Biochemische und strukturelle Charakterisierung von Enzymen der Riboflavin- und Folsäurebiosynthese. Thesis TU München, 2003.*
 33. Eberhardt, S., et al., *Cloning, sequencing, mapping and hyperexpression of the ribC gene coding for riboflavin synthase of Escherichia coli. European Journal of Biochemistry, 1996. 242(3): p. 712-719.*
 34. Gerhardt, S., et al., *Studies on the reaction mechanism of riboflavin synthase: X-ray crystal structure of a complex with 6-carboxyethyl-7-oxo-8-ribityllumazine. Structure, 2002. 10(10): p. 1371-1381.*

35. Jones, W.J., et al., *Methanococcus-Jannaschii Sp-Nov, an Extremely Thermophilic Methanogen from a Submarine Hydrothermal Vent*. Archives of Microbiology, 1983. 136(4): p. 254-261.
36. Eberhardt, S., et al., *Biosynthesis of riboflavin: An unusual riboflavin synthase of Methanobacterium thermoautotrophicum*. Journal of Bacteriology, 1997. 179(9): p. 2938-2943.
37. Graham DE, X.H., White RH., *Identification of the 7,8-didemethyl-8-hydroxy-5-deazariboflavin synthase required for coenzyme F(420) biosynthesis*. Arch Microbiol. 2003 Dec;180(6):455-64. Epub 2003 Oct 31., 2003.
38. Fischer, M., et al., *Evolution of vitamin B-2 biosynthesis. A novel class of riboflavin synthase in Archaea*. Journal of Molecular Biology, 2004. 343(1): p. 267-278.
39. Ewald, P.P., *The "reciprocal lattice" in structure theory*. Zeitschrift Fur Kristallographie, 1921. 56(2): p. 129-156.
40. Green, D.W., V.M. Ingram, and M.F. Perutz, *The Structure of Haemoglobin .4. Sign Determination by the Isomorphous Replacement Method*. Proceedings of the Royal Society of London Series a-Mathematical and Physical Sciences, 1954. 225(1162): p. 287-307.
41. Hendrickson, W.A., *Determination of Macromolecular Structures from Anomalous Diffraction of Synchrotron Radiation*. Science, 1991. 254(5028): p. 51-58.
42. Hoppe, W., *Die Falzmolekülmethode - Eine Neue Methode zur Bestimmung der Kristallstruktur bei ganz oder teilweise bekannter Molekülstruktur*. Acta Crystallographica, 1957. 10(12): p. 750-751.
43. Hoppe, W., *Die Falzmolekülmethode und ihre Anwendung in der röntgenographischen Konstitutionsanalyse Von Biflorin (C20h20o4)*. Zeitschrift Fur Elektrochemie, 1957. 61(8): p. 1076-1083.
44. Huber, R., *Die Automatisierte Falzmolekülmethode*. Acta Crystallographica, 1965. 19: p. 353-&.
45. Rossman, M.G. and D.M. Blow, *Determination of Phases by Conditions of Non-Crystallographic Symmetry*. Acta Crystallographica, 1963. 16(1): p. 39-&.
46. Hauptman, H. and J. Karle, *Solution of the Phase Problem for Space Group Pibar*. Acta Crystallographica, 1954. 7(4): p. 369-374.
47. Gill, S.C. and P.H. Vonhippel, *Calculation of Protein Extinction Coefficients From Amino-Acid Sequence Data*, in *Analytical Biochemistry*. 1989. p. 319-326.
48. Leslie, A.G.W., *MOSFILM 6.0 edit., Cambridge, UK*. 1998.
49. Otwinowski, Z. and W. Minor, *Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode*. Macromolecular Crystallography, Pt A, 1997. 276: p. 307-326.
50. CCP4, *The CCP4 suite: Programs for protein crystallography*. Acta Cryst. D., 1994. 50: p. 760-763.
51. Terwilliger, T.C. and J. Berendzen, *Automated MAD and MIR structure solution*. Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography, 1999. 55: p. 849-861.
52. E. de La Fortelle, J.I.G.B., *SHARP : A Maximum-Likelihood Heavy-Atom Parameter Refinement Program for the MIR and MAD Methods*. Methods Enzymol., 1997. 276: p. 472±494.

53. Turk, D., *Weiterentwicklung eines Programms für Molekülgraphik und Elektronendichte-Manipulation und seine Anwendung auf verschiedene Protein-Strukturaufklärungen*, in *PhD Thesis, TU München*. 1992.
54. Brunger, A.T., *Free R-Value - a Novel Statistical Quantity for Assessing the Accuracy of Crystal-Structures*. *Nature*, 1992. 355(6359): p. 472-475.
55. Laskowski, R.A., *PDBsum: summaries and analyses of PDB structures*. *Nucleic Acids Research*, 2001. 29(1): p. 221-222.
56. Frishman, D. and P. Argos, *Knowledge-based protein secondary structure assignment*. *Proteins-Structure Function and Genetics*, 1995. 23(4): p. 566-579.
57. Kraulis, P., *Hot Papers - (Molecular-Biology) - Molscript - a Program to Produce Both Detailed and Schematic Plots of Protein Structures by Kraulis, P.J.* *Scientist*, 1993. 7(2): p. 16-16.
58. Kraulis, P.J., *Molscript - a Program to Produce Both Detailed and Schematic Plots of Protein Structures*. *Journal of Applied Crystallography*, 1991. 24: p. 946-950.
59. DeLano, W.L., *The Pymol Molecular Graphics System*. DeLano Scientific, San Carlos, California, 2002.
60. Nicholls, A., R. Bharadwaj, and B. Honig, *Grasp - Graphical Representation and Analysis of Surface-Properties*. *Biophysical Journal*, 1993. 64(2): p. A166-A166.
61. Thompson, J.D., D.G. Higgins, and T.J. Gibson, *Clustal-W - Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment through Sequence Weighting, Position-Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice*. *Nucleic Acids Research*, 1994. 22(22): p. 4673-4680.
62. Womble, D., *GCG: The Wisconsin Package of sequence analysis programs*. *Methods Mol Biol.*, 2000: p. 132:3-22.
63. Engh, R.A. and R. Huber, *Accurate Bond and Angle Parameters for X-Ray Protein-Structure Refinement*. *Acta Crystallographica Section A*, 1991. 47: p. 392-400.
64. Holm, L. and C. Sander, *Protein-Structure Comparison by Alignment of Distance Matrices*. *Journal of Molecular Biology*, 1993. 233(1): p. 123-138.
65. Goetz, J.M., et al., *Investigation of the binding of fluorolumazines to the 1-MDa capsid of lumazine synthase by N-15{F-19} REDOR NMR*. *Journal of the American Chemical Society*, 1999. 121(33): p. 7500-7508.
66. Kemter, K., *Untersuchungen zur Riboflavin Synthase und Flavokinase aus verschiedenen Organismen*. Thesis. TU München, 2002.
67. Fornasari, M.S., et al., *Sequence determinants of quaternary structure in lumazine synthase*. *Molecular Biology and Evolution*, 2004. 21(1): p. 97-107.
68. Paterson, T. and H.C.S. Wood, *Deuterium Exchange of C-Methyl Protons in 6,7-Dimethyl-8-D-Ribityl-Lumazine and Studies of Mechanism of Riboflavin Biosynthesis*. *Journal of the Chemical Society D-Chemical Communications*, 1969(6): p. 290-&.
69. Beach, R.L. and G.W.E. Plaut, *Stereospecificity of Enzymic Synthesis of Northo-Xylene Ring of Riboflavin*. *Journal of the American Chemical Society*, 1970. 92(9): p. 2913-&.
70. Rowan, T. and H.C.S. Wood, *Biosynthesis of Riboflavin*. *Proceedings of the Chemical Society of London*, 1963(JAN): p. 21-&.

71. Rowan, T. and H.C.S. Wood, *Biosynthesis of Pteridines .V. Synthesis of Riboflavin from Pteridine Precursors*. Journal of the Chemical Society C-Organic, 1968(4): p. 452-&.
 72. Beach, R. and G.W.E. Plaut, *Formation of Riboflavin from 6,7-Dimethyl-8-Ribityllumazine in Acid Media*. Tetrahedron Letters, 1969(40): p. 3489-&.
 73. Sedlmaier, H., et al., *Enzymatic-Synthesis of Riboflavin and Fmn Specifically Labeled with C-13 in the Xylene Ring*. Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences, 1987. 42(4): p. 425-429.
 74. Truffault, V., *Solution State NMR Investigations on the Structure and Function of Proteins Application to Riboflavin Synthase*. Thesis, 2001. TU München.
 75. Diels, O. and K. Alder, *Synthesis in the hydro-aromatic tier*. Justus Liebigs Annalen Der Chemie, 1928. 460: p. 98-122.
 76. Stocking, E.M. and R.M. Williams, *Chemistry and biology of biosynthetic Diels-Alder reactions*. Angewandte Chemie-International Edition, 2003. 42(27): p. 3078-3115.
 77. Arigoni, D., *Comment concerning the review article: The Diels-Alder reaction and biopolymer catalysis by T. M. Tarasow and B. E. Eaton*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2000. 57(6): p. 982-982.
 78. Tarasow, T.M. and B.E. Eaton, *Reply to the comment concerning the review article: The Diels-Alder reaction and biopolymer catalysis*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2000. 57(6): p. 983-984.
 79. Tarasow, T.M. and B.E. Eaton, *The Diels-Alder reaction and biopolymer catalysis*. Cellular and Molecular Life Sciences, 1999. 55(11): p. 1463-1472.
 80. Otto, S., W. Blokzijl, and J.B.F.N. Engberts, *Diels-Alder Reactions in Water - Effects of Hydrophobicity and Hydrogen-Bonding*. Journal of Organic Chemistry, 1994. 59(18): p. 5372-5376.
 81. Otto, S. and J.B.F.N. Engberts, *Diels-Alder reactions in water*. Pure and Applied Chemistry, 2000. 72(7): p. 1365-1372.
 82. Blake, J.F., D. Lim, and W.L. Jorgensen, *Enhanced Hydrogen-Bonding of Water to Diels-Alder Transition-States - Ab-Initio Evidence*. Journal of Organic Chemistry, 1994. 59(4): p. 803-805.
 83. Hugot, M., et al., *A structural basis for the activity of retro-Diels-Alder catalytic antibodies: Evidence for a catalytic aromatic residue*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002. 99(15): p. 9674-9678.
 84. Hilvert, D., et al., *Antibody Catalysis of a Diels-Alder Reaction*. Journal of the American Chemical Society, 1989. 111(26): p. 9261-9262.
 85. Katayama, K., et al., *Enzymatic activity and partial purification of solanapyrone synthase: first enzyme catalyzing Diels-Alder reaction*. Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology, 1998. 1384(2): p. 387-395.
 86. Braisted, A.C. and P.G. Schultz, *An Antibody-Catalyzed Bimolecular Diels-Alder Reaction*. Journal of the American Chemical Society, 1990. 112(20): p. 7430-7431.
 87. C. Richard Hutchinson, J.K., Cheonseok Park, Steven Kendrew, Karine Auclair, and John Vederas, *Aspects of the biosynthesis of non-aromatic fungal polyketides by iterative polyketide synthases*. Antonie van Leeuwenhoek 78: 287-295, 2000.
- © 2001 Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands., 2000.

88. Oikawa, H., et al., *Macrophomate synthase: Unusual enzyme catalyzing multiple reactions from 2-pyrone to benzoate*. Abstracts of Papers of the American Chemical Society, 1999. 218: p. U167-U167.
89. Oikawa, H., et al., *Macrophomate synthase: unusual enzyme catalyzing multiple reactions from pyrones to benzoates*. Tetrahedron Letters, 1999. 40(38): p. 6983-6986.
90. Oikawa, H. and T. Tokiwano, *Enzymatic catalysis of the Diels-Alder reaction in the biosynthesis of natural products*. Natural Product Reports, 2004. 21(3): p. 321-352.
91. Watanabe, K., et al., *Detailed reaction mechanism of macrophomate synthase - Extraordinary enzyme catalyzing five-step transformation from 2-pyrones to benzoates*. Journal of Biological Chemistry, 2000. 275(49): p. 38393-38401.
92. Watanabe, K., et al., *Substrate diversity of macrophomate synthase catalyzing an unusual multistep transformation from 2-pyrones to benzoates*. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2000. 64(3): p. 530-538.
93. Watanabe, K., et al., *Macrophomate synthase: Characterization, sequence, and expression in Escherichia coli of the novel enzyme catalyzing unusual multistep transformation of 2-pyrones to benzoates*. Journal of Biochemistry, 2000. 127(3): p. 467-473.
94. Watanabe, K., et al., *Reaction mechanism of the macrophomate synthase: experimental evidence on intermediacy of a bicyclic compound*. Tetrahedron Letters, 2000. 41(9): p. 1443-1446.
95. Ose, T., et al., *Insight into a natural Diels-Alder reaction from the structure of macrophomate synthase*. Nature, 2003. 422(6928): p. 185-189.
96. Guimaraes, C.R.W., M. Udier-Blagovic, and W.L. Jorgensen, *Macrophomate synthase: QM/MM simulations address the Diels-Alder versus Michael-Aldol reaction mechanism*. Journal of the American Chemical Society, 2005. 127(10): p. 3577-3588.
97. Pohnert, G., *Macrophomate synthase: The first structure of a natural Diels-Alderase*. Chembiochem, 2003. 4(8): p. 713-715.
98. Hutzenla.W, et al., *Pteridines .59. Synthesis of 7-Amino-, 7-Hydroxy and 7-Methoxylumazine 5-Oxides and a New Pteridine-JPurine Transformation*. Chemische Berichte-Recueil, 1973. 106(10): p. 3203-3215.
99. Plaut, G.W.E., R.L. Beach, and T. Aogaichi, *Studies on Mechanism of Elimination of Protons from Methyl Groups of 6,7-Dimethyl-8-Ribityllumazine by Riboflavin Synthetase*. Biochemistry, 1970. 9(4): p. 771-&.
100. Bown, D.H., et al., *Solution Structures of 6,7-Dimethyl-8-Substituted-Lumazines - C-13 Nmr Evidence for Intramolecular Ether Formation*. Journal of Organic Chemistry, 1986. 51(13): p. 2461-2467.
101. Plaut, G.W.E.a.B., R.L., *Interaction of riboflavin synthase with analogs of 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine*. In: W. Pfeleiderer, Editor, Chemistry and Biology of Pteridines, de Gruyter, Berlin (1975) 101-124.pp . 1975.
102. Illarionov, B., W. Eisenreich, and A. Bacher, *A pentacyclic reaction intermediate of riboflavin synthase*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001. 98(13): p. 7224-7229.
103. Harvey, R.A. and G.W.E. Plaut, *Riboflavin Synthetase from Yeast - Properties of Complexes of Enzyme with Lumazine Derivatives and Riboflavin*. Journal of Biological Chemistry, 1966. 241(9): p. 2120-&.

104. Otto, M.K. and A. Bacher, *Ligand-Binding Studies on Light Riboflavin Synthase from Bacillus-Subtilis*. European Journal of Biochemistry, 1981. 115(3): p. 511-517.
105. Gerhardt, S., et al., *The structural basis of riboflavin binding to Schizosaccharomyces pombe 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase*. Journal of Molecular Biology, 2002. 318(5): p. 1317-1329.
106. Illarionov, B., et al., *Biosynthesis of vitamin B-2 - Diastereomeric reaction intermediates of archaeal and non-archaeal riboflavin synthases*. Journal of Biological Chemistry, 2005. 280(31): p. 28541-28546.
107. Zheng, Y.J., D.B. Jordan, and D.I. Liao, *Examination of a reaction intermediate in the active site of riboflavin synthase*. Bioorganic Chemistry, 2003. 31(4): p. 278-287.
108. Prof. Dr. Adelbert Bacher, persönliche Mitteilung.
109. Illarionov, B., et al., *Riboflavin synthase of Escherichia coli - Effect of single amino acid substitutions on reaction rate and ligand binding properties*. Journal of Biological Chemistry, 2001. 276(15): p. 11524-11530.
110. Fischer, M., et al., *Enzyme catalysis via control of activation entropy: Site-directed mutagenesis of 6,7-dimethyl-8-ribityl-lumazine synthase*. Journal of Molecular Biology, 2003. 326(3): p. 783-793.
111. Hoffmann, R. and R.B. Woodward, *Orbital Symmetry Control of Chemical Reactions*. Science, 1970. 167(3919): p. 825-&.
112. Dewar, M.J.S., *Multibond reactions cannot normally be synchronous*. J. Am. Chem. Soc, 1984. 106: p. 209-19.
113. Borden, W.T., R.J. Loncharich, and K.N. Houk, *Synchronicity in Multibond Reactions*. Annual Review of Physical Chemistry, 1988. 39: p. 213-236.
114. Hine, J., *Application of Principle of Least Motion to Stereochemistry of Elimination Reactions*. Journal of the American Chemical Society, 1966. 88(23): p. 5525-&.
115. Tripos, I., *Sybyl Molecular Modelling System 6.7*, St. Louis. 1998.
116. Fischer M, S.A., Kemter K, Feicht R, Richter G, Illarionov B, Eisenreich W, Gerhardt S, Cushman M, Steinbacher S, Huber R, Bacher A., *Riboflavin synthase of Schizosaccharomyces pombe. Protein dynamics revealed by 19F NMR protein perturbation experiments*. BMC Biochem., 2003. Dec 23;4:18.
117. Truffault, V., et al., *The solution structure of the N-terminal domain of riboflavin synthase*. Journal of Molecular Biology, 2001. 309(4): p. 949-960.
118. Meining, W., et al., *The structure of the N-terminal domain of riboflavin synthase in complex with riboflavin at 2.6 Å resolution*. Journal of Molecular Biology, 2003. 331(5): p. 1053-1063.
119. Illarionov, B., et al., *Pre-steady-state kinetic analysis of riboflavin synthase using a pentacyclic reaction intermediate as substrate*. Biological Chemistry, 2005. 386(2): p. 127-136.
120. Cleaves, H.J. and S.L. Miller, *The nicotinamide biosynthetic pathway is a by-product of the RNA world*. Journal of Molecular Evolution, 2001. 52(1): p. 73-77.
121. Graupner, M., H.M. Xu, and R.H. White, *The pyrimidine nucleotide reductase step in riboflavin and F-420 biosynthesis in Archaea proceeds by the eukaryotic route to riboflavin*. Journal of Bacteriology, 2002. 184(7): p. 1952-1957.

122. Horowitz, N.H., *On the Evolution of Biochemical Syntheses*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1945. 31(6): p. 153-157.
123. Jensen, R.A., *Enzyme Recruitment in Evolution of New Function*. Annual Review of Microbiology, 1976. 30: p. 409-425.
124. Rison, S.C.G. and J.M. Thornton, *Pathway evolution, structurally speaking*. Current Opinion in Structural Biology, 2002. 12(3): p. 374-382.
125. Light, S. and P. Kraulis, *Network analysis of metabolic enzyme evolution in Escherichia coli*. BMC Bioinformatics, 2004. 5.
126. Vorschlag von Ramsperger, A., *Arbeitsbesprechung zur apo-Struktur am 31.10.2003*; anwesende Personen: Dr. Markus Fischer, Ann-Kathrin Schott, und Prof. Dr. Adelbert Bacher.
127. Choy, N. and K.C. Russell, *Synthesis and cyclization of novel lumazine - Eneidyne chimeras*. Heterocycles, 1999. 51(1): p. 13-16.
128. Kim, J.H., et al., *Tautomeric energetics of xanthine oxidase substrates: xanthine, 2-oxo-6-methylpurine, and lumazine*. Journal of Inorganic Biochemistry, 2001. 84(1-2): p. 145-150.
129. Wilmanns, M., et al., *Structural Conservation in Parallel Beta/Alpha-Barrel Enzymes That Catalyze 3 Sequential Reactions in the Pathway of Tryptophan Biosynthesis*. Biochemistry, 1991. 30(38): p. 9161-9169.
130. Romisch, W., et al., *Rapid one-pot synthesis of riboflavin isotopomers*. Journal of Organic Chemistry, 2002. 67(25): p. 8890-8894.
131. Eschenmoser, A. and E. Loewenthal, *Chemistry of Potentially Prebiological Natural-Products*. Chemical Society Reviews, 1992. 21(1): p. 1-16.
132. Kim, J.Y. and I.K. Park, *The flavin coenzymes: a new class of group I intron inhibitors*. Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects, 2000. 1475(1): p. 61-66.
133. Winkler, W.C., S. Cohen-Chalamish, and R.R. Breaker, *An mRNA structure that controls gene expression by binding FMN*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002. 99(25): p. 15908-15913.
134. Koonin, E.V. and M.Y. Galperin, *Prokaryotic genomes: the emerging paradigm of genome-based microbiology*. Current Opinion in Genetics & Development, 1997. 7(6): p. 757-763.