Lehrstuhl für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität München

Untersuchungen zur Riboflavin Synthase und Flavokinase aus verschiedenen Organismen

Kristina Kemter

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

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prüfer der Dissertation: Univ.-Prof. Dr. F. H. Köhler 1. Univ.-Prof. Dr. Dr. A. Bacher 2. Univ.-Prof. Dr. A. Gierl

Die Dissertation wurde am 09.07.2002 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 21.08.2002 angenommen.

Die experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation wurden im Zeitraum von September 1997 bis Juni 2002 am Lehrstuhl für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität München durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Dr. Adelbert Bacher gilt mein besonderer Dank für seine Unterstützung und stete Hilfsbereitschaft bei der Betreuung der Arbeit, sowie für seine wertvollen Anregungen und seine Diskussionsbereitschaft.

Meinem Betreuer Herrn Dr. Fischer danke ich sehr herzlich für seine fachlichen Beiträge zum Gelingen dieser Arbeit und das ständige Interesse am Fortgang meiner Arbeit.

Dr. Wolfgang Eisenreich möchte ich ganz besonders für das Wechseln der Probenköpfe und die immer gewährte Hilfe bei Problemen mit dem NMR-Gerät danken. Aber auch für fachliche Diskussionen und das schnelle Korrekturlesen meiner Dissertation.

Frau Dr. Simone Mörtl danke ich für ihre gute Einführung in die Tiefen der Molekularbiologie sowie in die Gegebenheiten dieses Lehrstuhls.

Richard Feicht danke ich für seine großartige Hilfe und fachliche Kompetenz bei der Proteinreinigung.

Meinen Labormädels Susi Schiffmann und Ann-Kathrin Schott danke ich für gegenseitige Motivation und Aufmunterung, die mir immer sehr viel Spaß bereitet haben im grauen Laboralltag.

Stefanie Bauer und Dr. Stefan Steinbacher danke ich für die Strukturaufklärung der Flavokinase und die vielen schönen Bildchen, die meine Arbeit bereicherten.

Dr. Boris Illarionov danke ich für die Bereitstellung der *E. coli* Riboflavin Synthasen und für die außerordentlich gute Zusammenarbeit auf diesem Gebiet.

Werner Römisch danke ich für die Bereitstellung der ¹³C markierten Riboflavine.

Bei allen jetzigen und ehemaligen Laborkollegen möchte ich mich für die freundschaftliche Atmosphäre und die Hilfsbereitschaft bedanken. Insbesondere Petra Adam, Ilka Haase, Stefan Hecht, Heidi Hofner, Annett Kiekebusch, Erik Schleicher, Nick Schramek, Werner Römisch.

Der netten Kaffeerunde im Seminarraum, mit oftmals wechselnder Besatzung gilt mein besonderer Dank, da die fröhliche Runde mir über viele Tiefs hinweggeholfen hat.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Biologische Bedeutung der Flavine	1
1.2 Ein kurzer Überblick über die Riboflavin-Biosynthese	3
1.3 Riboflavin Synthase	7
1.4 Flavokinase und FAD-Synthetase	17
2 Materialien und Methoden	20
2.1 Geräte	20
2.2 Chemikalien	22
2.3 Extinktionskoeffizienten	23
2.4 Synthesen	24
2.4.1 6,7-Bis(trifluormethyl)-8-(D-ribityl)lumazin-7-hydrat (Epimere)	24
2.4.1.1 Hexafluorbiacetyl	24
2.4.1.2 6-Chloruracil	24
2.4.1.3 N-Benzyl-D-ribitylamin	25
2.4.1.4 D-Ribitylamin	25
2.4.1.5 5-Nitroso-6-ribitylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidindion	25
2.4.1.6 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidindion (HCI-Salz)	26
2.4.1.7 6, 7-Bis(trifluormethyl)-8-(D-ribityl)lumazin-7-hydrat (Epimere)	26
2.4.2 0- I filluofinethyl- /-0x0-8-(D-fibityl)lumazin	27
2.5 Dakterienstamme	21
2.0 Expressionsvertor 2.7 Molekularbiologische Methoden	20
2.7 Holekulai biologisene Wethoden 2.7 1 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>F. coli</i>	29
2.7.1 1 Schnellisolierung mit Hitzeschock	29
2.7.1.2 Plasmidisolierung mittels modifizierter Alkali/SDS-Methode	30
2.7.2 Reinigung von DNA-Fragmenten	31
2.7.2.1 Direkte Reinigung von PCR-Fragmenten (ohne Agarosegelelektrophorese)	31
2.7.2.2 Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	31
2.7.3 Agarosegelelektrophorese	32
2.7.4 DNA-Konzentrationsbestimmung	33
2.7.5 Herstellung kompetenter E. coli Zellen und Transformation	33
2.7.5.1 Kompetente Zellen nach Hanahan	33
2.7.5.2 Transformation mit kompetenten Zellen nach Hanahan	34
2.7.5.3 Herstellung von elektrokompetenten Zellen	34
2.7.5.4 Elektroporation elektrokompetenter Zellen	35
2.7.6 In vitro-Amplifikation von DNA mittels PCR	35
2.7.6.1 Standard-PCR	36
2.7.6.2 Gentotalsynthese	36
2.7.6.3 PCR-Screening	37
2.7.7 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen	39
2.7.8 Ligation von DNA-Fragmenten	39
2.7.9 DNA-Sequenzierung	39
2.6 Stammaltung und proteinchemische Methoden	41
2.8.1 Kulturniedien	41

2.8.2 Stammhaltung	41
2.8.3 Kulturbedingungen	42
2.8.4 Zellaufschluß mit Ultraschall zur Proteingewinnung	42
2.8.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	43
2.8.6 Test auf Flavokinase-Aktivität	44
2.8.7 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen nach Bradford	44
2.9 Proteinpräparation	45
2.9.1 Flavokinase aus Schizosaccharomyces pombe	45
2.9.2 Humane Flavokinase	45
2.9.3 Riboflavin Synthase und deren Mutanten	46
2.10 Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)	46
2.10.1 Stationäre Phasen	46
2.10.2 Mobile Phasen	47
2.10.3 Auftrennung der Reaktionsprodukte des Testes auf Flavokinase- bzw. FAD- Synthetase Aktivität	47
2.10.4 Präparative Trennung des Epimerengemisches von	47
6,7-Bis(trifluormethyl)-8-(D-ribityl)lumazin-7-hydrat	
2.11 NMR Spektroskopie	48
2.11.1 ¹⁹ F NMR Spektren	48
2.11.2 ¹³ C-NMR-Spektren	49
3 Ergebnisse	50
3.1 Flavokinase	50
3.1.1 Rekombinante Expression der monofunktionellen Flavokinase aus	50
Schizosaccharomyces pombe	
3.1.2 Rekombinante Expression der monofunktionellen humanen Flavokinase mittels Gentotalsynthese	53
3.1.2.1 In vitro Gensynthese	55
3.1.3 Reinigung rekombinanter Flavokinase aus Schizosaccharomyces pombe	57
3.1.4 Reinigung der rekombinanten humanen Flavokinase	59
3.1.5 ¹³ C NMR Untersuchungen mit unterschiedlich ¹³ C markierten Riboflavinen an der rekombinanten Flavokinase aus <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	61
3 1 6 Röntgenstrukturanalyse der Flavokinase aus Schizosaccharomyces pombe	72
3161 Kristallisation	72
3162 Beschreibung der Kristallstruktur	74
3.2.6.3 Beschreibung des Aktiven Zentrums	77
3.2.6.4 Bindung von ATP. Riboflavin und zweiwertige Metallkationen	78
3.2 ¹⁹ F NMR Untersuchungen an Riboflavin Synthasen	84
3.2.1 Die Fluorlumazine	84
3.2.2 Bindungsstudien mit 6,7-Bis(trifluormethyl)-8-(D-ribityl)lumazin-7-hydrat an Wildtyp Riboflayin Synthase aus <i>E coli</i>	89
3.2.3 Bindungsstudien mit 6-Trifluormethyl-7-oxo-8-(D-ribityl)lumazin an rekombinanter Riboflavin Synthase aus <i>F coli</i>	95
3.2.4 Untersuchungen an spezifischen Punktmutanten der Riboflavin Synthase	101
3 2 5 Bindungsstudien mit Enimer A an Mutanten der Riboflavin Synthase aus <i>F coli</i>	103
3.2.6 Bindungsstudien an Mutanten der Riboflavin Synthase aus <i>E.coli</i> mit 6-Trifluormethyl-7-oxo-8-(D-ribityl)lumazin	111
3.2.7 ¹⁹ F NMR Untersuchungen an rekombinanten Domänen der Riboflavin Synthase aus <i>E. coli</i>	119

3.2.8 ¹⁹ F NMR Experimente an der Riboflavin Synthase	125
aus Schizosaccharomyces pombe	
3.2.8.1 Vergleichende Betrachtungen der ¹⁹ F NMR Experimente an	125
Riboflavin Synthase aus Schizosaccharomyces pombe mit	
bisherigen ¹⁹ F NMR Bindungsstudien	
3.2.8.2 ¹⁹ F NMR Experimente mit Punktmutanten der Riboflavin Synthase aus	129
Schizosaccharomyces pombe	
3.2.8.3 Aus den ¹⁹ F NMR Experimenten abgeleitete Protein Dynamik der Riboflavin	137
Synthase aus Schizosaccharomyces pombe	
4 Diskussion	152
4.1 Flavokinase	152
4.2 ¹⁹ F NMR Untersuchungen an Riboflavin Synthasen	155
5 Zusammenfassung	161
6 Literaturverzeichnis	164

1 Einleitung

1.1 Biologische Bedeutung der Flavine

Nach der Entdeckung und chemischen Charakterisierung der Flavine in den 30iger Jahren dieses Jahrhunderts wurde begonnen, die Rolle der Flavocoenzyme FMN (Riboflavin-5`- Phosphat; "Flavinmononucleotid"; Abb. 1) sowie FAD (Flavinadenindiphosphat, "Flavinadenindinucleotid"; Abb. 1) als Cofaktoren in Redoxprozessen zu untersuchen. Seitdem wurde eine große Anzahl von flavinabhängigen Redoxenzymen gefunden (Bacher et al., 2001).

Isoalloxazin-Ring-System



Abb. 1: Strukturen von Riboflavin, FMN und FAD.

Das reversible Redoxsystem des Isoalloxazin-Ringes (Abb.1) ist der eigentliche chemisch aktive Teil des Flavinmoleküls mit einem Halbstufenpotential E_0 von ca. -200 mV. Der Chinonzustand des oxidierten Moleküls kann über einen Semichinonzustand zum entsprechenden Hydrochinonzustand reduziert werden.

Dies befähigt die Flavine sowohl 1-Elektronen- als auch 2-Elektronen-Transferprozesse einzugehen. Außerdem sind sie heute noch als vielseitige Verbindungen bekannt, die als Elektrophile und Nucleophile wirken und deren kovalente Intermediate mit denen des Substrates oftmals in der Katalyse involviert sind(Massey, 2000).

Da Flavine darüber hinaus amphotere Moleküle sind, muß immer abhängig vom pH-Wert die neutrale, anionische bzw. kationische Form des Moleküls in Betracht gezogen werden.

Die große Vielfalt der Reaktionen, die durch den gleichen Heteroaromaten katalysiert werden kann, setzt eine entsprechende chemische Vielseitigkeit voraus. Diese wird erst durch die Wechselwirkung des Flavins mit dem Protein erreicht, z.B. über kovalente Bindungen, Wasserstoffbrückenbindungen oder über mögliche Wechselwirkungen mit den Ladungen von Proteinresten bzw. Proteinbereichen. Das Redoxpotential der Flavoproteine kann durch unterschiedlich gute Bindung der oxidierten und reduzierten Form der Flavinnucleotide außerordentlich von dem des freien Flavins abweichen und liegt zwischen -400 und +200 mV. Flavine sind auf Grund ihrer chemischen Vielseitigkeit an einer Unmenge biologischer Phänomene beteiligt. Sie spielen eine zentrale Rolle im aeroben Stoffwechsel, wegen ihrer Fähigkeit 2-Elektronen-Dehydrogenierungen einer großen Anzahl von Substraten zu katalysieren und an 1-Elektronen-Übertragungen auf verschiedene Metallzentren über ihre freien Radikalzustände teilzunehmen. So bilden sie oft einen Teil von Enzymen mit Multiredoxzentren, wie z.B die Succinat- und NADH Dehydrogenase, Xanthin Oxidase/Dehydrogenase, Cytochrom P450 Systeme und die erst vor nicht all zu langer Zeit entdeckte NO Synthase (Massey, 2000).

Flavine tragen vermutlich zum oxidativen Streß bei, wegen ihrer Fähigkeit Superoxide zu produzieren. Aber gleichzeitig sind Flavine häufig an der Reduktion von Hydroperoxiden, Produkten der von Sauerstoff ausgehenden Radikalreaktionen beteiligt (Massey, 2000).

Flavoproteine spielen eine wichtige Rolle bei körperlichen Entgiftungsprozessen über die Hydroxylierung vieler aromatischer Verbindungen. Ein einfaches Flavoprotein in den Lebermicrosomen katalysiert viele Reaktionen, ähnlich denen, die durch das P450-Enzym katalysiert werden (Massey, 2000).

Flavine sind in bioluminiscenten Bakterien an der Lichtproduktion beteiligt. Zudem sind sie eng verbunden mit lichtinduzierten Reaktionen, wie Pflanzenphototropismus, Photosynthese und DNA-Reparaturprozesse (Massey, 2000).

Ein Riboflavinbindeprotein ist an der Entwicklung von Hühner- und Säugetierföten beteiligt. Flavine werden auch in Verbindung mit dem programmierten Zelltod gebracht, bei dem sie eine Aufgabe bei der Signalübertragung haben sollen (Massey, 2000).

Auch bei der Regulierung biologischer Uhren, wie die Anpassung des menschlichen Organismus an den sogenannten "jet lag", spielen Flavoproteine eine Rolle (Massey, 2000).

1.2 Ein kurzer Überblick über die Riboflavin-Biosynthese

Wie der Abschnitt über die vielfältigen Aufgaben der Flavine gezeigt hat, sind Flavocoenzyme in allen zellulären Organismen unentbehrlich. Pflanzen und viele Mikroorganismen produzieren ihr eigenes Riboflavin. Säuger und bestimmte Mikroorganismen sind auf die Aufnahme von Riboflavin als Vitamin angewiesen (Bacher et al., 2001). Die Hauptquelle für dieses Vitamin sind in der menschlichen Ernährung Gemüse und Milch. Wiederkäuer können Vitamin B2 über ihre Darmflora gewinnen. Obwohl die Flavoproteine in allen zellulären Organismen absolut unentbehrlich sind, treten Symptome von Riboflavinmangel beim Menschen äußerst selten auf (Bacher et al., 2000).

Abseits von den natürlichen Quellen wird Vitamin B2 in großtechnischem Maßstab als Nahrungsergänzungsmittel für die menschliche und tierische Ernährung hergestellt. Methoden zur chemischen Synthese von Riboflavin und seiner Cofaktoren FMN sowie FAD wurden durch die Gruppen von Karrer und Kuhn im Rahmen ihrer Strukturaufklärung entwickelt. Etwas modifiziert wurden diese Methoden zunächst für die Herstellung des Vitamins in großtechnischem Maßstab eingesetzt (Bacher et al., 2001).

Aber es wurde auch früh erkannt. dass Riboflavin relativ einfach durch Fermantationsprozesse mittels einer Vielzahl von Bakterien und Pilzen gewonnen werden kann, die Riboflavin im Überschuß weit über ihre metabolischen Erfordernisse hinaus produzieren (Bacher, 1991a; Demain, 1972). Die ersten Untersuchungen am Biosyntheseweg von Vitamin B2 wurden direkt aus praktischen Überlegungen heraus durchgeführt, um die Ausbeute von Riboflavin in frühen biotechnologischen Produktionsmethoden mittels flavinogener Mikroorganismen zu erhöhen (Bacher et al., 2000; 2001).

1952 berichtete McLaren, dass die Riboflavinproduktion durch Zugabe von Purin-Derivaten zum Kulturmedium von *Eremothecium ashbyii* stimuliert werden kann. Es schien also einen biosynthetischen Zusammenhang zwischen Purinen und Riboflavin zu geben (Bacher et al., 2000; 2001). Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass die Pyrimidin-Einheit des Riboflavins biosynthetisch zum Guanin in Beziehung steht. In späteren Arbeiten wurde Guanosintriphosphat (GTP) als Vorstufe des Riboflavins identifiziert, das den Pyrimidin-Ring und die N-Atome des Pyrazin-Ringes sowie die Ribityl-Seitenkette des Vitamins liefert (Bacher et al., 2000; 2001).

Zu den Arbeiten am Biosyntheseweg von Riboflavin sind in den letzten Jahren zahlreiche Review-Artikel erschienen (Bacher, 1991a; Bacher et al., 2001, 2000, 1996, 1993a, 1993b, 1991; Plaut et al., 1974; Plaut, 1971, 1961,Brown *et al.*, 1963; 1982; 1987).

Untersuchungen am Biosyntheseweg von Riboflavin wurden mit Eubacterien (*Bacillus subtilis; Escherichia coli*), Hefen (*Saccharomyces cerevisiae; Candida guilliermondii*) und Ascomyceten (*Ashbya gossypii; Eremothecium ashbyii*) durchgeführt. Diese Studien gipfelten in der Entwicklung effizienter Fermentationsprozesse für die großtechnische Produktion des Vitamins, die die chemische Synthese verdrängt hat (Bacher et al., 2001).

Eine kurze Zusammenfassung der einzelnen Schritte der Riboflavin-Biosynthese wird im Folgenden vorgestellt.

In Abbildung 2 ist der Biosyntheseweg von Riboflavin dargestellt. Generell wird ein Riboflavinmolekül aus einem Molekül GTP und zwei Molekülen Ribulose-5-phosphat gebildet (Review: Bacher et al., 2001).

Im ersten Schritt der Riboflavin-Biosynthese wird der Imidazolring des GTP (Verbindung **I** in Abb. 2) hydrolytisch unter Formiatabspaltung, begleitet durch die Abspaltung von Pyrophosphat, geöffnet. Diese Reaktion wird durch das Enzym GTP-Cyclohydrolase II katalysiert. Das Enzymprodukt der GTP-Cyclohydrolase II 2,5-Diamino-6-ribosylamino-4(3H)-pyrimidinon-5`-phosphat (**II** in Abb. 2) wird über zwei Reaktionsschritte, die die hydrolytische Abspaltung der Aminogruppe in Position 2 des heterocyclischen Ringes und die Reduktion der Ribosyl-Seitenkette zur Ribityl-Seitenkette des Vitamins beinhaltet, zu 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1H;3H)-pyrimidindion-5`-phosphat (**V** in Abb. 2) umgesetzt. Die Reihenfolge dieser Reaktionsschritte variiert in den unterschiedlichen Organismen. In Eubacterien findet die Ringdesaminierung vor der Reduktion der Zuckereinheit statt. In Hefen geht die Reduktionsreaktion der Desaminierung voraus. Die Abfolge der Reaktionen in Pflanzen und Archaea ist noch nicht ermittelt worden.

Nach Dephosphorylierung von Verbindung V (Abb. 2) durch vermutlich unspezifische Phosphatasen, erfolgt durch die 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin Synthase die Kondensation von 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidindion (VI in Abb. 2) mit 3,4-Dihydroxy-2butanon-4-phosphat (VII in Abb. 2) zu 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin (VIII in Abb. 2). Die Carbohydrat-Vorstufe (VII in Abb. 2) dieser Reaktion wurde erst in jüngerer Zeit entdeckt. Sie wird aus Ribulose-5-Phosphat (X in Abb. 2) in einer ungewöhnlichen Reaktion synthetisiert, die den Verlust des C4-Atoms über eine intramolekulare Umlagerung beinhaltet. Das Lumazinintermediat VIII ist Substrat einer ungewöhnlichen Dismutationsreaktion, die durch das Enzym Riboflavin Synthase katalysiert wird. Die Produkte dieser Reaktion sind Riboflavin und dessen eigene biosynthetische Vorstufe 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1H,3H)pyrimidindion (VI), das wieder in den Biosyntheseweg zurückgeführt wird (Abb. 2).



Abb. 2: Riboflavin-Biosynthese. a: GTP-Cyclohydrolase II; b: Pyrimidin Desaminase; c: Pyrimidin Reduktase; d: Phosphatase; e: 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase; f: 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin Synthase; g: Riboflavin Synthase



Abb. 3: Katalytischer Zyklus der Riboflavin-Bildung mit anschließender Umsetzung zu den Cofaktoren Flavinmononucleotid (FMN; XI) und Flavinadenindinucleotid (FAD; XII).

Das Produkt des Riboflavin-Biosyntheseweges ist unphosphoryliertes Riboflavin. Da aber die Cofaktoren FMN und FAD in allen zellulären Organismen unentbehrlich sind, benötigen Pflanzen und Mikroorganismen, die ihr eigenes Riboflavin erzeugen, zusätzliche Enzyme, die das Vitamin in seine Cofaktoren FMN (**XI**; Abb. 3) und FAD (**XII**; Abb. 3) umsetzen (Bacher, 1991b).

Tiere und bestimmte Mikroorganismen sind auf die Aufnahme des Vitamins in Form von Riboflavin angewiesen. Enzyme für die Umsetzung von Riboflavin in seine Cofaktoren sind in allen Organismen erforderlich, weil Riboflavin ein notwendiges Intermediat auf dem Weg zu den Flavocoenzymen ist (Bacher, 1991b).

Das Enzym Flavokinase katalysiert die Bildung von Flavinmononukleotid (FMN; **XI** in Abb. 3) durch Phosphorylierung der 5`-OH-Gruppe des Riboflavins mittels ATP und unter Freisetzung von ADP. Im anschließenden Schritt erfolgt die Umsetzung von FMN zu FAD (**XII** in Abb. 3) unter Katalyse des Enzyms Flavinadenindinukleotid Synthetase. Dabei liefert das zweite Substrat ATP eine AMP-Einheit unter Freisetzung von Pyrophosphat.

1.3 Riboflavin Synthase

Das Enzym Riboflavin Synthase katalysiert den letzten Schritt im Biosyntheseweg von Riboflavin (Abb. 2, 3).

Bei dieser Enzymreaktion handelt es sich um eine ungewöhnliche Dismutationsreaktion zweier Moleküle 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin (Maley & Plaut, 1959a; 1959b). Hierbei wird sowohl Riboflavin als auch 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidindion in stöchiometrischen Mengen gebildet. Letzteres ist Substrat des Enzyms Lumazin Synthase und wird in den Biosyntheseweg zurückgeführt (Plaut, 1963; Wacker et al., 1964). Im Laufe der Reaktion wird ein Gerüst von 4 Kohlenstoffatomen (6α , 6,7 und 7α) von einem Lumazin-Donor auf einen Lumazin-Akzeptor übertragen (Plaut, 1960; Goodwin & Horton, 1961). Überraschenderweise wurde festgestellt, dass diese Dismutationsreaktion auch ohne Katalysator unter relativ milden Bedingungen stattfindet. Riboflavin entsteht auch aus kochenden sauren oder neutralen wässrigen Lösungen von 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin (Beach & Plaut, 1969; Rowan & Wood, 1963; 1968).

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

Trotz zahlreicher Fortschritte verschiedener Arbeitsgruppen auf dem Gebiet der Riboflavin Synthase über einen Zeitraum von mehr als 4 Jahrzehnten, ist der Mechanismus der durch die Riboflavin Synthase katalysierten Dismutationsreaktion noch nicht komplett geklärt.

Die Methylgruppe in Position 7 des 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazins ist mit einem pK Wert von 8,5 ungewöhnlich sauer (Pfleiderer & Hutzenlaub, 1973), so dass eine leichte Deprotonierung an dieser Stelle möglich ist. Das dabei entstehende Monoanion bildet eine Gleichgewichtsmischung, die verschiedene tricyclische Strukturen beinhaltet, die aus einem nucleophilen Angriff einer Seitenketten OH-Gruppe an dem Kohlenstoffatom C7 resultieren. Diese Gleichgewichtsmischung enthält auch kleine Mengen der Exomethylenstruktur 1a in Abbildung 4 (Beach & Plaut, 1970a, 1971; Bown et al., 1986; Pfleiderer et al., 1971). Plaut et al. zeigten, dass die aciden Protonen der Methylgruppe in Position 7 des Lumazinringes leicht in Wasser austauschen (Beach & Plaut, 1970a; Paterson & Wood, 1969, 1972; Plaut et al., 1970) und das dieser Austausch in Anwesenheit der Riboflavin Synthase beschleunigt wird (Plaut et al., 1970). Auf der Grundlage dieser Erkenntnisse wurde die anionische Spezies als Intermediat sowohl der enzymatischen als auch der nicht-enzymatischen Riboflavin Synthese aus 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin (VII) vorgeschlagen. So wurde durch die Arbeitsgruppen um Plaut und Wood unabhägig voneinander ein Modell für den Mechanismus der Dismutationsreaktion der Riboflavin Synthase vorgestellt. Im ersten Schritt dieses Reaktionsmechanismus sollte das Exomethylenanion (1a in Abb. 4) ein Substratmolekül angreifen, das an Position 7 ein Addukt aus einem Lumazinmolekül mit einem Nucleophil darstellt (2 in Abb. 4) (Beach & Plaut, 1969, 1970b; Plaut & Beach, 1976; Rowan & Wood, 1963, 1968; Paterson & Wood, 1969, 1972). Das Produkt dieser ersten Reaktion war ein Lumazindimer (3 in Abb. 4), das über mehrere Ringöffnungs- und Ringschlußreaktionen, die in den vorgeschlagenen Reaktionsmechanismen von Plaut und Wood voneinander abwichen, letztendlich zu den Produkten Riboflavin und 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1H,3H)pyrimidindion (VI) reagiert.

In neuerer Zeit wurde mit Hilfe einer sehr langsamen Mutante S41A der Riboflavin Synthase aus *E. coli* durch Illarionov *et al.* ein pentacyclisches Dimerisierungsprodukt von 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin (4 in Abb. 4) isoliert, nachdem die Presteadystate-Mischung aus Substrat und Mutante S41A der Riboflavin Synthase aus *E. coli* mit Säure gequencht wurde (Illarionov et al., 2001). Die Verbindung wird durch die Riboflavin Synthase in Riboflavin umgewandelt und wurde als kinetisch kompetentes Intermediat des Enzyms identifiziert.



Abb. 4: Hypothetischer Reaktionsmechanismus der Bildung von Riboflavin (5) aus zwei Molekülen 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin (1) unter katalytischer Wirkung der Riboflavin Synthase über das pentacyclische Intermediat (4) (Illarionov et al., 2001). X ist das unbekannte Nucleophil. R ist die Ribityl-Seitenkette.

Dessen Umwandlung zu Riboflavin durch die Riboflavin Synthase in einer Folge von 2 Eliminierungsschritten führte zur Postulierung eines neuen hypothetischen Reaktionsmechanismus der Riboflavin Synthase, ausgehend ebenfalls vom nucleophilen Angriff des in Position 7 deprotonierten Lumazinmoleküls an das Addukt aus Lumazin und Nucleophil an Postion 7, über das pentacyclische Zwischenprodukt Verbindung 4 in Abbildung 4.

Die Regiochemie der enzymkatalysierten Reaktion erfordert die gleichzeitige Bindung zweier Substratmoleküle mit antiparalleler Orientierung. Ligandenbindungsstudien haben bestätigt, dass jede Untereinheit der homotrimeren Riboflavin Synthase 2 Lumazinmoleküle binden kann (Harvey & Plaut, 1966; Otto & Bacher, 1981; Plaut, 1971). Außerdem wurde im Rahmen dieser Bindungsstudien von Otto und Bacher festgestellt, dass von den Substratanalogen 6,7-Dioxo-8-ribityllumazin (**8** in Abb. 5) und 7-Methyl-8-ribityllumazin (**7** in Abb. 5) bis zu 6 Moleküle und vom Produkt Riboflavin bzw. vom Produktanalogen 5-Nitroso-6-ribitylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidindion (**9** in Abb. 5) je 3 Moleküle pro α -Trimer gebunden werden können. Diese Verbindungen erwiesen sich als starke Inhibitoren, mit K_i-Werten im Bereich von 1 µM. Diese Ergebnisse bekräftigten den Plaut`schen Vorschlag einer Akzeptor- und einer Donorbindungsstelle.



Abb. 5: Produkt- und Intermediatanaloge der Riboflavin Synthase. 7: 7-Methyl-8-ribitylluamzin; 8: 6,7-Dioxo-8-ribityllumazin; 9: 5-Nitroso-6-ribitylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidindion; 10: 5-Nitro-6-ribitylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidindion

Cushman und Mitarbeiteter entwickelten eine Reihe analoger Verbindungen des 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazins, bei denen Methylgruppen durch Trifluormethylgruppen ersetzt wurden. Einerseits war das Ziel dieser Arbeiten die Entwicklung potentieller Inhibitoren der Riboflavin Synthase. Aber zum zweiten bietet die Einführung von Fluoratomen die Möglichkeit, an diesen Verbindungen im Komplex mit den Proteinen ¹⁹F NMR spektroskopische Untersuchungen durchzuführen (Cushman et al., 1990, 1992, 1993, 1991, 1986).

In allen bisher vorgeschlagenen Mechanismen sind die Verbindungen **1a** und **2** in Abbildung 4 die ersten Intermediate der Riboflavin Synthase Reaktion. Die Exomethylenstruktur **1a** ist das Produkt der Eliminierung eines 7 α Protons von 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin und wird durch die 7-Carbonylgruppe im 6-Trifluormethyl-7-oxo-8-ribityllumazin (**12** in Abb. 6) simuliert. Im Intermediat **2** wurde durch Addition eines Nucleophils das C7 Atom sp³ hybridisiert. Diese Situation wird durch die Verbindung 6,7-Bis(trifluormethyl)-8-ribityllumazin-7-hydrat (**11a** bzw. **11b** in Abb. 6) bzw. deren Epimere A und B simuliert.

¹⁹F NMR Untersuchungen an der Riboflavin Synthase aus *Bacillus subtilis* mit den Intermediatanalogen 6,7-Bis(trifluormethyl)-8-ribityllumazin (**11a** und **11b** in Abb. 6) und 6-Trifluormethyl-7-oxo-8-ribityllumazin (**12** in Abb. 6) haben ergeben, dass die Bindungsstellen des homotrimeren Proteins nicht topologisch äquivalent sind (Cushman et al., 1992, 1993, 1991; Scheuring et al., 1996). In einem c₃ symmetrischen Homotrimer würde man 2 unterschiedliche Bindungszustände erwarten, einen für die N-terminale Domäne und einen für die C-terminale Domäne. Aber die Bindungsstudien an Riboflavin Synthase aus *Bacillus subtilis* haben ergeben, dass ein bestimmter Ligand in 3 bis 4 unterschiedlichen Bindungszuständen an die Riboflavin Synthase binden kann. Außerdem wurde eine Bindungsstöchiometrie für die beiden Intermediat Analoga von 3 Bindungsplätzen pro Homotrimer für die Monotrifluorverbindung (Cushman et al., 1992, 1993, 1991; Scheuring et al., 1996).

In bioluminiscenten marinen Bakterien wurden Proteine mit Sequenzhomologie zur Riboflavin-Synthase gefunden. Sie fungieren als optische "Transponder", die die Lichtemission von Luciferase regulieren. Diese monomeren luminiscenten Proteine haben keine katalytische Aktivität und binden ein Molekül 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin, Riboflavin oder FMN pro Proteinmolekül. Auch die interne Sequenzhomologie kennzeichnet diese Proteine (Petushkov et al., 1995, 1997).

¹⁹F NMR Bindungsstudien mit einem dieser monomeren luminiscenten Proteine, dem Lumazin Protein aus *Photobacterium phosphoreum* haben für jede an das Protein gebundene Trifluormethylgruppe jeweils nur ein relativ scharfes Signal ergeben. Auch im Falle der trifluormethylsubstituierten Lumazin Derivate betrug die Bindungsstöchiometrie von Protein zu Ligand 1:1 (Scheuring et al., 1993, 1994).



Abb. 6: Derivate des 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazins. 11a 6,7-Bis(trifluormethyl)-8-ribittyllumazin-7-hydrat (Epimer A); 11b 6,7-Bis(trifluormethyl)-8-ribittyllumazin-7-hydrat (Epimer B); 12 6-Trifluormethyl-7-oxo-8-ribityllumazin; 13 6-Carboxyethyl-7-oxo-8-ribityllumazin.

Riboflavin Synthasen wurden in einer großen Zahl von Mikroorganismen und Pflanzen gefunden. Die Riboflavin Synthasen aus Eubacterien und Hefen sind homotrimere Proteine mit einer ungefähren Masse von 24 kDa pro Untereinheit.

```
    MFTGIVQGTA KLVSIDEKPN FRTHVVELPD HMLDGLETG ASVAH-NGCCL
    IMSGHIMTTA EVAKILTSEN NRQIWFKVQD SQLMKYILYK GFIGIDGISL
    TVTEINGNHV SFDLMKETLR ITNLGDLKVG DWVNVERAAK FSDEIGGH
    TVGEVTPTRF CVHLIPETLE RTTLGKKKLG ARVNIEIDPQ TQAVVDTVERVLAARENAMNQPGTEA
```

Abb. 7: Inneres Alignment der Riboflavin Synthase aus *Escherichia coli*. Rot eingezeichnet sind die konservierten Aminosäurereste, blau eingezeichnet sind die topologisch äquivalenten Reste C48 und S146.

Die Aminosäuresequenzen der Riboflavin Synthasen aus Eubacterien sind durch ihre interne Sequenzhomologie charakterisiert (Schott et al., 1990a, 1990b). Ein Alignment zwischen Nterminaler und C-terminaler Hälfte des entsprechenden Enzyms aus *E. coli* ergab 25 identische Aminosäuren sowie 22 konservative Ersetzungen (Abb. 7) (Eberhardt et al., 1996). Daraus wurde die Hypothese abgeleitet, dass jede Untereinheit in 2 topologisch ähnlichen Domänen faltet, wobei jede Domäne 1 Substratmolekül bindet (Eberhardt et al., 1996). In Übereinstimmung mit dieser Hypothese deuteten erste Röntgenbeugungsexperimente an Kristallen der Riboflavin Synthase aus *E. coli* mit niedriger Auflösung auf eine pseudo-D₃ Symmetrie hin, die auf eine pseudo-zweifach Symmetrie des Monomers aus N- und Cterminaler Domäne hinwies (Meining et al., 1998).

Das aktive Zentrum wurde dem Zwischenraum zwischen zwei angrenzenden Domänen zugeordnet. Es wurde angenommen, dass sich zwischen zwei angrenzenden Domänen die Heterozyklen der zwei gebundenen 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin Moleküle planar gegenüberstehen, während die Ribitylseitenketten in entgegengesetzte Richtung weisen (Eberhardt et al., 1996).

Kürzlich gelang die rekombinante Expression der N-terminalen und der C-terminalen Domäne des *E. coli* Enzyms. Die N-terminale Domäne der *E. coli* Riboflavin Synthase (Rest 1-97) konnte als stabiles Protein mit relativ hoher Affinität zu Riboflavin exprimiert werden. Überraschenderweise erwies sich das artifizielle Protein als c₂ symmetrisches Homodimer, während die Untereinheiten der nativen Riboflavin Synthase ein Homotrimer ausbilden (Eberhardt et al., 2001). Die Struktur des artifiziellen Dimers der N-terminalen Domäne in Komplex mit Riboflavin konnte mittels NMR-Spektroskopie ermittelt werden (Abb. 7) (Truffault et al., 2001).

Das Monomer der N-terminalen Domäne besteht aus sechs β Faltblattsträngen und zwei α Helices, die zusammen ein typisches β -*berrel* (Fa β -Motiv) bilden. Ein Riboflavinmolekül wird pro Monomer gebunden, an einer Bindungsstelle an einem Ende des Fasses, die aus Aminosäuren beider Monomere besteht (Abb. 8) (Truffault et al., 2001).

Für die Struktur des Monomers und die Ligandenbindung wurden Homologien zu FAD Bindungsdomänen von Proteinen der Familie der Ferrodoxin Reduktasen gefunden (Truffault et al., 2001). Diese Struktur der artifiziellen c₂ symmetrischen N-terminalen Domäne der Riboflavin Synthase gab Einblicke in die bis dahin unbekannte Struktur des vollständigen Enzyms, der Organisation des funktionellen Trimers und des Mechanismus der Riboflavin Synthese.



Abb. 8: Stereodarstellung der dreidimensionalen Struktur des artifiziellen c₂ symmetrischen Dimers der N-terminalen Domäne der Riboflavin Synthase aus *E. coli*. Die zwei Riboflavin Liganden sind in Form von Kugel-Stab-Modellen eingezeichnet. Zusätztlich sind die streng konservierten Aminosäurereste N45, N83, E85 und N72 eingezeichnet (Truffault et al., 2001).



Abb. 9: Die Riboflavin Bindungsstellen. Die Monomere A und B sind als blaue bzw, grüne Linien eingezeichnet. Die Seitenketten der Aminosäurereste, die an intermolekularen NOE Kontakten (rote gestrichelte Linien) beteiligt sind, wie z. B. die Seitenkette von C48, die die Rolle des Nucleophils im Reaktionsmechanismus übernehmen könnte, sind als Kugel-Stab-Modelle eingezeichnet. Erwartete intermolekulare Wechselwirkungen in Form von Wasserstoffbrückenbindungen sind als grüne gestrichelte Linien eingezeichnet (Truffault et al., 2001).

Dem Aminosäurerest C48 aus der N-terminalen Domäne wurde die Rolle des Nucleophils im Mechanismus zugeordnet, während dem Rest H102 aus der C-terminalen Domäne auch eine Schlüsselrolle im Mechanismus zugeordnet wurde (Abb. 9) (Truffault et al., 2001).

Die Riboflavin Synthase aus *E. coli* ist ein Homotrimer aus Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von 23 kDa. Sie benötigt keine Cofaktoren für ihre katalytische Aktivität (Eberhardt et al., 1996).

Die mittels Röntgenstrukturanalyse bis zu einer Auflösung von 2,0 Å ermittelte Struktur der *E. coli* Riboflavin Synthase bestätigte die starke Ähnlichkeit der Faltungseigenschaften von N- bzw. C-terminaler Domäne. Das Homotrimer der Riboflavin Synthase aus *E. coli* besteht aus einer asymmetrischen Zusammenlagerung von Monomeren, wovon jedes aus zwei gleichartigen β *berrels* (Faß-Motiv) und einer C-terminalen α Helix besteht. Diese gleichartigen β *berrels* stimmten gut mit der aus der internen Sequenzhomologie geschlossenen Annahme einer pseudo-zweifach Symmetrie überein. Analog zur Struktur des Monomeren der artifiziellen N-terminalen Domäne wurden auch hier für die β *berrels* Strukturhomologien zu anderen Flavoproteinen gefunden. Aber über die Natur des aktiven Zentrums und damit über die Enzym/Substrat Wechselwirkungen ergaben sich aus dieser Struktur keine direkten Informationen (Liao et al., 2001).

Die Riboflavin Synthase aus *Schizosaccharomyces pombe* ist in Lösung ein homotrimeres Protein mit einem Molekulargewicht von 22,8 kDa pro Untereinheit. Die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur von rekombinanter Riboflavin Synthase aus *Schizosaccharomyces pombe* gelang kürzlich im Komplex mit dem substratanalogen Inhibitor 6-Carboxyethyl-7oxo-8-ribityllumazin (**13** in Abb. 6) bei einer Auflösung von 2,1 Å Überraschenderweise wurde das in Lösung homotrimere Protein als Monomer kristallisiert.

Das Monomer der Riboflavin Synthase besteht aus 203 Aminosäuren, die zu einem Nterminalen β *berrel*, einem fast identischen C-terminalen β *berrel* und einer C-terminalen α Helix gefaltet werden (Abb. 10) (Gerhardt et al., 2002).

Ein Strukturvergleich der Riboflavin Synthasen aus *Schizosaccharomyces pombe* und *Escherichia coli* ergab die Topologie des aktiven Zentrums während der Dimereisierung der zwei Substratmoleküle sowie der anschließenden Fragmentierung des pentacyclischen Intermediates (**4** in Abb. 4). Das pentacyclische Substratdimer wurde in das vorgeschlagene aktive Zentrum hineinmodelliert und seine stereochemischen Eigenschaften wurden zugeordnet. Das Modell deutet darauf hin, dass das in der C-terminalen Domäne gebundene Substrat Molekül als Donor der C-4-Einheit fungiert, die auf das im N-terminalen β *berrel* der

angrenzenden Domäne gebundene Akzeptor Substrat Molekül übertragen wird (Gerhardt et al., 2002).



Abb. 10: a) Stereodarstellung des Monomers der Riboflavin Synthase aus Schizosaccharomyces pombe mit gebundenem 6-Carboxyethyl-7-oxo-8-ribityllumazin (gelb; Verbindung 13).
B) Blick entlang der pseudo-zweifach Symmetrieachse der zwei Faltungsdomänen (Gerhardt et al., 2002). Die C-terminale α Helix (grün) stabilisiert über Trimerisierungskontakte das eigentliche Trimer der Riboflavin Synthase (Gerhardt *et al.*, 2002; Liao et al., 2001).

Da das Enzym beim Menschen nicht existiert, ist es ein mögliches Ziel für die Therapie bei Infektionen durch Gram-negative Bakterien, die auf Grund des Nichtvorhandenseins eines Transportsystems für Riboflavin nicht in der Lage sind Riboflavin aus ihrer Umgebung zu absorbieren und deshalb von seiner Biosynthese absolut abhängig sind. Speziell riboflavindefiziente Mutanten von *Escherichia coli* sowie *Salmonella typhimurium* benötigen Riboflavin-Konzentrationen über 10 mg/l Kulturmedium zum Wachstum (Bandrin et al., 1979; Wang, 1992). Ähnliche Mengen des Vitamins benötigen die riboflavindefizienten Mutanten der Hefen *Saccharomyces cerevisiae* und *Candida guilliermondii* zum Wachsen (Oltmanns et al., 1967; Neuberger & Bacher, 1985). Deshalb sind Inhibitoren der RiboflavinBiosynthese auch potentielle Wirkstoffe zur Therapie von Hefeinfektionen, die bei immungeschwächten Patienten immer häufiger werden.

1.4 Flavokinase und FAD-Synthetase

Die Flavocoenzyme FMN (Riboflavin-5`-phosphat, Flavinmononucleotid) sowie FAD (Flavinadenindinucleotid) sind in allen zellulären Organismen absolut essentiell. Während Pflanzen und einige Mikroorganismen ihr eigens Riboflavin produzieren, sind andere Mikroorganismen und Säuger auf die Aufnahme des Vitamins aus externen Quellen angewiesen. In allen Fällen muß unphosphoryliertes Riboflavin in die Coenzymformen umgewandelt werden (Bacher, 1991b).



Abb. 11: Bildung der Cofaktoren Flavinmononucleotid (FMN; 2) und Flavinadenindinucleotid (FAD;3) unter Katalyse der Enzyme Flavokinase bzw. FAD-Synthetase.

Die Riboflavinkinase (Flavokinase, ATP:Riboflavin-5`-Phosphotransferase E.C.2.7.1.26) katalysiert die Phosphorylierung von Riboflavin an seiner 5`-OH-Gruppe zu Flavinmononucleotid (FMN). Als zweites Substrat ist ATP notwendig, das im Laufe der

katalytischen Reaktion eine seiner Phosphatgruppen auf Riboflavin überträgt und selbst als ADP aus der Reaktion hervorgeht (Abb. 11). FMN wird durch FAD-Synthetase (FAD-Pyrophosphorylase, ATP:FMN-Adenyltransferase E.C.2.7.7.2) in Flavinadenindinucleotid (FAD) umgewandelt. Auch diese Reaktion ist eine ATP-abhängige Reaktion, dessen AMP-Einheit auf das Flavin unter Freisetzung von Pyrophosphat übertragen wird (Abb. 11). Beide Reaktionen sind abhängig von 2-wertigen Metallkationen.

Flavokinase- und FAD-Synthetase-Aktivität wurde in zahlreichen Organismen gefunden. Die ältere Literatur dazu ist in einem Review Artikel ausführlich diskutiert (Bacher, 1991b).

In tierischen Zellen, Hefen und Pflanzen werden die Reaktionen durch zwei getrennte Enzyme katalysiert.

Flavokinasen wurden aus Rattenleber (McCormick, 1962; McCormick & Butler, 1962; McCormick *et al.*, 1963; Arsenis & McCormick, 1964; Merrill & McCormick, 1979, 1980), *Pichia guilliermondii* (Kashchenko & Shavlovskii, 1976) und der Mung Bohne (Sobhanaditya & Rao, 1981) isoliert. Die Hefe *Pichia guilliermondii* enthält zwei unterschiedliche Formen der Flavokinase, von denen eine thermostabil ist (Faiura & Kashchenko, 1997). Außerdem wurde eine Flavokinase aus einer Mutante der Hefe *Neurospora crassa*, isoliert und kinetisch charakterisiert (Rajeswari et al., 1999). Diese Flavokinase wurde als Monomer mit einem Molekulargewicht von 35 kDa charakterisiert. Sie hat ihr pH-Optimum bei alkalischem pH und ein Temperatur-Optimum bei 55°C (Rajeswari et al., 1999).

Kürzlich konnte das Gen FMN1 aus *Saccharomyces cerevisiae* als Strukturgen für die monofunktionelle Flavokinase identifiziert werden. Das Gen wurde kloniert und das rekombinante Protein katalysiert die Bildung von FMN aus Riboflavin und ATP (Santos et al., 2000).

FAD-Synthetasen wurden unter anderem aus Rattenleber (Oka & McCormick, 1987), Bohnen (Giri *et al.*, 1960), *Saccharomyces cerevisiae* (Wu et al., 1995) erhalten. Die letztere FAD-Synthetase wurde kloniert und funktionell als solche identifiziert (Wu et al., 1995).

In allen bisher untersuchten Mikroorganismen werden beide Reaktionen von einem bifunktionellen Enzym katalysiert.

Aus *Corynebacterium ammoniagenes* wurde eine bifunktionelle Flavokinase/FAD-Synthetase isoliert, später kloniert sowie kinetisch charakterisiert (Efimov et al., 1998; Hagihara et al., 1995; Manstein & Pai, 1986; Nakagawa et al., 1995).

In *Escherichia coli* wurde ein ähnliches bifunktionelles Enzym gefunden (Kitatsuji et al., 1993; Kamio et al., 1985).

Das entsprechende bifunktionelle Enzym aus *Bacillus subtilis* soll neben seiner katalytischen Funktion noch eine regulatorische Funktion im Riboflavin-Biosyntheseweg haben (Kearney et al., 1979; Kreneva et al., 1990, 1999; Kreneva et al., 2001; Mack et al., 1998; Coquard *et al.*, 1997).

Zusätzlich dazu wurde auf dem gleichen Genabschnitt, der das ribC-Gen für die bifunktionelle Flavokinase/FAD-Synthetase in *Bacillus subtilis* trägt, sowie an der Regulation des *Bacillus subtilis* Riboflavin-Operons beteiligt sein soll, ein ribR-Gen gefunden, das für eine monofunktionelle Flavokinase codiert. Die aus dem ribR-Gen abgeleitete Aminosäuresequenz zeigt im N-terminalen Bereich auffallende Homologie zu den C-Termini bekannter bifunktioneller Flavokinasen/FAD-Synthetasen sowie zu bekannten monofunktionellen eukaryotischen Flavokinasen. Die entsprechende Flavokinase-Funktion wurde durch rekombinante Expression in *Escherichia coli*, sowie anschließender HPLC-Untersuchung der Aktivitätstests des Gen-Produktes ermittelt (Solovieva et al., 1998, 1999).

Die Sequenzanalyse verschiedener Mutanten des ribC-Gens aus *Bacillus subtilis* mit gesteigerter Aktivität, sowie die Ergebnisse aus Northern Hybridisierungsexperimenten zeigten, dass ein bestimmtes Gen-Motiv am C-Ende des truB-Gens die regulatorische Region ist, die das ribC-Gen auf dem Level der Transkription reguliert (Mack et al., 1998; Coquard et al., 1997).

Eine Reihe von Homologen zum bifunktionellen Flavokinase/FAD-Synthetase-Gen ribC aus *Bacillus subtilis* wurden in Archaea und Eubacterien identifiziert, was die Schlussfolgerung zulässt, dass diese Art der Genorganisation den Prokaryoten gemeinsam ist.

Das mreA-Gen aus einem gegenüber Macroliden und Clindamycin resistenten *Streptococcus agalactiae* –Stamm wurde kürzlich in *Escherichia coli* rekombinant exprimiert, wobei es dem verwendeten *Escherichia coli* –Stamm Macrolid-Resistenz verliehen hat. Die Analyse der aus dem mreA-Gen abgeleiteten Aminosäuresequenz zeigte signifikante Homologie zu verschiedenen bifunktionellen Flavokinasen/FAD-Synthetasen, ähnlich dem monofunktionellen ribR-Gen aus *Bacillus subtilis*. HPLC-Experimente mit dem exprimierten Gen-Produkt des mreA-Gens zeigten dessen Aktivität als monofunktionelle Flavokinase, analog zum ribR-Gen aus *Bacillus subtilis* (Clarebout et al., 2001).

Kristallstrukturen dieser hier aufgelisteten Proteine sind bis zum heutigen Zeitpunkt unbekannt.

2 Materialien und Methoden

2.1 Geräte

Hochdrucksterilisator:

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

Analysenfeinwaage:

1602 MP, Sartorius (Göttingen)

Vakuumpumpe:

MZ 2C (VAKUUBRAND GmbH + Co/Wertheim)

zum Filtrieren und Entgasen der Eluenten für die Säulenchromatographien

pH-Meter:

E 603 mit Standard-Glaselektrode Deutsche Metrohm (Filderstadt)

Thermoblock:

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

Zentrifugen:

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

Eppendorfkühlzentrifuge Z 382 K, Hermle (Gosheim)

Kühlzentrifuge Sorval Superspeed RC-2B und RC-5B mit den Rotoren GSA, GS-3

und SS-34 (DuPont Instruments/Bad Homburg)

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

Elektrophoresekammern:

H6 "Baby Gel", Gibco BRL (Eggenstein) mit Spannungsquelle LKB-GPS 200/400 (Pharmacia/Freiburg) zur SDS-PAGE

Elektrophoreseapparatur Appligene 210 mit Spannungsquelle LKB-GPS 200/400, Pharmacia Biotech (Freiburg)

Bildaufzeichnung:

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

Spektralphotometer:

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

Bradfordbestimmung mit 1/2 Mikro-Plastikküvetten (ratiolab)

Fluorimeter:

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

PCR-Maschine:

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

Elektroporator:

Gene Pulse mit Pulse Controller (Biorad, München)

Sequenzieranlage:

PrismTM 377 DNA Sequenzer, Perkin-Elmer-Applied Biosystems Inc. (Weiterstadt)

Thermostatisierung:

Schüttelinkubator Psycrotherm, New Brunswick Scientific Corp. (New Brunswick,

N.J., USA)

Brutschrank:

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

Ultraschallgerät:

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

Anlage zur analytischen Hochleistungsflüssigkeitschromatographie:

Knauer HPLC PUMP 64 (Knauer, Bad Homburg)

Fluoreszenz HPLC-Monitor RF-530 (Shimazu, Duisburg)

automatischer Probengeber AS-100 HPLC Automatic Sampling System (Biorad,

München)

reverse Phase Nucleosil 10 C₁₈-Säule (4 x 250 mm)

2-Kanal-Kompensationsschreiber (Knauer, Bad Homburg)

Anlage zur präparativen Hochleistungsflüssigkeitschromatographie:

präparatives HPLC-System 830 (Du Pont, Bad Nauheim)

Fluoreszenz HPLC-Monitor RF-530 (Shimazu, Duisburg)

UV-Spektrophotometer (Du Pont Instruments, Bad Nauheim)

Reverse Phase Nucleosil 10C₁₈-Säule (20x150 mm)

2-Kanal-Kompensationsschreiber (Philips)

NMR-Spektroskopie:

AM 360 FT-NMR-Spektrometer (Bruker, Heidelberg)

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

Chromatographische Proteinreinigung:

Komplettsysteme Hi Load oder Piccolo (Pharmacia Biotech, Freiburg)

2.2 Chemikalien

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

D₂O 99,9 % ig wurde von MSD-Isotopes (Montreal, CDN) bezogen. Das Palladium, 10 % auf Aktivkohle, wurde von der Firma Degussa (Frankfurt) erhalten. Das 2,3,-Dichloro-

1,1,1,4,4,4-hexafluoro-2-buten wurde von der Firma Lancaster (Morecamp, GB) verwendet.

2.3 Extinktionskoeffizienten

Tabelle 1: Extinktionskoeffizienten der verwendeten Substrat- und Produktanaloga der Riboflavi	n
Synthase bzw. von Substrat und Produkt selber.	

Verbindung	pH-Wert	λ	3	Literatur
		[nm]	$[M^{-1}cm^{-1}]$	
Riboflavin	7	470	9100	Plaut & Harvey
	1	445	11500	Cresswell&Wood
	7	115	12500	1960 Whithy
	7	443	12300	1953
6,7-Dimethyl-	1	410	10300	Plaut & Harvey
8-ribityllumazin				1971
6,7-Bis(trifluormethyl)-	1	339	7943	Cushman et al.
8-ribityllumazin (Epimer A)				1991
6,7-Bis(trifluormethyl)-	1	341	7079	Cushman et al.
8-ribityllumazin (Epimer B)				1991
6-Trifluormethyl-	1	341	12300	Cushman et al
7-oxo-8-ribityllumazin	1	541	12300	1992
5-Amino-6-ribitylamino-	1	268	24500	Plaut&Harvay
2,4(1H,3H)-pyrimidindion	1	200	24300	1971
5 Nitro-6-ribitylamino-				
2 1(1H 2H)_nyrimidindion	1	323	14200	Cresswell&Wood
2,4(11,31)-pyrimainaion				1300
5 Nituago 6 vikitularring				
3-INITOSO-0-FIDITYIAMINO-	7	313	17300	Winestock&Plaut
2,4(1H,3H)-pyrimiainaion				19/1

2.4 Synthesen

2.4.1 6,7-Bis(trifluormethyl)-8-(D-ribityl)lumazin-7-hydrat (Epimere)

2.4.1.1 Hexafluorbiacetyl

In einem Dreihalskolben (250 ml) wurde rauchende Chromschwefelsäure durch Zugabe von Chrom(VI)oxid (23 g, 155 mmol) zu einer Mischung aus rauchender Schwefelsäure (50 ml, 60 % SO₃) und konzentrierter Schwefelsäure (35 ml) vorgelegt. Zur Ableitung der gasförmigen Produkte wurde ein mehrstufiges Kühlsystem bestehend aus einem Luftkühler (15 cm Glasrohr), einer gekühlten kleinen Vorlage (30 ml Methanol/Trockeneis), einer Kühlfalle (flüssiger Stickstoff), einer leeren und einer mit wässriger Natronlauge (0,1 M) gefüllten Waschflasche angebaut. Zur auf 70 °C erwärmten, rauchenden Chromschwefelsäure wurden binnen 2 h 15 ml 2,3-Dichlor-1,1,1,4,4,4-hexafluor-2-buten (22 g, 94 mmol) getropft und 2,5 h weitergerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurden aus der braunen Lösung durch einen mehrstündigen Stickstoffstrom und Erwärmung auf 75-80 °C die Produkte Hexafluorbiacetyl (Sdp.65 °C) und Chlor in das Kühlsystem überführt. Das gelbe Rohprodukt der in ersten Vorlage wurde durch fraktionierte Destillation gereinigt (Mikrodestillationsapparatur mit 5 cm Vigreux-Kolonne, Vorlagekolben gekühlt mit Aceton/Trockeneis). Die gelbe Produktfraktion wurde durch Sublimation am Hochvakuum (0,1 Torr, max. 1 min) endgereinigt und bei -18 °C gelagert.

Ausbeute: 6,1 g (31 mmol, 33 %)

2.4.1.2 6-Chloruracil

67 g NaOH Plätzchen und 670 ml Wasser wurden in einem 21 Einhalskolben mit 50 g 2,4,6-Trichlopyrimidin gemischt. Das Gemisch wurde auf einem Heizpilz ca. 3 h unter Rückfluß gekocht, bis sich die ölige Flüssigkeit in der Natronlauge gelöst hat. Zu der heißen Lösung wurden 160 ml konzentrierte HCl hinzugegeben, wobei das 6-Chloruracil ausfällt. Die Suspension wurde über das Wochenende stehengelassen und das Produkt anschließend abfiltriert. Das 6-Chloruracil wurde über KOH im Exsikator getrocknet, wobei ein weißes Pulver entstand.

Ausbeute: 40g (272 mmol)

2.4.1.3 N-Benzyl-D-ribitylamin

D-Ribose (81 mmol, 12,2 g) und Benzylamin (9 ml, 82 mmol) wurden in 100 ml Methanol gelöst und 24 h gerührt. Nach Zugabe von 350 mg Platin(IV)oxid (2 Mol-%) wurde die Lösung mit H₂ bei Normaldruck und RT über Nacht hydriert. Die Suspension wurde über Celite 645 filtriert und am RV auf 35 ml eingeengt. Durch Zugabe von 110 ml Essigsäureethylester/Ethanol (3:1, v:v) umkristallisiert. Ausbeute: 12,5 g (52 mmol, 64 %)

¹H NMR (D₂O, 200 MHz): δ (ppm) 2,69 (dd, ²J 12,7 Hz, ³J 8,4 Hz, 1H), 2,87 (dd, ²J 12,7 Hz, ³J 3,5 Hz, 1H), 3,3-3,9 (m, 7H), 7,4 (m, 5H) ¹³C NMR (D₂O, 50 MHz): δ (ppm) 52,1 (C-Bz), 55,1 (C1), 65,4 (C5), 72,9; 74,6; 76,5 (C2, C3, C4), 130,2; 131,3; 141,6 (C-Ar)

2.4.1.4 D-Ribitylamin

12,5 g N-Benzyl-D-ribitylamin (52 mmol) wurden in 150 ml Methanol über ca. 320 mg Palladium auf Aktivkohle (1:10 w:w) bei Raumtemperatur 40 h mit Wasserstoff (1 bar) hydriert. Der Katalysator wurde über Celite 645 vom Produkt abgetrennt. Das klare Filtrat wurde am Rotationsverdampfer eingeengt, bis ein klares viskoses Öl übrigblieb, das zur Kristallisation neigt.

Ausbeute: 6,8 g (45 mmol)

¹H NMR (D₂O, 200 MHz): δ (ppm) 2,68 (dd, ²J 13,5 Hz, ³J 8,0 Hz, 1H), 2,88 (dd, ²J 13,5 Hz, ³J 3,2 Hz, 1H), 3,58-3,85 (m, 5H) ¹³C NMR (D₂O, 50 MHz): δ (ppm) 45,0 (C1), 65,2 (C5), 74,8, 75,3, 76,9 (C2,C3,C4)

2.4.1.5 5-Nitroso-6-ribitylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidindion

Eine Lösung von 6-Chloruracil (2,0 g, 13,6 mmol) und D-Ribitylamin (4 g, 26,7 mmol) in 80 ml Wasser wurde 24 h unter Rückfluß gekocht. Nach Abkühlung auf 10 °C mit einer

Eis/Kochsalzmischung wurde Natriumnitrit (3,12 g, 43,8 mmol) zugegeben und die Lösung mit verdünnter Essigsäure auf pH 4,6 angesäuert. Die tiefrot verfärbte Lösung wurde 30 min im Eisbad und 1 h bei RT gerührt, auf 15 ml eingeengt und in Ammoniak (80 ml, 3 N) aufgenommen. Zur Abtrennung des Produktes wurde die Lösung auf eine mit Wasser equilibrierte Dowex-Säule (1x8, Formiat-Form, 0,9x22 cm) aufgetragen. Anschließend wurde erst mit Wasser und dann mit 50 mM Ameisensäure gewaschen, bis das gelbe Eluat aufklarte. Das weinrote Produkt wurde mit 120 mM Ameisensäure eluiert, auf wenige ml eingeengt und bei +4 °C gelagert. Die ausgefallenen orangen Kristalle wurden gesammelt und über Phosphorpentoxid getrocknet.

Ausbeute: 2,8 g (5,6 mmol)

UV (H₂O, pH 1): 226nm (21600); 256 nm (11700); 314 nm (17600)

¹H NMR (D₂O, 200 MHz): δ (ppm) 3,56 (dd, ²J 14,3 Hz, ³J 7,4 Hz, 1H), 3,60-3,90 (m, 5H), 3,95-4,04 (m, 1H)

¹³C NMR (D₂O, 50 MHz): δ (ppm) 44,8 (C1´); 65,2 (C5´); 72,5, 74,8, 75,4 (C2´, C3´, C4´);141,7 (C5, d, ¹J_{CN} 3,2 Hz); 158, 161,9 (C2,C4); 168,4 (C6, d, ²J_{CN} 8,8 Hz)

2.4.1.6 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1H;3H)-pyrimidindion (HCl-Salz)

5-Nitroso-6-ribitylamino-2,4(1H;3H)-pyrimidindion (3,0 g, 10,3 mmol) wurde in 10 ml 30 mM Salzsäure suspendiert und bei RT an Palladium auf Aktivkohle (50 mg, 10 %, w:w) über Nacht hydriert. Unter Stickstoff wurde der Katalysator über Celite 645 abfiltriert, das klare Filtrat bis zur Trockne lyophylisiert und am Hochvakuum getrocknet. Ausbeute: ca. 2,7 g (8,6 mmol, 83 %)

2.4.1.7 6,7-Bis(trifluormethyl)-8-(D-ribityl)lumazin-7-hydrat (Epimere)

Zu 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidindion (2,7 g, 8,6 mmol) wurde Hexafluorbiacetyl (1,6 g, 8,2 mmol) in 7 ml absolutem Dimethylformamid gegeben und unter Luft- und Lichtausschluß 24 h gerührt. Das Lösungssmittel wurde am Hochvakuum entfernt und der rotbraune Rückstand in 20 ml Wasser durch Erwärmung mit einem Fön (4 min) gelöst. Die gelbe Lösung wurde über basisches Aluminiumoxid, das mit 100 mM Salzsäure vorequilibriert war, filtriert. Durch Zugabe von Ameisensäure wurde das Eluat auf pH 4 angesäuert und das Epimeren-Gemisch durch präparative HPLC getrennt.

¹⁹F NMR (10 % D₂O, pH 7,0 338 MHz): Epimer A: δ (ppm) 12,3 (q, ⁵J 6.8 Hz, 6α-CF₃); -8,0 (q, ⁵J 6,8 Hz, 7α-CF₃); Epimer B: δ (ppm) 12,3 (q, ⁵J 6.8 Hz, 6α-CF₃); -7,2 (q, ⁵J 6,8 Hz, 7α-CF₃)

2.4.2 6-Trifluormethyl-7-oxo-8-(D-ribityl)lumazin

Aus stark verdünnten Mischfraktionen der Epimerentrennung, für die sich eine Rechromatographie nicht lohnte, wurde durch basenkatalysierte Haloform-Reaktion eine kleine Menge an 6-Trifluormethyl-7-oxo-8-ribityllumazin gewonnen. Dazu wurde der pH-Wert des Epimerengemisches mit Phosphatpuffer auf pH 8 eingestellt und die Lösung bei 55 °C inkubiert. Der Fortschritt der Haloform-Eliminierung wurde mittels analytischer HPLC verfolgt. Nach 4 h wurde die gelbe Lösung am Rotationsverdampfer aufkonzentriert und zur Entsalzung über eine Nucleosil RP-10C₁₈ Kartusche filtriert.

¹⁹F-NMR (10 % D₂O, pH 7,0 338 MHz): δ (ppm) 7,8 (s, 6α-CF₃)

2.5 Bakterienstämme

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

 Tabelle 2: Genotyp der verwendeten Bakterienstämme.

Stamm	Genotyp	Literatur
XL1-Blue	recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1 lealE($proAB$ leal $^{19}ZAM15$ Tr10(tet ⁵)]	Bullock et al., 1987
	$[\text{relat, lac}[\mathbf{F}, \text{proad, lace} Z\Delta \text{WIIS, IIII0(let)}]$	
M15[pREP4]:	lac, ara, gal, mtl, recA ⁺ , uvr ⁺ , [pREP4: lacI, kan ^r]	Zamenhof et al., 1972

2.6 Expressionsvektor

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

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



Abb. 12: In der Arbeit verwendetes Expressionsplasmid pNCO113. P: T5-Promotor; lacO: lac-Operator; S/D: Shine-Dalgarno-Sequenz, bildet zusammen mit dem ATG-Start-Codon die Ribosomale Bindungsstelle; MCS: Multiple Cloning Site; to und t1: Terminatorsequenzen; (cat): nicht aktives Gen der Chloramphenicolacetyltransferase Ampicillin-Resistenzgen; (Leserahmenverschiebung); AmpR.: Ori:ColE1: Replikationsursprung

2.7 Molekularbiologische Methoden

2.7.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus E. coli

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

2.7.1.1 Schnellisolierung mit Hitzeschock

Für die Schnellisolierung von Plasmid-DNA wurde die Methode von (Holmes & Quigley, 1981) in abgewandelter Form verwendet. Bei high-copy Plasmiden konnten dabei bis zu 10 µg saubere Plasmid-DNA gewonnen werden. Durch Verwendung von 1 % Triton X 100 anstelle von 1 % SDS konnte die Lagerstabilität des STET-Puffers erhöht werden.

5 ml LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika wurden mit dem plasmidhaltigen *E. coli*-Stamm angeimpft und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln bebrütet. Das Zellmaterial wurde am nächsten Tag abzentrifugiert (4000 U/min, RT, 8 min) und in 300 μ l STET-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 10 μ l Lysozymlösung (10 mg/ml entionisiertem Wasser) wurde 30 Sekunden bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 90 Sekunden im Wasserbad gekocht.

Unlösliche Zellbestandteile, Proteine und chromosomale DNA wurden durch Zentrifugation (15000 U/min, 15 min, RT) entfernt. Der DNA-haltige Überstand wurde abdekantiert und mit 200 μ l Isopropanol die DNA ausgefällt. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde erneut zentrifugiert (15000 U/min, 15 min, RT). Der Überstand wurde verworfen, der Rückstand 2x mit je 170 μ l eiskaltem Ethanol (70 %) gewaschen, 5 min in der Vakuumzentrifuge getrocknet und in 20 μ l bidestilliertem Wasser aufgenommen.

STET-Puffer:

50 mM Tris/HCl pH 8.0 10 mM EDTA 8 % (w/v) Saccharose 5 % (w/v) Triton X-100
2.7.1.2 Plasmidisolierung mittels modifizierter Alkali/SDS-Methode

Mit dieser Methode (Birnboim & Doly, 1979) konnten größere DNA-Mengen - bis zu 150 µg - isoliert werden. Die erhaltene DNA war deutlich sauberer als die der Minipräparation und konnte ohne weitere Reinigungsschritte zur DNA-Sequenzierung eingesetzt werden.

Das abzentrifugierte Zellmaterial aus 150 ml Übernacht-Kultur wurde in 5 ml S1-Puffer suspendiert. Nach Zugabe von 5 ml S2-Puffer und vorsichtigem Mischen wurde die Probe für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 5 ml S3-Puffer zugesetzt und die Lösung für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Unlösliche Zelltrümmer und Proteine wurden durch Zentrifugation (14000 U/min, 4 °C, 30 min) entfernt. Der verbliebene Überstand wurde auf eine, mit 3 ml N2-Puffer äquilibrierte, Anionenaustauschsäule Nucleobond AX100 (Machery und Nagel) gegeben. Die Säule wurde zweimal mit je 2 ml N3-Puffer gewaschen. Die Plasmid-DNA wurde anschließend mit 3 ml N5-Puffer eluiert, unter Zusatz von 2 ml Isopropanol gefällt und abzentrifugiert (13000 U/min, 19 °C, 20 min). Nach Trocknung in der Vakuumzentrifuge wurde die DNA in 100-200 µl bidestilliertem Wasser aufgenommen.

S1-Puffer:	50 mM Tris/HCl 10 mM EDTA 100 μg Rnase A/ml
S2-Puffer:	200 mM NaOH 1 % SDS
S3-Puffer:	2,8 M Kaliumacetat, pH 5.2
N2-Puffer:	100 mM Tris/Phosphat, pH 6.3 0,9 M KCl 15 % (v/v) Ethanol
N3-Puffer:	100 mM Tris/Phosphat, pH 6.3 1,3 M KCl 15 % (v/v) Ethanol
N5-Puffer:	100 mM Tris/Phosphat, pH 8.0 1,3 M KCl 15 % (v/v) Ethanol

2.7.2 Reinigung von DNA-Fragmenten

Die Reinigung von DNA aus PCR- oder Restriktionsansätzen wurde unter Verwendung von QuiaQuick-Säulchen (Quiagen, Hilden) durchgeführt. Die DNA-Lösung wird bei dieser Methode mit einem chaotropen Salz (Solubilization-Buffer mit pH-Indikator) zur Zerstörung der DNA-Hydrathülle versetzt, so daß eine Bindung der DNA an die Silicagel-Membran möglich wird. Die Elution der DNA erfolgt, nach Entfernen der Salzlösung mit einem speziellen Waschpuffer (Wash-Buffer), mit Wasser.

2.7.2.1 Direkte Reinigung von PCR-Fragmenten (ohne Agarosegelelektrophorese)

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

2.7.2.2 Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Restriktions- oder PCR-Ansätze wurden zunächst mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und die DNA durch Färbung mit Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht. Die betreffenden Banden wurden mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten, das Gelstück wurde in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß überführt und mit Solubilization-Buffer bis zur 2 ml Marke aufgefüllt. Nach Aufschmelzen (55 °C, ca. 10 min) des Gelstückes wurde wie unter Punkt 2.7.2.1 beschrieben verfahren.

2.7.3 Agarosegelelektrophorese

Agarose-Gelsysteme dienen sowohl zur Trennung und Analyse von linearen DNA-Fragmenten und superhelicaler Plasmid-DNA als auch zur präparativen Isolierung von DNA-Fragmenten. Durch Variation der Agarosekonzentration lassen sich Fragmente im Bereich von 60-0.05 kb elektrophoretisch auftrennen. Als Längenstandards werden DNA-Molekular-Gewichtsmarker verwendet, deren Fragmentgrößen bekannt sind. Durch Auftrag der Laufstrecke der Fragmente vom Auftragungsort aus gegen den Logarithmus der Fragmentgröße wurde eine Eichkurve erhalten, mit deren Hilfe die Größe unbekannter Bruchstücke bestimmt werden kann. Als Molekulargewichtsstandard wurde ein Leitermarker der Firma peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen) verwendet (peqGold DNA-Leiter für Fragmentgrößen zwischen100 und 10000 bp).

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

TAE-Puffer (50x):	2,0 M Tris/Acetat pH 8,2 0,1 M EDTA
Probenpuffer für Agarosegelelektrophorese:	50 % (v/v) Glycerin 0,25 % (w/v) Bromphenolblau 0,25 % (w/v) Xylenblau in TE-Puffer gelöst

2.7.4 DNA-Konzentrationsbestimmung

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

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

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

2.7.5 Herstellung kompetenter E. coli Zellen und Transformation

2.7.5.1 Kompetente Zellen nach Hanahan

Zur Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen wurde die Methode nach (Hanahan, 1983) verwendet. Mit dieser Methode konnten Transformationsraten von 10^6 bis 10^7 Kolonien pro μ g "supercoiled Plasmid-DNA" erreicht werden.

Für die Herstellung kompetenter Zellen wurden 200 ml LB-Medium (mit Antibiotikazusätzen je nach Zelltyp) mit 2 ml Übernacht-Kultur angeimpft und bei 37 °C im Schüttelinkubator (200 U/min) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 bebrütet. Nach Zentrifugation (2300 U/min, 30 min, 4 °C) wird der Rückstand in 100 ml RF1-Puffer aufgenommen. Nach 15 min Inkubation auf Eis wird erneut zentrifugiert (2300 U/min, 30 min, 4 °C), der Rückstand in 10 ml RF2-Puffer suspendiert und weitere 15 min auf Eis inkubiert. Die kompetenten Zellen wurden in Cryo-Gefäße zu 0,85 ml portioniert und zur Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff eingefroren.

RF1-Puffer:	100 mM RbCl 50 mM MnCl ₂ *4 H ₂ O
	30 mM K-Acetat 10 mM CaCl ₂ * 2 H ₂ O
	15 % (v/v) Glycerin pH 5,8 mit Essigsäure eingestellt und sterilfiltriert
RF2-Puffer:	10 mM MOPS 10 mM RbCl 75 mM CaCl ₂ * 2 H ₂ O 15 % (v/v) Glycerin pH 6,8 mit NaOH eingestellt und sterilfiltriert

2.7.5.2 Transformation mit kompetenten Zellen nach Hanahan

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

2.7.5.3 Herstellung von elektrokompetenten Zellen

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

Mit 20 ml Vorkultur, die nicht länger als 16 h bei 30 °C bebrütet wurde, wurden 400 ml LB-Medium angeimpft. Sobald die Kultur eine optische Dichte von 0,5-0,7 (bei 600 nm) erreicht hatte, wurde sie 15 min lang auf Eis gestellt. Danach wurden die Zellen in einem auf 4 °C vorgekühlten Sorvall-GS3-Rotor bei 4000 U/min abzentrifugiert. Der Überstand wurde möglichst vollständig abdekantiert und der Rückstand in 500 ml 10% iger eiskalter, steriler Glycerinlösung resuspendiert, anschließend wie oben zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Dieser Schritt wurde noch zweimal wiederholt, wobei einmal 250 ml bzw. 10 ml der obigen Lösung eingesetzt wurden. Dann wurde nochmals wie oben zentrifugiert, der Überstand verworfen und der Rückstand in einem endgültigen Volumen von 1 ml 10 % iger eiskalter, steriler Glycerinlösung suspendiert. Die Suspension wurde in Cryo-Gefäßen zu 0,4 ml portioniert und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Transformationsrate betrug ca. 10^6 Transformanden/µg DNA.

2.7.5.4 Elektroporation elektrokompetenter Zellen

Einstellungen der Elektroporationsapparatur:

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

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

SOC-Medium:	20 g Caseinhydrolysat
	5 g Hefeextrakt
	10 mM NaCl
	2,5 mM KCl
	10 mM MgCl_2
	10 mM MgSO_4
	20 mM Glucose

2.7.6 In vitro-Amplifikation von DNA mittels PCR

Die von (Mullis et al., 1986; Mullis & Faloona, 1987) entwickelte Methode zur Vervielfältigung von DNA wurde zur Amplifikation und Gentotalsynthese der Ziel-DNA sowie zur Analyse von Bakterienklonen verwendet.

2.7.6.1 Standard-PCR

Für einen präparativen PCR-Ansatz (100 µl) wurden 10 ng Matrizen-DNA, je 100 pmol Primer und 1 U Taq-DNA-Polymerase (Eurogentec, Seraing, Belgien) aus *Thermus aquaticus* eingesetzt. Zusätzlich wurden 2,5 mM Magnesiumionen (MgCl₂) zugesetzt, da es sich bei der Taq-Polymerase um ein magnesiumabhängiges Enzym handelt. Folgendes Pipettierschema wurde für den Ansatz verwendet:

```
10 \mul Taq-Puffer
6 \mul Mg<sup>2+</sup> (2,5 mM)
4 \mul dNTP's (je 200 \muM)
1 \mul Primer I (100 pmol)
1 \mul Primer II (100 pmol)
1 \mul Matrizen-DNA
71,5 \mul H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>
1 \mul TAQ-Polymerase (1 U)
```

Die Amplifikation der DNA wurde im Thermocycler (GeneAmp® PCR-System 2400; Perkin Elmer) bei folgenden Standardbedingungen durchgeführt:

5,0 min bei 95 °C
 0,45 min bei 95 °C
 0,45 min bei 50 °C
 0,45 min bei 50 °C
 0,45 min bei 72 °C
 7,0 min bei 72 °C
 abkühlen auf 4 °C

Die Schritte 2. - 4. wurden 30 x wiederholt.

2.7.6.2 Gentotalsynthese

Um bei der mehrstufigen Gensynthese den Einbau unkorrekter Nucleotide zu minimieren, wurde die EXT-Polymerase verwendet, welche über eine "proofreading"-Aktivität verfügt. Die Schritte 1-5 der Gentotalsynthese wurden nach folgendem Pipettierschema durchgeführt:

- 1. 10 µl EXT-Puffer
- 2. $8 \mu l dNTP's$ (je 200 μM)
- 3. 1µl Oligonucleotid I (100 pmol)
- 4. 1 µl Oligonucleotid II (100 pmol)
- 5. 1 µl EXT-Polymerase (1 U)
- 6. 79 μ l H₂O_{bidest}

Auch im Falle der Gentotalsynthese betrug das Gesamtvolumen in jedem Ansatz 100 μ l. Alle anderen Standardkomponenten wurden in der gleichen Konzentration eingesetzt, wie in den Standard-PCR-Reaktionen unter 2.7.6.1.

Das Reaktionsschema im Thermocycler für PCR 1.-3. sah wie folgt aus:

5,0 min bei 95 °C
 0,30 min bei 94 °C
 0,48 min bei 48 °C
 0,30 min bei 72 °C
 abkühlen auf 4 °C

Bei PCR 4. und 5. wurde folgendes Programm im Thermocycler verwendet:

- 5,0 min bei 95 °C
 0,30 min bei 94 °C
 0,30 min bei 48 °C
- 4. 0,45 min bei 72 °C
- 5. 7 min bei 72 °C
- 6. abkühlen auf 4 °C

Die 6. und letzte PCR zur Vervollständigung des Gens wurde nach Standardbedingungen mit Taq-Polymerase, wie in Abschnitt 2.7.6.1 durchgeführt.

2.7.6.3 PCR-Screening

Das PCR-Screening dient der schnellen Analyse des Genotyps von Bakterienkolonien und verwendet das unaufgeschlossene Zellmaterial einer Kolonie auf Agarplatten als Matrize.

Diese Methode wurde angewand, um über Nacht angewachsene Transformationskolonien auf das Vorhandensein des klonierten Transgens hin zu überprüfen. Die gewünschten Kolonien wurden mit einem sterilen Zahnstocher angestochen und im PCR-Gefäß in vorgelegtem PCR-Mix suspendiert (Clackson et al., 1991).

38

Die Bakterienzellen werden während der ersten Runde der PCR bei 95 °C thermisch lysiert und geben die Matrize der Reaktion, die Plasmid-DNA frei. Pro PCR-Gefäß wurden 30 µl PCR-Mix vorgelegt und durch Drehen des Zahnstochers mit den absorbierten Zellen wurde diese im Reaktionsgefäß suspendiert. Nach erfolgtem Eintauchen des Zahnstochers in die PCR-Lösung wurden Kopien von den jeweiligen Transformanden (durch Einstechen des Zahnstochers auf einer LB-Platte) angelegt. Dieses Vorgehen erlaubte später ein gezieltes Rückgreifen auf den zuvor analysierten Klon. Die PCR wurde unter Standardbedingungen durchgeführt.

Screeningstammlösung für 24 Proben: (PCR-Mastermix) 80 μl Taq-Puffer
48 μl MgCl₂ (25 mM)
64 μl dNTP's (je 200 μM)
10 μl Oligonucleotid I (100 pM)
10 μl Oligonucleotid II (100 pM)
10 μl Taq-Polymerase (1 U)
578 μl H₂O_{bidest}

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

0,01 % (w/v) Tween 20

15 mM MgCl₂

2.7.7 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Die Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen wurde nach den vom Hersteller angegebenen Bedingungen mit den mitgelieferten Puffer-10x-Konzentraten durchgeführt. Dazu wurde im allgemeinen folgender Ansatz verwendet:

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

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

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

2.7.8 Ligation von DNA-Fragmenten

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

Zur Ligation wurden 20 -100 fmol Plasmid-DNA und ein 2-5 facher molarer Überschuß an Insert-DNA in Wasser vorgelegt. Nach 10 minütiger Inkubation im Wasserbad (bei 55 °C) und anschließender 5 minütiger Eiskühlung wurden Ligasepuffer und T4-DNA-Ligase (beides von Gibco-BRL, Eggenstein) zugesetzt und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

2.7.9 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA wurde nach der Kettenabbruchmethode von (Sanger et al., 1977) mit markierten Terminatoren und mutagenisierter Taq-DNA-Polymerase durchgeführt. Dabei wurden die Komponenten des "Thermo sequenase dye terminator cycle sequencing pre-mix kit" (Amersham Life Science, Cleveland, USA) verwendet.

Der Sequenzieransatz enthielt 1 μ g Plasmid-DNA, 10 pmol Primer, 1 μ l DMSO und 11 μ l Terminator PremixTM (dNTP's, markierte ddNTP's und Taq-DNA-Polymerase in einem

Endvolumen von 21 μ l. Da die markierten ddNTP's lichtempfindlich sind, sollte möglichst schnell und unter Ausschluß von Licht gearbeitet werden.

Die Reaktion wurde mit folgendem Programm durchgeführt:

25 Zyklen:
1. 30 s bei 96 °C (Denaturierung der DNA)
2. 15 s bei 45 °C (Hybridisierung des Primers)
3. 4 min bei 60 °C (Vermehrung der DNA)

Nach Beendigung der Reaktion wurde des 21 µl Reaktionsansatz in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß transferiert, in dem 7 µl NH₄OAC (7,5 M) und 68 µl 100 % Ethanol vorgelegt waren. Nach dem Mischen wurde 10 min auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert (13500 U/min, 19 °C, 30 min). Der Überstand wurde verworfen, der Rückstand in der Vakuumzentrifuge getrocknet und in 4 µl DMF-Auftragspuffer aufgenommen. Die DNA wurde durch Erhitzung für 2 min auf 90 °C denaturiert und anschließend sofort auf Eis gekühlt. 1,5 µl dieser Proben wurden dann auf ein 4,75 %iges Polyacrylamid-Sequenziergel aufgetragen. Zur Erstellung des Sequenziergels wurden 13,3 ml UltraPureSequagelTM-Sequencing-System-Diluent vermischt und mit einer Spatelspitze von Amberlite MB-1 entionisiert. Die Suspension wurde anschließend filtriert (0,2 µm Filter) und 7 ml UltraPureSequagelTM-Sequencings-System-Puffer zugegeben. Nachdem 10 min unter Wasserstrahl-Vakuum entgast worden wurden 210 war, ul einer 10 %igen Ammoniumperoxodisulfat-Lösung und 25 µl TEMED zugegeben und in einen vorbereiteten Gelträger gegossen.

Die Auftrennung der markierten DNA-Fragmente erfolgte in TBE-Puffer über einen Zeitraum von 7 h auf einem PrismTM-377-DNA-Sequencer von Perkin-Elmer-ABI (Weiterstadt).

TBE-Puffer (10x):

1 M Tris-Base 0,85 M Borsäure 10 mM EDTA, pH 8,3

2.8 Stammhaltung und proteinchemische Methoden

2.8.1 Kulturmedien

 Tabelle 3: Es werden die verschiedenen Medien mit ihrer Zusammensetzung angegeben. Die Rezepturen beziehen sich auf 11 Gesamtvolumen.

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

Die Kulturmedien wurden nach den in der Tabelle 3 aufgeführten Rezepturen hergestellt und bei 120 °C und ca. 1.5 bar für 25 min autoklaviert. Für LB-Platten wurden vor dem Autoklavieren zusätzlich 12 g/l Agar zugegeben. Die Antibiotikalösungen wurden dem auf ca. 50 °C abgekühltem Medium zugegeben.

2.8.2 Stammhaltung

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

2.8.3 Kulturbedingungen

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

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

Expressionsstämme wurden bis zu einer OD_{600} von 0,6 bebrütet und dann die Bildung des Zielproteins mit IPTG in einer Konzentration von 2 mM induziert. Bei *E. coli* XL1-Blue und M15 Stämmen erfolgte anschließend eine vierstündige Inkubation bei 37 °C.

Nach der Fermentation wurden die Zellen mittels Zentrifugation (5000 U/min, 10 min, 4°C) geerntet, mit 0,9 %iger Saline (20 % des Volumens der Hauptkultur; Saline: 0,9 % NaCl-Lsg.) und bei -20 °C bis zu einer weiteren Verwendung gelagert.

2.8.4 Zellaufschluß mit Ultraschall zur Proteingewinnung

Zellrückstände aus *E. coli* Kulturen wurden durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. Zum Aufschluß wurden die gewaschenen Zellen in 800 µl Aufschlußpuffer suspendiert und auf 4 °C gekühlt. Die Zellsuspension wurde dann 8 s mit der Nadel des Ultraschallgerätes bei Stufe 4,5 behandelt. Nach 5 minütiger Eiskühlung wurde die Ultraschallbehandlung wiederholt. Anschließend wurde unlösliches Protein und Zellmembranbestandteile abzentrifugiert (13000 U/min, 10 min, 4 °C) und mit dem Überstand (Rohextrakt) weitergearbeitet.

Aufschlußpuffer:	50 mM K-Phosphat pH 7,0
_	10 mM EDTA
	$10 \text{ mM } \text{Na}_2 \text{SO}_3$
	0,3 mM PMSF

2.8.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Es wurde eine denaturierende Polyacrylamidelektrophorese nach Laemmli, 1970 durchgeführt. Routinemäßig wurden Gele mit 4 % Acrylamid im Sammelgel und 15 % Acrylamid im Trenngel angefertigt.

Trenngel (15 %): Das Trenngel wurde aus 3,75 ml 40 %ige Acrylamidlösung, 2,5 ml Trenngelpuffer, 3,75 ml bidestilliertem Wasser, 50 µl 10 %iger Ammoniumperoxodisulfat-Lösung und 5 µl Tetramethyletylendiamin (TEMED) hergestellt.

Sammelgel (4 %): Zur Herstellung des Sammelgels wurden 0,4 ml 40 %ige Acrylamidlösung, 2,5 ml Sammelgelpuffer, 2,1 ml bidestilliertem Wasser, 50 μl 10 %iger Ammoniumperoxodisulfat-Lösung und 5 μl TEMED vermischt.

Probenvorbereitung: Die Rohextrakte wurden 1:3 mit 2x-Sample-Puffer verdünnt und 10 min. gekocht. Nach dem Abkühlen wird zentrifugiert (14000 U/min, 1 min, RT) und 8 µl des klaren Überstandes werden auf das Sammelgel aufgetragen.

Als Proteinstandard diente Dalton Mark VII-L von Sigma (Deisenhofen) mit Proteinbanden bei 66, 40, 36, 28, 24, 20 und 14 kDa.

Die Elektrophorese wurde bei konstant 30 mA je SDS-Gel durchgeführt.

Zur Anfärbung wurde das Gel für 1 Stunde mit Färbelösung inkubiert. Mittels der Entfärbelösung, die zweimal gewechselt wurde, erfolgte die Entfärbung des Gelhintergrundes innerhalb von 2 h.

Sammelgelpuffer:	0,25 M Tris/HCl pH 6,8 0,2 % SDS
Trenngelpuffer:	1,5 M Tris/HCl pH 8,3 0,4 % SDS
Acrylamidlösung (40 %):	40 % (w/v)Acrylamid 3 % (w/v) N,N`-Methylenbisacrylamid
Ammoniumperoxo-	
disulfat-Lsg:	10 % (w/v) in $H_2O_{bidest.}$

Elektrophoresepuffer:	25 mM Tris pH 8,3 192 mM Glycin 0,1 % SDS
2x-Sample-Puffer:	6 % 2-Mercaptoethanol 10 % Glycerin 6 % (w/v) SDS 0,05 % Bromphenolblau 0,062 M Tris/HCl, pH 6,8
Färbelösung:	0,2 % (w/v) Coomassie Blue R 250 40 % Methanol 10 % Eisessig
Entfärbelösung:	50 % Methanol 10 % Eisessig

2.8.6 Test auf Flavokinase-Aktivität

Die Zusammensetzung des Testansatzes im Standardenzymtest mit einem Gesamtvolumen von 150 μ l war folgendermaßen: 100 mM Tris/HCl pH 8,0; 13 mM MgCl₂; 200 μ M Riboflavin; 50 mM ATP und zwischen 2 und 10 μ l Enzymlösung. Nach 15 -30 min Inkubationszeit bei 37 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 μ l 20 %iger TCA gestoppt. Substrat und Produkte wurden mittels analytischer HPLC, wie in Abschnitt 2.10.3 beschrieben analysiert.

2.8.7 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen nach Bradford

Der Proteingehalt des Rohextraktes wurde nach einer Variante der Methode von Bradford (Bradford, 1976; Read & Northcote, 1981; Compton & Jones, 1985) bestimmt.

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

Die konzentrierten Proben wurden zunächst mit Bradfordpuffer verdünnt. Für den Testansatz wurden als Dreifachbestimmung jeweils 50 μ l verdünnte Probe mit 950 μ l Bradfordfarbstoffreagenz versetzt und 20 Minuten bei Raumtemperatur unter Lichtausschluß inkubiert. Anschließend wurde bei 595 nm gegen einen Leerwert aus 50 μ l Bradfordpuffer und 950 μ l Farbstoffreagenz die Extinktion bestimmt.

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

Bradfordpuffer:	2,0 g Na ₂ HPO ₄
	0,6 g NaH ₂ PO ₄
	7,0 g NaCl
	0.2 g NaN_3
	pro 1 Liter

2.9 Proteinpräparation

2.9.1 Flavokinase aus Schizosaccharomyces pombe

Die Reinignung der Flavokinase aus *Schizosaccharomyces pombe* erfolgte aus dem rekombinanten *E. coli* M15 (pREP4) Stamm, der das Expressionsplasmid pNCO113FkSSP trägt. 10 g feuchte Zellmasse wurden in 70 ml 20 mM Tris/HCl (pH 8,0) suspendiert und wie in Abschnitt 2.8.4 beschrieben mittels Ultraschallbehandlung aufgeschlossen.

Der so erhaltene Zellrohextrakt wurde auf eine mit 20 mM Tris/HCl Puffer (pH 8,0) equilibrierte Sepharose Q Säule (10 x 2 cm) aufgetragen. Die Säule wurde mit 350 ml des Equilibrierungspuffers gewaschen, da die Fraktionen mit Flavokinase Aktivität auf Grund des aus der Aminosäuresequenz ermittelten pI-Wertes im fortgeschrittenen Durchlauf der Säule erwartet wurden. Die Säule wurde anschließend mit 300 ml eines linearen Gradienten aus 20 mM Tris/HCl Puffer (pH 8,0) und 1 M NaCl zur Eluierung der an der Anionenaustauschersäule gebundenen Proteine des *E. coli* Rohextraktes gewaschen. Die saubersten Fraktionen mit Flavokinase Aktivität wurden vereinigt und mittels Ultrafiltration (Amicon Rührzelle; Membran 5 kDa untere Ausschlussgrenze) auf ca. 10 ml Volumen eingeegnt.

Die weitere Aufreinigung der Flavokinase und gleichzeitige Abschätzung des nativen Molekulargewichtes erfolgte mittels Gelfiltrationschromatographie. Dazu wurden pro Lauf jeweils 3–5 ml der aufkonzentrierten Proteinlösung auf eine Gelfiltrationssäule (Superdex G75; 2,6 x 60 cm), die eine Trennspanne von Proteingrößen zwischen 3-70 kDa hat, aufgetragen. Die Gelfiltrationssäule wurde mit einem Puffer aus 20 mM Tris/HCl (pH 8,0) und 100 mM NaCl equilibriert und isokratisch entwickelt. Enzymhaltige Fraktionen wurden vereinigt und durch Ultrafiltration (Amicon Rührzelle; Membran 5 kDa untere Ausschlussgrenze) aufkonzentriert.

2.9.2 Humane Flavokinase

Die Reinigung der humanen Flavokinase erfolgte aus dem rekombinanten *E. coli* XL-1 Blue Stamm, der das Expressionsplasmid pNCO113FkHs trägt. 5 g feuchter Zellmasse wurden in

35 ml 50 mM Tris/HCl Puffer (pH 7), der 2 mM DTT enthielt suspendiert und wie in Abschnitt 2.8.4 beschrieben mittels Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. Der so erhaltene Rohextrakt wurde auf eine Sepharose Q Säule aufgetragen, die mit dem Puffer; 50 mM Tris/HCl (pH 7,0), 2 mM DTT equilibriert wurde. Die Flavokinase Aktivität enthaltenden Fraktionen wurden mit kalt gesättigter Ammoniumsulfatlösung gefällt und das nach 30 minütiger Zntrifugation bei 15000 U/min erhaltene Pellet wurde in ca. 3 ml 50 mM Tris/HCl (pH 8,2), 300 mM KCl, 2 mM DTT resuspendiert, wobei die Flavokinase fast vollständig renaturiert wurde. Die Lösung blieb leicht trüb und wurde deshalb 10 min bei 17000 U/min zentrifugiert. Der klare Überstand wurde auf eine mit 50 mM Tris/HCl (pH 8,2), 300 mM KCl, 2 mM DTT equilibrierte Gelfiltrationssäule (Superdex G75; 2,6 x 60 cm) geladen und mit diesem Puffer isokratisch entwickelt. Enzymhaltige Fraktionen wurden gepoolt und mittels Ultrafiltration (Amicon Rührzelle; Membran 5 kDa untere Ausschlussgrenze) aufkonzentriert.

2.9.3 Riboflavin Synthase und deren Mutanten

Die Riboflavin Synthase aus *Escherichia coli* und deren Mutanten wurden von Dr. Boris Illarionov (TU-München) kloniert, gereinigt, kinetisch charakterisiert und mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Die Riboflavin Synthase aus *Schizosaccharomyces pombe* und deren Mutanten wurden von Dr. Markus Fischer, Dr. Boris Illarionov und Frau Dipl.-Leb.-Chem. Ann-Kathrin Schott kloniert, gereinigt, kinetisch charakterisiert und mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

2.10 Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

2.10.1 Stationäre Phasen

Analytisch:	Reverse Phase Hypersil ODS 5 μ (250 x 6 mm); Schambeck GmbH		
	(Bad Honnef)		
Analytisch:	Reverse Phase Nucleosil 10C ₁₈ (250 x 4 mm); Macherey & Nagel (Düren)		
Präparativ:	Reverse Phase Nucleosil 10C ₁₈ (250 x 20 mm); Macherey & Nagel (Düren)		

2.10.2 Mobile Phasen

Methanol für HPLC-Zwecke war rektifiziert, ebenso wurde entionisiertes Wasser nochmals destilliert. Methanol und wässrige Eluentenkomponenten wurden getrennt über ein Membranfilter filtriert, gemischt und 3 min am Ultraschall entgast. Zusatzstoffe hatten grundsätzlich analytische Qualität.

Eluent A1:	25 % Methanol (v :v), 5 mM Ammoniumacetat
Eluent A2:	19 % Methanol (v : v), 0,1 % Trifluoressigsäure
Eluent P1:	10 % Methanol (v : v), 30 mM Ameisensäure

2.10.3 Auftrennung der Reaktionsprodukte des Testes auf Flavokinase- bzw. FAD-Synthetase Aktivität

Riboflavin, FMN bzw. FAD wurden isokratisch an Säulen des Typs Reverse Phase Hypersil ODS 5 μ (250 x 6 mm) mit Eluent A1 und einer Flussrate von 2,0 ml/min aufgetrennt und fluorimetrisch quantifiziert (Anregung 470 nm; Emmission 530 nm).

FAD eluierte unter diesen Bedingungen bei einem Volumen von 6 ml, FMN bei 10 ml und Riboflavin bei einem Retentionsvolumen von 44 ml. Als Standards dienten wässrige Lösungen der käuflich zu erwerbenden Verbindungen, deren Konzentrationen bei 445 nm photometrisch bestimmt worden waren.

2.10.4 Präparative Trennung des Epimerengemisches von 6,7-Bis(trifluormethyl)-8-(Dribityl)lumazin-7-hydrat

Das Gemisch beider Epimere von 6,7-Bis(trifluormethyl)-8-ribityllumazin-7-hydrat wurde an einer Nucleosil RP $10C_{18}$ -Säule (250 x 20 mm) mit Eluent P1 präparativ voneinander getrennt. Die Epimere im Eluat wurden photometrisch (340 nm) detektiert. Bei einer Flussrate um 40 ml/min und einer maximalen Auftragsmenge von 1-2 mg Epimerengemisch pro Injektion war Basislinientrennung erreichbar. Epimer A eluierte unter diesen Bedingungen bei ca. 480 ml, Epimer B bei ca. 600 ml. Bei Flussraten unter 20 ml/min verschlechterte sich die Trennleistung aufgrund von Diffusionseffekten.

Parallel zur präparativen Trennung wurde das Trennergebnis durch analytische HPLC überprüft. Mit Eluent A2 und einer Flussrate von 2,2 ml/min wurden die Epimere an Säulen

des Typs Nucleosil RP $10C_{18}$ (250 x 4 mm) voneinander getrennt und photometrisch bei 365 nm quantifiziert. Unter diesen Bedingungen eluierte Epimer A bei einem Volumen von 23,5 ml und Epimer B bei 27,5 ml.

Auch das durch Haloformreaktion aus dem Rest des Epimerengemisches synthetisierte 6-Trifluormethyl-7-oxo-8-ribityllumazin ließ sich unter diesen Bedingungen erfassen. Sein Retentionsvolumen betrug 6 ml.

2.11 NMR Spektroskopie

2.11.1 ¹⁹F NMR Spektren

 19 F NMR Spektren der Fluorliganden wurden bei 470 MHz bzw. 338 MHz in Wasser mit ca. 10 % D₂O aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen wurden extern durch 50 mM Natriumtrifluoracetat (pH 7,0) referenziert.

Für Ligandentitrationen mit Riboflavin Synthasen bzw. deren Mutanten wurden die jeweiligen Proteine mittels Ultrafiltration auf Konzentrationen im Bereich von 15-30 mg/ml aufkonzentriert. Die eingesetzte Proteinkonzentration wurde mit der Methode nach Bradford bzw. durch photometrische Messung der Absorbtion bei 280 nm mittels des aus der Aminosäuresequenz berechneten Extinktionskoeffizienten bestimmt. Die Proteine befanden sich jeweils im Puffer der letzten Aufarbeitungsstufe, im allgemeinen 20 mM Na/K Phosphat bzw. K Phosphat bei pH 7,0 und enthielten zusätzlich 0,2 mM EDTA, 0,5 mM DTT im Falle der *E. coli* Enzyme bzw. 100 mM KCl im Falle der *S. pombe* Enzyme. Alle Proben enthielten 10-15 % D_2O .

Um eine große Volumenzunahme während der Ligandentitration zu vermeiden, wurden jeweils nur sehr kleine Aliquote des konzentrierten Fluorliganden direkt in das NMR-Rohr titriert. Die Endkonzentrationen der eingesetzten Liganden lag zwischen 500-4000 µM. Die Spektren wurden mit einer Linienverbreiterung von 20 Hz transformiert und die Signale des freien und enzymgebundenen Fluorligenden integriert. Aus den Signal Integralen wurde die Konzentration an gebundenem bzw. freiem Liganden abgeleitet und daraus nach Scatchard, 1949 die Zahl der Bindungsplätze und die Dissoziationskonstanten bestimmt.

Für die 338 MHz 19 F NMR Spektren betrug der Datensatz 32 K; das Relaxationsdelay 1,6 s; der Pulswinkel 30° (2µs).

Für die 470 MHz ¹⁹F-NMR-Spektren betrug der Datensatz 64 K; das Relaxationsdelay (d1) 1 s, der Pulswinkel (p1) 70 ° (10 μ s).

Je nach Konzentration von Protein und Fluorligand betrug die Anzahl der Scans zwischen 500 und 20000.

2.11.2¹³C-NMR-Spektren

Die ¹³C NMR Spektren der an unterschiedlichen Stellen ¹³C markierten Riboflavine wurden bei 125,8 MHz in wässriger Lösung mit ca. 10% D₂O aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen wurden extern durch Tetramethylsilan referenziert.

Für die Messungen bzw. Titrationen der Flavokinase mit ${}^{13}C_n$ Riboflavin wurde das Protein jeweils mittels Ultrafiltration auf eine Konzentration von 13 mg/ml also 0,7 mM aufkonzentriert. Das Protein befand sich in einem Puffer, der 100 mM Tris HCl pH 8 sowie 10% D₂O enthielt. Die Lösungen der ${}^{13}C$ markierten Riboflavine wurde direkt in das NMR Rohr titriert. Die Spektren wurden mit einer Linienverbreiterung von 10 Hz transformiert. Der Datensatz betrug 64K, das Relaxationsdelay (d1) 1 s, der Pulswinkel (p1) 30° (3 μ s), "repetition time" 2 s, spektrale Breite 28,9 kHz. Die Anzahl der aufgenommenen Scans lag zwischen 2000 und 100000 Pulsen. Die Spektren wurden mit 1 H Breitbandentkopplung (WALTZ 16) aufgenommen.

3. Ergebnisse

3.1 Flavokinase

Zu Beginn dieser Arbeit waren einige Gene, die für das Enzym Flavokinase codieren bekannt. Es handelt sich dabei zum überwiegenden Teil um bakterielle Flavokinasen, die für bifunktionelle Proteine codieren, die sowohl Flavokinase- als auch FAD-Synthetase- Aktivität tragen.

Dazu gehören die für die bifunktionellen Enzyme codierenden Gene ribF aus *Escherichia coli*, *Corynebacterium ammoniagenes*, *Mycoplasma genitalium*, ribC aus *Bacillus subtilis*, sowie ein für eine monofunktionelle Flavokinase codierendes Gen ribR aus *Bacillus subtilis*.

Kürzlich wurde ebenfalls ein für eine monofunktionelle bakterielle Flavokinase codierendes Gen aus *Streptococcus agalactiae* als solche identifiziert. Die zuletzt genannten Proteine wurden bereits kloniert, gereinigt und in ihrer Funktion charakterisiert.

Einige für bakterielle bifunktionelle Flavokinasen/FAD-Synthetasen codierenden Gene sind in den Datenbanken auf Grund ihrer Homologie zu bekannten Genen bzw. den daraus abgeleiteten Genprodukten als solche eingetragen.

Das Strukturgen FMN1, das für eine monofunktionelle Flavokinase aus *Saccharomyces cerevisiae* codiert, wurde kürzlich molekular charakterisiert.

Mittels Datenbankrecherchen auf Grundlage der aus dieser Gensequenz abgeleiteten Proteinsequenz, wurden homologe Sequenzen aus der Hefe *Schizosaccharomyces pombe* sowie eine entsprechende Sequenz aus *Homo sapiens* gefunden.

Mit dem Ziel der Charakterisierung der Genprodukte, deren biochemischen Charakterisierung sowie der Strukturaufklärung mittels Röntgenstrukturanalyse wurden diese beiden Gene im Rahmen dieser Arbeit rekombinant exprimiert.

Dabei kamen zwei völlig unterschiedliche Klonierungsstrategien zur Anwendung.

3.1.1 Rekombinante Expression der monofunktionellen Flavokinase aus Schizosaccharomyces pombe

Da die chromosomale DNA der Hefe *Schizosaccharomyces pombe* Introns ohne genetische Information enthält, musste bei der Klonierung der Flavokinase von cDNA ausgegangen werden. Diese wurde von Dr. Markus Fischer (TU-München) zur Verfügung gestellt.

Das Expressionskonstrunkt wurde durch direkte Klonierung nach zwei PCR-Reaktionen und anschließendem Restriktionsverdau hergestellt. In einer ersten PCR wurde das zu klonierende Fragment mit 2 genspezifischen Primern aus einem Templat (cDNA) vervielfältigt. Die Primer waren gegenüber der nativen Zielsequenz so modifiziert, dass der Vorwärtsprimer einen Teil der ribosomalen Bindungsstelle enthielt und der Rückwärtsprimer die zur Klonierung geeignete BamHI-Restriktionsschnittstelle für das 3`-Ende des Gens enthielt. Das Produkt der Reaktion wurde über Agarosegel gereinigt und in einer zweiten PCR-Reaktion als Template eingesetzt. Als Vorwärtsprimer diente ein Universalprimer, der am 5`-Ende eine MfeI-Restriktionsschnittstelle beinhaltete und die Sequenz der gesamten vektoriellen Ribosomalen Bindungsstelle besitzt. Da das Gen eine EcoRI-Schnittstelle besitzt, konnte nicht der sonst übliche kEcoRI-Universalprimer verwendet werden.



Abb. 13: Konstruktion des Expressionsplasmids durch zwei PCR Reaktionen mit anschließender Restriktion und Ligation (P=Promotor; O=Operator; S/D=ribosomale Bindungsstelle).

Als Rückwärtsprimer wurde in der zweiten PCR der gleiche wie in der ersten PCR verwendet. Das erhaltene DNA-Fragment wurde nach Reinigung der DNA mit den entsprechenden Restriktionsenzymen MfeI (MunI) und BamHI verdaut und in einen vorbereiteten Vektor ligiert. Der Vektor wurde entsprechend mit den Restriktionsenzymen EcoRI und BamHI verdaut. Durch Ligation der komplementären Basenüberhänge des EcoRI-Verdaus des Vektors sowie dem MfeI-Verdau des Inserts ging die EcoRI-Schnittstelle im Konstrukt am 5`-Ende des Inserts verloren. Diese Strategie wurde im Hinblick auf spätere Konstruktion von Mutanten verfolgt.



Abb. 14: Restriktion und Ligation vom Vektor pNCO113 und dem Flavokinase Gen.

Als Vektor wurde der *E.coli* Expressionsvektor pNCO113 verwendet. Das Plasmid besitzt einen T5-Promotor, der von der RNA-Polymerase aus *E.coli* erkannt wird und eine hohe Expression erlaubt. Der Promotor steht unter Kontrolle eines lac-Operators. Damit kann die Genexpression durch einen erhöhten Spiegel an lac-Repressor reguliert werden. Verwendet wurde dazu der Stamm *E.coli* XL-1-Blue, der eine Mutation im lacI-Gen besitzt, was zu einer verstärkten Expression an lac-Repressor führt und der Stamm *E.coli* M15(pREP4) auf dessen Plasmid sich das lacI-Gen befindet.

Auf diese Weise wurden mehrere rekombinante *E.coli* Stämme erhalten, die das Plasmid pNCOFkSSP mit dem Flavokinase-Gen aus *Schizosaccharomyces pombe* enthielten.

Sie exprimierten ein Protein mit einem annähernden Molekulargewicht von 20 kDa, was durch SDS-Gelelektrophorese ermittelt wurde.

Die rekombinante Flavokinase machte ungefähr 20% des Zellrohextraktes aus.

Ein Test der Funktion des erhaltenen Genproduktes in den Rohextrakten und die anschließende HPLC-Analyse der Enzymtestansätze ergab eine eindeutige Phosphorylierung von Riboflavin unter Verbrauch von ATP und der Bildung von FMN in Anwesenheit der rekombinanten Flavokinase.

3.1.2 Rekombinante Expression der monofunktionellen humanen Flavokinase mittels Gentotalsynthese

Die generelle Strategie einer Gentotalsynthese besteht darin, durch mehrere in vitro Arbeitsschritte ein doppelsträngiges Polynucleotid zu schaffen, welches sich in ein Vektormolekül ligiert, als Matrize zur heterologen Expression im prokaryotischen System eignet.

Hierzu wurden sechs sequenzielle PCR-Schritte mit je einem speziell zu diesem Zweck konstruierten Primerpaar durchgeführt, wobei das Amplifikat der 1. Reaktion der 2. Reaktion als Matrize diente, das Amplifikat der 2. Reaktion der 3. Reaktion wiederum als Matrize diente usw., bis nach der 6. Reaktion das vollständige Polynucleotid vorlag (Abb. 1). In der esten Reaktion, in der noch keine Matrize vorlag, waren Primer 1 und 2 über ein Teilstück von 30 bp komplementär und bildeten so gegenseitig ihre eigene Matrize.

Die Gentotalsynthese bietet den Vorteil, dass die gesamte Sequenz über eine Auswahl der Basenabfolge der einzelnen Primer gezielten Veränderungen zugänglich ist.

Diese Möglichkeit wurde zum einen genutzt, um die heterologe Expression in *E. coli* zu optimieren, zum anderen, um die Sequenz gezielt biotechnologisch manipulieren zu können. Die Sequenz des 489 bp langen Polynucleotids wurde im ersten Schritt an insgesamt 26 Positionen durch Punktmutationen gegenüber der Orginal Sequenz verändert, um die Translationseffizienz zu erhöhen. Dazu wurde die "codon usage" des exprimierenden *E. coli* Systems berücksichtigt, indem einzelne Codons vor allem in den "Wobble" Positionen durch ihre besser ablesbaren Synonyme ersetzt wurden. Hierbei galt es insbesondere die Arginincodons AGA, AGG, CGA und CGG, die Glycincodons GGA und GGG, das Prolincodon CCC und das Isoleucincodon ATA durch gezielte Punktmutation gegen die

besser translatierten Synonyme auszutauschen. In der Tabelle 4 sind die unter Berücksichtigung der "codon usage" von *E. coli* ausgetauschten Codons gegen die besser translatierten Synonyme aufgeführt.

Codierte AS	Arginin	Glycin	Isoleucin	Prolin
Natives Codon	AGA	GGG	ATA	CCC
	AGG	GGA		
	CGA			
	CGG			
	CGC			
Mutiert zu	CGT	GGT	ATC	CCT
	CGC		ATT	

 Tabelle 4: Unter Berücksichtigung der "codon usage" von E. coli in das Leseraster eingeführte Mutationen

Stromaufwärts zum Startcodon wurde eine purinreiche Sequenz entworfen, die teilweise komplementär zu einer pyrimidinreichen Sequenz am 3`-Ende der 16S rRNA des *E. coli* Ribosoms ist. Basenpaarung zwischen der 16S rRNA und dieser "Shine-Dalgarno" Sequenz der mRNA dient der Anbindung an das Ribosom und Spezifizieren des Startcodons des Leserasters.

Ein weiteres Kriterium der rechnergestützten Konstruktion der Primer war der G,C-Gehalt des zu synthetisierenden Polynucleotids. Da Guanin und Cytosin drei H-Brücken ausbilden und sich somit stabiler paaren als Adenin und Thymin, kann ein hoher G,C-Gehalt zur Ausbildung von unerwünschten Sekundärstrukturen in selbstkomplementären Bereichen der mRNA führen, was deren Transkription stört.

Um in späteren Arbeitsschritten die Modifikation des Flavokinase Gens durch gezielten enzymatischen Verdau zu ermöglichen, wurden durch gezielte Punktmutationen an geeigneten Stellen Erkennungssequenzen für Typ II Restriktionsendonucleasen eingeführt. Jenseits der Enden des Gens erlaubte dies die Klonierung in einen ebenso verdauten Vektor, während Schnittstellen mitten im Gen eine spätere Reparatur der Sequenz durch Kombination ermöglichen. Der komplette PCR Ansatz des ersten Syntheseschrittes mit den Oligonucleotiden 1 und 2 (Tabelle 5) wurden nach Inkubation im Thermocycler über eine Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Die mit Ethidiumbromid visualisierte DNA Bande lief wie erwartet als ca. 100 bp großes Fragment und wurde auf dem UV Leuchttisch ausgeschnitten. Zur Aufreinigung des Amplifikats wurde das zylindrische Gelstück in einem 2 ml Eppendorf Cap mit 1,5 ml Bindepuffer im Wasserbad aufgeschmolzen und mit dem Gel Extraction Kit (peqLab) isoliert. Vom wässrigen Eluat dieser Reinigung wurden ca. 20 ng als Template für die 2. PCR mit Primer 3 und 4 eingesetzt. Diese Prozedur aus PCR und anschließender Isolierung des Amplifikats wurde sechsmal durchgeführt, je einmal mit einem der Primerpaare, wobei jedes Mal ein Amplifikat erwarteter Größe isoliert wurde (Tabelle 5).

Nach dem sechsten PCR Syntheseschritt wurde das 535 bp lange Amplifikat erhalten, das stromaufwärts zum ATG Startcodon am 5`-Ende einen Teil der ribosomalen Bindungsstelle mit einer zur Klonierung in den Vektor pNCO113 notwendige EcoRI Schnittstelle trägt. Am 3`-Ende wurde direkt im Anschluß zum TAA Stopcodon eine zur Klonierung notwendige HindIII Schnittstelle generiert. Zwischen dem ATG Startcodon und dem TAA Stopcodon beinhaltet dieses synthetische Gen die Sequenz, die für die humane Flavokinase codiert. Zur Klonierung in den Vektor pNCO113 wurde das Gen am 5`-Ende mit EcoRI verdaut und am 3`-Ende mit HindIII.

Der Vektor pNCO113 wurde analog zum Favokinase Gen mit den Restriktionsendonucleasen EcoRI und HindIII verdaut und das geschnittene Gen wurde in den geschnittenen Vektor ligiert. Das so entstandene Konstrukt pNCOFkHs wurde wurde im Expressionsstamm *E. coli* XL-1 Blue transformiert. Die rekombinante humane Flavokinase wurde als lösliches Protein exprimiert und machte ungefähr 20% des gesamten zellulären Proteins der rekombinanten *E. coli* Stämme aus. Alle Zellen, die rekombinante Flavokinase in großen Mengen als lösliches Protein exprimiert haben, wurden durch eine gelbe Farbe charakterisiert.

Mittels SDS-PAGE konnte das Molekulargewicht auf 18,4 kDa ermittelt werden.

Mit einem Test auf Flavokinase Aktivität und anschließender HPLC Analyse der Enzymtestansätze konnte eindeutig eine Phosphorylierung des eingesetzten Riboflavins durch ATP unter Katalyse des Enzyms festgestellt werden. 56

Tabelle 5: Zur Gensynthase verwendete Oligonucleotide.

Primer	PCR Schritt	Primersequenz	Größe des Amplifikats
Fk-HS			[bp]
1	1	5`-ggatccggtgatgtccataagatggtggtgagc attggttggaacccatattacaagaatacgaag-3``	105 bp
2		5`-cctctttgaaggtatgcatgatatgtgtttccatcg atttcttcgtattcttgtaatatgggttccaacc-3	
3	2	5`-cttccagctgatatttccaccggtatttactatggtt gggctagcgttggatccggtgatgtccataagatg-3`	192 bp
4		5`-agccaacaatggccacagataagatctcac catagaagtcctctttgaaggtatgcatgatatg-3	
5	3	5`-gggcatcccaacagctaattttccggagcaa gtggtagataatcttccagctgatatttccaccgg-3`	279 bp
6		5`-gatcagtgactcgagagaatcaaagttcttttctg gacgcaggtagccaacaatggccacagataagatc-3	
7	4	5`-gccgcggtcaagtggtgcgtggcttcggccg tggctctaagcagctgggcatcccaacagctaattttcc-3`	396 bp
8		5`-caagacgtttettagettetteaatateaeettga attgeaetgateagtgaetegagagaateaaag-3	
9	5	5`-atgcctcgtgctgactgcattatgcgtcatctgcc ttacttctgccgcggtcaagtggtgcgtggcttc-3`-	454 bp
10		5`-ggaagaaattgtcttctttgattttcagatgttc tggtaactcaagacgtttcttagcttcttcaatatc-3	
11	6	5`-ataatagaattcattaaagaggagaaat taactatgcctcgtgctgactgcattatg-3`	535 bp
12		5`-tattattataagcttagtggccattcatgattttgctt ttcgaaacctggaagaaattgtcttctttgattttc-3`	



Abb.15: Schematische Darstellung der sechs PCR Schritte der Gentotalsynthese. Die nummerierten Pfeile stellen die einzelsträngigen Oligonucleotide dar (Primer 1-12 aus Tabelle 5), die zentrale Linie symbolisiert die doppelsträngige DNA Matrize.

3.1.3 Reinigung rekombinanter Flavokinase aus Schizosaccharomyces pombe

Zur Reinigung des Proteins wurden 10 g feuchte Zellmasse des rekombinanten Stammes pNCOFkSSP *E. coli* M15 (pREP4) wie in Abschnitt 2.8.4 beschrieben mittels Ultraschallbehandlung aufgeschlossen und vom Zelldebris abgetrennt. Der so erhaltene Rohextrakt wurde auf eine Sepharose Q Säule aufgetragen. Da die Flavokinase auf dieser Säule bei pH 8,0 etwas retardiert wird, das heißt erst in den späteren Durchlauffraktionen von der Säule eluiert wird, wurde mit einem sehr großen Volumen Äquilibrierungs- bzw. Waschpuffer gewaschen bis keine Absorption bei 280 nm festgestellt wurde. Ein schematisches Elutionsprofil ist in Abb. 16 auf der linken Seite dargestellt. Die Fraktionen 12-50 mit Flavokinase wurden vereinigt, aufkonzentriert und auf eine Gelfiltrationssäule Superdex 75 aufgetragen, die eine Trennspanne von Proteingrößen zwischen 3-70 kDa hat. Die Elution der Flavokinase von der Gelfiltrationssäule erfolgte bei einem Elutionsvolumen von 205 ml. Ein Vergleich dieses Elutionsvolumens für die Flavokinase aus *Schizosaccharomyces pombe* mit der Eichkurve für die Gelfiltrationssäule Superdex 75 zeigt,

dass die Flavokinase in Lösung als Monomer mit einem Molekulargewicht von 19 kDa vorliegt. Das Elutionsprofil für diese Säule ist in Abb. 16 auf der rechten Seite dargestellt.



Abb. 16: Elutionsprofile (schematisch) der beiden Chromatographieschritte. Linke Spur: Sepharose Q bei pH 8,0; rechte Spur: Gelfiltration Superdex 75.

In Abb. 17 ist eine SDS-PAGE der Reinigungsschritte gezeigt. Im Rohextrakt (Spur 1) ist eine deutliche Expressionsbande für die rekombinante Flavokinase bei einem Molekulargewicht knapp unterhalb der 20 kDa Bande des Molekulargewichtsstandards zu erkennen. Die Flavokinase macht ungefähr 20% der Proteinmenge des Zellrohextraktes aus. In der Spur 2 sieht man eine Fraktion des Durchlaufes der Rohextraktproteine der E. coli Zellen. In Spur 3 sind Durchlauffraktionen zu erkennen, die schon Flavokinase enthalten aber noch mit zu vielen Rohextraktproteinen kontaminiert sind, dass diese zwei Fraktionen verworfen werden konnten. In Spur 4 erkennt man die vereinigten Fraktionen, die Flavokinase schon zu mindestens 90 % gereinigt enthielten. Auf dieser Stufe der Aufreinigung konnte das Protein für die NMR spektroskopischen Anwendungen belassen werden. Für die Bestimmung des nativen Molekulargewichts mittels analytischer Ultrazentrifuge sowie für die Kristallstrukturanalyse war noch ein zweiter Reinigungsschritt notwendig, um eine Reinheit von 100% zu erreichen. Dieser dafür erforderliche Reinigungsgrad wurde durch die zweite Säule (Gelfiltration, Superdex 75) erreicht (Spur 5).



Abb. 17: 15% SDS-PAGE der Reinigung der Flavokinase aus Schizosaccharomyces pombe. Spur 1: Rohextrakt pNCOFkSSP E. coli M15 (pREP4); Spur 2: Durchlauf Sepharose Q pH 8,0 Fraktionen 4-9; Spur 3: Durchlauf Sepharose Q pH 8,0 Fraktionen 10-11; Spur 4: Flavokinase im späteren Durchlauf Sepharose Q pH 8,0 vereinigte Fraktionen 12-40; Spur 5: Flavokinase vereinigte Fraktionen nach Superdex 75. Spur M: Molekulargewichtsmarker (66 kDa, 44 kDa, 36 kDa, 28 kDa, 24 kDa, 20 kDa, 14 kDa).

3.1.4 Reinigung der rekombinanten humanen Flavokinase

Zur Reinigung der humanen Flavokinase wurden ungefähr 10 g feuchter Zellmasse des rekombinanten Stammes pNCOFkHs E. coli XL-1 Blue wie in Abschnitt 2.8.4 beschrieben mittels Ultraschallbehandlung aufgeschlossen und vom Zelldebris abgetrennt. Der so erhaltene gelbe Zellrohextrakt wurde analog zur Flavokinase aus Schizosaccharomyces pombe auf eine Sepharose Q Säule aufgetragen, die im Falle der humanen Flavokinase bei pH 7,0 gefahren wurde und auf der das Protein etwas retardiert wurde. In den späteren Fraktionen des Durchlaufes (Fraktionen 8-12) wurde die humane Flavokinase von der Säule eluiert. Die Fraktionen 8-12 wurden im zweiten Schritt der Aufreinigung mit kalt gesättigter 3 M Ammoniumsulfatlösung gefällt, abzentrifugiert und das die Flavokinase enthaltende Pellet wurde in einem kleinen Volumen Puffer bei pH 8,2 resuspendiert. Die leicht trübe Lösung wurde nochmals zentrifugiert und der Überstand wurde auf eine Gelfiltrationssäule Superdex 75 aufgetragen. Das Elutionsvolumen liegt analog zur Flavokinase aus Schizosaccharomyces pombe um 200 ml, da sich die beiden Proteine in ihren Molekulargewichten nur unwesentlich unterscheiden. Nach Vergleich dieses Elutionsvolumens mit der Eichgeraden der Gelfiltrationssäule Superdex 75 liegt die humane Flavokinase als Monomer mit einem Molekulargewicht von 18,4 kDa in Lösung vor. Da die Elutionsprofile der zwei Säulen analog zu denen der Flavokinase aus Schizosaccharomyces pombe sind wurde hier auf ihre Abbildung verzichtet.

In Abbildung 18 ist eine SDS-PAGE der Reinigungsschritte gezeigt. In Spur 2 sieht man die vereinigten Fraktionen der Flavokinase nach demn Sepharose Q Lauf. Das Protein ist auf dieser Reinigungsstufe schon zu 90 % gereinigt (Abb. 18, Spur 3). Für eine Kristallstrukturanalyse benötigt man 100 % gereinigtes Protein. Mit dem Lauf über eine Gelfiltrationssäule Superdex 75 wurde dieser gewünschte Reinigungsgrad erreicht (Abb. 5, Spur 4).



Abb. 18: 15% SDS-PAGE der Reinigung der humanen Flavokinase. Spur M: Molekulargewichtsmarker (66 kDa, 44 kDa, 36 kDa, 28 kDa, 24 kDa, 20 kDa, 14 kDa); Spur 1: Durchlauf Sepharose Q pH 7,0 Fraktionen 2-6; Spur 2: Durchlauf Sepharose Q pH 7,0 Fraktion 7; Spur 3: vereinigte Fraktionen des späteren Durchlaufes mit humaner Flavokinase Fraktionen 8-12; Spur 4: Flavokinase vereinigte Fraktionen nach Superdex 75.

Aber nach Aufkonzentrierung mittels Ultrafiltration auf die für die Kristallisation erforderliche Konzentration wurde festgestellt, dass das Protein in Lösung bei 4 °C relativ instabil ist und zum Ausfallen neigt. Deshalb konnte bis jetzt noch keine Kristallstruktur dieses Proteins ermittelt werden. Auch eine biochemische Charakterisierung des Proteins steht noch aus.

61

3.1.5 ¹³C NMR Untersuchungen mit unterschiedlich ¹³C markierten Riboflavinen an der rekombinanten Flavokinase aus *Schizosaccharomyces pombe*

In den letzten 2 Jahrzehnten hat sich die ¹³C und ¹⁵N NMR Spektroskopie als erfolgreiches Instrument zum Verständnis der molekularen Natur von Flavoproteinen erwiesen. Durch Rekonstitution der Flavoproteine mit entsprechend spezifisch markierten ¹³C bzw. ¹⁵N markierten Flavinen und deren NMR Untersuchung, kann man Informationen über konformative und elektronische Eigenschaften der gebundenen Flavine erhalten. Man erhält Informationen über das Muster der Wasserstoffbrückenbindungen des an das Protein gebundenen Isoalloxazin Ringes. Gerade in Fällen, in denen nichts über die Primär-, Sekundär- bzw. Tertiärstruktur der Proteine bekannt ist, erhält man aus den NMR Spektren interessante Informationen, die die elektronische Struktur und den Hybridisierungsgrad einzelner Atome des an das Protein gebundenen Flavins in den unterschiedlichen Redoxzuständen betreffen.



Abb. 19: Chemische Struktur des oxidierten Riboflavins mit der IUPAC Numerierung des Isoalloxazinringes.

In früheren Studien wurden freie Flavine entweder in wässriger Lösung (FMN in H₂O), um eine polare Umgebung der Flavine herzustellen, gemesssen oder in Chloroform (Tetraacetylriboflavin in CHCl₃), um eine apolare Umgebung zu modellieren (Verwoort et al., 1986; Müller, 1992; Moonen et al., 1984).

Diese Untersuchungen an freien Flavinen haben ergeben, dass die chemischen Verschiebungen der ¹³C markierten Flavine mit der π Elektronendichte an den entsprechenden Atomen korrelieren. Eine Erniedrigung der π Elektronendichte, z. B. durch Wasserstoff-

brückenbindungen resultiert in einer Tieffeld Verschiebung der beteiligten Atome. Eine Erhöhung der π Elektronendichte führt zu einem Hochfeldshift. Obwohl im Falle des hier untersuchten Proteins keine ¹⁵N NMR Messungen vorliegen, ist auch das Verhalten der vier N Atome des Flavinmoleküls für die Interpretation der ¹³C Verschiebungen von Bedeutung. Im oxidierten Zustand werden N(1) und N(5) des Flavins als Pyridin- bzw. β-Typ N-Atome eingeordnet, auf Grund der Orthogonalität des einsamen Elektronenpaares am Stickstoff zum aromatischen Ringsystem. Die chemischen Verschiebungen dieser Atome sind besonders sensitiv gegenüber der Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen und unterliegen dabei einem ziemlich starken Hochfeldshift. Die Stickstoffatome N(3) und N(10) werden als Pyrrolbzw. α-Typ Atome eingeordnet, auf Grund der Einbeziehung des einsamen Elektronenpaares am Stickstoff in das Ringsystem. Diese Art der N Atome ist weniger sensitiv auf die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen und erfahren dabei nur einen kleinen Tieffeldshift. Obwohl das Stickstoffatom N(10) keine Wasserstoffbrückenbindung bilden kann, da es die Ribityl Seitenkette trägt, zeigen seine ¹⁵N NMR Verschiebungen bemerkenswerte Lösungsmittelabhängigkeiten. Beim Übergang vom apolaren Lösungsmittel Chloroform zum polaren Lösungsmittel Wasser unterliegt die ¹⁵N Resonanz für das Atom N(10) einem starken Tieffeldshift von 12 ppm. Dieser starke Tieffeldshift wurde mit einer Änderung des Hybridisierungsgrades am Stickstoff in Position 10 des Isoalloxazinringes erklärt. Das bedeutet einen Übergang von einem stärkeren sp³ Hybridisierungsgrad in Chloroform zu einem stärkeren sp² Hybridisierungsgrad in Wasser. Deshalb ragt dieses Stickstoffatom in Chloroform etwas aus der Ebene des Flavinringes heraus, während es in Wasser in der Ebene des Isoalloxazinringes liegt. Deshalb spielt das N(10) Atom eine zentrale Rolle bei der Anziehung von π Elektronendichte aus dem Ringsystem bzw. bei der Abgabe von π Elektronendichte in den Flavinring. Das letztere findet nur im Lösungsmittel hoher Polarität statt. Die Ladung wird auf die Carbonylgruppe am C Atom C(4) delokalisiert.

Diese Eigenschaften der vier N Atome des Flavinringes beeinflussen die ¹³C Verschiebungen aller C Atome des Flavinringes über das konjugierte System. Somit können Rückschlüsse auf die Art der Bindung der vier N Atome allein aus den ¹³C Verschiebungen gewonnen werden.

In allen ¹³C NMR Spektren mit Proteinen treten "natural abundance" Resonanzen der C Atome bestimmter Aminosäure Typen aus dem jeweiligen Protein auf. Bei 170-180 ppm erscheinen die Peptid Carbonylgruppen und die Carboxyl Seitenketten, die Arginin C(ξ) Atome zeigen bei 158 ppm ein Signal, die aromatischen C Atome von Tryptophan, Tyrosin, Phenylalanin, und Histidin kommen bei 110-140 ppm, und die C Atome der aliphatischen Aminosäuren kommen bei 10-70 ppm. Falls diese Resonanzen mit denen des gebundenen Flavins interferieren, müssen Differenzspektren berechnet werden, was aber im Falle dieser Messungen nicht notwendig wurde. Die Intensitäten der Signale der an die Flavokinase gebundenen einzeln bzw. doppelt markierten Riboflavine übertrafen weit die "natural abundance" Resonanzen des Proteins.

Magnetische Anisotropie Effekte bzw. Ringstrom Effekte müssen im Falle der ¹³C Verschiebungen nicht berücksichtigt werden, da sie weniger als 1 ppm ausmachen. Sterische und stereochemische Effekte können die ¹³C Verschiebungen beeinflussen.

Bei dem hier untersuchten Protein der Flavokinase handelt es sich nicht um ein Flavoprotein, das ein Flavinmolekül als Cofaktor bindet, sondern um ein Enzym, das ein Riboflavin als Substrat bindet, um die Übertragung einer Phosphatgruppe von dem zweiten Substrat ATP auf die 5`-OH Gruppe des Riboflavins zu katalysieren. Um etwas über die Art und Weise der Bindung des Riboflavins im aktiven Zentrum zu erfahren, wurden ¹³C NMR Spektren mit unterschiedlich einzeln, doppelt bzw. achtfach ¹³C markierten Riboflavinen aufgenommen. Im Unterschied zu den Flavoproteinen, bei denen der gebundene unmarkierte Cofaktor erst entfernt werden muß und die anschließend mit dem entsprechend markierten Cofaktor rekonstituiert werden müssen, kann man im Falle der Flavokinase die Lösung der markierten Flavine direkt zur Proteinlösung in kleinen Aliquoten ins NMR Rohr zutitrieren.

Für die Messungen wurden Riboflavine mit ¹³C Markierungen an folgenden C Atomen des Isoalloxazinringes verwendet (siehe Numerierungen in Abb. 19):

- [5a, 6, 7, 7α, 8, 8α, 9, 9a-¹³C₈] Riboflavin
- $[2, 4a^{-13}C_2]$ Riboflavin
- [4, 10a-¹³C₂] Riboflavin
- [5a, 8-¹³C₂] Riboflavin
- $[6, 8\alpha$ -¹³C₂] Riboflavin
- $[7\alpha, 9^{-13}C_2]$ Riboflavin
- [4a-¹³C] Riboflavin

Zur Interpretation der chemischen Verschiebungen der an die Flavokinase gebundenen ¹³C markierten Riboflavine wird zum Vergleich auf bereits publizierte Daten freier bzw. proteingebundener Flavine aus zahlreichen Untersuchungen an den unterschiedlichsten Flavoproteinen zurückgegriffen (Müller, 1992;Verwoort et al., 1986; Moonen et al., 1984).

Tabelle 6: ¹³C NMR chemische Verschiebungen von ¹³C markiertem FMN, TARF und unterschiedlich ¹³C markiertem Riboflavin frei und im Komplex mit der Flavokinase aus *Schizosaccharomyces pombe*.

Atom	FMN	TARF	¹³ C Riboflavin	¹³ C Riboflavin
Nr.	in H ₂ O	in CHCl ₃	in Tris HCl pH8	+Flavokinase
	[ppm]	[ppm]	[ppm]	in Tris HCl pH 8
	Verwoort	Verwoort		[ppm]
	et al., 1986	et al., 1986		
C(2)	159,8	155,2	159,9	158,0
C(4)	163,7	159,8	163,8	165,2
C(4a)	136,2	135,6	136,1	137,9
C(5a)	136,4	134,6	137,1	137,2
C(6)	131,8	132,8	132,4	133,8
C(7)	140,4	136,6	141,2	139,5 *
C(7α)	19,9	19,4	20,5	20,6
C(8)	151,7	147,5	152,3	150,1
C(8α)	22,2	21,4	22,7	21,7
C(9)	118,3	115,5	118,8	120,2
C(9a)	133,5	131,2	133,4	134,1 *
C(10a)	152,1	149,1	152,1	153,1

* Die mit dem Stern gekennzeichneten Werte sind nicht mit doppelt oder einfach markierten Riboflavinen gemessen, sondern den Spektren mit ¹³C₈ Riboflavin entnommen.

In den Abbildungen 20, 21, 22 und 23 sind die ¹³C NMR Spektren mit an Flavokinase gebundenen spezifisch ¹³C markierten Riboflavinen zu sehen. Das Spektrum A in den Abbildungen 20, 22 und 23 zeigt jeweils das ¹³C₈ Riboflavin gebunden an die Flavokinase. Man erkennt eine deutliche Linienverbreiterung der Signale und nur noch wenig Multiplett Aufspaltung, die im Spektrum des entsprechenden freien Riboflavins auf Grund der Kopplung der einzelnen C Atome untereinander auftritt. Die Signalzuordnung konnte durch Messungen mit einzeln bzw. doppelt spezifisch markierten Riboflavinen durchgeführt werden. Diese Spektren sind in den Abbildungen 20 Spektren B und D, 21 Spektren A und C sowie 22 Spektrum B immer im Vergleich zu dem Spektrum des an die Flavokinase gebundenen ¹³C₈ Riboflavins zu sehen. Zusätzlich dazu wurde in den Abbildungen zu Vergleichszwecken immer das ¹³C NMR Spektrum des doppelt markierten Riboflavins frei im Puffer der



Abb. 20: ¹³C NMR Untersuchugen an Flavokinase mit unterschiedlich ¹³C markierten Riboflavinen. **A** Flavokinase (0,5 mM) mit [5a, 6, 7, 7 α , 8, 8 α , 9, 9a-¹³C₈] Riboflavin (0,5 mM); **B** Flavokinase (1,3 mM) mit [6, 8 α -¹³C₂] Riboflavin (1,9 mM); **C** [6, 8 α -¹³C₂] Riboflavin (1,7 mM) ohne Flavokinase; **D** Flavokinase (0,8 mM) mit [7 α , 9-¹³C₂] Riboflavin (1,0 mM); **E** [7 α , 9-¹³C₂] Riboflavin (1,5 mM) ohne Flavokinase. Alle Proben mit und ohne Protein enthielten 100 mM Tris HCl pH 8 und 10% D₂O. Die Signale wurden mit einer Linienverbreiterung von 15 Hz transformiert. **f** bedeutet freies nicht proteingebundenes Riboflavin. **b** bedeutet an die Flavokinase gebundenes Riboflavin.
Proteinpräparation unter den entsprechenden Spektren des an die Flavokinase gebundenen Riboflavins abgebildet.

Auf diese Weise wurden die in Tabelle 6 aufgelisteten Verschiebungen den einzelnen C Atomen zugeordnet. Nur die Werte für die Atome C(7) und C(9a) wurden dem komplexeren Spektrum der Flavokinase mit ${}^{13}C_8$ Riboflavin entnommen und sind deshalb mit einer gewissen Ungenauigkeit behaftet. Die anderen Signale dieses Spektrums konnten auf der Grundlage der Messungen mit den einzelnen bzw. doppelt markierten Riboflavinen genau den einzelnen Atomen des Isoalloxazinringes zugeordnet werden. Außerdem konnten so alle C Atome des Isoalloxazinringes des Riboflavins in die Untersuchungen einbezogen werden.

Mit diesen ¹³C₂ bzw. ¹³C₁ Riboflavinen sind sogar Titrationen analog denen der in Kapitel 3.2 vorgestellten ¹⁹F NMR Untersuchungen mit Fluorlumazinen an Riboflavin Synthasen möglich. Aber ähnliche quantitative Messungen stehen noch aus.

In Tabelle 6 sind die ¹³C chemischen Verschiebungen der C Atome der an die Flavokinase gebundenen unterschiedlich spezifisch ¹³C markierten Riboflavine aufgelistet. Zum Vergleich dazu sind die entsprechenden Werte für die entsprechenden Riboflavine ohne Protein im gleichen Puffer aufgelistet und zusätzlich dazu die entsprechenden Verschiebungen von FMN in wässriger Lösung (polar) sowie TARF in Chloroform (apolar).

Die ¹³C Verschiebungen des an die Flavokinase gebunden Riboflavins zeigen, dass der Isoalloxazinring im Vergleich zum freien ungebundenen Flavin in polarer und protischer Umgebung (FMN in Wasser bzw. freies entsprechend ¹³C markiertes Riboflavin in Puffer) stärker polarisiert vorliegen muß. Die Polarisierung des an die Flavokinase gebundenen Riboflavins wird an der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Protein und den zwei Carbonylgruppen bzw. an deren Stärke gemessen. Der Tieffeldshift des C Atoms der C(4) Carbonylgruppe von 1,4 ppm verglichen mit der entsprechenden Verschiebung von freiem FMN in Wasser sowie Riboflavin im wässrigen Puffer der Proteinpräparation (Abbildung 21; Spektrum C gebunden, Spektrum D frei) ist die Folge einer Erniedrigung der π Elektronendichte an dieser Stelle und macht deutlich, dass diese an die Flavokinase gebundene Carbonylgruppe in größerem Ausmaß polarisiert sein muß, als im freien Flavin in wässriger, polarer Umgebung. Es besteht also zwischen dem Flavin und der Flavokinase eine stärkere Wasserstoffbrückenbindung als zwischen dem FMN bzw. Riboflavin und Wasser.

Dagegen zeigt das C Atom der an die Flavokinase gebundenen C(2) Carbonylgruppe als Folge einer Erhöhung der π Elektronendichte an dieser Stelle einen deutlichen Hochfeldshift von 2 ppm im Vergleich zu den Signalen der freien Flavine in polarer Umgebung (Abbildung 21; Spektrum A gebunden, Spektrum B frei). Vergleicht man aber diese chemische Verschiebung mit der Verschiebung der C(2) Carbonylgruppe des TARF in apolarer Umgebung, das unter diesen Bedingungen nicht in der Lage ist Wasserstoff Brücken zu bilden, so liegt sie noch deutlich um 2,8 ppm nach tieferem Feld hin verschoben. Dieses Ergebnis zeigt, dass auch das O Atom der C(2) Carbonylgruppe eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Protein bildet, die aber wesentlich schwächer ist, als die zwischen freiem Flavin und Wasser. Eine zweite Erklärung für diesen Hochfeldshift des Carbonyl C(2) im Vergleich zum freien Flavin in polarer Umgebung wäre das Auftreten einer sehr starken H Brücke am Stickstoffatom N(1). Je stärker die H Brücke an N(1), desto mehr werden die Nachbaratome C(2) bzw. C(10a) nach höherem Feld hin verschoben. Dieses Phänomen wird als sogenannter α Effekt bezeichnet. Durch die starke H Brücke an N(1) wird am Stickstoff eine partielle positive Ladung erzeugt, durch die die π Elektronendichte an den benachbarten C Atomen C(2) und C(10a) erhöht wird. Das würde die Verschiebung von C(2) erklären, aber nicht den Tieffeldshift von 1 ppm der Resonanz für C(10a) (Abbildung 21, Spektrum C gebunden, Spektrum D frei). Endgültige Klarheit über die Wasserstoff Brückenbindung an N(1) kann nur eine entsprechende ¹⁵N NMR Messung geben.

Der Grad der sp² Hybridisierung wird in freien Flavinen beim Übergang vom apoalaren zum poalaren Medium gesteigert. Durch Bildung einer starken Wasserstoffbrückenbindung an dem Sauerstoff der Carbonylgruppe C(4 α) wird π Elektronendichte von N(10) abgezogen und über C(4a) zur Carbonylgruppe delokalisiert. Würde bei Steigerung des sp² Hybridisierungsgrades zwischen Flavin und Protein keine Wasserstoff Brücke gebildet werden können, würde die π Elektronendichte auf C(4a) delokalisiert werden und somit die chemische Verschiebung nach höherem Feld hin verändert werden. Das C Atom in Position 4a ist im Falle der Bindung an die Flavokinase im Vergleich zum freien Flavin um 1,8 ppm nach tieferem Feld hin verschoben (Abbildung 21, Spektrum A gebunden, Spektrum B frei). Dieser starke Tieffeldshift des C Atoms C(4a) im Vergleich sowohl zu TARF in Chloroform als auch Flavin in wässrigem Medium und damit die Abnnahme der π Elektronendichte an diesem Kohlenstoff Atom spricht für das Vorhandensein einer starken Wasserstoffbrückenbindung an der Carbonylgruppe des C Atoms C(4). Die Steigerung des sp^2 Hybridisierungscharakters an N(10) hat in freien Flavinen durch Delokalisierung der partiellen positiven Ladung über C(4a), C(9), C(7), $C(7\alpha)$ und C(5a) einen Tieffeldshift dieser Resonanzen zur Folge. Diese Eigenschaft des Stickstoffs in Position 10 könnte den Tieffeldshift der Resonanz für das C Atom C(4a) noch unterstützt haben. Für C(9) wurde bei Bindung des Riboflavins an die Flavokinase ebenfalls eine Änderung der chemischen Verschiebung nach tieferem Feld hin

gefunden (Abbildung 20, Spektrum D gebunden, Spektrum E frei). Die chemische Verschiebung der Resonanz für das Atom C(5a) zeigt beim Vergleich zwischen gebundenem und freiem Riboflavin keinen Unterschied (Abbildung 22, Spektrum B gebunden, Spektrum C frei).



Abb. 21: ¹³C NMR Untersuchugen an Flavokinase mit unterschiedlich ¹³C markierten Riboflavinen.
A [2, 4a-¹³C₂] Riboflavin (1,4 mM) mit Flavokinase (1,5 mM); B [2, 4a-¹³C₂] Riboflavin (2,5 mM) ohne Flavokinase; C [4, 10a-¹³C₂] Riboflavin (1,4 mM) mit Flavokinase (1,5 mM); D [4, 10a-¹³C₂] Riboflavin (3,5 mM) ohne Flavokinase. Alle Proben mit und ohne Protein enthielten 100 mM Tris HCl pH 8 und 10% D₂O. Die Signale wurden mit einer Linienverbreiterung von 15 Hz transformiert. f bedeutet freies nicht proteingebundenes Riboflavin.

In diesem Falle könnten sich zwei gegensätzliche Effekte aufheben. Das ist zum einen der erwartete Tieffeldshift durch die Delokalisierung der positiven Ladung in Folge der Steigerung der sp² Hybridisierung an N(10) und zum Anderen der Hochfeldshift durch die Ausbildung einer relativ starken Wasserstoffbrückenbindung zwischen N(5) und der Flavokinase. Diese H Brücke müsste aber auch die chemische Verschiebung der Resonanz von C(4a) in Richtung Hochfeld beeinflussen. Entweder ist die Wassersoffbrückenbindung an N(5) nicht sehr stark oder diese Tatsache bestätigt die Stärke der H Brücke zur Carbonylgruppe an C(4). Aber der erwartete Tieffeldshift der Resonanzen für die Atome C(7) bzw. C(7 α) als Folge der Eigenschaften von N(10) tritt nicht auf.

Letzteres zeigt bei der Bindung des Riboflavins an die Flavokinase keine Veränderung der chemischen Verschiebung (Abbildung 20, Spektrum D gebunden, Spektrum E frei). Während die entsprechende Resonanz von C(7) einen Hochfeldshift von etwa 1 ppm zeigt. Aber die genaue Verschiebung dieser Resonanz muß erst durch Messung des Proteins mit doppelt ¹³C markiertem Riboflavin in Position 7 und 9a verifiziert werden.



Abb. 22: ¹³C NMR Untersuchugen an Flavokinase mit unterschiedlich ¹³C markierten Riboflavinen. **A** Flavokinase (0,5 mM) mit [5a, 6, 7, 7 α , 8, 8 α , 9, 9a-¹³C₈] Riboflavin (0,5 mM); **B** [5a, 8-¹³C₂] Riboflavin (0,6 mM) mit Flavokinase (1,3 mM); **C** [5a, 8-¹³C₂] Riboflavin (1,1 mM) ohne Flavokinase. Alle Proben mit und ohne Protein enthielten 100 mM Tris HCl pH 8 und 10% D₂O. Die Signale wurden mit einer Linienverbreiterung von 15 Hz transformiert.

In freien Flavinen beeinflusst eine starke Wasserstoffbrückenbindung mit der Carbonylgruppe an Position C(2) die π Elektronendichte an den Atomen C(8), C(6), N(5), C(9a) und C(10a) durch konjugative Effekte, was zu einem hoch polarisierten Flavinmolekül führt. Zur Stabilisierung der resultierenden mesomeren Strukturen ist ein Lösungsmittel mit einer hohen Dielektrizitätskonstante notwendig. Deshalb sollte die Bildung einer starken Wasserstoffbrückenbindung zwischen C(2 α) und dem Protein zu einem Tieffeldshift der

Resonanzen der eben genannten C Atome führen. Aber die chemische Verschiebung der Resonanz für C(2) macht deutlich, dass zwar eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen der C(2) Carbonylgruppe und der Flavokinase besteht, die aber wesentlich schwächer ist, als zwischen freiem Flavin und Wasser. Im Falle der hier betrachteten Flavokinase folgen die Atome C(6) (Abb. 20, Spektrum B gebunden, Spektrum C frei), C(9a) und C(10a) (Abb. 21, Spektrum C gebunden, Spektrum D frei) dem für die freien Flavine beobachteten Tieffeldshift bei H-Brückenbildung am Sauerstoff der Carbonylgruppe von $C(2\alpha)$. Die chemische Verschiebung der Resonanz des Atoms C(9a) muß erst durch Messung mit einem doppelt ¹³C markierten Riboflavin in Position 7 und 9a genau bestimmt werden. Nur die Atome C(8) (Abb. 22, Spektrum B gebunden, Spektrum C frei) bzw. C(8a) (Abb. 20, Spektrum B gebunden, Spektrum C frei) zeigen bei Bindung an die Flavokinase den entgegengesetzten Effekt einer Verschiebung ihrer Resonanzen nach höherem Feld hin verglichen mit freiem Flavin in wässrigem Medium. Die chemische Verschiebung von $C(8\alpha)$ kommt sogar nahe an die Verschiebung dieses Atoms von TARF in apolarem Medium heran. Diese Ergebnisse könnten dafür sprechen, dass dieser Anteil des Flavinmoleküls in einer relativ hydrophoben Umgebung liegt in dem aktiven Zentrum der Flavokinase, und so die chemischen Verschiebungen dem erwarteten Trend des bisher Betrachteten entgegenwirken. Das würde auch für die erwarteten Verschiebungen für C(7) sowie C(7 α) der Fall sein.

Zur genauen Einordnung der ¹³C Verschiebungen sind noch Messungen der Flavokinase mit ¹⁵N markierten Flavinen notwendig. Ein Vergleich der hier aufgeführten Ergebnisse mit der Kristallstruktur, in der FMN und ADP gebunden vorliegt, könnte Aufschluß über die Art und Weise der Bindung von Riboflavin an die Flavokinase geben.

In der folgenden Abbildung 23 sind nochmals zwei ¹³C NMR Spektren der Flavokinase mit ¹³C₈ markiertem Riboflavin zu sehen. Der einzige Unterschied zwischen diesen Spektren besteht darin, dass Spektrum 1 ohne ATP gemessen wurde und Spektrum 2 nach der Zugabe von stöchiometrischen Mengen von ATP gemessen wurde. Besonders im Bereich der chemischen Verschiebung des Signals für das C Atom 8 sieht man eine Veränderung. Ein zusätzliches Signal bei 151,8 ppm taucht auf. Nach der bisherigen Zuordnung der Signale für das freie Flavin bzw. das gebundene Flavin durch die einfach und doppelt markierten Flavine kann dieses zusätzliche Signal dem Atom C(8) zugeordnet werden, das nicht an das Protein gebunden ist. Auch bei genauer Analyse der anderen Resonanzen konnten nach Zugabe von ATP Signale für freies Flavin zusätzlich zu den ursprünglich vorhandenen Signalen für an die Flavokinase gebundenes Flavin zugeordnet werden.

Die Erklärung hierfür wäre, dass die Flavokinase auch ohne Mg^{2+} das gebundene ${}^{13}C_8$ Riboflavin umgesetzt hat und das Produkt FMN vom Protein abgespalten hat. Experimente dazu sind noch in der Durchführung.



Abb. 23: ¹³C NMR Untersuchugen an Flavokinase mit unterschiedlich ¹³C markierten Riboflavinen. A Flavokinase (0,5 mM) mit [5a, 6, 7, 7α, 8, 8α, 9, 9a-¹³C₈] Riboflavin (0,5 mM); B Flavokinase (0,5 mM) mit [5a, 6, 7, 7α, 8, 8α, 9, 9a-¹³C₈] Riboflavin (0,5 mM) plus ATP (0,6 mM). Alle Proben enthielten 100 mM Tris HCl pH 8 und 10% D₂O. Die Signale wurden mit einer Linienverbreiterung von 15 Hz transformiert.

3.1.6 Röntgenstrukturanalyse der Flavokinase aus S. pombe

Die Kristallisation der Flavokinase aus *Schizosaccharomyces pombe* und die Röntgenstrukturanalyse an Kristallen dieses Proteins wurde von Frau Dipl.-Chem. Stefanie Bauer und Dr. Stefan Steinbacher am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Robert Huber durchgeführt, und die Ergebnisse wurden mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

3.1.6.1 Kristallisation



Abb. 24: Kristalle der substratfreien nativen Flavokinase aus Schizosaccharomyces pombe in 0,1 M Mes/NaOH pH 6,5, 0,2M MgAc, 20% PEG 8000

Für Röntgenbeugungsexperimente taugliche Kristalle der Flavokinase aus *Schizosaccharomyces pombe* wurden im sitzenden Tropfen nach der Methode der Dampfdiffusion erhalten. Das gereinigte rekombinante Protein wurde in einer Konzentration von 10 mg/ml in 20 mM Tris/HCl pH 8.0 und 100 mM NaCl eingesetzt. Mit der Kristallisationsbedingung 0,1 M Mes/NaOH pH 6.5, 0,2 M MgAc und 20 % PEG 8000 konnten typische Kristalle der Flavokinase aus *S. pombe*, die in Abbildung 24 zu sehen sind, erhalten werden.

Im pH-Bereich von 6,1 – 6,6 und einer PEG-Konzentration von 18 –21 % wuchsen mit diesem Fällungsmittel fast überall hochgeordnete Kristalle mit hohem Streuvermögen.

Die Kristalle der Flavokinase zeigen eine hexagonale Gittermetrik mit den Gitterkonstanten a = b = 70,32 Å, c = 141,28 Å und $\alpha = \beta = 90^{\circ}$, $\gamma = 120^{\circ}$. Die Raumgruppe konnte mit P6₁22 mit einem Monomer von 18,9 kDa in der asymmetrischen Einheit bestimmt werden, was die Verhältnisse für die Flavokinase in Lösung widerspiegelt. Der erste native Datensatz der Flavokinase beinhaltet gemessene Reflexe bis zu einer Auflösung von 3,0 Å.

Da bisher keine Struktur der Flavokinase aus anderen Organismen oder homologe Strukturen bekannt waren, blieb als Möglichkeit zur Strukturlösung der Flavokinase aus *S. pombe* die Methode des Multiplen Isomorphen Ersatzes. Das Modell konnte mit dieser Methode bis zu einer Auflösung von 2,1 Å verfeinert werden. Während aller Stadien der Verfeinerung war für die interne Region zwischen den Aminosäureresten 1-9 und 82-94 keine Elektronendichte sichtbar, so daß dieser Teil des Moleküls nicht im finalen Modell beinhaltet war. Nachdem ein Modell für die sichtbaren Regionen des Proteins eingebaut worden war, wurden Wassermoleküle an stereochemisch sinnvollen Positionen in positiven Differenzdichten eingebaut. Das finale Modell enthielt 142 Aminosäuren von 163.

Durch "Soaken" dieser Kristalle mit 10 mM ATP-, ADP- bzw. FMN- Lösungen konnte keine zusätzliche Elektronendichte beobachtet werden, was die Schlussfolgerung zulässt, dass die Bindungsstellen durch Kristallkontakte blockiert sind.

Experimente zur Co-Kristallisation der Flavokinase mit ADP wurden bei Raumtemperatur durchgeführt, indem die Flavokinase mit einer Konzentration von 10 mg/ml in 20 mM Tris/HCl pH 8.0 und 100 mM NaCl mit 2 mM ADP Lösung gemischt wurde. Die Methode des sitzenden Tropfens wurde auch hier angewendet. Als Fällungsmittel diente eine Lösung von 50 mM NaKHPO₄ und 20 – 22% PEG 8000. Es wurde eine neue tricline zur Raumgruppe P1 gehörige Kristallform mit zwei Monomeren von 18,9 kDa in der asymmetrischen Einheit erhalten. Die Gitterkonstanten der triclinen Kristalle sind a = 38,8 Å b = 45,8 Å, c = 51,9 Å und α = 90,7° β = 111,0°, γ = 97,3°. In diesen Kristallen war Elektronendichte für das gebundene ADP klar sichtbar. In dieser Kristallform war die Riboflavin Bindungsstelle für beide Moleküle zugänglich und durch "soaken" dieser Kristalle mit dem Produkt FMN konnte Elektronendichte des Isoalloxazinringes von FMN gefunden werden. Die Strukturen der ADP und FMN Komplexe wurden mit der Methode der molekularen Ersetzung gelöst und bis zu einer Auflösung von 2,0 Å (für ADP) und 2,45 Å (für ADP + FMN) verfeine rt. Die finalen Modelle der zwei Komplexe bestehen aus 151 Aminosäureresten von 163. Für die Reste 34 –

35 und für die Ribitylseitenkette des FMN war die Ekektronendichte nur schwach definiert. Für die Reste 89 – 91 wurde keine Elektronendichte gefunden.

3.1.6.2 Beschreibung der Kristallstruktur

Die Flavokinase aus *Schizosaccharomyces pombe* besteht aus einer einzelnen Domäne mit einer relativ kugelförmigen Gestalt mit einem Durchmesser von ca. 36 Å (Abb. 25a). Die hervorstechendste Eigenschaft der Flavokinase Struktur ist, dass der N-terminale Anteil der Helix H3, der an die Substrat Bindungsplattform angrenzt, aus der Struktur herausragt, in der er zur Riboflavin Bindungsstelle beiträgt. Das Kristallmodell der Flavokinase aus *Schizosaccharomyces pombe* beinhaltet die Aminosäurereste 10 – 82 und 94 – 162, die in 6 β Faltblattstränge, 4 α Helices sowie die verbindenen Loops falten. Die 6 β Faltblattstränge sind sehr stark verdreht, so dass sie ein abgeflachtes β - *berrel* (Faß – Motiv) bilden, das aus zwei übereinander liegenden viersträngigen antiparallelen β Faltblattstrukturen besteht. In Abbildung 26 sieht man die Abfolge der Sekundärstrukturelemente der Flavokinase aus *Schizosaccharomyces pombe*.

Die obere β Faltblattstruktur bildet die Substrat Bindungsplattform und ist aus 5 β Faltblattsträngen der Topologie 1–2–5–4–3 zusammengesetzt. Die untere β Faltblattstruktur besteht aus 4 β Faltblattsträngen mit der Topologie 1–6–3–4. Die β Faltblattstränge S1, S3 und S4 sind zwischen diesen beiden β Faltblattstrukturen angeordnet. Auf der oberen β Faltblattstruktur befindet sich zwischen den beiden β Faltblattsträngen S1 und S2 eine kurze α Helix H1, bestehend aus den Aminosäureresten 36–41, die für die ATP Bindung essentiell ist. Zwischen den β Faltblattsträngen S4 und S5 von dem Aminosäurerest Gly82 bis zum Ser94 ist ein Abschnitt von 11 Aminosäureresten vollkommen flexibel und zeigt deshalb keinerlei Elektronendichte. Da diese Region an die Substrat Bindungsregion angrenzt, könnte sie an der Katalyse beteiligt sein, indem sie einen flexible Loop bildet. Eine andere kurze Helix H2 befindet sich zwischen den β Faltblattsträngen S2 und S3 zwischen den Resten 53– 60. Der C-terminale helikale Anteil besteht aus einer längeren α Helix, die aus den Resten 129–147 besteht und einer kurzen 3₁₀ Helix aus den Resten 150–158, die im rechten Winkel zur ersteren Helix liegt. Beide zusammen haben eine Form wie ein L und umklammern das zentrale β -berrel.



Abb. 25: Stereodarstellung der Struktur der Flavokinase aus *Schizosaccharomyces pombe*. (A) ohne gebundene Substrate; (B) co-kristallisiert mit ADP und FMN durch *Soaking* Experimente eingeführt. Die Sekundärstrukturelemente haben folgende Farben: α Helices rot und β Faltblätter gelb. (C) Überlagerung der substratfreien (rot) und ADP haltigen (blau) Flavokinase. Konservierte Aminoesäurereste, die ihre Orientierung bei ADP Bindung ändern, sind als Kugel-Stab Modell eingezeichnet. Asp106 und Tyr108 helfen, die Ribose Einheit in die richtige Position zu bringen und His98 bildet einen Kontakt zur Adenyl Einheit aus.

	51
S. pombe S. cerevisiae A. thaliana C. elegans M. musculus H. sapiens D. melanogaster	1 10 20 MTVNLEEKRPEIVGPEKVQSPYPIRFE. GKVVHGFG TNTDIIDTFKREVDLPIPAQPGPPFPLVTDYCDIVCGFG NSSRANIESKISYHEGIENTLPIDPWHIG. GPVIKGFG MNLLPYQFV. GEVVRGFG MRSLPFFCR. GQVVRGFG
	H1 S2 H2 S3
S. pombe S. cerevisiae A. thaliana C. elegans M. musculus H. sapiens D. melanogaster	40 F G S K E L G L P T A N I S E D A I Q E L L R Y R D S G V Y F G Y A M V R G S A E L G L P T A N V P I N Q L P K G I N D L D L G V Y F G F A H I K T V R G S K V L G L P T A N L S T K D Y A D E L V E H P S G V Y F G WA G L R G G K E L G C P T A N M D G T V V N G L P E G L P V G Y Y F G WA G L R G S K Q L G L P T A N F P E Q V V D N L P A D V S T G I Y Y G WA S V R G S K Q L G L P T A N F P E Q V V D N L P A D I S T G I Y Y G WA S V R G S K E L G L P T A N F P E Q V V D N L P A D I S T G I Y Y G WA S V R G S K E L G L P T A N F P E Q V V K S L P E S L P T G A Y Y G WA N V
	S4
S. pombe S. cerevisiae A. thaliana C. elegans M. musculus H. sapiens D. melanogaster	80 D G Q E L S V E T R R D G R T V V Y N Y G Q Y L S E A N D D L S V L P M V M S A K R G V F K M V M S D . G K S Y K M A M S
	Loop S5 S6
S. pombe S. cerevisiae A. thaliana C. elegans M. musculus H. sapiens D. melanogaster	90 V G WN P Y Y K N K L R S A E V H L I E R O G E D F Y E E I M R V I V L G Y I V G K N P F Y G N D F K T M E L H I I H D F K N D F Y G A R V K F N L G H I I G WN P Y F N N K E K T I E P W L L H D F T E D F Y G E E L R L I I V G Y I I G WN P Q Y Q N E K K T V E L H L I D Y S G S D F Y G K T L S A V I I G F I I G WN P Y Y K N V K K S M E T H I I H T F K E D F Y G E I L N V A I V G Y L I G WN P Y Y K N T K K S M E T H I M H T F K E D F Y G E I L S V A I V G Y L I G WN P Y Y N N K E K S V E T H M L H D F N C D L Y G Q T L K I C V G Y L
	H3 H4
S. pombe S. cerevisiae A. thaliana C. elegans M. musculus H. sapiens D. melanogaster	130 RPELNYAGLDKLLEDLHTDLRVALNSMDRPSYSSYKKDP RPELNYTTKEALLEDLHTDLRTAQTVLATPPYQVFKQQL RPEANFSSLESLLAKIHEDREVAEKALDLPSYAKFKGDP REMKSFESLDELKSALAMDIKVARRGSVEQGKL RPEKNFDSLESLLSALQGDLEEAKKQLDLPEHLKLKDDN RPEKNFDSLESLLSALQGDLEEAKKRLELPEHLKIKEDN RPERSFDSLESLLAAFRGDLEQAKAFLDEADKAKLKEAP
S. pombe S. cerevisiae A. thaliana C. elegans M. musculus H. sapiens	160 FFKV. YLTK. FF. QVSKGKIMNGH

Abb. 26: Abfolge der Sekundärstrukturelemente in der Aminosäuresequenz der Flavokinase aus *Schizosaccharomyces pombe* und Sequenz Alignment mit homologen Flavokinasen verschiedener eukaryotischer Organismen. Die Numereierung bezieht sich auf die Squenz der Flavokinase aus *Schizosaccharomyces pombe*. Die für die Flavokinase aus *Schizosaccharomyces pombe* gefundenen Sekundärstrukturelemente sind über dem Alignment eingezeichnet (grün: α Helices; blau: β Faltblattstränge). Identische Reste haben einen roten Hintergrund und konservierte Reste einen gelben Hintergrund.

Der ADP/FMN Komplex zeigt 9 zusätzliche geordnete Reste im Vergleich zum substratfreien Enzym. Am N-terminalen Ende konnte ein Rest hinzugefügt werden. Acht Reste konnten zwischen den β Faltblattsträngen S4 und S5 zwischen den Resten 83 – 88 sowie 92 – 93 zu den geordneten Resten hinzugefügt werden. Es scheint so, als ob diese Reste hauptsächlich durch Kristallkontakte geordnet werden.

3.2.6.3 Beschreibung des Aktiven Zentrums

Versuche, die Substrat Bindungsstelle durch *soaken* der substratfreien hexagonalen Kristalle mit den Substraten bzw. mit den Produkten der Flavokinase zu identifizieren, schlugen alle fehl. Später wurde als Grund dafür angenommen, dass die gesamte Bindungsstelle für ATP und Riboflavin durch Kristallkontakte in den hexagonalen substratfreien Kristallen blockiert sind.

Durch Co-Kristallisation der Flavokinase mit 2 mM ADP wurde eine neue tricline Kristallform erhalten mit zwei Molekülen in der asymmetrischen Einheit (Abb. 25b). In diesen Kristallen war Elektronendichte für das gebundene ADP in der Nähe der Helix H1 sichtbar. Durch *soaken* dieser Kristalle mit dem zweiten Reaktionsprodukt FMN wurden leuchtend gelbe Kristalle erhalten. Die Elektronendichte für den Isoalloxazinring des FMN war in dem Zwischenraum, der durch die N-terminale Hälfte der α Helix H1 und dem Loop zwischen dem β Faltblattstrang S6 und der α Helix H3 gebildet wird, sichtbar. Für die Phosphoribitylseitenkette war nur wenig Elektronendichte sichtbar. Aber es wird angenommen, dass die Phosphoribitylseitenkette eine gedehnte Form annimmt, um einen engen Kontakt zwischen dem β Phosphat des ADP und der Phosphatgruppe der Phosphoribitylseitenkette in direkter Nachbarschaft zum streng konservierten Rest Asn47 zu ermöglichen. Der benachbarte Rest Glu96 könnte eine Wasserstoffbrücke zum Sauerstoff O4 der Ribitylseitenkette bilden. Die Stelle der Phosphatübertragung ist durch einen flexiblen Loop genannt "flap I" zwischen dem β Faltblattstrang S2 und der α Helix H1, der die Reste Gly33 bis Gly37 beinhaltet, verdeckt.

Die Phosphoribitylseitenkette des FMN ist deutlich dem Lösungsmittel ausgesetzt. Das ist sehr ungewöhnlich, da als generelles Prinzip von phosphatübertragenden Enzymen, die Abschirmung der Substrate vom Lösungsmittel beobachtet wurde, um unkontrollierte ATP Hydrolyse vorzubeugen. Das wird durch große Domänen Bewegungen, wie es z. B. für die Adenylat Kinase, die Hexokinase oder die Phosphoglycerat Kinase gefunden wurde, erreicht. Zwischen den Resten Ser81 bis Ser 94 befindet sich ein langer flexibler Loop, der die β Faltblattstränge S4 und S5 miteinander verbindet und "flap II" genannt wird. Dieser Loop ist nicht nur verantwortlich dafür, dass die Ribitylseitenkette in die richtige Position gebracht wird, sondern er könnte auch das aktive Zentrum während der Übertragung der Phosphatgruppe abschirmen, indem er einfach diesen Bereich abdeckt. Diese Zuordnung einer speziellen Aufgabe für diesen Loop "flap II" wird durch das Vorhandensein einer hoch konservierten Konsensussequenz S81-x-G-N-P-x-x-x-N90 in diesem Bereich unterstützt. Ein Vergleich der Strukturen der substratfreien Form der Flavokinase mit dem ADP/FMN Komplex der Flavokinase lässt eine bemerkenswerte strukturelle Flexibilität um die Helix H1 und den Loop, der die β Faltblattstränge S5 und S6 verbindet, erkennen, der mit der Bindung von ADP (Abb. 25c) verbunden ist. Auch die glycinreiche Sequenz mit den Resten Gly35 und Gly40 an den N- und C-terminalen Enden der α Helix H3 tragen wahrscheinlich zu dieser Flexibilität bei. Der gesamte Bereich zwischen den Aminosäureresten His32 und Asn47 ist

einer der am höchsten konservierten Bereiche im gesamten Molekül und ist entscheidend an der ATP Bindung sowie an der dynamischen Formierung der Bindungsstelle beteiligt. Auch das in allen verglichenen Flavokinasen konservierte Motiv G43-x-PTAN, in dem x einenen großen hydrophoben Rest darstellt, befindet sich in diesem Abschnitt des Moleküls. Die Glycin Reste 33, 35 und 37 erscheinen essentiell für die beobachtete konformative Flexibilität um die α Helix H1 während der ATP Bindung.

Die hier identifizierten Substrat Bindungsstellen für ADP und FMN stimmen gut mit den über die gesamte Substrat Bindungsplattform verteilten konservierten Resten überein (Abb. 25a). Zusätzlich zu den konservierten Resten Asn47 und Glu96 auf der Seite der Übertragung der Phosphat Gruppe, nehmen konservierte Reste an der Riboflavin Bindung (R121 und D139) bzw. an der ATP Bindung (H98, D106 und Tyr108) teil.

3.2.6.4 Bindung von ATP, Riboflavin und zweiwertige Metallkationen

Das aktive Zentrum der Flavokinase kann in zwei Bindungsstellen unterteilt werden, zum einen für ATP und zum anderen für Riboflavin, die in der Struktur durch ADP und FMN in Abwesenheit zweiwertige Metall Kationen repräsentiert werden. In den Abbildungen 27 und 28 sind die Bindungsstellen für Riboflavin und ATP in der Flavokinase aus *Schizosaccharomyces pombe* zu erkennen. Die Bindungsstelle für Riboflavin wird von der C-terminalen α Helix H3 und dem Loop, der die α Helix H3 mit dem β Faltblatt S3 verbindet,

gebildet. Der Isoalloxazinring des FMN ist in einer hydrophoben Tasche gebunden, die aus den Aminosäureresten V79, Y126, L129, L132 und I136 besteht. Die konservierten Aminosäurereste Arg 121 und Asp139, die miteinander eine Salzbrücke bilden, zeigen Wechselwirkungen mit dem Sauerstoff O4 der Carbonylgruppe am Kohlenstoffatom C(4) des FMN über die Amidinogruppe von Arg121.

Sowohl zwischen dem Aminosäurerückrad als auch den Seitenketten der Aminosäuren der Flavokinase und den polaren Gruppen des gebundenen FMN Ringes bestehen einige Wasserstoffbrückenbindungen (Abb. 29). Zwischen der Amidgruppe der Aminosäure Leu124 und dem Carbonylsauerstoff O4 des FMN bestehen Wechselwirkungen. Zwischen der Guanidinogruppe der Seitenkette der Aminosäure Arg121 und dem Carbonylsauerstoff O4 des FMN bestehen Wechselwirkungen.

Die Ribitylseitenkette des FMN erscheint in großem Ausmaß ungeordnet und besitzt eine gedehnte Konformation, die notwendig ist, um den Abstand zum ADP Molekül zu verringern. Diese wird durch eine Wasserstoffbrückenbindung der Hydroxylgruppe OH2 der Ribitylseitenkette mit der Hydroxylgruppe von Ser81 und durch Wechselwirkungen der Carboxylgruppe der Aminosäure Glu96 mit der Hydroxylgruppe OH3 stabilisiert. Außerdem ist die Aminosäure Glu96 in Nachbarschaft zur 5`-Phosphatgruppe angeordnet.

Die ATP Bindungstelle der Flavokinase (Abb. 27b) ist in der Nachbarschaft der α Helix H1 lokalisiert und umfasst die Loops, die dieser Helix vorangehen bzw. nachfolgen sowie den Loop, der die β Faltblattstränge S5 und S6 verbindet.

Die Bindung des Adenosin Ringes vom ADP Molekül an die Flavokinase wird durch Wechselwirkungen mit dem Aminosäurerückrad und den Aminosäureseitenketten über Wasserstoffbrückenbindungen unterstützt. Die Aminogruppe von Leu99 zeigt Wechselwirkungen mit der Imidogruppe N1 des Adenylringes.

Desweiteren sind Wechselwirkungen zwischen der Aminogruppe N6 des Purinringes mit dem Stickstoff N δ von His98 und dem Carbonylsauerstoff von Leu99 sowie zwischen N7 und der Aminogruppe der Seitenkette von Arg102 zu beobachten.

Zwischen dem Sauerstoff O4 des Ribosylringes und der Aminogruppe von Lys39 und zwischen dem Carboxyl Sauerstoff von Asp106 bestehen Wasserstoffbrückenbindungen. Die Hydroxylgruppen des Ribosylringes OH2 bilden mit den Aminogruppen von Phe107 und Tyr108 sowie die Hydroxylgruppe OH3 mit der Hydroxylgruppe von Tyr108 Wasserstoffbrückenbindungen.



Abb. 27: Stereoabbildung der Bindung der Produkte an die Flavokinase aus *Schizosaccharomyces pombe*, (A) mit FMN in der Flavin Bindungsstelle; (B) mit ADP in der ATP Bindungsstelle. Die Aminosäurereste, die hydrophobe Wechselwirkungen oder Wassersoff Brückenbindungen eingehen, sind eingezeichnet.



Abb. 28: Stereodarstellung des Aktiven Zentrums der Flavokinase aus *Schizosaccharomyces pombe*. Die gebundenen FMN und ADP Moleküle sind als Kugel-Stab-Modelle eingezeichnet. Der flexible Loop "flap I" bedeckt die β - und γ - Phosphat Bindungsstelle.

Durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Carbonyl Sauerstoff von Lys39 mit einem der O α Sauerstoffatome der Diphosphatgruppe von ADP wird diese stabilisiert.

Ein Sequenzvergleich zeigt, dass die meisten Aminosäurereste, die zur Bindung von ADP und FMN über Wasserstoffbrückenbindungen bzw. hydrophobe Wechselwirkungen beitragen, in allen Organismen konserviert sind bzw. konservativ ersetzt sind.

Zur Identifizierung der Metall Bindungsstelle gibt es bis jetzt noch keine experimentellen Daten.

Phosphatgruppenübertragende Enzyme haben einige gemeinsame Eigenschaften, z. B. die Einbeziehung von Carboxylgruppen in die Metallbindung sowie eine Base, die das Substrat aktiviert.

Die drei konservierten Aminosäurerste Thr45, Asn47 und Glu96 sind die einzigen invarianten Reste in der Nähe des aktiven Zentrums (Abb. 28). Für eine Metall Bindungsstelle mit hoher Affinität zum Metall ist kein Cluster geeigneter Aminosäuren vorhanden. Wahrscheinlich wird das Metall nur übergangsweise in Anwesenheit des Substrates gebunden. Übergangsweise Bindung des Metalls ist für phosphatgruppenübertragende Enzyme allgemein beobachtet worden.





Abb. 29: Schematische Darstellung der Wechselwirkungen zwischen Produkt und Protein in den Bindungsstellen für ADP und FMN.

Im aktiven Zentrum, das den flexiblen Loop "flap II" beinhaltet, gibt es nur den Rest Glu96, dessen Carboxylgruppe als Ligand für das Metall dienen könnte. Die Carboxylgruppe des Aminosäurerstes Glu96 zeigt auf das Ende der Phosphoribitylseitenkette und ist so in der idealen Position, um die 5`-Hydroxylgruppe der Ribitylseitenkette des Riboflavins durch Aufnahme ihres Protons zu aktivieren.

Geometrisch gesehen, wäre der Rest Asn47 der ideale Kandidat als Ligand zur Komplexierung der zweiwertigen Metallkationen, da es genau in der Mitte zwischen der β Phosphatgruppe des ADP und der 5`-Phosphatgruppe des FMN bei gedehnter Konformation der Phosphoribitylseitenkette liegt (Abb. 25b und 28). Aber Mg²⁺ bevorzugt zur Komplexierung Carboxylgruppen.

Es könnte spekuliert werden, dass der flexible ungeordnete Loop "flap II" zwischen den β Faltblattsträngen S4 und S5 an der Positionierung der Ribitylseitenkette und an der Bindung der zweiwertigen Metallkationen beteiligt ist. An der Metallbindung könnten dabei zwei konservierte Asn Reste Asn85 und Asn90 beteiligt sein.

Eine andere Möglichkeit für die Metallbindung wäre die Beteiligung der Hydroxylgruppen von Ser bzw. Thr, wie in GTP bindenden Proteinen beobachtet wurde. In GTP bindenden Proteinen bindet ein konservierter Ser/Thr Rest aus dem P-Loop, der das β Phosphat des GTP umhüllt, an Mg²⁺ und bildet so einen zweizähnigen Komplex mit der β und der γ Phosphatgruppe des GTP. Die Reste Ser38 und Thr45 könnten in der Flavokinase diese Funktion übernehmen. Die Mutation des Glu96 Restes zu Gln, Ala und Ser hat die Aktivität des Enzyms stark reduziert, führte aber nicht zur vollständigen Inaktivierung des Enzyms (Ergebnisse hier nicht gezeigt).

Der am meisten diskutierte Mechanismus von phosphatübertragenden Enzymen ist ein assoziativer Mechanismus über einen fünfwertigen Übergangszustand, der oft durch positiv geladene Reste stabilisiert wird. In der Flavokinase gibt es keine konservierten basischen Reste in der Nähe des aktiven Zentrums. Nur der nicht strikt konservierte Arg36 Rest im flexiblen Loop "flap I", der nur wenig Elektronendichte hat und in Richtung des Lösungsmittels zeigt, könnte diese Rolle in unterschiedlichen Loop Konformationen spielen. Das gleiche gilt für die basischen Reste His32 und Lys39, die nahe beim β Phosphat und der Ribose liegen. Aber beide Reste sind nicht ideal positioniert, um mit dem β Phosphat zu interagieren.

Die Suche nach Struktur Homologie zu anderen bekannten ATP bindenden bzw. FMN bindenden Proteinen, wie z. B. der Phthalat Dioxygenase, Flavohämprotein, Flavodoxin Reduktase und die F1-ATPase ergab nur eine strukturelle Ähnlichkeit mit dem zentralen β -*berrel* der Flavokinase. Die Cofaktor bzw. ATP Bindungsstellen dieser Proteine zeigen keine strukturelle Übereinstimmung dieser Proteine mit der Flavokinase. Demnach zeigt die Flavokinase keinerlei strukturelle Homologien zu ATP bindenden bzw. Flavin bindenden Proteinen bekannter dreidimensioneler Struktur. Die Flavokinase bildet eine neue Art der Faltung von FMN bzw. ATP Bindungsstellen.

84

3.2¹⁹F NMR Untersuchungen an Riboflavin Synthasen

3.2.1 Die Fluorlumazine

Für ¹⁹F NMR Untersuchungen wurden von Cushman und Mitarbeitern eine Reihe strukturanaloger Verbindungen des 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazins (Verbindung **VIII**) synthetisiert, bei denen Methylgruppen durch Trifluormethylgruppen ersetzt wurden.

Zum einen war das Ziel dieser Arbeiten die Entwicklung potentieller Inhibitoren der Riboflavin Synthase. Zum anderen stellt die ¹⁹F NMR Spektroskopie mit fluorhaltigen Liganden als Sonden ein interessantes Werkzeug zur Untersuchung von Protein/Ligand Wechselwirkungen dar, denn der ¹⁹F Kern bietet dafür einige Vorteile (Gerig, 1989).

Der ¹⁹F Kern ist ein Reinisotop mit einer dem ¹H Kern vergleichbaren Empfindlichkeit. Das macht ihn vom messtechnischen Standpunkt aus den biologisch relevanteren ¹³C und ¹⁵N Kernen überlegen.

Das ¹⁹F NMR Spektrum eines Protein/Ligand Komplexes enthält normalerweise keine störenden Protein- oder Lösungsmittelsignale, sondern nur Signale, die vom Fluorliganden stammen.

Der chemische Verschiebungsbereich der ¹⁹F Kerne ist sehr breit. Allein die Signale von Trifluormethylgruppen variieren um etwa 50 ppm. Dies macht ¹⁹F NMR Signale sehr sensitiv. Schon kleinste Änderungen in der chemischen Umgebung der Fluorkerne können Signalverschiebungen um mehrere ppm verursachen. Eine solche Änderung wird durch den Wechsel eines Fluorliganden von der freien Solvensumgebung in die Bindungstasche eines Proteins induziert. Die ¹⁹F NMR Signale proteingebundener Fluorliganden werden dadurch oft so weit von den Signalen des freien Liganden separiert, dass sich beide Signale durch Integration quantitativ auswerten lassen. Nach der Titration des Proteins mit einem Fluorliganden lassen sich so, wie bei der Gleichgewichtsdialyse, die Bindungsparameter bestimmen.

Diese Methode gibt aber noch einen viel detaillierteren Einblick in das Gesamtsystem. Zum Beispiel kann der Einfluß von Mutationen in der Aminosäuresequenz auf die chemischen Verschiebungen, die Signalintensitäten oder das Aufspaltungsmuster der Signale für den an das Protein gebundenen Fluorliganden Aufschluß über das aktive Zentrum bzw. über die Bindungsstellen geben.



Abb. 30: Intermediate 1a und 2 der postulierten Raktionsmechanismen der Riboflavin Synthase und deren trifluormethylsubstituierte Analoga. 6,7-Bis(trifluormethyl)-8-ribityllumazin, 11a Epimer A, 11b Epimer B; 6-Trifluormethyl-7-oxo-8-ribityllumazin 12.

Durch Kondensation von 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidindion (Verbindung **VI**) mit Hexafluoro-2,3-butandion, dem Fluoranalogon von Diacetyl, wurden zwei an C7 epimere stabile Formen des 6,7-Bis(trifluormethyl)-8-ribityllumazin-7-hydrats dargestellt. Sie wurden durch präparative HPLC getrennt und entsprechend ihrer HPLC Elution als Epimer A (Verbindung **11a**) und Epimer B (Verbindung **11b**) bezeichnet. Diese Epimere racemisieren nicht und werden nicht dehydratisiert. Die in der Abbildung eingezeichnete absolute Stereochemie an C7 wurde auf der Grundlage von Feststoff NMR Untersuchungen

an 6,7 Dimethyl-8-ribityllumazin Synthase ermittelt (Goetz et al. 1999; Mehta et al. 2002). Biosynthetisch stellen die beiden Epimere fluorierte Analogverbindungen zum Intermediat 2 der hypothetischen Reaktionsmechanismen dar, bei dem durch Addition eines Nucleophils an das C7 Atom dieses sp³ hybridisiert wurde.

6-Trifluormethyl-7-oxo-8-ribityllumazin (Verbindung 12) wurde durch Cushman und Mitarbeiter durch Kondensation von Methyltrifluoropyruvat mit 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidindion (Verbindung VI) synthetisiert (Cushman et al., 1992). Die Carbonylgruppe an C7 dieser Verbindung soll die 7 α Exomethylenstruktur 1a simulieren, die Produkt der Eliminierung eines 7 α Protons von 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin in den hypothetischen Reaktionsmechanismen ist.

Mit diesen Fluorlumazinen wurden im Rahmen dieser Arbeit ¹⁹F NMR Untersuchungen an rekombinanten Riboflavin Synthasen aus *Escherichia coli* und *Schizosaccharomyces pombe*, sowie den rekombinanten N- bzw. C-terminalen Domänen der Riboflavin Synthase aus *Escherichia coli* durchgeführt. Mittels der ¹⁹F NMR Spektroskopie wurde die Bindung dieser Liganden an diese Proteine und die Auswirkung spezifischer Mutationen auf die Ligandenbindung untersucht.

Die ¹⁹F NMR Spektren der Epimere von 6,7-Bis(trifluormethyl)-8-ribityllumazin-7-hydrat (Verbindungen **11a** bzw. **11b**) sind in der Abbildung 31 dargestellt. In wässriger Lösung zeigten die ¹⁹F NMR Spektren der beiden epimeren Formen von 6,7-Bis(trifluormethyl)-8-ribityllumazin-7-hydrat (Verbindungen **11a** bzw. **11b**) die erwarteten zwei Signale ihrer Trifluormethylgruppen mit geringen Unterschieden in der chemischen Verschiebung des 7-Trifluormethylgruppe lagen für beide Epimere bei einer chemischen Verschiebung von 12,3 ppm. Die Signale für die 7-Trifluormethylgruppe lagen für Epimer A (Verbindung **11a**) bei -8,0 ppm und für Epimer B (Verbindung **11b**) bei -7,2 ppm (Abb. 31). Die Signale der Trifluormethylgruppen waren durch ¹⁹F, ¹⁹F Kopplungen zu Quartetts mit einer ⁵J Kopplungskonstanten von jeweils 6,8 Hz aufgespalten. Das Tieffeldsignal bei 12,3 ppm wurde entsprechend seiner Nachbarschaft zu einem sp² hybridisierten Kohlenstoffatom jeweils der 6-Trifluormethylgruppe zugeordnet. Die Signale bei -7,2 ppm bzw. bei -8,0 ppm entsprachen den Trifluormethylgruppe am sp³ hybridisierten Hydrat C7 Atom (Cushman et al. 1986).

Die ¹⁹F NMR Spektren beider Epimere zeigten eine geringe pH Abhängigkeit (Scheuring, 1992). Im Falle des Epimer A (**11a**) blieb im pH Bereich von 6 bis 9 das Signal bei 12,3 ppm praktisch unverändert, während das 7-Trifluormethylsignal von -7,9 ppm weiter in Richtung

Hochfeld auf -8,4 ppm verschoben wurde. Durch dieselbe pH Änderung wurde das Tieffeldsignal von Epimer B (**11b**) von 11,9 ppm auf 12,3 ppm verschoben und das Signal der 7-Trifluormethylgruppe um mehr als ein ppm von -6,9 ppm auf -8,15 ppm verschoben. Aus den pK_s Werten der Titrationskurven und einem weitgehend photometrische ermittelten pK_s Wert bei tiefem pH wurde abgeleitet, dass sich die Epimere bei pH 7,0 in einem Gleichgewicht zwischen Mono- und Dianion mit dem Schwerpunkt auf der Monoanion Struktur befinden (Scheuring et al.; 1992).

Die Stabilität der Epimere war beschränkt. Eine Erhöhung des pH Wertes über pH 7,5 und vor allem die Steigerung der Temperatur führte bei beiden Epimeren zu einer spontanen Eliminierung der 7-Trifluormethylgruppe durch Haloformreaktion (Abb. 32).

Bei dieser Reaktion entstand 6-Trifluormethyl-7-oxo-8-ribityllumazin (Verbindung **12**), was man leicht an seiner blauen Fluoreszenz (340/385 nm) erkennen konnte. Das Nebenprodukt Fluoroform ist kaum wasserlöslich und bei RT flüchtig. (Scheuring, 1992; Scheuring et al. 1995; Scheuring 2001). Die Eliminierung der 7-Trifluormethylgruppe unter solch milden Bedingungen ist ungewöhnlich, denn bei vergleichbaren CF₃ Eliminierungen hydratisierter Alkyl- oder Aryl(trifluormethyl)ketonen waren zur Deprotonierung starke Basen wie Natriumhydrid erforderlich (Delgado & Clardy, 1992). Die treibende Kraft der Eliminierung ist hier wohl die außerordentliche Stabilität des resultierenden konjugierten Säureamids im Produkt **12** (Scheuring et al., 1995).

Unter Ausnutzung dieser Eigenschaft der Epimere wurde im Rahmen dieser Arbeit der eingesetzte Fluorligand 6-Trifluormethyl-7-oxo-8-ribityllumazin (Verbindung **12**) aus Mischfraktionen der Epimerentrennung synthetisiert (Abschnitt 2.4.1.7).

Das ¹⁹F NMR Spektrum des Eliminierungsproduktes 6-Trifluormethyl-7-oxo-8-ribityllumazin (**12**) zeigte bei pH 7,0 ein einziges im Vergleich zum Trifluoracetat tieffeldverschobenes Singulett bei 7,8 ppm (Abbildung 33). Dessen Lage veränderte sich ab pH 5 mit fallendem pH Wert von 7,8 auf 6,8 ppm. Unter Lichtausschluß war das Produkt **12** bei pH 7,0 völlig stabil.



Abb. 31: 470 MHz ¹⁹F NMR Spektren der beiden Epimere des 6,7-Bis(trifluormethyl)-8ribityllumazin-7-hydrats in D₂O bei pH 7. Verunreinigungen wie Trifluoracetat sind mit **x** bezeichnet: **a** Epimer A (Verbindung **11a**); **b** Epimer B (Verbindung **11b**).



Abb. 32: Spontane Eliminierung der 7-Trifluormethylgruppe von 6,7-Bis(trifluormethyl)-8ribityllumazin-7-hydrat (Verbindung 11a und 11b) unter Bildung von 6-Trifluormethyl-7-oxo-8-ribityllumazin (Verbindung 12) und Fluoroform.



Abb. 33: 470 MHz ¹⁹F NMR Spektrum von 6-Trifluormethyl-7-oxo-8-ribityllumazin (Verbindung **12**) in D₂O bei pH 7,0. **x**: Trifluoracetat.

3.2.2 Bindungsstudien mit 6,7-Bis(trifluormethyl)-8-D-ribityllumazin-7-hydrat an Wildtyp Riboflavin Synthase aus *E.coli*

Die ¹⁹F NMR Spektren in Abbildung 34 zeigen die Titration der Riboflavin Synthase aus *E. coli* mit Epimer A (Verbindung **11a**). Bei Sättigung der Bindungsstellen mit Epimer A sind die Signale der freien, nichtproteingebundenen Trifluormethylgruppen bei 12,23 ppm (6-CF₃) bzw. -8,1 ppm (7-CF₃) in Anwesenheit der Riboflavin Synthase auf etwa 55 Hz verbreitert (Abbildung 34; Spektrum **d**). Die drei zusätzlichen, stärker verbreiterten, im Vergleich zum freien Liganden nach tieferem Feld verschobenen Signale, können dem enzymgebundenen Liganden zugeordnet werden. Im Bereich der 6-CF₃-Gruppe werden zwei enzymgebundene Signale bei 14,2 ppm sowie 15,8 ppm beobachtet. Das Signal bei tieferem Feld ist auf 165 Hz verbreitert, während das Signal bei 14,2 ppm auf 285 Hz verbreitert ist. Die enzymgebundene 7-CF₃-Gruppe wird nur durch ein Signal bei -5,9 ppm im Spektrum repräsentiert, das auf 272 Hz linienverbreitert ist. Die Verbreiterung der Signale resultiert aus dem Austausch der Liganden innerhalb der NMR Zeitskala zwischen gebundener Form und freier Form.

Dem Verlauf des Titrationsexperimentes in Abbildung 34 Spektren **a** bis **d** ist zu entnehmen, dass im frühen Stadium der Titration die ¹⁹F NMR Signale des freien Liganden eine niedrige Intensität haben und die Spektren von den Signalen des enzymgebundenen Liganden bei 14,2 ppm (6-CF₃) bzw. -5,9 ppm (7-CF₃) mit Halbwertsbreiten von 280 Hz sowie 270 Hz dominiert werden. Mit fortschreitender Sättigung der Proteinbindungsstellen wachsen die Signale des freien Liganden. Dabei erscheint die proteingebundene 7-Trifluormethylgruppe als relativ breites Signal mit 272 Hz Linienbreite um 2,2 ppm tieffeldverschoben im Vergleich zum Signal des freien Liganden. Die zunehmende Sättigung der Riboflavin Synthase mit Ligand ergibt für die 6-Trifluormethylgruppe ein etwas komplexeres Aufspaltungsmuster. Bei niedrigen Ligandenkonzentrationen kann man ein sehr intensives Signal mit Halbwertsbreiten um 280 Hz bei 14,2 ppm, also 2,0 ppm tieffeldverschoben im Vergleich zum Signal des freien Liganden beobachten. Das zweite Signal bei 15,8 ppm, also um 3,3 ppm nach tieferem Feld hin verschoben im Vergleich zum Signal für den freien Liganden, ist zunächst auf 222 Hz linienverbreitert und steigt im Verlauf der Titration mit jeder Zugabe eines Aliquots Ligand an. Die Linienbreite verringert sich dabei auf 165 Hz.

Diese Beobachtung zeigt, dass das Enzym zwei unterschiedliche Typen von Bindungsstellen mit signifikant unterschiedlichen Affinitäten zu Epimer A hat. Zusammen mit experimentelle Daten aus Gleichgewichtsdialyse-Experimenten ergibt die quantitative Auswertung der Signalintegrale einen nicht-linearen Scatchard-Plot im guten Einklang mit dem in den NMR Spektren beobachteten Verlauf der Signalintensitäten für die 6-CF₃-Gruppe während der Titration. Die aus diesen unterschiedlichen Experimenten erhaltenen Daten ergeben ein gefittetes Modell mit annähernd 3,2 Bindungsstellen hoher Affinität (K_d =2,0 µM) und 2,5 Bindungsstellen niedrigerer Affinität (K_D =41µM) zu Epimer A pro Enzymmolekül (Abbildung 35; Bild **A**). Die separate Auswertung der Signalintergrale aus den ¹⁹F-NMR-Experimenten ergeben einen K_D-Wert von 30 µM für die Bindungsstelle mit der niedrigeren Affinität zu Epimer A (Abbildung 35; Bild **B**). Es ist also anzunehmen, dass mit den NMR-Experimenten nur die Auswertung der nieder affinen Bindungsstelle möglich ist, auf Grund des zunächst sehr geringen Anteils an freiem Liganden im Spektrum.

Die so erhaltenen Ergebnisse sind gut mit den NMR-Bindungsexperimenten an rekombinanter N-terminaler bzw. C-terminaler Domäne der Riboflavin-Synthase aus *E.coli* in Einklang zu bringen Abschnitt 3.2.7). Die beiden oberen Spektren in Abbildung 34 zeigen die ¹⁹F-NMR-Spektren von Epimer A gebunden an die rekombinante N-terminale bzw. C-terminale Domäne der Riboflavin-Synthase. Der Vergleich dieser beiden Spektren mit den entsprechenden Spektren für Epimer A gebunden an die rekombinante Wildtyp Riboflavin-Synthase (Abbildung 34; Spektrum **d**) ermöglicht eine Zuordnung der Signale für die gebundene 6-Trifluormethylgruppe bei 15,8 ppm zur N-terminalen Domäne des nativen Proteins bzw. des Signales bei 14,2 ppm zur C-terminalen Domäne des Wildtyp Proteins. Die entsprechenden Signale für die an die N-terminale bzw. C-terminale Domäne des Wildtyp Proteins.



Abb. 34: 338 MHz ¹⁹F NMR Spektren der Titration der rekombinanten Riboflavin Synthase aus *Escherichia coli* mit 6,7-Bis(trifluormethyl)-8-ribityllumazin (Epimer A; Verbindung 11a). Die eingesetzte Proteinkonzentration war 0,4 mM. Ligandkonzentrationen: a 0,33 mM; b 0,92 mM; c 1,3 mM; d 1,8 mM; Die Spektren der rekombinanten N-terminalen Domäne (Protein: 1,5 mM; Ligand: 0,56 mM) bzw. der C-terminalen Domäne (Protein: 0,08 mM; Ligand: 0,18 mM) sind zum Vergleich abgebildet. F kennzeichnet den freien Liganden und B den gebundenen Liganden. x steht für Verunreinigungen. Alle Proben enthielten 20 mM Kaliumphosphat Puffer, 0,2 mM EDTA, 0,5 mM DTE und 10% D₂O bei pH 7,0. Die Spektren wurden mit einer Linienverbreiterung von 20 Hz transformiert.



Abb. 35: Bindung von 6,7-Bis(trifluormethyl)-8-ribityllumazin (Epimer A; Verbindung 11a) an die rekombinante Riboflavin Synthase aus *Escherichia coli*. A Scatchard Plot nach der Gleichgewichtsdialyse (Dreiecke) und NMR Titrationen (Kreise). B Bindung an die nieder affine Bindungsstelle. Scatchard Plot aus den NMR Signal Integralen der nieder affinen Bindungsstelle und dem freien Liganden.

chemische Verschiebung. Nach dieser Zuordnung und mittels ¹⁹F-NMR-Daten sowie Gleichgewichtsdialyse-Experimenten kann man die C-terminale Bindungsstelle als die zum Epimer A höher affine Bindungsstelle bezeichnen und die N-terminale Bindungsstelle als die zum Epimer A niedriger affine Bindungsstelle bezeichnen.

In weiteren Experimenten wurde versucht, durch Rücktitration mit dem Produktanalogon 5-Nitroso-6-ribitylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidindion (Verbindung **9**), sowie dem Produkt Riboflavin selber das gebundene Epimer A gezielt von den postulierten Donor-bzw. Akzeptorbindungsstellen zu verdrängen. Durch Titration mit dem Produktanalogon **9** wurde das Fluorlumazin vollständig vom Enzym verdrängt (Abbildung 36). Aber es konnte keine eindeutige Präferenz für die bevorzugte Abnahme eines Signals beobachtet werden, was eine Zuordnung zu den verschiedenen Bindungsstellen ermöglichen würde.



Abb. 36: 470 MHz ¹⁹F NMR Spektren der Rücktitration des Komplexes aus Riboflavin Synthase aus *E. coli* und Epimer A (Verbindung 11a) mit 5-Nitroso-6-ribitylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidindion (Verbindung 9). Alle Proben enthielten 25 mM Kaliumphosphat Puffer, 0,2 mM DTE und 10% D₂O bei pH 6,9. Die zu Beginn eingesetzte Monomerenkonzentration der Riboflavin Synthase betrug 1,8 mM. A: 3,3 mM 11a; kein 9; B: 4,1 mM 11a; kein 9; C: 4,0 mM 11a, 0,9 mM 9; D: 3,9 mM 11a, 2,5 mM 9; E: 3,7 mM 11a, 4,1 mM 9; F: 3,3 mM 11a, 8,1 mM 9. Die Spektren wurden mit einer Linienverbreiterung von 20 Hz transformiert.



Abb. 37: 470 MHz ¹⁹F NMR Spektren der Rücktitration des Komplexes aus 6,7-Bis(trifluormethyl)-8-ribityllumazin (Epimer A, Verbindung 11a) und Riboflavin Synthase aus *E. coli* mit Riboflavin. Alle Proben enthielten 25 mM Kaliumphosphat Puffer, 0,2 mM DTE und 10% D₂O bei pH 6,9. Die zu Beginn eingesetzte Monomerenkonzentration der Riboflavin Synthase betrug 1,8 mM. A: 3,3 mM 11a; kein Riboflavin; B: 4,0 mM 11a, 0,1 mM Riboflavin; C: 3,9 mM 11a, 0,5 mM Riboflavin; D: 3,4 mM 11a, 1,04 mM Riboflavin; E: 3,0 mM 11a, 1,6 mM Riboflavin; F: 2,5 mM 11a, 2,4 mM Riboflavin. Die Spektren wurden mit einer Linienverbreiterung von 20 Hz transformiert.

Die Rücktitration der mit Epimer A gesättigten Riboflavin-Synthase mit Riboflavin ergibt eine bevorzugte Abnahme des Signals bei 15,8 ppm gegenüber dem Signal bei 14,2 ppm. Dieses Ergebnis wurde aus der Veränderung der Verhältnisse der Signalintegrale dieser Peaks bei zunehmender Sättigung des Proteins mit Riboflavin erhalten (Abb. 37).

3.2.3 Bindungsstudien mit 6-Trifluormethyl-7-oxo-8-ribityllumazin an rekombinanter Riboflavin Synthase aus *E.coli*

In Abbildung 38 sind die ¹⁹F-NMR-Spektren der Titration der Riboflavin Synthase aus *E.coli* mit der Fluorlumazinverbindung 6-Trifluormethyl-7-oxo-8-ribityllumazin zu sehen, deren Carbonylgruppe an C-7 ein Analogon zur 7 α -Exomethylenstruktur des Lumazinanions **1a** aus dem hypothetischen Mechanismus der Riboflavin-Synthase-Reaktion entsprechen soll (Abb. 4).

Im Spektrum E bzw. F in Abbildung 38 für das mit der Verbindung 12 gesättigte Enzym sind neben dem Signal der freien Fluorlumazinverbindung bei 7,7 ppm vier weitere Signale für die 6-Trifluormethylgruppe mit sehr unterschiedlichen Intensitäten und Linienverbreiterungen, tieffeldgeshiftet im Vergleich zum freien Signal zu erkennen. Es handelt sich dabei um zwei intensive Signale bei 8,6 ppm sowie 11,9 ppm und zwei kleinere Signale bei 10,2 ppm bzw. 14,7 ppm. Die Halbwertsbreiten dieser Signale sind sehr unterschiedlich. Während die in der Intensität recht kleinen Signale auf 300-400 Hz verbreitert sind, ist das weniger tieffeldverschobene intensive Signal bei 8,6 ppm auf 160-180 Hz verbreitert, während das andere intensive Signal auf 100-110 Hz verbreitert ist. Das Signal des freien Liganden ist auf ca. 40 Hz verbreitert. Die Verbreiterung resultiert auch hier aus dem Austausch des Liganden innerhalb der NMR-Zeitskala zwischen freier und gebundener Form.

Vergleicht man jetzt diese Ergebnisse mit denen für die Bistrifluormethylverbindung sieht man deutliche Unterschiede. Obwohl die 6-CF₃ Gruppen der Verbindungen 6,7-Bis(trifluormethyl)-8-ribityllumazin (Epimer A; Verbindung **11a**) und 6-Trifluormethyl-7oxo-8-ribityllumazin (Verbindung **12**) topologische äquivalent sind, ist ihre Bindung an die Riboflavin Synthase deutlich unterschiedlich. Die 6-CF₃ Gruppe der Verbindung **12** bindet in vier unterschiedlichen Bindungszuständen an das Protein, die sich über einen Verschiebungsbereich von 7 ppm nach tieferem Feld verglichen mit dem freien Liganden erstrecken. Die 6-CF₃ Gruppe von Epimer A (Verbindung **11a**) bindet dagegen in nur zwei unterschiedlichen Zuständen an das Protein, wobei sich der Verschiebungsbereich der gebundenen Signale über 3,4 ppm im Bereich tieferen Feldes verglichen mit dem freien Signal erstreckt.

Bei Betrachtung des Titrationsverlaufes erkennt man, dass das Enzym unterschiedliche Ligandenbindungsstellen mit sich stark unterscheidenden Affinitäten zu den Liganden haben muß. Das Spektrum **A** in Abbildung 38 wird von zwei intensiven Signalen bei 8,5 ppm



Abb. 38: 338 MHz ¹⁹F NMR Spektren der Titration der rekombinanten Riboflavin Synthase aus Escherichia coli mit 6-Trifluormethyl-7-oxo-8-ribityllumazin (Verbindung 12). Die eingesetzte Proteinkonzentration war 0,5 mM. Ligandenkonzentrationen: A 0,35 mM; B 0,54 mM; C 0,78 mM; D 1,01 mM; E 1,17 mM; F 1,22 mM. Die gestrichelte Linie kennzeichnet die chemische Verschiebung für den freien Liganden. Alle Proben enthielten 20 mM Kaliumphosphat Puffer, 0,2 mM EDTA, 0,5 mM DTE und 10% D₂O bei pH 7,0. Die Spektren wurden mit einer Linienverbreiterung von 20 Hz transformiert.

sowie bei 14,1 ppm dominiert. Das Signal bei 11,9 ppm ist noch recht klein, während das Signal bei 10,5 ppm nur als Hügel im Rauschen des Spektrums erkennbar ist. Die Zugabe weiterer Aliquote der Monotrifluormethylverbindung bewirkt einen Anstieg der Intensitäten der Signale bei 11,9 ppm und bei 10,4 ppm. Die beiden vorher das Spektrum dominierenden

96

Signale bleiben in ihrer Intensität zunächst unverändert. Die Sättigung der Bindungsstellen im Protein mit Ligand bewirkt eine Angleichung der Signalintensitäten für die Signale bei 8,6 ppm und 11,9 ppm, sowie für die kleineren Signale bei 14,5 ppm und 10,3 ppm. Auch eine leichte Verschiebungsänderung der wenig intensiven Signale ist bei Sättigung der Bindungsstellen des Enzyms mit Ligand zu erkennen. Zunächst haben sie eine chemische Verschiebung von 14,1 ppm bzw. 10,4 ppm. Im Spektrum des mit Ligand gesättigten Proteins erscheinen diese Signale bei 14,7 ppm bzw. 10,2 ppm. Auch im Falle dieses Proteins ist also eine bestimmte Protein Dynamik in Abhägigkeit des Konzentrationsverhältnisses Protein zu Ligand erkennbar.

Auch im Falle dieses Liganden konnte wie für Epimer A wegen des zunächst sehr geringen Anteils an freiem Liganden im Spektrum aus den NMR-Daten nur die niederaffine Bindungsstelle quantitativ analysiert werden.

Die quantitative Auswertung der im Verlauf der Titration ansteigenden Signale bei 11,9 ppm bzw. 10,3 ppm ergibt einen annähernd linearen Scatchard-Plot mit einem K_D -Wert von 13 μ M und annähernd 3 Bindungsstellen niedrigerer Affinität.

Fluorlumazinliganden sind die Auch im Falle dieser erhaltenen qualitativen Aufspaltungsmuster gut mit den ¹⁹F-NMR Bindungsexperimenten an rekombinanter Nterminaler bzw. C-terminaler Domäne der Riboflavin Synthase aus E.coli in Einklang zu bringen (Abb. 39). Die beiden unteren NMR-Spektren in Abbildung 10 zeigen die ¹⁹F-NMR-Spektren des 7-Oxo-Liganden (Verbindung 12) gebunden an die N-terminale bzw. Cterminale Domäne der Riboflavin-Synthase. Der Vergleich dieser beiden Spektren mit den entsprechenden Signalen der an die native Riboflavin Synthase gebundenen Fluorlumazinverbindung (oberes Spektrum in Abbildung 39) ermöglicht eine Zuordnung der das Spektrum dominierenden Signale bei 11,9 ppm zur N-terminalen Domäne des nativen Proteins (11,5 ppm für rekombinante N-terminale Domäne) bzw. bei 8,6 ppm zur Cterminalen Domäne des nativen Proteins (8,7 ppm für rekombinante C-terminale Domäne). Die zusätzlichen kleineren Signale bei 14,7 ppm bzw. 10,2 ppm können auf diese Weise nicht erklärt werden und sind wahrscheinlich die Folge der Zusammenlagerung der Monomere aus N-terminaler bzw. C-terminaler Domäne zum Homotrimer.



Abb. 39: 338 MHz ¹⁹F NMR Spektren der ganzen Riboflavin Synthase aus E.coli im Komplex mit 6-Trifluormethyl-7-oxo-8-ribityllumazin (Verbindung 12) im Vergleich mit den entsprechenden Spektren der N-bzw. C-terminalen Domäne. Die Proben enthielten 70 mM Phosphat Puffer, 100 mM NaCl und 10% D₂O bei pH 7,0. Die einzelnen Proben enthielten folgende Konzentrationen: Wildtyp Riboflavin Synthase 0,37 mM, 12 1,17 mM; rekombinante N-terminale Domäne 0,6 mM, 12 1,54 mM; rekombinante C-terminale Domäne 0,6 mM, 12 0,46 mM. Die Spektren wurden mit einer Linienverbreiterung von 20 Hz transformiert.

Aus diesen Beobachtungen lässt sich die Annahme formulieren, dass die Signale bei 8,6 ppm und 14,7 ppm sowie bei 11,9 ppm und 10,2 ppm zwei zusammengehörende Signalgruppen bilden. Daraus resultieren diesen Signalgruppen entsprechenden Bindungsstellen mit unterschiedlichen Affinitäten zum Liganden.

Durch die Rücktitration mit Riboflavin und den Produktanalogon 5-Nitroso-6-ribitylamino-2,4(1H;3H)-pyrimidindion (Verbindung **9**) sollte der Ligand gezielt von den unterschiedlichen Bindungsstellen verdrängt werden.



Abb. 40: 338 MHz ¹⁹F NMR Spektrem der Rücktitration der mit 6-Trifluormethyl-7-oxo-8ribityllumazin (12) gesättigten Riboflavin Synthase aus E. coli mit 5-Nitroso-6ribitylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidindion (9). Alle Proben enthielten 25 mМ Kaliumphosphat Puffer, 0,2 mM DTE und 10% D₂O bei pH 6,9. Die zu Beginn eingesetzte Monomerenkonzentration der Riboflavin Synthase betrug 1,8 mM. A: 2,6 mM 12; kein 9; B: 3,9 mM 12; kein 9; C: 3,8 mM 12, 0,42 mM 9; D: 3,8 mM 12, 0,63 mM 9; E: 3,6 mM 12, 1,8 mM 9; F: 3,3 mM 12, 3,8 mM 9. Die Spektren wurden mit einer Linienverbreiterung von 20 Hz transformiert.





Abb. 41: 338 MHz ¹⁹F NMR Spektren der Rücktitration der Riboflavin Synthase aus *E. coli* gesättigt mit 6-Trifluormethyl-7-oxo-8-ribityllumazin (Verbindung 12) mit Riboflavin. Alle Proben enthielten 25 mM Kaliumphosphat Puffer, 0,2 mM DTE und 10% D₂O bei pH 6,9. Die zu Beginn eingesetzte Monomerenkonzentration der Riboflavin Synthase betrug 1,8 mM. A: 1,87 mM 12; kein Riboflavin; B: 3,2 mM 12, kein Riboflavin; C: 3,1 mM 12, 0,32 mM Riboflavin; D: 2,9 mM 12, 0,78 mM Riboflavin; E: 2,7 mM 12, 1,1 mM Riboflavin; F: 2,0 mM 12, 2,6 mM Riboflavin. Die Spektren wurden mit einer Linienverbreiterung von 20 Hz transformiert.

Das Produktanalogon 5-Nitroso-6-ribitylamino-2,4(1H;3H)-pyrimidindion verdrängte das Fluorlumazin vollständig vom Enzym. Hier konnte keine eindeutige Präferenz für die bevorzugte Abnahme eines Signals beobachtet werden, was eine Zuordnung zur Donorbindungsstelle ermöglicht hätte (Abb. 40).

Bei genauerer Betrachtung der Verhältnisse der einzelnen Intergrale im Verlauf der Rücktitration mit 5-Nitroso-6-ribitylamino-2,4(1H;3H)-pyrimidindion sieht man eine Zunahme des Verhältnisses zwischen intensiveren (8,6 ppm sowie 11,9 ppm) und weniger intensiven Peaks (10,2 ppm sowie 14,7 ppm) von 2:1 auf 6:1 (Integrale sind in der Abbildung der Übersichtlichkeit halber nicht eingezeichnet). Im weiteren Verlauf der Rücktitration verschwinden die weniger intensiven Peaks schon bei Nitrosokonzentrationen weit unterhalb der Proteinkonzentration. Die Integrale der Signale bei 8,6 ppm bzw.11,9 ppm verkleinern sich erst deutlich ab einer Nitrosokonzentration, die ungefähr der Proteinkonzentration entspricht. Im Bereich starker Übersättigung der Lösung mit Nitroso wird der Fluorligend vollständig vom Protein verdrängt.

Die Rücktitration des an das Enzym gebundenen Fluorligenden mit Riboflavin zeigt eine unterschiedliche Abnahme der Signale. Bei der Auswertung der Integrale der einzelnen Spektren erkennt man, dass im mit Fluorligand gesättigten Spektrum die Integralverhältnisse 2:1 zwischen intensiverem Signal und weniger intensivem Signal sind. Bei Zugabe von Riboflavin in Konzentrationen weit unterhalb der Proteinkonzentration bleiben die Integralverhältnisse zunächst unverändert. Weitere Zugabe von Riboflavin ergibt eine bevorzugte Abnahme der Signale bei 14,7 ppm, 11,9 ppm und 10,2 ppm gegenüber dem Signal bei 8,6 ppm. Wobei das weniger intensive Signal bei 14,7 ppm zuerst verschwindet. Auch bei Übersättigung der Lösung mit Riboflavin gelingt es nicht den Fluorligenden vollständing vom Protein zu verdrängen. Auch die beiden Signale bei 11,9 ppm sowie 10,2 ppm verschwinden nicht vollständig, sind aber bedeutend geringer besetzt als das Signal bei 8,6 ppm (Abb. 41).

3.2.4 Untersuchungen an spezifischen Punktmutanten der Riboflavin Synthase aus *E. coli*

Auf Grund zunächst fehlender struktureller Daten für die Riboflavin Synthase aus *E. coli* sollten Bindungsstudien an Mutanten-Proteinen mit Fluorlumazinen einigen Aufschluß über das katalytisch aktive Zentrum der Riboflavin Synthase bzw. über den Mechanismus der durch das Enzym katalysierten Dismutationsreaktion zweier Lumazinmoleküle zu einem Riboflavinmolekül und einem Aminopyrimidindionmolekül geben.

101
In allen bisher vorgeschlagenen hypothetischen Mechanismen dieser Reaktion beinhaltet der erste Schritt die Addition eines Nucleophils an ein Lumazinmolekül, das als Donor einer C-4-Einheit fungiert, die während der enzymkatalysierten Reaktion auf ein zweites Lumazinmolekül übertragen wird. Dieses hypothetische Nucleophil könnte ein Wassermolekül oder ein polarer Aminosäurerest sein.

Um die Richtigkeit dieser Hypothese zu überprüfen, sind vor allem polare Aminosäurereste, die als hypothetisches Nucleophil dienen könnten, Ziel dieser Mutationsexperimente.

Ein Sequenzvergleich aller bekannten Riboflavin-Synthasen oder der als solche vorgeschlagenen Proteine aus Pilzen und Eubakterien zeigt eine relativ geringe Sequenzhomologie. Mit 63 % identischen Aminosäuren besteht zwischen den Enzymen aus *E.coli* und *Haemophilus influenzae* die größte Homologie. Ansonsten blieben die identischen Aminosäuren in der Größenordnung zwischen 29-38 %.

Aus dem Sequenzvergleich ergeben sich 11 polare Aminosäurereste, die absolut konserviert sind. Außerdem sind einige andere polare Aminosäurereste, wie Ser41, Asn45, Thr50, Thr67, Thr71, Asn83, Tyr133, Lys137, Asp143 nur selten durch andere ähnliche Aminosäurereste ersetzt (Abbildung 42). Angesichts der relativ geringen Sequenzhomologie zwischen den verglichenen Riboflavin-Synthase Sequenzen ist es bemerkenswert, dass alle verglichenen Riboflavin-Synthasen die N-terminale Sequenz MFXG enthalten. Dieser Sequenzteil wurde auch in die Mutationsstudien aufgenommen, um dessen funktionelle Rolle im Enzym zu untersuchen.

In der Abbildung 42 sind alle für die Mutationen ausgewählten Aminosäurereste durch Kästchen gekennzeichnet. Die fünf mutierten Gene C48S, T50R, T67R, T148R, T165R konnten nicht rekombinant in *E.coli*-Wirtsstämmen exprimiert werden. Es wird angenommen, dass diese Aminosäurereste eine Funktion bei der Proteinfaltung besitzen bzw. die Proteinkonformation beeinflussen, so dass diese mutierten Gene nicht weiter untersucht wurden. Vier mutierte Gene Y133A, D143G, D143N, N181G ergaben die Expression löslichen Proteins, das für eine Reinigung nicht stabil genug war.

Das Gen der Mutante T3R ergibt eine Expression löslichen Proteins, das nur etwa 3 % des gesamten zellulären Proteins in rekombinanten *E.coli*-Wirtsstämmen entspricht. Diese Mutante konnte aber trotzdem mit einer Ausbeute von 95 % angereichert werden.

Alle anderen in Abbildung 42 gekennzeichneten Mutanten wurden bis zu einem Anteil von 20 % des gesamten zellulären Proteins der *E.coli*-Wirtsstämme exprimiert und mit einer Ausbeute von bis zu 95 % gereinigt.



Abb. 42: Aminosäuresequenz der Riboflavin Synthase aus E. coli. Die für die Mutagenese ausgewählten Aminosäurereste sind mit Kästchen dargestellt. Absolut konservierte Reste sind fett gedruckt. Genetische Alternativen sind unter den eingekästelten Aminosäureresten der E. coli Sequenz eingezeichet.

Die Mutanten der Riboflavin-Synthase aus E.coli wurden in größerem Maßstab gereinigt und Titrationsexperimenten mit den Fluorlumazinen 6,7-Bis(trifluormethyl)-8-ribityllumazin (11a) und 6-Trifluormethyl-7-oxo-8-ribityllumazin (12) unterworfen.

3.2.5 Bindungsstudien mit Epimer A an Mutanten der Riboflavin-Synthase aus E.coli

Die Bindungsstudien mit Epimer A an den Mutanten der Riboflavin-Synthase aus E.coli haben ergeben, dass es nur wenige Mutanten gibt, deren Mutation große Auswirkungen auf die Aufspaltungsmuster in den ¹⁹F-NMR-Spektren hat (Tabelle 8).

Die größten Veränderungen treten in den NMR-Spektren der Phenylalanin 2-Mutanten auf. Diese Veränderungen der Proteinsequenz haben auch auf die katalytischen Aktivitäten die größten Auswirkungen, die für die beiden Mutanten F2A sowie F2A gleich null sind und bei dem konservativen Austausch des aromatischen Phenylalaninrestes gegen einen ebenfalls aromatischen Tyrosinrest auf ca. 1/50 der Aktivität des Wildtypenzyms reduziert wird (Tabelle 7).

In Abbildung 43 ist in den beiden oberen Spektren ein Vergleich zwischen den mit Epimer A gesättigten Enzymen der Wildtyp Riboflavin-Synthase sowie der Mutante F2 Δ zu sehen. Man erkennt deutlich die Verschiebungsänderungen der gebundenen CF₃-Gruppen des an die F2 Δ -

Protein	V _{max}	K _D [*]			
	[nmol*mg ⁻¹ *min ⁻¹]	[µM]			
Wildtyp	21 ± 3,4	41 ± 12			
F2A	< 0,0001	79 ± 15			
F2Δ	< 0,0001	57 ± 14			
F2Y	$0,\!42 \pm 0,\!08$	87 ± 7,2			
T3R	17 ± 5,6	6 ± 2,1			
S41A	$0,003 \pm 0,001$	25 ± 8			
N45G	17 ± 4,2	8,5 ± 1,4			
E66G	$3,8 \pm 0,4$	$4,2 \pm 1,1$			
T71A	$20 \pm 7,2$	91 ± 18			
N83G	15 ± 1,4	10 ± 3,1			
E85G	11 ± 2,1	10 ± 1,2			
H97Q	$8,4\pm0,8$	5,0 ± 1,2			
H102Q	$0,\!08 \pm 0,\!03$	103 ± 13			
K137A	$2,8 \pm 0,3$	16 ± 3,5			
S146G	$2,7\pm0,1$	17 ± 2,1			
E183G	11 ± 0,2	$14 \pm 1,7$			
D185L	$1,4\pm0,1$	12 ± 3,3			

Tabelle 7: Eigenschaften der Riboflavin Synthase Mutanten.

 K_D Werte sind die für die weniger affine Bindungsstelle ermittelten Werte bezüglich Verbindung **11a**.

Mutante gebundenen Epimers A im Vergleich zu den entsprechenden Signalen im Wildtyp-Spektrum. Die beiden der 6-CF₃-Gruppe zugeordneten Signale sind sehr nahe zusammengerückt, während das Signal der gebundenen 7-CF₃-Gruppe in zwei getrennte



Abb. 43: ¹⁹F NMR Spektren von Mutanten der Riboflavin Synthase aus *Escherichia coli* im Vergleich zum Wildtyp Protein im Komplex mit 6,7-Bis(trifluormethyl)-8-ribityllumazin (Epimer A; Verbindung 11a in Abbildung 8). Konzentrationen: 0,37 mM Protein, 1,8 mM Ligand (wild type); 0,22 mM Protein, 1,7 mM Ligand (F2Δ); 0,39 mM Protein, 2,0 mM Ligand (K137A); 0,18 mM Protein, 1,0 mM Ligand (S146G); 0,28 mM Protein, 1,6 mM Ligand (E183G). F kennzeichnet den freien Liganden und B den gebundenen Liganden. x steht für Verunreinigungen. Zum Vergleich sind am Kopf dieser Abbildung die entsprechenden chemischen Verschiebungen für diesen gebundenen Liganden an die rekombinante N-bzw. C-terminale Domäne gekennzeichnet.

Signale aufgespalten wurde. Das Signal der an die native Riboflavin Synthase gebundenen 6-CF₃-Gruppe von Epimer A, dessen chemische Verschiebung bei 15,8 ppm liegt, wurde im Falle der Mutante F2 Δ um 1,9 ppm nach höherem Feld auf 13,9 ppm verschoben. Das relativ breite Signal der an das Wildtyp Protein gebundenen 7-CF₃ Gruppe hat eine chemische Verschiebung von -5,9 ppm. Im ¹⁹F NMR Spektrum der Mutante F2 Δ Signal ist es in zwei separate Signale aufgespalten, wobei ein Anteil um 1,2 ppm in Richtung höheren Feldes auf -7,1 ppm verschoben wurde. Durch die Mutation wurde also eine Bindungsstelle so verändert, dass sich die chemische Umgebung für beide Trifluormethylgruppen deutlich verändert hat.

Protein	¹⁹ F NMR chemische Verschiebungen							
	6-CF ₃ Gruppe			7-CF ₃ Gruppe				
	Proteinge	ebundene	Freie	Proteinge	Proteingebundene			
	Sig	nale	Signale	Signale		Signale		
	[pp	om]	[ppm]	[ppm]		[ppm]		
Wildtyp	15,8	14,2	12,2	-5	-8,1			
N-Terminus	15,6		12,2	-6	-8,1			
C-Terminus	14,1		12,2	-5	-5,5			
F2Δ	13,9	13,6	12,2	-6,2 -7,1		-8,1		
F2A	13,8		12,2	-6,1	-6,1 -7,2			
F2Y	15,2	14,2	12,2	-6,3 (-7,2)		-8,1		
T3R	15,7	14,0	12,2	-6,1 -5,7		-8,1		
S41A	15,8	14,2	12,2	-5,8		-8,1		
N45G	15,7	14,3	12,2	-5,8		-8,1		
E66G	15,7	14,3	12,2	-5,9		-8,1		
T71A	15,6	14,3	12,2	-5	,9	-8,1		
N83G	15,7	14,1	12,2	-5,9 -6,2		-8,1		
E85G	15,4	14,3	12,2	-6,1		-8,1		
H97Q	15,6	14,2	12,2	-5,8		-8,1		
H102Q	15,6	14,2	12,2	-5,9		-8,1		
K137A	15,6	14,2; 13,6	12,2	-6,1 -5,8		-8,1		
S146G	15,8	13,4	12,2	-6,5	-5,8	-8,1		
E183G	15,6; 15,1	14,1	12,2	-5,9	-6,4	-8,1		
D185L	15,8	13,9	12,2	-6,0		-8,1		

Tabelle	8:	Chemische	Verschiebungen	der	Wildtyp	Riboflavin	Synthase	sowie	deren	Mutanten	im
		Komplex m	nit 6,7-Bis(trifluo	rmet	thyl)-8-ril	oityllumazin	(Verbind	ung 11	a).		

Dagegen wurden die Verschiebungen der verbleibenden Signale von der Mutation kaum beeinflusst.

Aus der Signalaufspaltung ist erkennbar, dass der Mutante die Kapazität, ein Ligandenmolekül jeweils an die N-terminale Domäne bzw. an die C-terminale Domäne zu binden erhalten bleibt.

In den Abbildungen 43 und 44 sind jeweils an der Spitze die chemischen Verschiebungen der Signale der an die rekombinante N-terminale bzw. C-terminale Domäne der Riboflavin Synthase gebundenen 6-CF₃ Gruppen bzw. 7-CF₃ Gruppen von Epimer A (**11a**) schematisch eingezeichnet. Vergleicht man diese Verschiebungen mit den entsprechenden Signalen für die Mutante F2 Δ und für das Wildtyp Protein, erkennt man, dass die Mutation besonders die chemischen Verschiebungen der N-terminalen Bindungsstelle betrifft. Das bedeutet, dass die Deletion des N-terminalen Phenylalaninrestes 2 einen Hochfeldshift der Signale für die an die N-terminale Bindungsstelle der Riboflavin Synthase gebundenen Trifluormethylgruppen bewirkt und somit im direkten Kontakt mit diesen ist.

Dagegen wurden die der C-terminalen Domäne zugeordneten Signale der 6-CF₃-Gruppe (0,6 ppm Hochfeldshift) bzw. der 7-CF₃-Gruppe (0,3 ppm Hochfeldshift) wenig von der Mutation beeinflusst.

Der Verlauf der Titration in Abbildung 44 zeigt wie im Falle des Wildtypenzyms das Vorhandensein zweier unterschiedlicher Bindungsstellen mit differierenden Affinitäten zu den Liganden. Für die Bindungsstelle mit der niedrigeren Affinität zum Epimer A konnte ein K_D -Wert von 57 μ M ermittelt werden. Der entsprechende K_D -Wert für die Bindungsstelle mit der höheren Affinität zum Liganden konnte aus experimentellen Gründen nicht ermittelt werden, da in den ersten Titrationsschritten die Signale für die freien Liganden so klein sind, dass sie im Rauschen des Spektrums verschwinden und somit nicht integriert werden können. Der Wert für diese Dissoziationskonstante wird kleiner als 1 μ M angenommen.

Auch im Falle des Austausches der aromatischen N-terminalen Aminosäure Phenylalanin 2 gegen die hydrophobe, aliphatische Aminosäure Alanin ergeben sich deutliche Abweichungen der Verschiebungen im ¹⁹F-NMR-Spektrum von gebundenem Epimer A verglichen mit dem Wildtyp Enzym. Die Verschiebungsänderungen sind mit unbedeutenden Abweichungen im Falle dieser Mutante F2A ähnlich denen der Mutante F2 Δ (Tabelle 8).

Die Titration dieser Mutante mit Epimer A ergibt wieder zwei zum Liganden unterschiedlich affine Bindungsstellen, wobei der K_D-Wert der höher affinen Bindungsstelle aus den gleichen Gründen wie bei F2 Δ nicht bestimmt werden kann. Der K_D-Wert der niedriger affinen Bindungsstelle kann auf 79 μ M bestimmt werden.



Abb. 44: ¹⁹F NMR der Titration der Mutante F2Δ der Riboflavin Synthase aus *E. coli* mit 6,7-Bis(trifluormethyl)-8-ribityllumazin (Epimer A; Verbindung 11a in Abbildung 8). Die eingesetzte Proteinkonzentration war 0,29 mM. Ligandkonzentrationen: a 0,22 mM; b 1,1 mM; c 1,4 mM; d 1,7 mM; Die chemischen Verschiebungen dieses an die rekombinante N-terminale Domäne bzw. C-terminale Domäne gebundenen Liganden sind zum Vergleich im Kopf dieser Abbildung markiert. F kennzeichnet den freien Liganden und B den gebundenen Liganden. x steht für Verunreinigungen.

Die der N-terminalen Domäne zugeordneten Signale der $6-CF_3$ Gruppe sowie der $7-CF_3$ Gruppe sind auch hier um 2 ppm bzw. um 1,3 ppm nach höherem Feld hin verschoben, während die C-terminalen Signale kaum beeinflusst werden (0,4 ppm Hochfeldshift für die 6- CF_3 -Gruppe und 0,2 ppm Hochfeldshift für die 7-CF_3-Gruppe).

Der konservativere Ersatz der aromatischen Aminosäure Phenylalanin 2 gegen die ebenfalls aromatische Aminosäure Tyrosin ergibt aktives Protein, allerdings um 1/50 reduziert verglichen mit dem Wildtypenzym (Tabelle 7). Die Wechselwirkungen dieser Mutante mit Epimer A sehen ähnlich denen dieses Liganden mit dem Wildtypenzym aus. Die chemischen Verschiebungen sind für die Signale des gebundenen Ligenden praktisch unverändert (Tabelle 8), allerdings unterscheiden sich die Intensitäten der Signale im gesättigten Zustand erheblich. Das stärker tieffeldige Signal der an das Protein gebundenen 6-CF₃-Gruppe ist nur als Hügel im Rauschen des Spektrums erkennbar, während das Signal bei 14,2 ppm im Spektrum dominiert. Der K_D -Wert kann auch hier für die niederaffine Bindungsstelle zu 87 μ M ermittelt werden.

Von den anderen mit Epimer A gemessenen Mutanten zeigten nur wenige deutliche Veränderungen im ¹⁹F-NMR-Spektrum. Ein Vergleich der Spektren des an die Mutanten gebundenen Epimers A mit dem Wildtypenzym, sowie der N-terminalen bzw. der C-teminalen Domäne ist in Abbildung 43 gezeigt. Die aus den ¹⁹F-NMR-Titrationen mit Epimer A ermittelten Dissoziationskonstanten für die niederaffine Bindungsstelle sind in Tabelle 7 zusammengestellt.

In den Fällen der Mutanten K137A und S146G, deren katalytische Akltivitäten noch ca. 1/10 der Wildtypaktivität entsprechen sowie der Mutante E183G, die fast so aktiv wie das Wildtypenzym ist, sieht man 2 separierte Signale für die gebundenen 7-CF₃-Gruppen. Der Austausch des Serinrestes 146 gegen einen Glycinrest ergibt bei der Bindung von Epimer A einen deutlichen Hochfeldshift zweier Signale. Für die 6-CF₃-Gruppe beträgt der Hochfeldshift ca. 1,4 ppm verglichen mit dem Signal bei 14,2 ppm im entsprechenden Wildtypspektrum, während das Signal der gebunden 7-CF₃-Gruppe nur um etwa 0,6 ppm nach höherem Feld hin verschoben ist, verglichen mit der chemischen Verschiebung von -5,9 ppm des entsprechenden Signals im Wildtyp Spektrum. Die Mutation in der C-terminalen Domäne der Riboflavin Synthase Sequenz beeinflusst die chemischen Verschiebungen der dieser Domäne zugeordneten Bindungsstellen für die Trifluormethylgruppen von Epimer A. Die der N-terminalen Bindungsstelle zugeordneten Signale bleiben von der Mutation unbeeinflusst.

Zum anderen beeinflusst diese Mutation S146G deutlich die Halbwertsbreiten der ¹⁹F NMR Signale der an die Mutante gebundenen Trifluormethylgrueppn. Die Signale der an die Mutante gebundenen Trifluormethylgruppen haben mit Abstand die geringsten Halbwertsbreiten der hier untersuchten homotrimeren Proteine. Die der C-terminalen Bindungsstelle zugeordneten, die hier für die Mutante S146G nach höherem Feld hin verschoben wurden, sind nur auf 75 Hz linienverbreitert, verglichen mit ca. 285 Hz für das entsprechende separierte Signal der 6-CF₃ Gruppe im Spektrum des Wildtyp Proteins. Die Halbwertsbreiten der Signale für die an die N-terminale Bindungsstelle gebundenen Trifluormethylgruppen sind ebenfalls mit Linienbreiten von 94 Hz viel schärfer als die entsprechenden separierten Signale der 6-CF₃ Gruppe im Wildtyp Spektrum, die auf 165 Hz linienverbreitert sind. Der Verlauf der Titration der Mutante S146G mit Epimer A (Ergebnisse hier nicht abgebildet) zeigt auch hier wieder zwei verschieden affine Bindungsstellen für den Liganden, wobei der K_D -Wert der zweiten Bindungsstelle hier auf 17 μ M bestimmt werden kann (Tabelle 7).

In den Spektren des an die Mutante K137A bzw. E183G gebundenen Epimers A besteht zusätzlich zu den zwei separierten Signalen der gebundenen 7-CF₃-Gruppe noch ein Anhaltspunkt für eine dritte gebundene Spezies, die dem zusätzlich auftretenden Signal in der Position der 6-CF₃-Gruppe zugeordnet werden kann (Abbildung 43).

Da alle diese Mutanten sichtbare Effekte auf die ¹⁹F-NMR-Verschiebungen des Epimers A relativ zum Wildtypenzym haben, kann geschlossen werden, dass diese Reste F2, K137, S146, E183 in der Nähe des Liganden liegen und in gegenseitiger Nähe.

Alle anderen untersuchten Mutanten ergeben mit Epimer A die gleichen chemischen Verschiebungen verglichen mit dem Wildtypenzym (Tabelle 8). Auch die Aktivitäten dieser Mutanten sind um weniger als 1/10 reduziert, mit Ausnahme von S41A und H102Q, deren katalytische Aktivitäten stark reduziert wurden (Tabelle 7).

Die Mutation Asparagin 83 gegen Glycin bildet eine Ausnahme in der Reihe der betrachteten Mutanten. Die Titration mit Epimer A ist in Abbildung 45 dargestellt. Die chemischen Verschiebungen der Signale für das an das Protein gebundene Epimer A entsprechen denen im Wildtypspektrum. Aber im Verlauf der Titration erkennt man Unterschiede verglichen mit der entsprechenden Titration des Wildtypenzyms (Abbildung 34). Am Beginn der Titration wird das Spektrum durch das Signal bei 15,7 ppm für die 6-CF₃-Gruppe sowie -5,9 ppm für die 7-CF₃-Gruppe dominiert. Bei wachsender Zugabe von Epimer A wächst das Siganl bei 14,1 ppm für die 6-CF₃-Gruppe bzw. eine Schulter am Peak der 7-CF₃-Gruppe. Man erkennt besonders anhand der Verhältnisse für die 6-CF₃ Gruppe verglichen mit der entsprechenden Titration für das Wildtypenzym eine deutliche Umkehr der Intensitäten.



Abb. 45: 338 MHz ¹⁹F NMR Titration der Mutante N83G der Riboflavin Synthase aus *E. coli* mit 6,7-Bis(trifluormethyl)-8-ribityllumazin (Verbindung 11a). Die eingesetzte Monomerenkonzentration an Mutante N83G der Riboflavin Synthase war 1,45 mM. A: 0,34 mM 11a; B: 0,72 mM 11a; C: 1,14 mM 11a; D: 1,26 mM 11a. Alle Proben enthielten 20 mM Kaliumphisphat Puffer, 0,2 mM EDTA, 0,5 mM DTE und 10% D2O bei pH 7,0. Die Spektren wurden mit einer Linienverbreiterung von 20 Hz transformiert. B steht für gebunden. F steht für frei. x steht für Verunreinigung.

3.2.6 Bindungsstudien an Mutanten der Riboflavin Synthase aus *E. coli* mit 6-Trifluormethyl-7-oxo-8-ribityllumazin

In der Tabelle 9 sind die chemischen Verschiebungen der an die Mutanten der Riboflavin Synthase gebundenen Trifluormethylgruppe der Verbindung 6-Trifluormethyl-7-oxo-8ribityllumazin (Verbindung **12**) im Vergleich mit den entsprechenden Verschiebungen für das Wildtyp Protein und die rekombinante N-terminale und C-terminale Domäne aufgelistet.

111

Protein	¹⁹ F NMR chemische Verschiebungen									
		proteingebundene Signale								
		[ppm]								
Wildtyp	14,7	11,9	10,2	8,6	7,7					
N-Terminus		11,6			7,7					
C-Terminus				8,5	7,7					
F2Δ	11,2	9,8	9,1	8,1	7,7					
F2A	12,8	9,8;	, 9,5	7,7						
F2Y	11,2	9,8;	9,2	7,7						
S41A	15,2	11,9	10,0	8,5	7,7					
N45G	14,8	11,8	10,2	8,4	7,7					
E66G		11,8		8,6	7,7					
T71A	14,7	11,9	10,2	8,6	7,7					
N83G	13,7	12,0; 11,8	10,5	8,6	7,7					
E85G	13,5	11,9	9,7	8,6	7,7					
H102Q		11,9		8,7	7,7					
K137A		11,9		8,6	7,7					
S146G	15,3	11,8	9,0	8,4; 8,1	7,7					
E183G	14,4	11,3	10,1	8,3	7,7					

 Tabelle 9: Chemische Verschiebungen der an die Mutanten und das Wildtyp Protein gebundenen Verbindung 12.

Auch im Falle der 7-Oxo-Verbindung gibt es nur wenige Mutationen, die die chemischen Verschiebungen in den ¹⁹F-NMR-Spektren im Vergleich zu den Spektren mit Wildtyp Protein deutlich verändern. Aber trotzdem gibt es bemerkenswerte Unterschiede zu den Ergebnissen für die 6-Trifluormethylgruppe von Epimer A.

Die Phenylalanin 2 Mutanten beeinflussen auch im Falle des 6-Trifluormethyl-7-oxo-8ribityllumzin Liganden am meisten die chemischen Verschiebungen der Signale für den an die Proteine gebundenen Liganden. Die Mutationen am Phenylalanin 2 Rest der Riboflavin Synthase beeinflussen bei der Bindung dieses Monotrifluormethylliganden nicht nur einzelne Signale der ¹⁹F NMR Spektren, wie im Falle von Epimer A, sondern sie beeinflussen in allen drei Fällen das gesamte Spektrum. In der Abbildung 46 sind die Spektren der Phenylalanin 2



Abb. 46: 338 MHz ¹⁹F NMR Spektren der Phenylalanin 2 Mutanten im Komplex mit 6-Trifluormethyl-7-oxo-8-ribityllumazin (Verbindung 12) im Vergleich mit den entsprechenden Spektren des Wildtyp Proteins und der N- bzw. C-terminalen Domäne. A Wildtyp Riboflavin Synthase 0,37 mM, 12 1,17 mM; B rekombinante N-terminale Domäne 0,6 mM, 12 1,54 mM; C rekombinante C-terminale Domäne 0,6 mM, 12 0,46 mM; D F2Δ 0,23 mM, 12 1,11 mM; E F2A 0,22mM, 12 0,46 mM; F F2Y 0,32 mM, 12 1,9 mM. Alle Proben enthielten 20 mM Kaliumphosphat Puffer, 0,2 mM EDTA, 0,5 mM DTE und 10% D₂O bei pH 7,0. Die gestrichelte Linie kennzeichnet die chemische Verschiebung des freien Liganden in den Spektren. Die Spektren wurden mit einer Linienverbreiterung von 20 Hz transformiert.

Mutanten im Vergleich zum entsprechenden Wildtyp Spektrum und zu denen der Nterminalen bzw. C-terminalen Domäne zu sehen. Das ¹⁹F-NMR-Spektrum der Mutante F2 Δ , bei der der Phenylalanin 2 Rest deletiert wurde, ist in Abbildung 46 Spektrum D zu sehen. Das Aufspaltungsmuster für den an diese Mutante gebundenen Fluorliganden ist mit dem des Wildtyp Enzyms vergleichbar. Man erkennt zwei das Spektrum dominierende Signale bei 8,0 ppm und 9,8 ppm. Unter Berücksichtignung der bisherigen Ergebnisse, dass im Wildtyp Spektrum der an die N-terminale Domäne gebundene Ligand ein Signal bei 11,9 ppm gibt sowie der an die C-terminale Domäne gebundene Ligand dem Signal bei 8,6 ppm entspricht, ist im Falle der F2 Δ Mutante das N-terminale Signal um 2,1 ppm nach höherem Feld hin verschoben, während der an die C-terminale Bindungsstelle gebundene Rest nur um 0,6 ppm unbedeutend hochfeldgeshiftet ist.

Auch die beiden weniger intensiven Signale sind von den Mutationen beeinflusst. Sie sind im Spektrum bei 9,1 ppm bzw. 11,2 ppm zu finden. Im Vergleich zu den entsprechenden Signalen im WT-Spektrum sind sie um 1,1 ppm sowie 3,5 ppm zu höherem Feld hin verschoben.

In Abbildung 46 Spektrum E ist das Spektrum der Mutante F2A gesättigt mit der 7-Oxo-Verbindung im Vergleich zum Wildtypspektrum zu sehen. Ein breites Signal bei 9,5-9,8 ppm dominiert das Spektrum. Ein zweites recht intensives Signal liegt bei einer chemischen Verschiebung von 8,1 ppm und liegt sehr eng am Signal für den freien Liganden bei 7,7 ppm. Ein kleiner Hügel im Rauschen des Spektrums befindet sich bei 12,8 ppm. Es ist anzunehmen, dass im Falle dieser Mutation das der N-terminalen Bindungsstelle zugeordnete Signal für die Trifluormethylgruppe des Liganden nach höherem Feld hin verschoben wurde.

Die Mutante F2Y mit dem konservativen Austausch des aromatischen Aminosäurerstes Phenylalanin 2 gegen den ebenfalls aromatischen aber größeren Tyrosinrest hat überraschenderweise auch einen Einfluß auf das ¹⁹F-NMR-Spektrum. Bei den Messungen dieser Mutante mit Epimer A waren nur Änderungen der Intensitätsverhältnisse der Signale zu sehen aber weniger der Verschiebungen.

Die chemischen Verschiebungen ähneln bei der Mutante F2Y denen der anderen Phenylalanin 2 Mutanten. Aber die Intensitäten der Signale für die an das Protein gebundene 6-CF₃ Gruppe sind anders (Abbildung 46; Spektrum E). Die beiden eng beieinander liegenden Signale bei 9,0 und 9,2 ppm sind die intensivsten Signale, während die beiden mehr nach tieferem Feld verschobenen Signale bei 9,8 und 11,2 ppm recht kleine Signale darstellen. Es ist anzunehmen, dass die der N- bzw. C-terminalen Bindungsstelle zugeordneten Hauptsignale des Wildtyp Spektrums im Falle dieser Mutante zu einem sehr breiten und wenig separierten Signal zusammengefallen sind.

Die im Wildtyp Spektrum wenig intensiven und sehr stark linienverbreiterten Signale sind in allen Fällen der Phenylalanin 2 Mutationen von den Mutationen beeinflusst. Nur die der Cterminalen Domäne zugeordneten Signale wurden nur wenig von den Mutationen beeinflusst.



Abb. 47: 338 MHz ¹⁹F NMR Titration der Mutante S41A mit 6-Trifluormethyl-7-oxo-8-ribityllumazin (Verbindung 12). Die eingesetzte Proteinkonzentration war 0,97 mM. Die Proben enthielten folgende Ligandenkonzentrationen: A 2,02 mM 12; B 2,2 mM 12; C 2,4 mM 12. Alle Proben enthielten 20 mM Tris HCl, 0,2 mM EDTA, 0,5 mM DTE und 10% D₂O bei pH 7,0. Die gestrichelte Linie kennzeichnet die Lage des freien Liganden in den Spektren. Die Spektren wurden mit einer Linienverbreiterung von 20 Hz transformiert.

Abbildung 47 zeigt den Titrationsverlauf der Mutante S41A mit der 7-Oxo-Verbindung. Bei Sättigung des Enzyms mit dem Liganden hat das Spektrum ein Aufspaltungsmuster ähnlich dem Wildtypspektrum mit nur unbedeutenden Abweichungen der chemischen Verschiebungen. Im ersten Spektrum dagegen mit nur geringer Ligandenkonzentration dominiert das Signal bei 8,5 ppm das Spektrum, und es gibt 4 zusätzliche ungefähr gleich intensive Signale bei 10,2; 11,9; 14,1 und 15,4 ppm. Weitere Zugabe des Liganden bewirkt, dass das zusätzliche Signal bei 14,1 ppm als Hügel im Rauschen verschwindet und bei weiterer Zugabe total verschwindet. Keine weiteren Mutanten zeigten solche Dynamik in den NMR-Spektren im Verlauf der Titration.

Die S41A Mutante war die in der Umsetzung der Riboflavin-Synthase langsamste Mutante, mit einem V_{max} -Wert von 0,003 nmol/mg*min im Vergleich zum V_{max} -Wertes des WT-Enzyms von 21 nmol/mg*min (Tabelle 9). Mit dieser langsamen Mutante wurde das

pentazyklische Zwischenprodukt des Mechanismus der Riboflavin Synthase durch Illarionov et al. identifiziert.



Abb. 48: 338 MHz ¹⁹F NMR Spektren der Mutanten E66G, H102Q, K137A im Vergleich mit dem Wildtyp Enzym im Komplex mit 6-Trifluormethyl-7-oxo-8-ribityllumazin (Verbindung 12). Die Proben enthielten folgende Konzentrationen: A 0,37 mM Protein, 1,17 mM 12; B 0,36 mM Protein, 1,62 mM 12; C 0,8 mM Protein, 0,7 mM 12; D 0,5 mM Protein, 1,9 mM 12. Alle Proben enthielten 20 mM Kaliumphosphat Puffer, 0,2 mM EDTA, 0,5 mM DTE und 10% D₂O bei pH 7,0. Die gestrichelte Linie kennzeichnet die chemische Verschiebung des freien Liganden in den Spektren. Die Spektren wurden mit einer Linienverbreiterung von 20 Hz transformiert.

In Abbildung 48 sind die ¹⁹F-NMR-Spektren der 7-Oxo- Verbindung mit den Mutanten E66G; H102Q und K137A im Vergleich mit dem entsprechenden Wildtyp-Spektrum zu sehen. Im Bereich der gebundenen Trifluormethylgruppen sind nur die der N-terminalen bzw. der C-terminalen Domäne zugeordneten Signale mit den gleichen chemischen Verschiebungen wie die entsprechenden Signale im WT-Spektrum zu erkennen. Die beiden weniger intensiven Signale bei 14,7 ppm bzw. 10,2 ppm fehlen vollständig. Diese betrachteten Mutationen vereinfachen die Spektren im Vergleich zum Wildtyp.

Die Mutation S146G hat ebenfalls Einfluß auf das ¹⁹F-NMR-Spektrum des gebundenen 6-Trifluormethyl-7-Oxo-8-ribityllumazins (hier keine Abbildung). Die Sättigung mit diesem Liganden ergibt Signale für die gebundene Trifluormethylgruppe bei 8,4; 9,0; 11,8 und 15,3 ppm, sowie eine Schulter am erstgenannten Signal bei 8,1 ppm. Der der N-terminalen Bindungsstelle zugeordnete Peak bleibt unverändert, auch der der C-terminalen Bindungsstelle zugeordnete Peak wird kaum verändert. Nur der im Wildtyp-Spektrum als Hügel auftretende Peak bei 10,2 ppm erfährt einen Hochfeldshift um 1,2 ppm. Der im Wildtyp-Spektrum auftretende wenig intensive und stark verbreiterte Signalhügel bei 14,7 ppm ist nur um 0,6 ppm nach tieferem Feld hin verschoben und ist ein viel schärferes Signal als im Wildtyp-Spektrum.

Die Linienverbreiteung der Signale für den gebundenen Liganden ist nicht so stark wie im Wildtyp oder bei anderen Mutanten.

Die Mutanten N45G; T71A; E85G; E183G zeigen wenig Einfluß auf das Aufspaltungsmuster im ¹⁹F-NMR-Spektrum des Monotrifluormethylliganden (Tabelle 9).

Im Falle der Mutante N45G sowie T71A kann man eine Verbreiterung der weniger intensiven Signale beobachten.

Die Mutation E85G bewirkt eine deutliche Verschiebung der weniger intensiven und stark linienverbreiterten Signale um jeweils 0,6 ppm nach höherem Feld. Die Mutation der topologische äquivalenten Aminosäure im C-terminalen Anteil der Aminosäuresequenz E183G bewirkt einen relativ geringen Hochfeldshift des der N-terminalen Domäne zugeordneten Signals um 0,6 ppm. Auch in den Spektren der beiden letzgenannten Mutanten werden die Halbwertsbreiten der Signale deutlich verändert.

Eine ungewöhnliche Veränderung bewirkt die Mutation N83G auf den Titrationsverlauf mit der 7-Oxo-Verbindung. In Abbildung 49 ist die entsprechenden Titrationen dieser Mutante dargestellt. Das erste Spektrum im Bereich geringer Ligandenkonzentration der WT-Titration wird deutlich durch die zwei Signale bei 8,5 ppm und 14,1 ppm dominiert. Das entsprechende Spektrum der Titration der Mutante N83G dagegen wird durch zwei Signale bei 11,8 ppm sowie 13,7 ppm dominiert. Im Verlauf der Titration mit Wildtyp-Enzym wachsen zwei zusätzliche Signale bei 10,5 ppm und 11,8 ppm. Die Signale bei 8,5 ppm bzw. 11,8 ppm sowie 10,2 ppm und 14,7 ppm gleichen sich in ihren Intensitäten bei Sättigung mit Ligand aneinander an. Im Verlauf der Titration der Mutante N83G entsteht bei weiterer Sättigung mit Ligand ein Signal bei 8,6 ppm und ein Hügel im Rauschen des Spektrums bei 10,5 ppm. Bei Sättigung mit Ligand ist also das Aufspaltungsmuster ähnlich dem im Wildtyp-Spektrum. Aber im Verlauf der Titration treten Änderungen der Signalintensitäten auf im Vergleich zur Titration des Wildtyp-Enzyms. Lediglich das am weitesten tieffeldverschobene Signal im Vergleich zur freien Trifluormethylgruppe ist um 1 ppm nach höherem Feld hin verschoben.



Abb. 49: 338 MHz ¹⁹F NMR Spektren der Titration der Mutante N83G der Riboflavin Synthase aus *E. coli* mit 6-Trifluormethyl-7-oxo-8-ribityllumazin (Verbindung 12). Die eingesetzte Monomerenkonzentration an Mutante N83G der Riboflavin Synthase war 1,45 mM. A: 0,32 mM 12; B: 0,55 mM 12; C: 0,7 mM 12; D: 0,83 mM 12; E: 1,1 mM 12; F: 1,21 mM 12. Alle Proben enthielten 20 mM Kaliumphisphat Puffer, 0,2 mM EDTA, 0,5 mM DTE und 10% D₂O bei pH 7,0. Die Spektren wurden mit einer Linienverbreiterung von 20 Hz transformiert. Die gestrichelte Linie kennzeichnet die Lage des Signals für den freien Liganden im Spektrum.

3.2.7 ¹⁹F NMR Untersuchungen an rekombinanten Domänen der Riboflavin Synthase aus *Escherichia coli*

Eine bemerkenswerte Eigenschaft der Aminosäuresequenzen der Ribflavin Synthasen aus Eubacterien und Hefen ist deren interne Sequenzhomologie zwischen N-terminaler und Cterminaler Hälfte. In der nachfolgenden Abbildung ist ein Inneres Alignment der Riboflavin Synthase aus *E. coli* stellvertretend für alle Riboflavin Synthase Sequenzen dargestellt.

```
    MFTGIVQGTA KLVSIDEKPN FRTHVVELPD -HMLDGLETG ASVAHNGCCL
    LMSGHIMTTA EVAKILTSEN NRQIWFKVQD SQLMKYILYK GFIGIDGISL
    TVTEINGNHV SFDLMKETLR ITNLGDLKVG DWVNVERAAK FSDEIGGH
    TVGEVTPTRF CVHLIPETLE RTTLGKKKLG ARVNIEIDPQ TQAVVDTVERVLAARENAMNQPGTEA
```

Abb. 50: Inneres Alignment der Riboflavin Synthase aus *Escherichia coli*. Rot eingezeichnet sind die konservierten Aminosäurereste, blau eingezeichnet sind die topologisch äquivalenten Reste C48 und S146.

Die interne Sequenzhomologie der Riboflavin Synthase aus *E. coli* besteht aus 25 identischen Aminosäureresten und 22 ähnlichen Aminosäureresten in einem Alignment, das nur eine einzelne Lücke von einer Aminosäure aufweist.

Aus dieser Ähnlichkeit der zwei Teile der Riboflavin Synthase wurde geschlossen, dass jede Untereinheit in zwei topologische ähnlichen Domänen faltet.

Die rekombinante Expression der N-terminalen Domäne von Aminosäurerest 1-97, sowie der C-terminalen Domäne von Aminosäurerest 101-203 in rekombinanten *E. coli* Stämmen sollte Hinweise auf die Richtigkeit dieser Hypothese geben.

Das rekombinante Protein der N-terminalen Domäne bildet ein Homodimer mit einer Molekülmasse von 19,8 kDa. Im Gegensatz dazu bildet die ganze Riboflavin Synthase ein Homotrimer.

Titrationsexperimente mit 6-Trifluormethyl-7-oxo-8-ribityllumazin (Verbindung **12**) und der rekombinanten N-terminalen Domäne der Riboflavin Synthase aus *Escherichia coli* sind in Abbildung 51 zu sehen. Man erkennt ein ¹⁹F NMR Signal bei 7,7 ppm für die 6-Trifluormethylgruppe des freien Liganden und ein Signal bei einer chemischen Verschiebung von 11,6 ppm, das dem proteingebundenen Liganden zugeordnet werden kann. Das Signal für

den freien Liganden ist auf ca. 25 Hz verbreitert, während die Halbwertsbreite für das Signal des gebunden Liganden ca. 50 Hz beträgt.



Abb. 51: 470 MHz ¹⁹F NMR Titration der rekombinanten N-terminalen Domäne der Riboflavin Synthase aus *E. coli* mit 6-Trifluormethyl-7-oxo-8-ribityllumazin (Verbindung 12). Die eingesetzte Monomerenkonzentration des Proteins war 1,7 mM. Die Proben enthielten folgende Konzentrationen an Verbindung 12: A 0,92 mM; B 1,06 mM; C 1,43 mM; D 1,65 mM. Die Proben enthielten 70 mM Phosphat Puffer, 100 mM NaCl und 10% D₂O bei pH 7,0. Die Spektren wurden mit einer Linienverbreiterung von 20 Hz transformiert. Die gestrichelte Linie kennzeichnet die Lage des Signals für den freien Liganden im Spektrum.

Die Rücktitration dieses Protein/Ligand Komplexes mit einer großen Menge an Riboflavin bewirkt das Verschwinden des Signals bei 11,6 ppm und dementsprechend reduziert sich die die Linienverbreiterung des Signals bei 7,7 ppm auf ca. 1 Hz (Ergebnisse hier nicht gezeigt).

Die Titration der rekombinanten N-terminalen Domäne der Riboflavin Synthase aus *E. coli* mit 6,7-Bis(trifluormethyl)-8-ribityllumazin (Epimer A, Verbindung **11a**) ergibt die in Abbildung 52 gezeigten ¹⁹F NMR Spektren. Die Signale für die am Protein gebundenen Trifluormethylgruppen sind im Vergleich zu den entsprechenden Signalen für die freien Trifluormethylgruppen nach tieferem Feld hin verschoben. Das Signal für die enzymgebundene 6-CF₃ Gruppe hat eine chemische Verschiebung von 15,7 ppm und ist auf

52 Hz linienverbreitert. Die an das Protein gebundene 7-CF₃ Gruppe wird durch das Signal bei einer chemischen Verschiebung von -6,4 ppm im Spektrum repräsentiert, das auf ca. 55 Hz linienverbreitert ist. Die Signale im ¹⁹F NMR Spektrum bei chemischen Verschiebungen von 12,2 ppm und -8,1 ppm sind den freien 6- bzw. 7-CF₃ Gruppen zuzuordnen und sind auch auf ca. 35 Hz verbreitert.



Abb. 52: 470 MHz ¹⁹F NMR Spektren der Titration der rekombinanten N-terminalen Domäne der Riboflavin Synthase aus *E. coli* mit 6,7-Bis(trifluormethyl)-8-ribityllumazin (Verbindung 11a). Die eingesetzte Monomerenkonzentration des Proteins war 1,74 mM. Die Proben enthielten folgende Konzentrationen an Verbindung 11a: A 1,1 mM; B 1,2 mM; C 1,32 mM; D 1,4 mM. Die Proben enthielten 70 mM Phosphat Puffer, 100 mM NaCl und 10% D₂O bei pH 7,0. Die Spektren wurden mit einer Linienverbreiterung von 20 Hz transformiert.

Diese beobachteten Linienverbreiterungen der NMR Signale resultieren auch hier aus dem Austausch zwischen freiem Liganden und gebundenem Liganden innerhalb der NMR Zeitskala. Aber die Signale der an die rekonmbinante N-terminale Domäne gebundenen Trifluormethylgruppen sind deutlich schärfer als die entsprechenden Signale der an die homotrimeren Riboflavin Synthasen aus *E. coli* bzw. *Schizosaccharomyces pombe* gebundenen Trifluormethylgruppen.

Das ist eine Folge der Proteingröße. Die rekombinante N-terminale Domäne ist ein artifizielles c₂ symmetrisches Dimer mit einer Molekülmasse von 20 kDa. Die Liganden besetzten zwei Bindungsplätze mit jeweils gleicher chemischer Umgebung. Zwischen denen und dem freien Liganden kann ein Austausch stattfinden. In der rekombinanten Wildtyp Riboflavin Synthase belegen die Liganden 6 Bindungsplätze in einem Homotrimer mit einer Molekülmasse von 70 kDa.

¹⁹F NMR Bindungsversuche mit dem diastereomeren Epimer B (Verbindung **11b**) ergeben keine detektierbare Bindung bis zu Ligandenkonzentrationen über 1 mM. Die Signale des nicht bindenden Liganden sind nicht verbreitert durch die Anwesenheit der rekombinanten Nterminalen Domäne (Daten hier nicht gezeigt). Für die rekombinante N-terminale Domäne der Riboflavin Synthase bleibt die Stereoselektivität des ganzen Proteins im Hinblick auf die Konfiguration an C7 des kovalenten Hydrats erhalten.

Um festzustellen, bei welcher minimalen Länge die N-terminale Domäne noch in der Lage ist, Liganden zu binden, wurden verkürzte rekombinante N-terminale Domänen mit der Länge von 81, 85 und 87 Aminosäureresten konstruiert. Nur die um 10 Aminosäurereste verkürzte N-terminale Domäne (AS Rest 1-87) war noch in der Lage sowohl Epimer A als auch die 7-Oxo Verbindung zu binden. Die Aufspaltungsmuster, chemischen Verschiebungen und Linienverbreiterungen in den erhaltenen ¹⁹F NMR Spektren entsprechen denen der nicht verkürzten N-terminalen Domäne (Daten hier nicht gezeigt).

Die C-terminale Domäne von Aminosäurerest 101-213 der Riboflavin Synthase aus *E. coli* wurde unter Austausch des N-terminalen Methionin Restes gegen einen Prolin Rest durch einen PCR Fehler expriminert. Die C-terminale Domäne ist viel instabiler als die N-terminale Domäne und konnte nur partiell angereinigt werden.

Die ¹⁹F NMR Spektren in Abbildung 53 zeigen 6-Trifluormethyl-7-oxo-8-ribityllumazin (Verbindung **12**) in Komplex mit der rekombinanten C-terminalen Domäne. Das Signal für die an das Protein gebundene 6-CF₃ Gruppe hat eine chemische Verschiebung von 8,5 ppm und ist sehr stark linienverbreitert. Es ist nur minimal um 0,8 ppm nach tieferem Feld hin verschoben verglichen mit dem Signal für die nicht proteingebundene 6-CF₃ Gruppe bei 7,7 ppm. Auch dieses Signal ist stark linienverbreitert.

Auch Epimer A (Verbindung **11a**) bildet einen Komplex mit der rekombinanten C-terminalen Domäne. Das Signal für die an das Protein gebundenen 6-CF₃ Gruppe hat eine chemische Verschiebung von 14,1 ppm und das entsprechende Signal für die 7-CF₃ Gruppe erscheint bei einer Verschiebung von -5,5 ppm. Die Signale der an das Protein gebundenen Trifluormethylgruppen und die entsprechenden freien Signale sind auch im Falle von Epimer A stark linienverbreitert.

Die rekombinante C-terminale Domäne zeigt die gleiche Stereospezifität bezogen auf C7 des hydratisierten Lumazin Derivates wie die rekombinante N-terminale Domäne und die ganze rekombinante Riboflavin Synthase aus *E. coli*, da Epimer B nicht bindet.



Abb. 53: 338 MHz ¹⁹F NMR Spektren der ganzen Riboflavin Synthase aus *E.coli* im Komplex mit 6-Trifluormethyl-7-oxo-8-ribityllumazin (Verbindung 12) im Vergleich mit den entsprechenden Spektren der N-bzw. C-terminalen Domäne. Die Proben enthielten 70 mM Phosphat Puffer, 100 mM NaCl und 10% D₂O bei pH 7,0. Die einzelnen Proben enthielten folgende Konzentrationen: Wildtyp Riboflavin Synthase 0,37 mM, 12 1,17 mM; rekombinante N-terminale Domäne 0,6 mM, 12 1,54 mM; rekombinante C-terminale Domäne 0,6 mM, 12 0,46 mM. Die Spektren wurden mit einer Linienverbreiterung von 20 Hz transformiert.



Abb. 54: 338 MHz ¹⁹F NMR Spektren der Riboflavin Synthase (0,4 mM Protein, 1,8 mM Ligand), der rekombinanten N-terminalen Domäne (1,5 mM Protein, 0,56 mM Ligand) und der rekombinanten C-terminalen Domäne (0,08 mM Protein, 0,18 mM Ligand) im Komplex mit 6,7-Bis(trifluormethyl)-8-ribityllumazin (Verbindung 11a). Die Proben enthielten 70 mM Phosphat Puffer, 100 mM NaCl und 10% D₂O bei pH 7,0. Die Spektren wurden mit einer Linienverbreiterung von 20 Hz transformiert.

Ein Vergleich dieser Spektren für die N-terminale bzw. C-terminale Domäne der Riboflavin Synthase aus *E. coli* mit dem vollständigen rekombinanten homotrimeren Protein, wie in Abb. 53 und Abb. 54 gezeigt, erlaubt eine eindeutige Zuordnung der gebundenen Fluorsignale in den ¹⁹F NMR Spektren der ganzen Riboflavin Synthase zur N-terminalen bzw. C-terminalen Bindungsstelle. Dieser Aspekt wurde schon detailliert im Abschnitt für die ¹⁹F NMR Untersuchungen an ganzer rekombinanter Riboflavin Synthase aus *E. coli* besprochen.

3.2.8¹⁹F NMR Experimente an der Riboflavin Synthase aus Schizosaccharomyces pombe

3.2.8.1 Vergleichende Betrachtungen der ¹⁹F NMR Experimente an Riboflavin Synthase aus Schizosaccharomyces pombe mit bisherigen ¹⁹F NMR Bindungsstudien

Die bisherigen ¹⁹F NMR Bindungsstudien mit Riboflavin Synthasen aus Bacillus subtilis (Cushman et al.1991, 1992, 1993; Scheuring et al. 1996) und Escherichia coli (Abschnitt 3.2.2-3.2.6) haben überraschenderweise eine starke Signalmultiplizität der an die Proteine gebundenen Liganden ergeben. Die Untersuchungen mit dem Intermediatanalogen 6-Trifluormethyl-7-oxo-8-ribityllumazin (Verbindung 12) haben mindestens 4 unterschiedliche Bindungszustände ergeben, die durch unterschiedliche, stark linienverbreiterte ¹⁹F NMR Signale charakterisiert sind und deren chemische Vrschiebungen sich über einen Bereich von etwa 9 ppm erstrecken. Das kovalente Hydrat des 6,7-Bis(trifluormethyl)-8-ribityllumazins (Epimer A; Verbindung 11a) wurde dagegen nur in mindestens zwei unterschiedlichen Zuständen an die Riboflavin Synthasen gebunden. Andererseits zeigten entsprechende Bindungsstudien mit Lumazin Protein aus Photobacterium phosphoreum, einem monomeren Parallogon der Riboflavin Synthase nur ein einzelnes scharfes Signal für jede an das Enzym gebundene Trifluormethylgruppe (Scheuring et al. 1993; 1994). Auch die artifizielle Nterminale Domäne der E. coli Ribflavin Synthase, die ein c2 symmetrisches Homodimer Signale für jede an das zeigte einzelne scharfe Protein gebundene bildet. Trifluormethylgruppe der trifluormethylsubstituierten Lumazin Derivate (Abschnitt 3.2.7).

Die Abbildungen 55 und 56 zeigen vergleichende Protein Perturbationsstudien mit verschiedenen Orthologen und Parallogen der Riboflavin Synthase aus *Schizosaccharomyces pombe*. Es handelt sich dabei um das Lumazin Protein aus *Photobacterium leiognathi* (Abb. 55a, 56a), die rekombinante N-terminale Domäne der *E. coli* Riboflavin Synthase (Abb. 55b, 56b) und die vollständigen Riboflavin Synthasen aus *B. subtilis*, *E. coli*, sowie aus *S. pombe* (Abb. 55c-55e, 56c-56e). Alle in diesem Abschnitt abgebildeten Spektren sind 470 MHz ¹⁹F NMR Spektren und wurden im Rahmen dieser Arbeit aufgenommen.

Das Monotrifluormethyl Derivat (Verbindung **12**) ist in Abbildung 55e im Komplex mit der Riboflavin Synthase aus *Schizosaccharomyces pombe* abgebildet. Das Signal, das dem freien Liganden zugeordnet werden kann, hat eine chemische Verschiebung von 7,7 ppm (in Abb. 55e als gestrichelte Linie markiert) und ist auf 56 Hz linienverbreitert. Dagegen zeigen



Abb. 55: Vergleich der ¹⁹F NMR Spektren von 6-Trifluormethyl-7-oxo-8-ribityllumazin (Verbindung 12) gebunden an: A Lumazin Protein aus *P. leiognathi* (0,39 mM Protein; 0,25 mM 12); B rekombinante N-terminale Domäne der Riboflavin Synthase aus *E. coli* (1,6 mM Protein; 0,98 mM 12); C Riboflavin Synthase aus *E. coli* (1,12 mM Protein; 1,43 mM 12); D Riboflavin Synthase aus *B. subtilis* (0,30 mM Protein; 0,75 mM 12); E Riboflavin Synthase aus *S. pombe* (0,84 mM Protein; 1,22 mM 12). Alle Proben enthielten 20 mM Phosphat Puffer, 100 mM KCl und 10% D₂O bei pH 7. Die Signale des freien Liganden sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet. Die Spektren wurden mit einer Linienverbreiterung von 20 Hz transformiert.



Abb. 56: Vergleich der ¹⁹F NMR Spektren von 6,7-Bis(trifluormethyl)-8-ribityllumazin (Verbindung 11a) gebunden an: A Lumazin Protein aus *P. leiognathi* (0,42 mM Protein; 0,23 mM 11a); B rekombinante N-terminale Domäne der Riboflavin Synthase aus *E. coli* (1,5 mM Protein; 0,56 mM 11a); C Riboflavin Synthase aus *E. coli* (1,5 mM Protein; 3,34 mM 11a); D Riboflavin Synthase aus *B. subtilis* (0,40 mM Protein; 0,41 mM 11a); E Riboflavin Synthase aus *S. pombe* (0,77 mM Protein; 0,60 mM 11a). Alle Proben enthielten 20 mM Phosphat Puffer, 100 mM KCl und 10% D₂O bei pH 7. Die Signale des freien Liganden sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet. Die Spektren wurden mit einer Linienverbreiterung von 20 Hz transformiert.

die Signale des in unterschiedlichen Zuständen an das Protein gebundnen Liganden Linienbreiten, die von annährend 90 Hz bis etwa 540 Hz variieren. Die Riboflavin Synthasen aus *Bacillus subtilis* (Abb. 55c) und *Escherichia coli* (Abb. 55d) zeigen eine ähnliche

Signalmultiplizität. Aber die chemischen Verschiebungen und Linienbreiten unterscheiden sich deutlich.

Aber im Unterschied dazu zeigen die Komplexe des Monotrifluormethylderivates mit Lumazin Protein aus *Photobacterium leiognathi* (Abb. 55a) und die artifizielle c₂ symmetrische N-terminale Domäne der *E. coli* Riboflavin Synthase nur einzelne und deutlich schärfere Signale für den proteingebundenen Liganden (Abb. 55b). Diese Ergebnisse zeigen, dass 6-Trifluormethyl-7-oxo-8-ribityllumazin (Verbindung **12**) an alle untersuchten Riboflavin Synthasen in mehreren deutlich unterschiedlichen Zuständen bindet, während es nur einen einzigen gebundenen Zustand im Lumazin Protein und in der artifiziellen Nterminalen Domäne gibt.

Ein ähnlicher Satz von Experimenten mit 6,7-Bis(trifluormethyl)-8-ribityllumazin (Epimer A, Verbindung **11a**) ist in Abbildung 56 zu sehen. Diese Verbindung bildet zwei stabile diastereomere Hydrate Epimer A (**11a**) und Epimer B (**11b**), die sich durch ihre Konfiguration am Ring Kohlenstoffatom C7 unterscheiden. Während die 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin Synthase beide Epimere binden kann (Scheuring et al. 1995, 2001), bindet die Riboflavin Synthase aus *Schizosaccharomyces pombe* nur Epimer A. Alle anderen untersuchten Riboflavin Synthasen zeigen die gleiche Stereoselektivität (Cushman et al. 1991; Scheuring et al. 1993; 1994; Abschnitt 3.2.2-3.2.7 dieser Arbeit).

In Abbildung 56a bis 56b sind die ¹⁹F NMR Spektren von Epimer A gebunden an Lumazin Protein aus *Photobacterium leiognathi* sowie an die homodimere N-terminale Domäne der *E. coli* Riboflavin Synthase zu sehen. Für jede an das entsprechende Protein gebundene Trifluormethylgruppe ist nur jeweils ein relativ scharfes Signal im Spektrum vorhanden.

Im Gegensatz dazu zeigen die untersuchten Riboflavin Synthasen mit diesem Liganden (Abb.56c-56e) mehrere unterschiedliche Signale für den an das Protein gebundenen Liganden aber die Aufspaltungsmuster sind von Proteinspezies zu Proteinspezies unterschiedlich. Für die Riboflavin Synthase aus *Schizosaccharomyces pombe* ist auch im Falle dieses Liganden ein sehr komplexes Aufspaltungsmuster zu beobachten (Abb. 56e). Im Bereich der 7-Trifluormethylgruppe sind 3 Hauptsignale für den an das Protein gebundenen Liganden im Spektrum vorhanden (-3,6 ppm; -5,3 ppm; -6,5 ppm). Im Verschiebungsbereich der 6-Trifluormethylgruppe sind 2 Hauptsignale für das an das Potein gebundene Epimer A zu erkennen (16,2 ppm und 15,2 ppm) sowie ein Hügel im Rauschen des Spektrums bei 14,2 ppm. Die Signale für die nicht proteingebundenen Trifluormethylgruppen liegen bei 12,3 ppm (6-CF₃) und -8,1 ppm (7-CF₃) und sind durch gestrichelte Linien in der Abbildung gekennzeichnet. Die Halbwertsbreiten der freien Signale liegen zwischen 85 und 130 Hz. Die

Signale der gebundenen Trifluormethylgruppen haben Linienbreiten zwischen 240 und 310 Hz. Das etwas weniger intensive und schärfere Signal bei -3,6 ppm ist nur auf 140 Hz linienverbreitert.

Obwohl die $6\text{-}CF_3\text{-}Gruppen$ der beiden Fluorlumazine 6-Trifluormethyl-7-oxo-8-ribityllumazin und 6,7-Bis(trifluormethyl)-8-ribityllumazin (Epimer A) topologisch äquivalent sind, sind die ¹⁹F NMR Signale, die den an die Riboflavin Synthase aus*Schizosaccharomyces pombe*gebundenen <math>6-Trifluormethylgruppen entsprechen, im Falle der Monotrifluormethyl Verbindung über einen Bereich von 9 ppm im Bereich tieferen Feldes verglichen mit dem freien Signal verstreut, während die Signale der <math>6-Trifluormethylgruppe von Epimer A nur um 4 ppm in diese Richtung verstreut liegen. Außerdem bindet die $6\text{-}CF_3$ Gruppe von Epimer A in weniger unterschiedlichen Bindungszuständen an das Protein als die entsprechende $6\text{-}CF_3$ Gruppe der Monotrifluormethylverbindung.

3.2.8.2 ¹⁹F NMR Experimente mit Punktmutanten der Riboflavin Synthase aus Schizosaccharomyces pombe

In Abschnitt 3.2.4 wurde über eine Serie von ¹⁹F NMR Experimenten mit Punktmutanten der Riboflavin Synthase aus *E. coli* berichtet. Im Rahmen dieser Experimente war es nicht möglich Mutanten Proteine zu exprimieren, die eine Mutation der Aminosäure C48 enthielten. Diese Aminosäure C48 liegt in dem artifiziellen Dimer der N-terminalen Domäne nahe am gebundenen Riboflavin (Truffault et al. 2001). Diese Aminosäure wurde demnach als das die Reaktion einleitende Nucleophil vorgeschlagen. Auch in der Röntgenstruktur der gesamten Riboflavin Synthase aus *E. coli* (Liao et al. 2001) wurde dem Rest C48 aus Modellberechnungen heraus eine katalytische Funktion zugeordnet.

Ein erneuter Anlauf zur Mutation dieses offensichtlich wichtigen Aminosäurerestes C48 wurde an der Riboflavin Synthase aus *Schizosaccharomyces pombe* versucht. Im Unterschied zu den früheren Erkenntnissen mit dem *E. coli* Enzym konnte der C48 Rest des *Schizosaccharomyces pombe* Enzyms durch unterschiedliche Aminosäurereste ersetzt werden und die Mutanten Proteine konnten bis zu einem hohen Anteil am gesamten zellulären Protein der rekombinanten *E. coli* Stämme exprimiert werden. Analog dazu wurden Mutanten Proteine mit dem zum C48 Rest topologisch äquivalenten S146 Rest exprimiert.



Abb. 57: ¹⁹F NMR Spektren von 6-Trifluormethyl-7-oxo-8-ribityllumazin (Verbindung 12) im Komplex mit Mutanten der Riboflavin Synthase aus *Schizosaccharomyces pombe* im Vergeleich mit dem entsprechenden Wildtyp Spektrum. Die einzelnen Proben enthielten folgende Konzentrationen: C48M, 0,85 mM Protein, 1,10 mM 12; C48A, 0,44 mM Protein, 0,57 mM 12; C48S, 0,46 mM Protein, 0,80 mM 12; wild type, 0,84 mM Protein, 1,22 mM 12; S146C, 0,61 mM Protein, 0,92 mM 12; S146A, 0,77 mM Protein, 1 mM 12. Alle Proben enthielten 20 mM Phosphat Puffer, 100 mM KCl und 10% D₂O bei pH 7. Die Signale des freien Liganden sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet. Die Spektren wurden mit einer Linienverbreiterung von 20 Hz transformiert.

Die katalytischen Eigenschaften der Mutanten sind in Tabelle 10 zusammengefasst. Das Ersetzen des Cystein 48 Restes durch ein Serin reduziert die Geschwindigkeit der Umsetzung durch das Protein etwa um den Faktor 6. Die Mutanten C48A und C48M zeigen keine detektierbare katalytische Aktivität. Dagegen haben die Mutationen an der Position S146 nur unbedeutenden Einfluß auf die katalytische Aktivität, ähnlich den Ergebnissen mit der S146 Mutante der *E. coli* Riboflavin Synthase.

Enzym	V _{max} [nmol mg ⁻¹ min ⁻¹]	Κ _M [μM]
wild type	158 <u>+</u> 2.9	5.7 <u>+</u> 0.24
S146A	183 <u>+</u> 9.5	3.8 <u>+</u> 0.40
S146C	179 <u>+</u> 7.0	8.9 <u>+</u> 1.06
C48S	27 <u>+</u> 1	1.1 <u>+</u> 0.13
C48A	< 0.1	
C48M	< 0.1	

Tabelle	10:	Kinetische	Eigenschaften	der	Wildtyp	Riboflavin	Synthase	aus	Schizosaccharomyces
		pombe und	l deren Mutante	n:					

In Abbildung 57 sind die ¹⁹F NMR Spektren der mit 6-Trifluormethyl-7-oxo-8-ribityllumazin (Verbindung **12**) gesättigten Proteine abgebildet. Die Mutation des C48 Restes hat einen starken Effekt auf die ¹⁹F NMR Spektren mit der Monotrifluormethyl Verbindung. Dieser Einfluß auf die NMR Spektren beschränkt sich nicht nur auf die Veränderung eines einzelnen Signales, sondern beeinflusst das gesamte Spektrum.

Der Austausch der Aminosäure Cystein 48 durch die kleineren Reste Alanin sowie Serin bewirkt, das der im Wildtyp Spektrum dominierende Doppelpeak bei 16,0 bzw. 15,6 ppm entweder verschoben wird (C48S um 3 ppm nach höherem Feld hin auf 12,7 ppm) oder verschwindet, das heißt in seiner Intensität verändert wird (C48A nicht genau zuzuordnen; vermutlich bei 10,5 ppm nach Titrationsverlauf). Der Ersatz der Aminosäure Cystein 48 gegen den mehr Raum in Anspruch nehmenden Methionin Rest bewirkt dagegen die deutlich geringere Verschiebung des intensiven Wildtyp Signals (16,0 bzw.15,6 ppm) um nur ca. 2 ppm zu höherem Feld hin auf 14 ppm bzw. 13,7 ppm. Im Falle der C48M Mutante bleibt das Aufspaltungsmuster der an das Protein gebundenen 6-CF₃ Gruppe ziemlich ähnlich, verglichen mit dem Wildtyp Spektrum. Die restlichen Signale zeigen nur leichte Verschiebungsänderungen bzw. Änderungen in ihren Intensitäten und Linienbreiten.

Auch im Falle der Mutante C48S bleibt das Aufspaltungsmuster des Wildtypspektrums weitgehend erhalten. Allerdings gibt es auch hier leichte Verschiebungsänderungen und auffällige Änderungen der Intensitätsverhältnisse sowie Linienbreiten. Nur die Mutante C48A zeigt deutlich veränderte Intensitätsverhältnisse. Allen C48 Mutanten und dem Wildtyp gemeinsam ist ein relativ scharfes Signal bei 8,8 ppm. Aber seine relative Intensität ist in der Mutante C48A anders als in den anderen C48 Mutanten und im Wildtyp Spektrum. Und es ist ein dominierendes Signal bei einer chemischen Verschiebung von 9,3 ppm zu beobachten, das im Falle aller anderen C48 Mutanten und im Falle des Wildtyp Proteins nur in den Anfangsstadien der Titrationen also bei Ligandenunterschuß im Spektrum zu beobachten ist und im Stadium der Sättigung mit Ligand zugunsten des im Laufe der Titrationen wachsenden Signals bei 8,8 ppm verschwindet (Abschnitt 3.2.8.3).

Aus dem innreren Alignment zwischen N-terminaler bzw. C-terminaler Hälfte der Aminosäuresequenz der Riboflavin Synthase folgt, dass die Aminosäure Serin 146 in der Cterminalen Domäne topologisch Äquivalent zum Cystein 48 aus der N-terminalen Domäne ist. Obwohl dieser Rest beim Vergleich von Riboflavin Synthasen aus unterschiedlichen Spezies absolut konserviert erscheint, hat der Ersatz dieses Aminosäurerestes S146 durch das kleinere Alanin bzw. das größere Serin nur wenig Einfluß auf die katalytische Aktivität bzw. die Michaelis Konstante des Proteins (Tabelle 10).

Aber der Austausch der Aminosäure Serin146 hat großen Einfluß auf die ¹⁹F NMR Spektren der Mutanten Proteine gesättigt mit 6-Trifluormethyl-7-oxo-8-ribityllumazin (Verbindung **12**). Das Signal bei 8,8 ppm, das im Wildtyp Spektrum und in allen C48 Mutanten Spektren vorhanden ist, ist entweder verschoben bzw. nicht mehr vorhanden, wie im Falle der S146C Mutante bzw. es ist als scharfes und sehr intensives Signal im Spektrum der Mutante S146A zu erkennen. Im Falle beider Mutanten S146C und S146A sind im mit Ligand gesättigtem Spektrum zwei ungefähr gleich intensive Signale bei einer Verschiebung von 15,7 ppm und bei Verschiebungen von 10,5 (S146C) bzw. 10,2 ppm (S146A) zu finden. Auch im Falle der Serin 146 Mutanten muß beachtet werden, dass sich der Einfluß der Mutation auf das gesamte Spektrum des an das Protein gebundenen Fluorlumazins bemerkbar macht. Andererseits ist durch die Mutation an Position S146 eine deutliche Vereinfachung des Aufspaltungsmusters der Signale des an das Protein gebundenen Fluorlumazins zu erkennen.

Die Signale bei der Verschiebung von 15,7 ppm in den Spektren der Mutanten S146C und S146A entsprechen dem Doppelsignal im Spektrum des Wildtyp Enzyms bei 16,0 bzw. 15,7

ppm, dessen chemische Verschiebung in den Spektren der C48 Mutanten variiert. Die Verschiebung bleibt für dieses Signal in den Spektren der S146 Mutanten verglichen mit dem Wildtyp unverändert. Die Mutation der Aminosäure C48 befindet sich im N-terminalen Anteil der Riboflavin Synthase, während die S146 Mutationen den C-terminalen Anteil betreffen. So kann man schlussfolgern, dass das Signal im Wildtyp Spektrum bei 16,0 bzw. 15,7 ppm der N-terminalen Bindungsstelle zuzuordnen ist. Während das Signal bei 8,8 ppm bei den C48 Mutanten völlig invariant ist, kann dieser Verschiebungsbereich, der in den S146 Mutanten variiert als C-terminale Bindungsstelle zugeordnet werden.

Wenn man alle Mutanten Spektren mit 6-Trifluormethyl-7-oxo-8-ribityllumazin (Verbindung **12**) mit dem entsprechenden Spektrum des Wildtyp Proteins vergleicht, kann sogar angenommen werden, dass der gesamte Bereich zwischen dem der N-terminalen Bindungsstelle zugeordneten Signal und dem nicht proteingebundenen Signal C-terminalen Bindungsstellen zuzuordnen ist, die unterschiedliche chemische Umgebungen haben und sehr unterschiedlich von der Dynamik des Proteins während der Beladung mit Ligand beeinflusst werden. Dieser Verschiebungsbereich wird zwar in den C48 Mutanten beeinflusst aber in den S146 Mutanten ist dieser Bereich völlig verändert (Abschnitt 3.2.8.3).

Analog zu dem bisher betrachteten wurde ein Satz Experimente mit dem Intermediat Analogen 6,7-Bis(trifluormethyl)-8-ribityllumazin (Verbindung **11a**) durchgeführt.

In Abbildung 58 sind die ¹⁹F NMR Spektren der mit Epimer A gesättigten Proteine sowohl der Mutanten als auch des Wildtyps dargestellt.

Beim Vergleich der Mutante C48M mit dem Spektrum der Wildtyp Riboflavin Synthase erkennt man, das sich das Aufspaltungsmuster für beide Trifluormethylgruppen kaum geändert hat. Der auffälligste Unterschied besteht im Fehlen des etwas weniger intensiven Signals bei -3,6 ppm aus dem Wildtypspektrum im Spektrum der Mutante C48M, bei der das Cystein durch den größeren Methionin Rest ersetzt worden ist. Das ist eine allgemeine Eigenschaft der mit Epimer A gesättigten C48 Mutanten. Auch die mit Epimer A gesättigten Mutanten C48A und C48S, deren Cystein Reste durch kleinere Reste ersetzt worden sind, haben bei der chemischen Verschiebung von -3,6 ppm kein Signal. Dafür erscheint in den Spektren der mit Epimer A gesättigten Mutanten C48A und C48S im Bereich der 7-CF₃-Gruppe dieses Signal um 3,5 ppm nach höherem Feld hin verschoben bei -7,1 ppm, das weder im Spektrum des Wildtyp Proteins noch im Spektrum der Mutante C48M zu finden ist. Im Bereich der 6-CF₃-Gruppe gibt es beim Vergleich zwischen Wildtyp und Mutante C48M nur Verschiebungsunterschiede unbedeutende und minimale Veränderungen der Intensitätsverhältnisse zwischen den einzelnen Signalen. Dagegen zeigen die Spektren der mit



Abb. 58: ¹⁹F NMR Spektren von 6,7-Bis(trifluormethyl)-8-ribityllumazin (Verbindung 11a in Abb.8) im Komplex mit Mutanten der Riboflavin Synthase aus *Schizosaccharomyces pombe* im Vergeleich mit dem entsprechenden Wildtyp Spektrum. Die einzelnen Proben enthielten folgende Konzentrationen: C48M, 0,90 mM Protein, 0,94 mM 11a; C48A, 0,57 mM Protein, 0,33 mM 11a; C48S, 0,60 mM Protein, 0,42 mM 11a; wild type, 0,77 mM Protein, 0,60 mM 11a; S146C, 0,78 mM Protein, 0,65 mM 11a; S146A, 1,03 mM Protein, 1 mM 11a. Alle Proben enthielten 20 mM Phosphat Puffer, 100 mM KCl und 10% D₂O bei pH 7. Die Signale des freien Liganden sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet. Die Spektren wurden mit einer Linienverbreiterung von 20 Hz transformiert.

Epimer A gesättigten Mutanten C48A und C48S im Bereich der 6-Trifluormethylgruppe deutliche Unterschiede sowohl zum Wildtyp Spektrum als auch zum Spektrum der Mutante C48M. Das im Wildtyp Spektrum im Bereich der 6-CF₃-Gruppe dominierende Signal bei 16,2 ppm ist in den Mutanten Spektren für C48A und C48S nur noch als Hügel im Rauschen des Spektrums erkennbar. Dagegen erscheint im Spektrum der mit Epimer A gesättigten Mutante C48S ein sehr intensives Signal bei 14,8 ppm mit einer deutlichen Schulter bei 15,1 ppm. Ein kleiner Hügel im Rauschen des Spektrums erscheint wieder bei 14,0 ppm. Es kann vermutet werden, dass im Fall der Mutante C48S die beiden Hauptsignale des Wildtypspektrums von 16,2 und 15,2 ppm so nahe zusammengefallen sind, dass sie nicht mehr separiert werden können. Das würde einen Hochfeldshift des intensiveren Signals aus dem Wildtyp Spektrum im Mutanten Spektrum um 2,2 ppm bedeuten. Während das kleinere Signal bei 15,2 ppm am Hauptsignal ist.

Im Spektrum der mit Epimer A gesättigten Mutante C48A ist ein sehr intensiver Peak bei einer Verschiebung von 15,1 ppm zu erkennen, neben dem sich noch ein etwas weniger intensiver Peak bei 14,14 ppm befindet. Im Falle dieser Mutante sind vermutlich beide Signale durch die Mutation jeweils um ca. 1 ppm nach höherem Feld hin veschoben verglichen mit dem Wildtyp Spektrum.

Im Bereich der 7-CF₃-Gruppe zeigen die beiden Hauptsignale , die im Wildtyp Spektrum eine chemische Verschiebung von -5,3 und -6,4 ppm haben, kaum bzw. nur unbedeutende Verschiebungsänderungen. Die Verschiebungen dieser Signale sind für die mit Epimer A gesättigte Mutante C48S -5,4 ppm sowie -6,4 ppm. Im Spektrum der mit Epimer A gesättigten Mutante C48A erscheinen diese Signale bei chemischen Verschiebungen von -5,7 und -6,4 ppm. Außerdem sind die Signale der Mutanten viel schärfer als die Signale im Wildtyp Spektrum. Über das zusätzliche Signal bei -7,2 ppm sowohl in den Spektren der Mutante C48S als auch in den Spektren der Mutante C48A im Bereich der 7-CF₃-Gruppe und dem gleichzeiteigen Nichtvorhandensein des Wildtyp Signals bei -3,6 ppm wurde schon weiter oben berichtet. Das Aufspaltungsmuster der Signale für die gebundenen 7-CF₃ Gruppe ist bei den Mutanten C48S und C48A analog.

Die Signale der an das Protein gebundenen 7-Trifluormethylgruppe von Epimer A gebunden an die Mutante C48M zeigen in ihren chemischen Verschiebungen nur unbedeutende Unterschiede von höchstens 0,5 ppm zum Wildtyp. Allerdings unterscheidet sich die Form der Signale. Im Falle der C48M Mutante sieht man sehr breite Signale, die zum Teil aufgespalten vorliegen, das heißt, es liegen mehrere gebundene Zustände mit nur minimalen Unterschieden ihrer chemischen Umgebung sehr nahe beieinander, dass man zwar noch eine Signalaufspaltung erkennen kann aber keine Separierung der Signale vorliegt. Trotzdem ist das eine Signal bei ca. -5 ppm deutlich zu drei Signalen aufgespalten. Auch unter dem Signal bei einer chemischen Verschiebung von ca. -6,4 ppm verstecken sich drei Bindungsstellen. Es ist zu vermuten, dass es sich hierbei um drei C-terminale und drei N-terminale Bindungsstellen handelt. Aber eine Zuordnung zu N- bzw. C-terminaler Domäne ist hier nicht möglich.

Das Spektrum der mit Epimer A gesättigten Mutante S146A zeigt im Bereich der 6-CF₃-Gruppe zwei unterschiedlich intensive Signale bei chemischen Verschiebungen von 17,0 ppm (kleiner) sowie 14,8 ppm (intensivstes Signal mit einer Schulter nach höherem Feld hin) mit Halbwertsbreiten von 89 Hz bzw. 166 Hz, also deutlich schärfer als die Signale im Wildtyp Spektrum. Außerdem sind noch zwei kleinere Signale bzw. Hügel im Rauschen des Spektrums bei 16,2 bzw. 13,9 ppm zu erkennen. Das sehr scharfe Signal bei 17,0 ppm ist um 4,8 ppm verglichen mit dem Signal der freien 6-CF₃-Gruppe nach tieferem Feld hin verschoben. Bei Betrachtung der Signale, die der an die Mutante gebundenen 7-CF₃-Gruppe entsprechen, erkennt man auch ein scharfes und in der Intensität ähnliches Signal bei -3,5 ppm, das ebenfalls um 4,8 ppm verglichen mit dem Signal der freien 7-CF₃-Gruppe zu tieferem Feld hin verschoben wurde. Diese Mutation könnte in einer Bindungsstelle im Protein sowohl auf die 6-CF₃ Gruppe als auch auf die 7-CF₃ Gruppe gleichzeitig diesen Einfluß ausüben, der zu diesem relativ starken Tieffeldshift der Signale führt. Es ist aber auch möglich, dass im Wildtyp Spektrum das Signal für die 6-CF₃ Gruppe, das dem stark tieffeldgeshifteten Signal für die 7-CF₃ Gruppe bei -3,6 ppm entspricht, im Verschiebungsbereich der 6-CF₃ Gruppe unter dem sehr intensiven Signal bei 16,2 ppm liegt und im Falle der Mutante S146A durch den Hochfeldshift eines Teils des Signales auf 14,8 ppm separiert wird. Das wäre auch eine Erklärung für die Schärfe der Signale im Falle der Mutante S146A, da hier nicht mehr mehrere Signale übereinander liegen. Zwei Signale unterschiedlicher Intensität liegen im Bereich der gebundenen 7-CF₃-Gruppe noch ziemlich dicht beieinander, bei Verschiebungen von -6,3 und -6,8 ppm. Es könnte sich dabei im Unterschied zu dem entsprechenden Signal für die an das Protein gebundenen 6-CF₃-Gruppe bei 14,8 ppm mit der Schulter nach höherem Feld um eine geringe Aufspaltung, d.h. einen geringen Unterschied in der chemischen Umgebung von zwei Bindungsplätzen handeln. Im Rauschen des Spektrums sind auch im Bereich der 7-CF₃-Gruppe zwei kleine Signale bei -2,1 und -5,3 ppm zu erkennen. Das Signal bei -6,8 ppm hat außerdem noch eine Schulter bei ca.-7,3 ppm, die dem separierten Signal bei 13,9 ppm im Verschiebungsbereich der 6-CF₃Gruppe entsprechen könnte.

Im Spektrum der mit Epimer A gesättigten Mutante S146C sieht man sowohl im Verschiebungsbereich der 6-CF₃-Gruppe als auch der 7-CF₃-Gruppe jeweils ein zu einem

Doppelsignal aufgespaltenes Hauptsignal bei chemischen Verschiebungen von 15,2 und 14,9 ppm sowie -6,1 und -6,6 ppm von ungefähr gleicher Intensität. Die Signale entsprechen zwei Bindungsstellen mit sich nur wenig voneinander unterscheidenden chemischen Umgebungen, die zwar zur Aufspaltung der Signale aber nicht zu vollständigen Separierung der Signale führt. Die chemische Verschiebung dieses Doppelsignals entspricht ungefähr der Verschiebung des Signals bei 15,2 ppm bzw. -6,4 ppm im Wildtyp Spektrum. Die an das Protein gebundene 6-CF₃-Gruppe wird noch durch zwei weniger intensive Signale bei 16,7 sowie 16,2 ppm repräsentiert. Im Bereich der 7-CF₃-Gruppe liegen noch zwei Hügel im Rauschen des Spektrums bei -2,5 sowie-5,3 ppm.

Auch im Falle der Bis(trifluormethyl)verbindung führt die Mutation in Position Serin 146 zu einer relativen Vereinfachung der Spektren in Bezug auf die Hauptsignale.

Beim Vergleich aller Protein Spektren im Komplex mit Epimer A fällt auf, dass das Signal bei -3,6 ppm im Wildtyp Spektrum auf alle Fälle einer N-terminalen Bindungsstelle zugeordnet werden muß, da es bei allen C48 Mutanten verschoben oder unter einem Anderen Signal verschwunden ist und in den S146 Mutanten einmal als sehr scharfes Signal nur wenig verschoben und einmal als sehr breites Signal etwas stärker verschoben für beide Trifluornethylgruppen im Spektrum vorhanden ist. Die anderen Signale sind nicht so leicht einer Domäne zuzuordnen, da meist mehrere Signale übereinander liegen.

3.2.8.3 Aus den ¹⁹F NMR Experimenten abgeleitete Protein Dynamik der Riboflavin Synthase aus Schizosaccharomyces pombe

Titrationsexperimente der Riboflavin Synthase aus *Schizosaccharomyces pombe* mit den Fluorlumazinen zeigen die besondere Komplexität der Wechselwirkungen des Proteins mit den Liganden. Abbildung 59 zeigt ein Titrationsexperiment der Riboflavin Synthase aus *Schizosaccharomyces pombe* mit dem Intermediatanalogon 6-Trifluormethyl-7-oxo-8-ribityl-


Abb. 59: ¹⁹F NMR Spektren der Titration der Riboflavin Synthase aus *Schizosaccharomyces pombe* mit 6-Trifluormethyl-7-oxo-8-ribityllumazin (Verbindung 12). Die zu Beginn eingesetzte Monomerenkonzentration betrug 1,1 mM. Die Konzentrationen des Fluorliganden in den einzelnen Titrationsschritten sind über jedem Spektrum angegeben. Die Spektren sind auf die Signalintensität des Signals bei 15,6 ppm kalibriert, das durch einen * gekennzeichnet ist. Alle Proben enthielten 20 mM Phosphat Puffer, 100 mM KCl und 10% D₂O bei pH 7. Die Signale des freien Liganden sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet. Die Spektren wurden mit einer Linienverbreiterung von 20 Hz transformiert.

lumazin. Die anfängliche Monomerenkonzentration der Riboflavin Synthase war 1,1 mM. Die Ligandenkonzentrationen für jeden einzelnen Titrationsschritt sind in der Abbildung 59 in jedem Spektrum eingezeichnet. Die Lage des freien Liganden in den Spektren ist in der Abbildung durch die gestrichelte Linie gekennzeichnet. Im Bereich eines deutlichen

Unterschusses an Ligand verglichen mit der Monomerenkonzentration werden die ¹⁹F NMR Spektren von einem relativ scharfen Signal bei 15,6 ppm dominiert, das noch eine Schulter bei ungefähr 15,8 ppm trägt. Im Rauschen des Spektrums erscheinen drei weitere stark linienverbreiterte Signale. Ein Doppelsignal bei 14,6 und 14,3 ppm, ein einzelnes sehr breites Signal bei 10,9 ppm und ein kleines Doppelsignal bei 9,4 und 9,1 ppm. Im weiteren Verlauf der Titration bleibt das Signal bei 10,9 ppm unverändert. Das dominante Signal bei 15,6 ppm bleibt ebenfalls unverändert, während die Schulter bei 15,8 ppm kleiner wird und durch ein zweites Signal bei 16,0 ppm ersetzt wird. Bei 8,8 ppm wächst bei zunehmender Ligandenkonzentration ein relativ scharfes Signal und das Signal bei 9 ppm verschwindet im Rauschen des Spektrums. Das Signal bei 14,7 ppm wird mit zunehmender Ligandenkonzentration kleiner, während im Verlauf der Titration ein Hügel zwischen dem Signal bei 10,9 ppm und dem das Spektrum dominierenden Signal bei 15,6 ppm immer mehr nach höherem Feld hin wandert. Im Spektrum des mit Ligand gesättigtem Protein erkennt man zwei das Spektrum dominierende Signale bei 15,6 und 16,0 ppm, sowie ein Relativ scharfes Signal bei 8,8 ppm. Im Verschiebungsbereich zwischen diesen Signalen liegt das von Anfang an vorhandene Signal bei 10,9 ppm und das erst mit zunehmender Ligandenkonzentration entstandene Signal bei 11,8 ppm, an das sich noch ein sehr breiter Hügel zwischen 12 und 14 ppm anschließt.

Dieser Verlauf der Titration zeigt eine starke Komplexität der Protein/Ligand Wechselwirkungen. Das Konzentrationsverhältnis von Ligand zu Protein verändert im Verlauf der Titration die Intensitäten, die Linienbreiten und die chemischen Verschiebungen der verschiedenen Signale, der an das Protein gebundenen Monotrifluormethylverbindung **12**. Eine quantitative Auswertung dieses Titrationsexperimentes ist auf Grund dieser Komplexizität unter Anwendung gängiger Modelle nicht möglich.

Nach der bisherigen Zuordnung der Signale im ¹⁹F NMR Spektrum des mit Ligand gesättigten Proteins mittels der auftretenden Veränderungen in den Mutanten Spektren, wurde das intensive Doppelsignal bei 16,0 ppm bzw. 15,7 ppm der N-terminalen Bindungsstelle zugeordnet und der Verschiebungsbereich zwischen diesem Signal und dem Signal für den freien Liganden wurde C-terminalen Bindungsstellen mit unterschiedlicher chemischer Umgebung zugeordnet. Betrachtet man daraufhin den Titrationsverlauf, beobachtet man für die N-terminale Bindungsstelle im Verlauf der Beladung des Proteins mit Ligand nur unwesentliche Veränderungen. In allen sechs Spektren ist ein sehr intensives Signal vorhanden. Im Verschiebungsbereich der C-terminalen Bindungsstellen beobachtet man dagegen im Spektrum mit Liganden Unterschuß drei relativ gleich intensive Signale, die für

drei C-terminale Bindungsstellen stehen könnten. Das Signal bei 10,8 ppm verändert sich bei weiterer Sättigung des Proteins mit Ligand überhaupt nicht. Aber die beiden anderen Signale wandern im Spektrum und verändern Intensitäten und Linienbreiten. Das könnte bedeuten, dass das Protein während der Beladung mit dem Trifluormethylliganden eine solche Konformationsänderung durchläuft. dass sich die chemischen Umgebungen der Trifluormethylgruppen diesen Bindungsstellen ändert. diese an so dass Verschiebungsänderungen zu beobachten sind.

In Abbildung 60 ist die Titrationsreihe der Mutante C48A mit dem Monotrifluormethylliganden zu erkennen. Die hier eingesetzte Monomerenkonzentration der Proteinlösung war 0,73 mM. Die Ligandenkonzentration ist für jeden Titrationsschritt in der Abbildung eingezeichnet. Die Lage des freien Liganden ist in der Abbildung durch die gestrichelte Linie gekennzeichnet.

Im ersten Spektrum des deutlichen Ligandenunterschusses sieht man ein sehr intensives Signal bei 10,5; 10,3; 10,2 ppm, das 3 Bindungszuständen mit minimal unterschiedlicher chemischer Umgebung zuzuordnen ist, was zur geringen Aufspaltung des Signals führt aber nicht zur Separierung der Signale. Dieses Signal müsste nach dem bisher gesagten, das Signal für die N-terminale Bindungsstelle sein. Das heißt, man beobachtet drei gebundene Zustände für die N-terminale Bindungsstelle im ersten Spektrum. Nach Zugabe eines kleinen Aliquotes des Liganden ist dieses Signal nur noch in zwei Signale aufgespalten, zusätzlich werden zwei Hügel im Rauschen des Spektrums im Bereich von 9 ppm sowie 12 ppm sichtbar. Zugabe eines weiteren Aliquotes des Liganden bewirkt, dass beim Hauptsignal die Aufspaltung völlig verschwindet und nur noch ein intensives Signal bei 10,5 ppm erscheint, das vermutlich drei N-terminalen Bindungsstellen mit gleicher chemischen Umgebung der 6-CF₃ Gruppe entspricht. Der Hügel um 12 ppm wird intensiver. Gleichzeitig wird aus dem Hügel um 9 ppm ein Doppelsignal bei 9,3 und 9,1 ppm sowie ein noch sehr kleines Signal bei 8,8 ppm. Diese Signale entsprechen wahrscheinlich den C-terminalen Bindungsstellen. Weitere Zugabe des Liganden bewirkt einen Anstieg der Intensitäten der Signale bei 9,3 und 8,8 ppm, wobei das Signal bei 9,1 ppm mit dem bei 9,3 ppm zusammenfällt. Der Hügel um 12 ppm wird intensiver und sieht wie ein sehr breites Signal zwischen 11,4 ppm und 12,2 ppm aus. Bei weiterer Zugabe des Liganden kommt es zu einem Intensitätswechsel. Das Signal bei 9,3 ppm wächst über das bis jetzt dominierende Signal bei 10,5 ppm hinaus. Das Signal bei 10,5 ppm hat nun ungefähr die gleiche Intensität wie das Signal bei 8,8 ppm. Sättigung des Proteins mit der Monotrifluormethylverbindung bewirkt, dass das Signal bei 9,3 ppm dominiert und das



Abb. 60: ¹⁹F NMR Spektren der Titration der Mutante C48A der Riboflavin Synthase aus *Schizosaccharomyces pombe* mit 6-Trifluormethyl-7-oxo-8-ribityllumazin (Verbindung 12). Die zu Beginn eingesetzte Monomerenkonzentration betrug 0,73 mM. Die Konzentrationen des Fluorliganden in den einzelnen Titrationsschritten sind über jedem Spektrum angegeben. Die Spektren sind jeweils auf die Signalintensität des mit * gekennzeichneten Signals kalibriert. Alle Proben enthielten 20 mM Phosphat Puffer, 100 mM KCl und 10% D₂O bei pH 7. Die Signale des freien Liganden sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet. Die Spektren wurden mit einer Linienverbreiterung von 20 Hz transformiert.



Abb. 61: ¹⁹F NMR Spektren der Titration der Mutante C48S der Riboflavin Synthase aus *Schizosaccharomyces pombe* mit 6-Trifluormethyl-7-oxo-8-ribityllumazin (Verbindung 12). Die zu Beginn eingesetzte Monomerenkonzentration betrug 0,8 mM. Die Konzentrationen des Fluorliganden in den einzelnen Titrationsschritten sind über jedem Spektrum angegeben. Die Spektren sind jeweils auf die Signalintensität des mit * gekennzeichneten Signals kalibriert. Alle Proben enthielten 20 mM Phosphat Puffer, 100 mM KCl und 10% D₂O bei pH 7. Die Signale des freien Liganden sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet. Die Spektren wurden mit einer Linienverbreiterung von 20 Hz transformiert.

am Anfang dominierende Signal bei 10,5 ppm so intensiv ist wie der Hügel um 12 ppm. Das im Wildtyp und in den anderen C48 Mutanten immer recht intensive Signal bei 8,8 ppm, das einem C-terminalen Bindungszustand zugeordnet wurde, bleibt relativ klein.

Wenn man diese Titration direkt mit der entsprechenden Titration der Wildtyp Riboflavin Synthase (Abbildung 59) vergleicht, sieht man im Spektrum mit Ligandenunterschuß auch ein kleines Doppelsignal bei 9,2 und 9,4 ppm sowie das kleine Signal bei 8,8 ppm. Aber im Verlaufe der Titration fallen diese Signale zusammen, bis im Zustand der Sättigung des Proteins mit Ligand nur ein relativ scharfes Signal bei 8,8 ppm in diesem Bereich übrig bleibt. Diese Signale wurden bei der Titration des Wildtyp Proteins mit diesem Liganden einer Cterminalen Bindungsstelle zugeordnet, deren chemische Verschiebung im Verlaufe der Beladung des Proteins mit Ligand durch eine Konformationsänderung des Proteins im Verlaufe der Bindung des Liganden an das Protein von 9,2 ppm bzw. 9,4 ppm auf 8,8 ppm zu einem scharfen, sehr intensiven Signal zusammenfällt. Die Mutation C48A hat demzufolge nicht nur direkten Einfluß auf die chemische Umgebung der an der N-terminalen Bindungsstelle gebundnenen Trifluormethylgruppe, sondern sie beeinflusst auch die chemische Umgebung die C-terminale der an Bindungsstelle gebundenen Trifluormethylgruppe durch Interdomänenwechselwirkungen auf Grund der Dynamik im Protein.

Die entsprechende Titration der Mutante C48S mit diesem Liganden ist in Abbildung 61 dargestellt. Im Zustand des Unterschusses an Ligand ist im Falle dieser Mutante ein einzelnes Signal bei 12,7 ppm zu beobachten, das nach den bisherigen Schlussfolgerungen der N-terminalen Bindungsstelle zugeordnet wurde und dessen chemische Verschiebung infolge der Mutation im Vergleich zum entsprechenden Signal im Spektrum des Wildtyp Proteins um 3 ppm in den Bereich höheren Feldes verschoben wurde. Dieses Signal wird im Verlauf der Titration sehr stark linienverbreitert. Die weitere Beladung des Proteins mit Ligand ergibt die Entstehung von zwei sehr kleinen, sehr stark linienverbreiterten Signalen im Rauschen des Spektrums bei chemischen Verschiebungen von 11,3 ppm und 9,2 ppm. Weitere Ligandenzugabe ergibt zwei zusätzliche Signale bei Verschiebungen von 10,2 ppm und 8,8 ppm. Diese beiden Signale werden bei Sättigung des Proteins mit Ligand immer größer und das Signal bei 9,2 ppm verschwindet analog der Verhältnisse beim Wildtyp Protein. Im Zustand der Sättigung der Mutante mit Ligand sind ein N-terminales Signal bei 12,7 ppm und 8,8 ppm zu beobachten.

Für die Titration der Mutante C48M mit diesem Monotrifluormethylliganden ist ein etwas anderes Verhalten zu beobachten (Abbildung 62). Hier ist im Bereich des Unterschusses an Ligand zuerst ein sehr intensives breites Signal bei 9,4 ppm zu sehen, das die gleiche Intensität hat, wie das der N-terminalen Bindungsstelle zugeordnete Signal bei 13,8 ppm (16,0; 15,7 ppm WT). Ein kleines Signal bei 8,8 ppm ist ebenfalls zu beobachten. Bei weiterer Ligandenzugabe wächst das Signal bei 8,8 ppm und ein neues Signal ungefähr gleicher Intensität bei 9,9 ppm. Bei Sättigung des Mutanten Proteins mit Ligand verschwindet das anfänglich so intensive Signal bei 9,4 ppm und es bleiben die beiden Signale bei 9,9 ppm sowie 8,8 ppm ungefähr gleicher Intansität in diesem Verschiebungsbereich übrig. Zwei Signale bei 11,8 ppm und 10,6 ppm fallen im Verlauf der Beladung des Proteins mit Ligand zu einem Signal bei 10,9 ppm zusammen. Im mit Ligand gesättigten Zustand ist ein sehr intensives N-terminales Signal bei einer chemischen Verschiebung von 13,8 ppm und drei Cterminale Signale bei chemischen Verschiebungen von 10,9 ppm, 9,9 ppm und 8,8 ppm zu beobachten.

In Abbildung 63 ist in der linken Spalte die Titration der Mutante S146A mit dem Fluorlumazin Liganden 6-Trifluormethyl-7-oxo-8-ribityllumazin abgebildet. Die anfängliche Monomerenkonzentration des Proteins betrug 1,3 mM. Die Konzentration des Liganden für jedes Stadium der Titration ist in den einzelnen Spektren eingezeichnet.

Im ersten Spektrum erkennt man 3 scharfe, relativ gleich intensive Signale mit Halbwertsbreiten von 92 - 167 Hz. Die kleinen Signale im Rauschen des Spektrums verschwinden im Verlauf der Titration. Die chemischen Verschiebungen der intensiven Signale sind: 15,5 ppm; 10,1 ppm und 9,1 ppm. Im Verlauf der Titration wachsen an den Signalen Schultern. Das Signal bei 15,5 ppm wird zum Doppelsignal bei 15,7 und 15,5 ppm, die anderen beiden Signal werden zunächst breiter. Das Signal bei 15,7 ppm bleibt als verbreitertes Signal im Verlauf der Titration mit einer Halbwertsbreite von 276 Hz immer mit ähnlicher Intensität erhalten. Das Signal zunächst bei 10,1 ppm wird ein verbreitertes Signal bei 10,2 ppm mit einer Halbwertsbreite von 227 Hz. An dem Signal bei 9,1 ppm beginnt das Signal bei 8,8 ppm zu wachsen. Im weiteren Verlauf der Titration verschwindet das Signal bei 9,1 ppm und das Signal bei 8,8 ppm bleibt als relativ scharfes sehr intensives Signal erhalten mit einer Halbwertsbreite von 100 Hz neben den beiden stark linienverbreiterten Signalen bei 15,7 und 10,2 ppm.



Abb. 62: ¹⁹F NMR Spektren der Titration der Mutante C48M der Riboflavin Synthase aus *Schizosaccharomyces pombe* mit 6-Trifluormethyl-7-oxo-8-ribityllumazin (Verbindung 12). Die zu Beginn eingesetzte Monomerenkonzentration betrug 1,15 mM. Die Konzentrationen des Fluorliganden in den einzelnen Titrationsschritten sind über jedem Spektrum angegeben. Die Spektren sind jeweils auf die Signalintensität des mit * gekennzeichneten Signals kalibriert. Alle Proben enthielten 20 mM Phosphat Puffer, 100 mM KCl und 10% D₂O bei pH 7. Die Signale des freien Liganden sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet. Die Spektren wurden mit einer Linienverbreiterung von 20 Hz transformiert.

Im Falle dieser Mutante könnte man sagen, es gibt 3 unterschiedliche Bindungsstellen mit hoher Affinität zum Liganden und 3 unterschiedliche Bindungsstellen mit niedrigerer

Affinität zum Liganden, die zuletzt besetzt werden. Diese unterschiedlichen Bindungsstellen mit den unterschiedlichen Affinitäten zum Liganden unterscheiden sich in ihren chemischen Umgebungen im Falle der zwei nach tieferem Feld verschobenen Zustände im Vergleich zum freien Liganden nur minimal bzw. überhaupt nicht (keine Separierung der Signale im Verlauf der Titration nur sehr starke Linienverbreiterung bzw. Bildung von Doppelsignalen). Aber im Falle des Signals bei 9,1 ppm bzw. 8,8 ppm hat die 6-Trifluormethylgruppe des Liganden in der höheraffinen Bindungsstelle eine andere chemische Umgebung als in der niederaffinen Bindungsstelle. Anhand dieses Verhaltens dieser zwei Signale ist die bei der entsprechenden Titration des Wildtyp Proteins und der C48 Mutanten angesprochene Konformationsänderung, die das Protein im Verlauf der Sättigung mit Ligand durchläuft besonders gut zu beobachten. Am Ende sind 3 unterschiedliche, gleich besetzte Bindungszustände der an die Mutante S146A gebundenen Trifluormethylgruppe des 6-Trifluormethyl-7-oxo-8-ribityllumazins zu beobachten, von denen ein Signal bei 15,7 ppm der N-terminalen Bindungsstelle zugeordnet wird und zwei Signale bei 10,2 ppm und 8,8 ppm Cterminale Bindungsstellen sind. Das Aufspaltungsmuster der an dieses Mutante gebundenen 6-CF₃ Gruppe ist einfacher als im Wildtyp und in den C48 Mutanten.

Die Titration der Mutante S146C ist in der Abbildung 63 in der rechten Spalte abgebildet. Im ersten Spektrum sind zwei intensive Signale bei 10,0 und 15,5 ppm erkennbar. Sie haben eine Schulter bei 10,5 und 15,7 ppm. Daraus werden in den weiteren Stadien der Titration Doppelsignale bei 15,7; 15,5 ppm sowie 10,5; 10,0 ppm. Im weiteren Verlauf der Titration bleiben diese Schultern bei 15,7 ppm und 10,5 ppm die intensiveren Signale und die zunächst dominierenden Signale werden zu Schultern bei 15,5 bzw. 10,0 ppm. Im Falle dieser Mutante gibt es also zwei unterschiedliche Bindungsstellen mit sich unterscheidender chemischer Umgebung. Außerdem gibt es eine zum Liganden höher affine Bindungsstelle, die zuerst besetzt wird und eine zum Liganden niedriger affine Bindungsstelle, die im Verlauf der Titration besetzt wird. Die chemische Umgebung dieser unterschiedlich affinen Bindungsstellen unterscheidet sich nur minimal. Diese Mutation hat zu einer starken Vereinfachung der Verhältnisse bei der Bindung des Monotrifluormethylliganden an das Protein geführt. Im Falle der Mutante S146C gibt es für den Liganden 6-Trifluormethyl-7oxo-8-ribityllumazin nur zwei Bindungszustände im Protein, wovon der bei 15,7 ppm einer N-terminalen Bindungsstelle zugeordnet werden kann und der bei 10,5 ppm einer Cterminalen Bindungsstelle zugeordnet werden kann.

Den S146 Mutanten ist gemeinsam, dass die Spektren für den an das Protein gebundnenen Trifluormethylliganden stark vereinfacht worden sind. In Abbildung 64 ist ein analoges Titrationsexperiment mit dem Intermediatanalogen 6,7-Bis(trifluormethyl)-8-ribityllumazin (Verbindung **11a**) im Komplex mit der Riboflavin Synthase aus *Schizosaccharomyces pombe* dargestellt.

Auch im Falle dieses Intermediatanalogen ist die Wechselwirkung zwischen Ligand und Protein sehr komplex.

Die der gebundenen 6-CF₃-Gruppe zugeordneten Signale bei 16,2 ppm und 15,3 ppm bleiben über alle Stadien der Titration relativ unverändert, sowohl in ihren Linienbreiten, als auch in ihren Intensitätsverhältnissen. Das etwas kleinere Signal bei 14,3 ppm erscheint erst in den Spektren bei Sättigung des Protreins mit Ligand als relativ separates Signal. Die 3 der gebundenen 7-CF₃-Gruppe zugeordneten Signale bei -3,6 ppm; -5,3 ppm und -6,5 ppm verhalten sich etwas anders. Der Spektrenbereich der 7-CF₃-Gruppe wird in den Spektren mit niedriger Ligandkonzentration von den Signalen bei -5,3 ppm und -6,5 ppm dominiert. Im Bereich des Signals bei -3,6 ppm erscheint zunächst ein kleines Signal im Rauschen des Spektrums bei -3,3 ppm, das dann zum Doppelpeak bei -3,3 und -3,6 ppm wird. Bei zunehmender Ligandkonzentration wächst das Signal bei -3,6 ppm und das bei -3,3 ppm verschwindet. Auch das Signal bei -6,5 ppm etwa gleich besetzt sind.

Die Dynamik des Proteins, durch die im Verlauf der Titrationen sowohl des Wildtyp Proteins als auch der Mutanten Proteine der Riboflavin Synthase aus *Schizosaccharomyces pombe* mit der Fluorlumazin Verbindung 6-Trifluormethyl-7-oxo-8-ribityllumazin (Verbindung 12) die chemischen Verschiebungen einzelner Signale, die C-terminalen Bindungsstellen zugeordnet wurden, verändert werden, ist im Falle der Titrationenen mit 6,7-Bis(trifluormethyl)-8-ribityllumazin nicht so deutlich beobachtbar.

In den Abbildungen 65 und 66 sind die Titrationen der Mutanten C48A und C48S mit Epimer A gezeigt.

Auch bei der Beladung der Mutanten Proteine mit der Bistrifluormethylverbindung ist eine Abhängigkeit der Protein/Ligand Wechselwirkung von der Konzentration des Liganden zu beobachten. In dem ersten Spektrum mit einem Unterschuß an Ligand dominiert für beide CF₃ Gruppen jeweils ein Hauptsignal. Das liegt für die 6-CF₃ Gruppe bei einer chemischen Verschiebung von 15,0 ppm und für die 7-CF₃ Gruppe bei -5,7 ppm. Links daneben liegt im Bereich beider CF₃ Gruppen ein kleineres Signal bei 16,3 (6-CF₃) bzw. -5,0 (7-CF₃). Diese beiden kleineren Signale werden im Verlauf steigender Liganden Konzentrationen in dem Maße kleiner, wie die Signale bei 14,15 ppm (6-CF₃) bzw. -6,4 ppm (7-CF₃) und -7,2 ppm (7-CF₃ Gruppe steigen. Im letzten Spektrum für die mit Ligand gesättigte Mutante C48A



Abb. 63: ¹⁹F NMR Spektren der Titrationen der Mutanten S146A (linke Spur) und S146C (rechte Spur) der Riboflavin Synthase aus Schizosaccharomyces pombe mit 6-Trifluormethyl-7oxo-8-ribityllumazin (Verbindung 12). Die zu Beginn eingesetzten Monomerenkonzentrationen betrugen 1,3 mM für S146A und 1 mM für S146C. Die Konzentrationen des Fluorliganden in den einzelnen Titrationsschritten sind über jedem Spektrum angegeben. Die Spektren sind jeweils auf die Signalintensität des mit * gekennzeichneten Signals kalibriert. Alle Proben enthielten 20 mM Phosphat Puffer, 100 mM KCl und 10% D₂O bei pH 7. Die Signale des freien Liganden sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet. Die Spektren wurden mit einer Linienverbreiterung von 20 Hz transformiert.



Abb. 64: 470 MHz ¹⁹F NMR Titration der Riboflavin Synthase aus Schizosaccharomyces pombe mit 6,7-Bis(trifluormethyl)-8-ribityllumazin (Epimer A; Verbindung 11a). Die zu Beginn eingesetzte Monomerenkonzentration der Riboflavin Synthase betrug 1,1 mM. Die Konzentrationen des Fluorliganden 11a in den einzelnen Titrationsschritten waren in der Reihenfolge von oben nach unten: 0,12 mM; 0,42 mM; 0,6 mM; 0,734 mM. Alle Proben enthielten 20 mM Phosphat Puffer, 100 mM KCl und 10% D₂O bei pH 7. Die Spektren wurden mit einer Linienverbreiterung von 20 Hz transformiert.



Abb. 65: 470 MHz ¹⁹F NMR Titration der Mutante C48A mit 6,7-Bis(trifluormethyl)-8-ribityllumazin (Epimer A; Verbindung 11a). Die zu Beginn eingesetzte Monomerenkonzentration der Riboflavin Synthase betrug 0,73 mM. Die Konzentrationen des Fluorliganden 11a in den einzelnen Titrationsschritten waren in der Reihenfolge von oben nach unten: 0,12 mM; 0,23 mM; 0,33 mM; 0,42 mM. Alle Proben enthielten 20 mM Phosphat Puffer, 100 mM KCl und 10% D₂O bei pH 7. Die Spektren wurden mit einer Linienverbreiterung von 20 Hz transformiert.

repräsentieren zwei scharfe Signale bei 15,0 ppm und bei 14,15 ppm (kleiner) die $6-CF_3$ Gruppe. Die 7-CF₃ Gruppe wird durch drei relativ scharfe, gleich intensive Signale bei chemischen Verschiebungen von -5,7 ppm, -6,8 ppm und -7,2 ppm repräsentiert, die drei unterschiedlichen Bindungsstellen für diese Trifluormethylgruppe entsprechen. Die anfänglich vorhandenen Signale bei 16,3 ppm (6-CF₃) und -5,0 ppm (7-CF₃) sind nur noch als Hügel im Rauschen des Spektrums erkennbar.

Die Mutante C48S hat einen ähnlichen Titrationsverlauf mit diesem Fluorliganden. Die Signale für die gebundene 7-CF₃ Gruppe verhalten sich vollkommen äquivalent im Verlauf der Sättigung der Mutante mit Protein. Im Bereich der 6-CF₃ Gruppe ist das bei der Mutante

C48A separierte Signal als Schulter unter den von anfang an dominierenden Peak gefallen. Die chemischen Verschiebungen unterscheiden sich etwas von denen der anderen betrachteten C48 Mutante. Trotzdem verhalten sich die Signale im Verlauf der Titration ähnlich.



Abb. 66: 470 MHz ¹⁹F NMR Titration der Mutante C48S mit 6,7-Bis(trifluuormethyl)-8-ribityllumazin (Epimer A; Verbindung 11a). Die zu Beginn eingesetzte Monomerenkonzentration der Riboflavin Synthase betrug 0,8 mM. Die Konzentrationen des Fluorliganden 11a in den einzelnen Titrationsschritten waren in der Reihenfolge von oben nach unten: 0,12 mM; 0,33 mM; 0,42 mM; 0,51 mM. Alle Proben enthielten 20 mM Phosphat Puffer, 100 mM KCl und 10% D₂O bei pH 7. Die Spektren wurden mit einer Linienverbreiterung von 20 Hz transformiert.

4. Diskussion

4.1 Flavokinase

Mittels Datenbankrecherchen mit der Gensequenz bzw. der daraus abgeleiteten Proteinsequenz des schon bekannten Strukturgens FMN1, das für eine monofunktionelle Flavokinase aus *Saccharomyces cerevisiae* codiert (Santos et al., 2000), wurden homologe Sequenzen aus *Schizosaccharomyces pombe* und *Homo sapiens* gefunden. Auf Grund der Homologie dieser Sequenzen zu schon bekannten Flavokinasen waren sie in der Datenbank als potentielle Flavokinasen eingetragen.

Mit dem Ziel der Charakterisierung der Genprodukte, der biochemischen Charakterisierung sowie der Strukturaufklärung mittels Röntgenstrukturanalyse wurden diese beiden Gene rekombinant exprimiert. Dabei kamen zwei unterschiedliche Klonierungsstrategien zur Anwendung.

Die Flavokinase aus *Schizosaccharomyces pombe* wurde aus cDNA in zwei PCR Reaktionen amplifiziert und durch Ligation in den Vektor pNCO113 sowie anschließender Transformation in *E. coli* exprimiert. Durch Bestimmung der Flavokinase Aktivität der rekombinanten Stämme konnte das exprimierte Protein eindeutig als Flavokinase identifiziert werden. Der Anteil der rekombinanten Flavokinase aus *Schizosaccharomyces pombe* an der Gesamtproteinmenge der *E. coli* Rohextrakte der rekombinanten *E. coli* Stämme bertrug mehr als 20 %.

Das 489 bp lange Flavokinase Gen aus *Homo sapiens* wurde nicht aus einer cDNA eines humanen Gewebes amplifiziert, sondern das aus der Datenbank erhaltene Gen wurde synthetisch in 6 PCR Reaktionen hergestellt. Diese Vorgehensweise hat den Vorteil, dass durch die Einführung bestimmter Punktmutationen in der DNA Sequenz die Translationseffizienz erhöht werden kann, indem die "codon usage" des exprimierenden *E. coli* Systems berücksichtigt wird. Außerdem können im Zuge dieser Punktmutationen in der DNA Sequenz die eine gezielte Manipulation der Sequenz vereinfachen. Das so erhaltene Flavokinase Gen wurde in den Vektor pNCO113 ligiert und nach anschließender Transformation in *E. coli* Stämme identifizierte das exprimierte Genprodukt eindeutig als Flavokinase. Auch im Falle

der humanen Flavokinase konnte das rekombinante Protein bis zu einem Anteil an der Gesamtproteinmenge des Rohextraktes der rekombinanten *E. coli* Stämme von mehr als 20% exprimiert werden.

Beide Proteine konnten durch ähnliche Reinigungsstrategien, die sich aus einem Sepharose Q Lauf und einem Gelfiltrationslauf über Superdex 75 zusammensetzen, auf einen für die Kristallisation erforderlichen Reinheitsgrad von 100 % gebracht werden. Der Gelfiltrationslauf ergab gleichzeitig das native Molekulargewicht beider Proteine. Die monofunktionellen Flavokinasen aus *Schizosaccharomyces pombe* sowie *Homo sapiens* sind in Lösung monomere Proteine mit einem Molekulargewicht von 19 kDa bzw. 18,4 kDa.

Die humane Flavokinase erwies sich nach der Reinigung als nicht sehr stabil. Experimente zu ihrer biochemischen Charakterisierung sowie zur Strukturaufklärung stehen noch aus.

Die Flavokinase aus *Schizosaccharomyces pombe* dagegen konnte zur Kristallisation gebracht werden. Außerdem wurde sie in ¹³C NMR Experimenten mit unterschiedlich ¹³C markierten Riboflavinen eingesetzt.

Die Röntgenstrukturanalyse an Kristallen der Flavokinase aus *Schizosaccharomyces pombe* ergab die Struktur eines neuen Mitglieds der Familie der phosphatübertragenden Enzyme. Das Faltungsmotiv des β *berrel* wurde in einer Reihe von anderen Proteinen, die entweder Flavin oder ATP binden gefunden. Aber im Falle der untersuchten Flavokinase bildet dieses Faß-Motiv ein Gerüst, das ATP und Riboflavin in einer plattformähnlichen Struktur bindet. Die Bindung von ATP ist mit einer bedeutenden Konformationsänderung einer ATP Bindungshelix verbunden. Teile dieser Helix bilden einen glycinreichen Loop (flap I), der die Triphosphatgruppe des ATP bedeckt. Wahrscheinlich liegt ein zweiter Loop (flap II), der in den Kristallen sehr ungeordnet erscheint, in direkter Nachbarschaft zum Riboflavin und bedeckt das aktive Zentrum während der Reaktion. Er hilft vermutlich bei der Anordnung der Ribityl Seitenkette in die richtige Position zur Triphosphatgruppe des ATP. Für die Bindung der zweiwertigen Metallkationen ergibt die Struktur nur einige wenige Kandidaten unter den Aminosäuren des aktiven Zentrums, wie z. B die stark konservierten Reste Asn47, Ser38 und Thr45. Das stark konservierte Glu96 könnte generell die Rolle einer Base übernehmen, da dieser Aminosäurerest nahe bei der 5`OH Gruppe der Ribityl Seitenkette liegt.

Die Struktur hat unter anderem die Art der Bindung des Flavinmoleküls im aktiven Zentrum ergeben. Damit ist es möglich, die aus den ¹³C NMR Experimenten mit unterschiedlich markierten Riboflavinen erhaltenen Daten zu diskutieren.

In der Kristallstruktur ist der Isoalloxazinring des FMN Moleküls in einer hydrophoben Tasche gebunden, die aus den Aminosäureresten V79, Y126, L129, L132 und I136 besteht (Abb. 27a, 28). In Abbildung 28 ist zu erkennen, dass der aromatische Ring des Flavins dem Einfluß dieser hydrophoben Tasche ausgesetzt ist. So sind demnach die chemischen Verschiebungen der C Atome C(7), C(7 α) sowie C(8), C(8 α) tatsächlich mit der hydrophoben Umgebung für diesen Teil des Flavinmoleküls zu erklären. Auch für die unveränderte chemische Verschiebung des C Atoms C(5a) nach der Bindung an die Flavokinase könnte diese Erklärung zutreffen.

Die beiden invarianten Aminosäurereste Arg121 und Asp139, die miteinander eine Salzbrücke bilden, zeigen Wechselwirkungen zu O4 der Carbonylgruppe am C(4) des FMN. Die Guanidino Gruppe des Arg121 bildet eine Wasserstoffbrücke mit dem Sauerstoff der Carbonygruppe an C(4) des Flavinringes. Auch die Amid Gruppe der Aminosäure Leu124 zeigt Wechselwirkungen mit dem Sauerstoff der Carbonylgruppe an C(4).

Die chemischen Verschiebungen der Kohlenstoffatome C(4) und C(4a), die bei der Bindung an die Flavokinase beide einen starken Tieffeldshift zeigen, deuteten auf eine starke Wasserstoffbrückenbindung zum Sauerstoff der Carbonylgruppe an C(4) hin, was durch die Struktur bestätigt wurde.

Die Tieffeldshifts der C Atome C(6), C(9a) und C(10a) würden durch eine Wasserstoffbrückenbindung am Sauerstoff der Carbonylgruppe an C(2) des Flavinringes zustande kommen. Aber die chemische Verschiebung des Kohlenstoffatoms C(2) selber verschiebt sich bei Bindung an die Flavokinase nach höherem Feld, verglichen mit freiem Flavin in Wasser. Vergleicht man die Verschiebung mit der entsprechenden Verschiebung von TARF in apolarem Medium, so ist die Resonanz noch deutlich nach tieferem Feld geshiftet. Das Argument einer starken Wasserstoffbrückenbindung zum benachbarten N(1), die dem Effekt des Tieffeldshiftes entgegenwirken würde (α Effekt, Verwoort et al., 1986), ist mit der Struktur nicht zu vereinbaren. Zum N(1) existiert keine Wasserstoffbrücke. Diese Seite des Moleküls liegt im aktiven Zentrum relativ frei. Aber eine Interaktion mit dieser Seite des Flavinmoleküls könnte gut mit der Vorstellung zusammenpassen, in der der im Kristall relativ ungeordnete Loop (flap II) das Riboflavin im aktiven Zentrum abdeckt.

Eine weitere Erklärung für den Hochfeldshift an C(2) bei der Bindung des Riboflavins an die Flavokinase könnte in dem Ringstromeffekt des Aromatischen Ringes des Restes Tyr126 liegen, der im aktiven Zentrum direkt über diesem Anteil des Flavin Ringes liegt (Abb. 27a, 29).

Dieser Vergleich der ¹³C NMR Ergebnisse der an die Flavokinase gebundenen unterschiedlich markierten Riboflavine mit der Kristallstruktur, in der FMN und ADP gebunden vorliegt, zeigt, dass die NMR Daten des an das Protein gebundenen Riboflavins schon einigen

Aufschluß über die Art der Bindung im Molekül geben können. ¹⁵N NMR Messungen könnten hier noch einigen Aufschluß geben, gerade über den Anteil des Flavinmoleküls auf der Seite des N(1) Stickstoffs bzw. des C(2) Carbonyls, die eventuell mit dem ungeordneten Loop (flap II) interagieren könnten, der die Riboflavin Bindungsstelle im aktiven Zentrum abdeckt.

Mutanten im aktiven Zentrum, z. B. der Aminosäuren Thr45, Asn47, Glu96 könnten weiteren Aufschluß über den Reaktionsmechanismus geben. Dabei könnte auch die Methode der ³¹P NMR Spektroskopie Aufschluß über die Lage dieser Aminosäurereste zu den Phosphatgruppen des ATP geben.

4.2¹⁹F NMR Untersuchungen an Riboflavin Synthasen

Die Riboflavin Synthase katalysiert eine ungewöhnliche Dismutationsreaktion zweier 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin Moleküle, die den Bruch zweier CN Bindungen und die Bildung zweier CC Bindungen beinhaltet. Daraus ist ersichtlich, dass die Reaktionstrajektorie eine Reaktionsintermediaten muß. komplexe Serie von enthalten Eines dieser Reaktionsintermediate ist kürzlich durch Illarionov et al. mit der sehr langsamen Mutante S41A der Riboflavin Synthase aus E. coli gefunden worden. Trotz zahlreicher Anstrengungen in den letzten 4 Jahrzehnten etwas mehr über den Mechanismus dieser Reaktion zu erfahren, ist dieses pentacyclische Intermediat das erste greifbare Zwischenprodukt. Der Weg zu diesem Intermediat ist noch genauso hypothetisch, wie der Zerfall des Intermediates zu den Riboflavin und 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidindion. Produkten Alle hypothetischen Mechanismen sowohl von Plaut und Wood als auch von Illarionov et al. beginnen im ersten Schritt mit der Abstraktion eines Protons von der ungewöhnlich sauren Methylgruppe an C7 des Lumazins unter Bildung einer Exomethylenstruktur (1a). Gleichzeitig soll an dem anderen Lumazinmolekül ein Nucleophil an C7 angreifen, das das C7 Atom sp³ hybridisiert (2). Das Nucleophil sollte ein Wassermolekül oder eine polare Seitenkette eines Aminosäurerestes sein.

Diese Intermediate sollten durch trifluormethylsubstituierte Analoga simuliert werden. ¹⁹F NMR Bindungsstudien mit diesen Intermediatanalogen an Riboflavin Synthasen aus verschiedenen Organismen sowie an Mutanten der Riboflavin Synthasen sollten Einblicke in das aktive Zentrum geben und einigen Aufschluß über den Mechanismus der Reaktion. Zu Beginn dieser Experimente war noch keine Struktur einer Riboflavin Synthase bekannt. So sollte die Carbonylgruppe an C7 im 6-Trifluormethyl-7-oxo-8-ribityllumazin (12) die Exomethylenstruktur im hypothetischen Intermediat (1a) simulieren. Die OH Gruppe in Position 7 der Verbindung 6,7-Bis(trifluormethyl)-8-ribityllumazin (11a und 11b) sollte das Nucleophil im Intermediat (2) simulieren. Diese Verbindung bildet zwei Epimere, die sich in ihrer Stereochemie an C7 unterscheiden. Alle bisher untersuchten Riboflavin Synthasen aus *B. subtilis* (Cushman et al., 1991, 1992, 1993; Scheuring et al., 1996), *E. coli, Schizosaccharomyces pombe* sowie die Domänen der Riboflavin Synthase aus *E. coli* und auch die untersuchten Lumazin Proteine (Scheuring et al., 1993, 1994) verhalten sich absolut stereoselektiv gegenüber diesen Epimeren. Von allen genannten Proteinen wird nur Epimer A (11a) gebunden.

Protein Perturbationsstudien an der Riboflavin Synthase aus *E. coli* mit 6,7-Bis(trifluormethyl)-8-ribityllumazin (Epimer A, **11a**) haben ergeben, dass der Ligand in zwei unterschiedlichen Bindungszuständen an das Protein bindet, deren Affinitäten für den Liganden sich um ungefähr eine Zehnerpotenz unterscheiden.

Durch die rekombinante Expression der N-bzw. C-terminalen Domäne der Riboflavin Synthase aus *E. coli* und die entsprechenden ¹⁹F NMR Experimente mit Epimer A wurde es möglich, die zwei Signale für die an die Riboflavin Synthase gebundene 6-CF₃ Gruppe des Epimer A, bestimmten Bindungsstellen zuzuordnen. Das Signal bei 14,2 ppm konnte einer Cterminalen Bindungsstelle zugeordnet werden, während das Signal bei 15,8 ppm der Nterminalen Bindungsstelle zugeordnet werden konnte. Für die an die Riboflavin Synthase gebundene 7-CF₃ Gruppe existiert im ¹⁹F NMR Spektrum nur ein Signal für die Bindungsstellen in beiden Domänen. Die chemische Umgebung ist vermutlich für die 7-CF₃ Gruppe in den Bindungsstellen ähnlich.

Um eine Aminosäure zu finden, die die Funktion des Nucleophils im hypothetischen Mechanismus ausüben könnte, wurden im Aminosäurealignment streng konservierte Reste ausgetauscht. Zusätzlich wurde das in allen bekannten Riboflavin Synthasen konservierte, lipophile, N-terminale Sequenzmotiv MFXG diesen Mutationsexperimenten unterzogen. Die exprimierten Mutanten wurden von Dr. Boris Illarionov gereinigt und kinetisch untersucht.

Mit den Mutanten wurden außerdem ¹⁹F NMR Experimente durchgeführt. Die auffälligsten Veränderungen der Eigenschaften des Proteins zeigten dabei die Phenylalanin 2 Mutanten. Die Deletion des aromatischen Aminosäurerestes Phenylalanin 2 und der Austausch dieser aromatischen Aminosäure gegen einen hydrophoben Alanin Rest ergab vollständig inaktives Protein. Auch die ¹⁹F NMR Spektren dieser Mutanten mit Epimer A wurden deutlich verändert. Das der N-terminalen Bindungsstelle zugeordnete Signal für die 6-CF₃ Gruppe bei

einer chemischen Verschiebung von 15,8 ppm wurde infolge der Mutation um 1,9 ppm (F2 Δ) bzw. 2 ppm (F2A) in Richtung höheren Feldes verschoben. Das Signal für die an das Protein gebundene 7-CF₃ Gruppe wurde in zwei Signale aufgespalten, wovon der N-terminale Anteil um 1,2 ppm (F2 Δ) bzw. 1,3 ppm (F2A) nach höherem Feld verschoben wurde. Bei Einbeziehung der ¹⁹F NMR Ergebnisse für die Domänen der Riboflavin Synthase aus *E.coli* kann man schlussfolgern, dass der Phenylalanin 2 Rest in der N-terminalen Bindungsstelle sich in der Nähe zu den Trifluormethylgruppen befindet und für den Tieffeldshift der an die N-terminalen Domäne gebundenen 6-CF₃ Gruppe im Wildtyp Protein sowie in der rekombinanten N-terminalen Domäne selber verantwortlich ist. Auch die Verschiebung der an das Protein gebundenen 7-CF₃ Gruppe wird durch den F2 Rest beeinflusst. Der Phenylalanin 2 Rest steht demnach im direkten Kontakt zum Liganden, was später sowohl in der Struktur der Riboflavin Synthase aus *E. coli* als auch in der Struktur der Riboflavin Synthase aus *Schizosaccharomyces pombe* bestätigt werden konnte (Liao et al., 2001; Gerhardt et al., 2002).

Der Austausch der aromatischen Aminosäure Phenylalanin 2 gegen die ebenfalls aromatische aber mehr Raum in Anspruch nehmende Aminosäure Tyrosin ergab ein Protein mit ungefähr 1/50 der Wildtyp Aktivität. Auch die chemischen Verschiebungen der ¹⁹F NMR Signale der an das Protein gebundenen CF₃ Gruppen ähnelten denen im Wildtyp Spektrum. Die aromatische Umgebung blieb erhalten.

Die Mutation S146G in der C-terminalen Domäne bewirkt einen Hochfeldshift der dieser Bindungsstelle zugeordneten Signale beider CF₃ Gruppen. Aßerdem sind die Signale, die den gebundenen CF₃ Gruppen zugeordnet werden können, nicht so stark linienverbreitert.

Alle anderen untersuchten Mutanten haben nur wenig Einfluß auf die Enzym Aktivität und auf die ¹⁹F NMR Spektren. Die Mutanten K137A und E183G zeigen noch geringfügige Veränderungen im Aufspaltungsmuster.

Überraschenderweise zeigten die Mutanten S41A und H102Q, deren katalytische Aktivitäten stark reduziert worden sind, überhaupt keine Änderungen im Aufspaltungsmuster der ¹⁹F NMR Spektren. Diese Reste liegen zwar im aktiven Zentrum, haben aber keinen direkten Kontakt zu den Trifluormethylgruppen.

Die Rücktitration der mit Epimer A gesättigten Riboflavin Synthase mit Riboflavin ergab eine bevorzugte Abnahme des N-terminalen Bindungszustandes. Da die bevorzugt abnehmende Bindungsstelle der N-terminalen Bindungsstelle zugeordnet werden kann, könnte diese Bindungsstelle als Akzeptorbindungsstelle definiert werden. Ein Vergleich mit dem Strukturmodell von Liao et al., 2001 würde dieses Ergebnis bestätigen, da dort das DMRL- Molekül im N-Faß als Akzeptormolekül postuliert wurde und das DMRL-Molekül am C-Faß als Donor. Auch in der Struktur der Riboflavin Synthase aus *Schizosaccharomyces pombe* wurde das an die N-terminale Bindungsstelle gebundene Lumazin als Akzeptor der C4 Einheit postuliert (Gerhardt et al., 2002).

Allerdings konnte durch die entsprechende Rücktiration mit dem Produktanalogon 5-Nitroso-6-ribitylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidindion keine bevorzugte Abnahme der entsprechenden Donor Bindungsstelle festgestellt werden.

Der analoge Satz von ¹⁹F NMR Experimenten wurde an der Riboflavin Synthase aus *E. coli* mit dem Intermediatanalogen 6-Trifluormethyl-7-oxo-8-ribityllumazin (**12**) durchgeführt.

Obwohl die 6-CF₃ Gruppen der beiden Intermediatanalogen topologisch äquivalent sind, bindet die Monotrifluormethylverbindung in 4 verschiedenen Bindungszuständen an die Riboflavin Synthase. Die beiden intensiven Signale des Spektrums konnten bei Vergleich mit den entsprechenden Spektren der Domänen den N- bzw. C-terminalen Bindungsplätzen zugeordnet werden. Das nach tieferem Feld verschobene Signal für die gebundene 6-CF3 Gruppe bei 11,8 ppm wurde der N-terminalen Bindungsstelle zugeordnet und das Signal bei 8,6 ppm wurde der C-terminalen Bindungsstelle zugeordnet. Man könnte vermuten, dass das Protein bei der Bindung dieses Liganden eine andere Konformation einnimmt als bei der Bindung von Epimer A. Nach dem Strukturmodell von Liao et al. wird immer zwischen zwei angrenzenden Monomeren aus N- und C-terminaler Domäne eine Bindungsstelle formiert. Das ist ein dynamischer Prozeß. Diese kleinen sehr stark linienverbreiterten Signale im Spektrum für die gebundene 6-CF3 Gruppe des Monotrifluormethylliganden könnten von solchen formierten Bindungsstellen stammen. Ein Indiz dafür ist das Verschwinden dieser Signale in den Spektren für die Mutanten E66G, K137A sowie H102Q. Diese Aminosäurereste sind im Modell von Liao et al. Bestandteil solcher formierter Bindungsstellen.

Auch im Falle dieses Liganden zeigen die F2 Mutanten die auffälligsten Veränderungen der chemischen Verschiebungen. Das wurde schon für Epimer A ausführlich diskutiert. Alle anderen untersuchten Mutanten zeigten nur geringfügige Veränderungen der ¹⁹F NMR Spektren.

Eine Ausnahme bildet die Mutante N83G sowohl für Epimer A als auch für den 7-Oxo Liganden. Die chemischen Verschiebungen bleiben im Vergleich zum Wildtyp Protein unverändert. Aber die Intensitätsverhältnisse der Signale kehren sich im Verlauf der Titrationen um. Auch für die in der C-terminalen Domäne toplogisch äquivalenten Aminosäure N181 wurde in Rohextraktmessungen dieses Phänomen beobachtet. Diesen im inneren Alignment konservierten Resten wird eine Funktion bei Interdomänen Wechselwirkungen zugeordnet (Truffault et al., 2001). So könnte diese Mutation zu der sehr kleinen Aminosäure Glycin die Zugänglichkeit der Bindungsstellen umkehren, durch Konformationsänderungen im Protein, auf Grund des Aufbrechens dieser Interdomänen Wechselwirkungen. Glycin ist im Gegensatz zur Aminosäure Asparagin nicht in der Lage Wasserstoffbrückenbindungen zu bilden.

Die Riboflavin Synthase aus *Schizosaccharomyces pombe* zeigt ein noch komplexeres Verhalten bei den ¹⁹F NMR Protein Perturbationsexperimenten mit den Fluorliganden.

Epimer A bindet an die Riboflavin Synthase aus *Schizosaccharomyces pombe* in mehr als zwei Bindungszuständen. Auch im Spektrum der an das Protein gebundenen Monotrifluormethylverbindung sind mehr als zwei Bindungszustände zu erkennen. Zusätzlich verändern sich im Falle dieses Liganden noch chemische Verschiebungen, Intensitäten und Linienbreiten einzelner Signale abhänging vom Konzentrationsverhältnis Protein zu Ligand. Das ist im Falle der Monotrifluormethylverbindung stärker der Fall als in den Spektren der Titrationen des Proteins mit Epimer A.

Die Mutation einer Aminosäure in der N-terminalen Domäne bzw. in der C-terminalen Domäne verändert nicht nur die Verschiebung eines einzelnen Signals im Spektrum, sondern beeinflusst alle Signale des Spektrums, die dem gebundenen Liganden zugeordnet werden können.

Alle bisher untersuchten Riboflavin Synthasen binden die eingesetzten Fluorliganden in mehr als zwei Bindungszuständen. Für ein c₃ symmetrisches Protein in Lösung würde man erwarten, dass wenn beide Domänen die Liganden binden können, zwei separate Signale für die gebundenen Liganden im Spektrum erscheinen, die dem an jeweils eine Domäne gebundenen Liganden zugeordnet werden können.

Daraus kann geschlossen werden, dass die Riboflavin Synthase in Lösung nicht c_3 symmetrisch ist. Die aus der Röntgenstruktur der Riboflavin Synthase aus *E. coli* ermittelte Asymmetrie des Proteins (Liao et al., 2001) ist demnach eine inhärente Eigenschaft des Proteins und ist nicht auf Kristallkontakte zurückzuführen.

Mit den ¹⁹F NMR Spektren an den Mutanten Proteinen der C48 sowie der S146 Mutanten konnten für den Fall der 7-Oxo Verbindung die Signale der gebundenen Liganden den N-bzw. C-terminalen Bindungsstellen zugeordnet werden. Die entsprechenden Experimente mit Epimer A führten nicht zu so einer Zuordnung.

Auf Grund des Einflusses einer geringen Veränderung entweder in der N-bzw. C-terminalen Domäne auf alle Aspekte des gesamten ¹⁹F NMR Spektrums wird postuliert, dass die

Riboflavin Synthase in der NMR Zeitskala eine bedeutende Konformationsänderung durchläuft. Die Paare der im direkten Kontakt stehenden N-bzw. C-terminalen Domänen sind nicht wie im Kristall beobachtet, fixiert, sondern in Lösung können sich die entsprechenden Domänen der unterschiedlichen Untereinheiten immer wieder zusammenlagern, was durch die Bewegung der Domänen ermöglicht wird. Dieses dynamische Modell würde die Vielfalt der Linienbreiten in den unterschiedlichen Bindungszuständen erklären sowie die unerwartete Abhängigkeit der ¹⁹F NMR Spektren von dem Konzentrationsverhältnis zwischen Protein und Ligand.

Diese Beobachtung der Proteindynamik ist für den Mechanismus von großer Bedeutung. Wenn die N-bzw. C-terminale Domdäne mit Ligand beladen wird sind die Domänen nicht in physikalischem Kontakt. Damit die Dismutation stattfinden kann, könnten die Domänen einen lokalen N-terminalen/C-terminalen Domänen Komplex bilden, durch eine Konformationsänderung des Proteins. Bei der Abgabe des Produktes würden die Domänen wieder durch eine Proteinbewegung separiert werden, und ein neuer Kontakt zwischen anderen Domänen könnte ausgebildet werden. So würden alle 6 Domänen an der Dismutation teilnehmen aber zu unterschiedlichen Zeiten.

Solch ein dynamisches Modell mit Konfigurationsänderungen der Riboflavin Synthase im Zusammenhang mit der Dismutationsreaktion wurde schon früher auf der Grundlage von Verdrängungsstudien mittels ¹⁹F NMR Spektroskopie vorgeschlagen (Cushman et al., 1992).

5 Zusammenfassung

Das Enzym Flavokinase katalysiert die Phosphorylierung von Riboflavin am 5`-OH zu FMN. Als zweites Substrat wird ATP benötigt, das als ADP aus der Reaktion hervorgeht. Zur Katalyse sind zweiwertige Metallkationen notwendig. In eukaryotischen Organismen liegt die Flavokinase als monofunktionelles Protein vor. In allen bisher bekannten bakteriellen Organismen liegt die Flavokinase im Komplex mit der FAD Synthetase als bifunktionelles Enzym vor.

In dieser Arbeit wurden die monofunktionellen, eukaryotischen Flavokinasen aus *Schizosaccharomyces pombe* und *Homo sapiens* kloniert und in *E. coli* zur Expression gebracht. Dabei wurden zwei unterschiedliche Klonierungsstrategien angewendet, die für beide Proteine eine Expression von mehr als 20 % der Gesamtproteinmenge der rekombinanten *E. coli* Stämme ergab. Die Proteine wurden auf Flavokinase Aktivität getestet und damit ihre Funktion als Flavokinase bestätigt. Die Reinigung der Flavokinasen gelang bis zu einem Reinheitsgrad von 100 %, der für die weiteren Experimente zur Strukturaufklärung notwendig war. Die humane Flavokinase aus *Schizosaccharomyces pombe* konnte zur Kristallisation gebracht werden konnte. Die Flavokinase aus *Schizosaccharomyces pombe* konnte zur Kristallisation gebracht werden und ihre Struktur wurde mittels Röngenstruktuanalyse aufgeklärt. Die Struktur wurde mit den gebundenen Produkten ADP und FMN ermittelt, so dass das aktive Zentrum ermittelt werden konnte. Ergebnisse aus ¹³C NMR Experimente mit unterschiedlich ¹³C markierten Riboflavinen zeigten eine gute Übereinstimmung mit der Kristallstruktur.

Die Riboflavin Synthase katalysiert den letzten Schritt des Riboflavin Biosyntheseweges. Dieses Enzym katalysiert eine ungewöhnliche Dismutationsreaktion von 2 Molekülen 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin zu den Produkten Riboflavin und 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidindion, das selber Substrat der 6,7-Dimetyhyl-8-ribityllumazin Synthase ist und wieder in den Biosyntheseweg zurückgeführt wird. Der Mechanismus dieser Reaktion ist noch in vielen Bereichen ungeklärt.

Aber in allen bisher vorgeschlagenen Mechanismen sind die Intermediate **1a** (Exomethylenstruktur) und **2** (Addukt aus Nucleophil und Lumazin) die ersten Zwischenverbindungen auf dem Weg zum Riboflavin.

Die Trifluormethylsubstituierten Lumazinanloga 6-Trifluormethyl-7-oxo-8-rbityllumazin (**12**) bzw. das 6,7-Bis(trifluormethyl)-8-ribityllumazin (**11a** und **11b**) sind Intermediatanaloge, die diese ersten Intermediate simulieren sollen.

Das Ziel der ¹⁹F NMR Experimente mit diesen Liganden ist, etwas mehr über den Mechanismus des Proteins, über das aktive Zentrum sowie über die Art und die Anzahl der Bindungsplätze im Protein zu erfahren. Der ¹⁹F Kern ist zu diesem Zweck eine sensitive Sonde.

In dieser Arbeit wurden die Riboflavin Synthasen aus *E. coli* und *Schizosaccharomyces pombe* mit beiden trifluormethylsubstituierten Lumazinderivaten untersucht. Auch die Nbzw. C-terminale Domäne der Riboflavin Synthase aus *E. coli* wurde ¹⁹F NMR spektroskopisch untersucht. Als Vergleich wurden auch die Riboflavin Synthase aus *Bacillus subtilis* und das Lumazin Protein aus *Photobacterium leiognathi* mit diesen Fluorlumazinen gemessen. Alle untersuchten Proteine sind stereoselektiv bezüglich C7 der epimeren Verbindung und binden nur Epimer A.

Alle untersuchten Riboflavin Synthasen binden die Fluorlumazine in mehr als zwei Zuständen, die man für ein c_3 symmetrisches Protein erwarten würde. Die Riboflavin Synthasen sind demnach in Lösung keine c_3 symmetrischen Proteine. Das Monomere Lumazin Protein sowie die homodimere artifizielle N-terminale Domäne bindet die Fluorlumazine jeweils nur in einem einzelnen Bindungszustand.

Durch die Messungen an den rekombinanten N- bzw. C-terminalen Domänen konnten im Falle der Riboflavin Synthase aus *E. coli* einzelne Signale den N- bzw. C-terminalen Bindungsstellen zugeordnet werden.

Obwohl die 6-CF₃ Gruppen der beiden Fluorlumazine topologisch äquivalent sind, bindet die 7-Oxo Verbindung an alle Riboflavin Synthasen in mehr Bindungszuständen, die über einen weiteren Verschiebungsbereich verteilt sind, als im Falle des Epimer A.

Die Mutanten der Riboflavin Synthase aus *E. coli* gaben einen kleinen Einblick in die Natur des aktiven Zentrums.

Die Riboflavin Synthase aus *Schizosaccharomyces pombe* zeigte eine ungewöhnliche Proteindynamik in Abhängigkeit von den Konzentrationsverhältnissen von Protein zu Ligand.

Der zunächst als Nucleophil im Mechanismus vorgeschlagenen C48 Rest, konnte hier durch mehrere unterschiedliche Aminosäurereste ersetzt werden. Der dazu topologische äquivalente Rest S146 in der C-terminalen Domäne wurde ebenfalls durch mehrer Aminosäuren ersetzt. Alle Mutationen hatten im Falle der Riboflavin Synthase aus *Schizosaccharomyces pombe* auf alle Signale des gebundenen Liganden Einfluß und änderten nicht nur chemische Verschiebungen sondern auch Halbwertsbreiten und Intensitäten der Signale. Trotzdem war im Falle der Monotrifluormethylverbindung eine Zuordnung der Signale zu N- bzw. C-terminaler Bindungsstelle möglich.

In Zukunft ist auf dem Gebiet der Flavokinase eine Mutagenese der Aminosäuren des aktiven Zentrums der Flavokinase aus *S. pombe* geplant. Diese sollen biochemisch charakterisiert und weiteren ¹³C, ¹⁵N sowie ³¹P NMR Messungen unterzogen werden. Außerdem ist eine Stabilitätsreihe der Flavokinase aus *Homo sapiens* notwendig, um auch dieses Protein einer Charakterisierung unterziehen zu können. Die entsprechenden FAD Synthetasen aus diesen Organismen stehen auch für eine Charakterisierung aus.

Auf dem Gebiet der Riboflavin Synthase sollen alle hier vorgestellten Mutanten sowohl aus *E. coli* als auch aus *S. pmbe* ähnlichen ¹³C NMR Untersuchungen, wie hier an der Flavokinase vorgestellt, unterworfen werden.

- Arsenis, C. & McCormick, D. B. (1964). Purification of Liver Flavokinase by Column Chromatography on Flavin-Cellulose Compounds. *J Biol Chem* **239**(9), 3063-3097.
- Bacher, A. (1991a). Biosynthesis of flavins. Chem Biochem Flavoenzymes 1, 215-59.
- Bacher, A. (1991b). Riboflavin kinase and FAD synthetase. *Chem Biochem Flavoenzymes* **1**, 349-70.
- Bacher, A., Eberhardt, S., Eisenreich, W., Fischer, M., Herz, S., Illarionov, B., Kis, K. & Richter, G. (2001). Biosynthesis of riboflavin. *Vitamines and Hormones* **61**, 1-49.
- Bacher, A., Eberhardt, S., Fischer, M., Kis, K. & Richter, G. (2000). Biosynthesis of vitamin B2 (Riboflavin). Annu Rev Nutr 20, 153-167.
- Bacher, A., Eberhardt, S. & Richter, G. (1996). Biosynthesis of Riboflavin. In *Escherichia coli and salmonella* 2nd edit. (Neidhardt, F. C., Ingraham, J. L., Low, K. B., Magasanik, B., Schaechter, M. & Umbarger, H. E., eds.), Vol. 1, pp. 657-664. 2 vols, Washington, D.C.
- Bacher, A., Eisenreich, W., Kis, K., Ladenstein, R., Richter, G., Scheuring, J. & Weinkauf, S. (1993a). Biosynthesis of flavins. In *Bioorganic Chemistry Frontiers* (Dugas, H. & Schmidtchen, F. P., eds.), Vol. 3, pp. 147-192. Springer, Berlin.
- Bacher, A., Eisenreich, W., Kis, K., Richter, G., Scheuring, J. & Weinkauf, S. (1993b).
 Recent advances in the biosynthesis of flavins and deazaflavins. *Trends Org Chem* 4(1), 335-349.
- Bacher, A. & Ladenstein, R. (1991). The lumazine synthase/riboflavin synthase complex of Bacillus subtilis. *Chem Biochem Flavoenzymes* 1, 293-316.
- Bacher, A., Le Van, Q., Keller, P. J. & Floss, H. G. (1983). Biosynthesis of riboflavin. Incorporation of 13C-labeled precursors into the xylene ring. J Biol Chem 258(22), 13431-7.
- Bandrin, S. V., Beburov, M. I. U., Rabinovich, P. M. & Stepanov, A. I. (1979).[Riboflavin auxotrophs of Escherichia coli.] *Genetika* 15(11), 2063-2065.
- Beach, R. L. & Plaut, G. W. (1969). The formation of riboflavin from 6,7-dimethyl-8ribityllumazine in acid media. *Tetrahedron Lett* **40**, 3489-3492
- Beach, R. L. & Plaut, G. W. (1970a). Investigations of structures of substituted lumazines by deuterium exchange and nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* 9(4), 760-70.

- Beach, R. L. & Plaut, G. W. (1970b). Stereospecificity of the enzymatic synthesis of the oxylene ring of riboflavin. *J Am Chem Soc* **92**(9), 2913-6.
- Beach, R. L. & Plaut, G. W. E. (1971). Synthesis, properties, and base-catalyzed interactions of 8-substituted 6,7-dimethyllumazines. *J Org Chem* **36**(25), 3937-43.
- Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7(6), 1513-23.
- Bown, D. H., Keller, P. J., Floss, H. G., Sedlmaier, H & Bacher, A. (1986). Solution structure of 6,7-dimethyl-8-substituted lumazines. ¹³C-NMR evidence for intramolecular ether formation. *J Org Chem* **51**, 2461-2467.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54.
- Brown, G. M. & Neims, A. (1982). Adv Enzymology 53, 345.
- Brown, G. M. & Reynolds, J. J. (1963). Biogenesis of water-soluble vitamins. *Annu Rev Biochem* 32, 419-462.
- Brown, G. M. & Williamson, J. M. (1987). Biosynthesis of folic acid, riboflavin, thiamine and pantothenic acid. In " *Escherichia coli* and *Salmonella thyphimurium*" (F.C. Neidhardt et al., eds.), Vol.1., pp. 521-538. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Bujard, H., Gentz, R., Lanzer, M., Stueber, D., Mueller, M., Ibrahimi, I., Haeuptle, M. T. & Dobberstein, B. (1987). A T5 promoter-based transcription-translation system for the analysis of proteins in vitro and in vivo. *Methods Enzymol* 155, 416-33.
- Bullock, W. O., Fernandez, J. M. & Shirt, J. M. (1987). XL-1 Blue: A high efficiency plasmid transforming recA Escherichia coli with β-Galactosidase selection. *Bio Techniques* 5 376-379.
- Clackson, T., Güssow, D. & Jones, P. (1991). General application of PCR to gene cloning and manipulation. In: PCR: A practical approach. Eds. McPherson, M., Quirke, P., Taylor, J. Oxford Press.
- Clarebout, G., Villers, C. & Leclercq, R. (2001). Macrolide resistance gene mreA of Streptococcus agalactiae encodes a flavokinase. Antimicrob Agents Chemother 45(8), 2280-6.
- Compton, S. J. & Jones, C. G. (1985). Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal Biochem* **151**(2), 369-74.

- Coquard, D. M., Huecas, M., Ott, J. M., Van Dijl, A. P. G. M. van Loon, Hohman, H.-P (1979). Molecular cloning and characterisation of the ribC gene from *Bacillus subtilis*: a point Mutation in ribC results in riboflavin overproduction. *Mol Gen Genet* 254 81-84.
- Cresswell, R. M. & Wood, H. C. S. (1960). The biosynthesis of pteridines. Part I. The synthesis of riboflavin. *J Chem Soc* **1960**, 4768-4775.
- Cushman, M., Patel, H. H., Patrick, D. A., Bacher, A. & Schott, K. (1990). Synthesis of fluorinated 8-ribityllumazines as fluorine-19 NMR probes and potential inhibitors of the light riboflavin synthase of Bacillus subtilis. *Chem Biol Pteridines 1989 Proc Int Symp Pteridines Folic Acid Deriv* **9th**, 249-54.
- Cushman, M., Patel, H. H., Scheuring, J. & Bacher, A. (1992). Fluorine-19 NMR studies on the mechanism of riboflavin synthase. Synthesis of 6-(trifluoromethyl)-7-oxo-8-(Dribityl)lumazine and 6-(trifluoromethyl)-7-methyl-8-(D-ribityl)lumazine. *J Org Chem* 57(21), 5630-43.
- Cushman, M., Patel, H. H., Scheuring, J. & Bacher, A. (1993). Fluorine-19 NMR studies of the mechanism of riboflavin synthase. Synthesis of 6-(trifluoromethyl)-8-(Dribityl)lumazine and derivatives. *J Org Chem* 58(15), 4033-42.
- Cushman, M., Patrick, D. A., Bacher, A. & Scheuring, J. (1991). Synthesis of epimeric 6,7bis(trifluoromethyl)-8-ribityllumazine hydrates. Stereoselective interaction with the light riboflavin synthase of Bacillus subtilis. *J Org Chem* **56**(15), 4603-8.
- Cushman, M., Wong, W. C. & Bacher, A. (1986). Synthesis of 6,7-bis(trifluoromethyl)-8-substituted pteridine-2,4(1H,3H)-dione (lumazine) hydrates from 4,5-diaminouracil hydrochlorides and perfluorobutane-2,3-dione. Stabilization of the transmolecular covalent hydrates of 8-substituted pteridinediones by trifluoromethyl groups. *J Chem Soc, Perkin Trans* 1(6), 1051-3.
- Delgado, A. & Clardy, J. (1992). Aryl trifluormethyl ketone hydrates as precursors of carboxylic acids and esters. *Terahedron Lett* **33**, 2789-2790.
- Demain, A. L. (1972). Riboflavin oversynthesis. Annu Rev Microbiol 26, 369-88.
- Dower, W. J., Miller, J. F. & Ragsdale, C. W. (1988). High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* **16**(13), 6127-45.
- Eberhardt, S., Richter, G., Gimbel, W., Werner, T. & Bacher, A. (1996). Cloning, sequencing, mapping and hyperexpression of the ribC gene coding for riboflavin synthase of Escherichia coli. *Eur J Biochem* **242**(3), 712-9.

- Eberhardt, S., Zingler, N., Kemter, K., Richter, G., Cushman, M. & Bacher, A. (2001). Domain structure of riboflavin synthase. *Eur J Biochem* **268**(15), 4315-4323.
- Efimov, I., Kuusk, V., Zhang, X. & McIntire, W. S. (1998). Proposed steady-state kinetic mechanism for Corynebacterium ammoniagenes FAD synthetase produced by Escherichia coli. *Biochemistry* **37**(27), 9716-23.
- Faiura, L. R. & Kashchenko, V. S. (1997). [Thermostable riboflavin kinase in the yeast Pichia guilliermondii]. Ukr Biokhim Zh 69(1), 21-5.
- Gerhardt, S., Schott, A.-K., Kairies, N., Cushman, M., Illarionov, B., Eisenreich, W., Bacher, A., Huber, R., Steinbacher, S. & Fischer, M. (2002). Studies on the Reaction Mechanism of Riboflavin Synthase: X-Ray crystal Structure of a Complex with 6-Carboxyethyl-7-Oxo-8-Ribityllumazine. *Structure*, in press.
- Gerig, J. T. (1989). Fluorine Nuclear Magnetic Resonance of Fluorinated Ligands. *Methods in Enzymology* **177**, 3-23.
- Giri, K. V., Rao, R. N., Cama, H. & Kumar, S. A. (1960). Studies on flavinadenin dinucleotide-synthesizing enzyme in plants. *Biochem J* **75**, 381.
- Goetz, J. M., Poliks, B., Studelska, D. R., Fischer, M., Kugelbrey, K., Bacher, A., Cushman, M. & Schaefer, J. (1999). Investigation of the Binding of Fluorlumazines to the 1-MDa Capsid of the Lumazine Synthase by ¹⁵N{¹⁹F} REDOR NMR. *J Am Chem Soc* 121, 7500-7508.
- Goodwin, T. W. & Horton, A. A. (1961). Biosynthesis of riboflavin in cell-free systems. *Nature* **191**, 772-774.
- Hagihara, T., Fujio, T. & Aisaka, K. (1995). Cloning of FAD synthetase gene from Corynebacterium ammoniagenes and its application to FAD and FMN production. *Appl Microbiol Biotechnol* 42(5), 724-9.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol* 166(4), 557-80.
- Harvey, R. A. & Plaut, G. W. (1966). Riboflavin synthetase from yeast. Properties of complexes of the enzyme with lumazine derivatives and riboflavin. J Biol Chem 241(9), 2120-36.
- Holmes, D. S. & Quigley, M. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem* **114**(1), 193-7.
- Illarionov, B., Eisenreich, W. & Bacher, A. (2001). A pentacyclic reaction intermediate of riboflavin synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(13), 7224-9.

- Kamio, Y., Lin, C. K., Regue, M. & Wu, H. C. (1985). Characterization of the *ileX-lsp* operon in Escherichia coli: identification of an open reading frame upstream of the *ileX* gene and potential promotor(s) for the *ileS-lsp* operon. *J Biol Chem* 260, 5616-5620.
- Kashchenko, V. E. & Shavlovskii, G. M. (1976). [Purification and properties of the riboflavin kinase of the yeast Pichia guilliermondii]. *Biokhimiia* **41**(2), 376-83.
- Kearney, E. B., Goldenberg, J., Lipsick, J. & Perl, M. (1979). Flavokinase and FAD synthetase from Bacillus subtilis specific for reduced flavins. J Biol Chem 254(19), 9551-7.
- Kitatsuji, K., Ishino, S., Teshiba, S. Arimoto, M. (1993) Process for producing flavin nucleotides. *Eur Pat Appl* EP0542240 A2 92119308.2.
- Kreneva, R. A. & Perumov, D. A. (1990). Genetic mapping of regulatory mutations of *Bacillus subtilis* riboflavin operon. *Mol Gen Genet* 222, 467-469.
- Kreneva, R. A., Polanuer, B. M., Solov'eva, I. M. & Perumov, D. A. (1999). [Analysis of an operator-like structure, regulating the activity of the ribC gene in Bacillus subtilis]. *Genetika* 35(2), 409-11.
- Kreneva, R. A., Solov'eva, I. M., Errais, L. L., Mironov, A. S. & Perumov, D. A. (2001). [Study of the mechanism of regulating the activity of the ribC gene in Bacillus subtilis]. *Genetika* 37(9), 1300-3.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Liao, D. I., Wawrzak, Z., Calabrese, J. C., Viitanen, P. V. & Jordan, D. B. (2001). Crystal structure of riboflavin synthase. *Structure (Camb)* **9**(5), 399-408.
- Mack, M., van Loon, A. P. & Hohmann, H. P. (1998). Regulation of riboflavin biosynthesis in Bacillus subtilis is affected by the activity of the flavokinase/flavin adenine dinucleotide synthetase encoded by ribC. *J Bacteriol* 180(4), 950-5.
- Manstein, D. J. & Pai, E. F. (1986). Purification and characterization of FAD synthetase from Brevibacterium ammoniagenes. *J Biol Chem* **261**(34), 16169-73.
- Maley, G. F. & Plaut, G. W. E. (1959a). The isolation, synthesis and metabolic properties of 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine. *J Biol Chem* **234**, 641-647
- Maley, G. F. & Plaut, G. W. E. (1959b). The conversion of 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine (6,7-dimethyl-8-ribityl-2,4-(1H,3H)-pyrimidindion) to riboflavin by extracts of *Ashbya gossypii. J Am Chem Soc* 81, 2025
- Massey, V. (2000). The chemical and biological versatility of riboflavin. *Biochem Soc Trans* **28**(4), 283-96.

- McCormick, D. B. (1962). The Intracellular Localization, Partial Purification, and Properties of Flavokinase from Rat Liver. *J Biol Chem* **237**(3), 959-962.
- McCormick, D. B. & Butler, R. C. (1962). Substrate specificity of liver flavokinase. *Biochim Biophys Acta* 65, 326-332.
- McCormick, D. B., Arsenis, C. & Hemmerich, P. (1963). Specificity of liver flavokinase for 9-(1'-D-ribityl)isoalloxazines variously substituted in positions 2, 6 and 7. J Biol Chem 238, 3095-3099.
- Mehta, A. K., Studelska, D. R., Fischer, M., Giessauf, A., Kemter, K., Bacher, A., Cushman, M. & Schaefer, J. (2002). Investigation of Binding of Epimer A of the Covalent Hydrate of 6,7-Bis(trifluormethyl)-8-D-ribityllumazine to Recombinant F22W *Bacillus subtilis* Lumazine Synthase Mutant by ¹⁵N{¹⁹F} REDOR NMR. *J Org Chem* 67, 2087-2092.
- Meining, W., Tibbelin, G., Ladenstein, R., Eberhardt, S., Fischer, M. & Bacher, A. (1998). Evidence for local 32 symmetry in homotrimeric riboflavin synthase of Escherichia coli. *J Struct Biol* **121**(1), 53-60.
- Merrill, A. H., Jr. & McCormick, D. B. (1979). Preparation and properties of immobilized flavokinase. *Biotechnol Bioeng* **21**(9), 1629-38.
- Merrill, A. H., Jr. & McCormick, D. B. (1980). Affinity chromatographic purification and properties of flavokinase (ATP:riboflavin 5'-phosphotransferase) from rat liver. *J Biol Chem* 255(4), 1335-8.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. & Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51**(Pt 1), 263-73.
- Mullis, K. B. & Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerasecatalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**, 335-50.
- Müller, F(1992). Nuclear magnetic resonance studies on flavoproteins, in "Chemistry and Biochemistry of flavocoenzyms", Vol III (Müller, F., ed.) pp. 557-595, CRC Press, Boca Raton Fl. .
- Moonen, C. T. W., Van den Berg, W. A. M., Boerjahn, M. & Müller F. (1984). Reinvestigation of the structure of oxidized and reduced flavin: Carbon-13 and Nitrogen-15 Nuclear Magnetic Resonance study. *Biochemistry* 23, 4859-4867
- Nakagawa, S., Igarashi, A., Ohta, T., Hagihara, T., Fujio, T. & Aisaka, K. (1995). Nucleotide sequence of the FAD synthetase gene from Corynebacterium ammoniagenes and its expression in Escherichia coli. *Biosci Biotechnol Biochem* **59**(4), 694-702.

- Neuberger, G. & Bacher, A. (1985). Biosynthesis of riboflavin. An aliphatic intermediate in the formation of 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine from pentose phosphate. *Biochem Biophys Res Commun* **127**(1), 175-81.
- Oka, M. & McCormick, D. B. (1987). Complete purification and general characterization of FAD synthetase from rat liver. *J Biol Chem* **262**(15), 7418-22.
- Oltmanns, O. & Lingens, F. (1967). [Isolation of riboflavin-deficient mutants of Saccharomyces cerevisiae. *Z Naturforsch Sect B Chem Sci* **22**, 751-754.
- Otto, M. K. & Bacher, A. (1981). Ligand-binding studies on light riboflavin synthase from Bacillus subtilis. *Eur J Biochem* **115**(3), 511-7.
- Paterson, T. & Wood, H. C. S. (1968). Deuterium exchange of C-Methyl protons in 6,7dimethyl-8-ribityllumazine, and studies of the mechanism of riboflavin. *Chem Soc Chem Commun* 290-291.
- Paterson, T. & Wood, H. C. S. (1969). Deuterium exchange of C-methyl protons in 6,7dimethyl-8-D-ribityllumazine, and studies of the mechanism of riboflavin biosynthesis. J Chem Soc, Chem Commun 290-291.
- Paterson, T. & Wood, H. C. S. (1972). The biosynthesis of pteridines. VI. Studies of the mechanism of riboflavin biosynthesis. *Chem Soc Perkin Trans* **I**, 1051-1056.
- Petushkov, V. N., Gibson, B. G. & Lee, J. (1995). Properties of recombinant fluorescent proteins from Photobacterium leiognathi and their interaction with luciferase intermediates. *Biochemistry* **34**(10), 3300-9.
- Petushkov, V. N. & Lee, J. (1997). Purification and characterization of flavoproteins and cytochromes from the yellow bioluminescence marine bacterium Vibrio fischeri strain Y1. *Eur J Biochem* 245(3), 790-6.
- Pfleiderer, W., Mengel, R. & Hemmerich, P. (1971). Über die Synthese und Struktur N-8substituierter Pterine und Lumazine. *Chem Ber* **104**, 2273- 2292.
- Pfleiderer, W. & Hutzenlaub, W. (1973). Synthesen und Eigenschaften von Lumazin Noxiden. *Chem Ber* **106**, 3149-3174.
- Plaut, G. W. (1960). Studies on the enzymatic conversion of 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin to riboflavin. *J Biol Chem* 235, 41-42.
- Plaut, G. W. & Beach, R. L. (1976). Substrate specifity and Stereospecific Mode of Action of Riboflavin Synthase in "Flavin and Flavoproteins", Ed. T. P Singer, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, pp. 737-746.

- Plaut, G. W., Beach, R. L. & Aogaichi, T. (1970). Studies on the mechanism of elimination of protons from the methyl groups of 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine by riboflavin synthetase. *Biochemistry* 9(4), 771-85.
- Plaut, G. W., Smith, C. M. & Alworth, W. L. (1974). Biosynthesis of water-soluble vitamins. *Annu Rev Biochem* **43**(0), 899-922.
- Plaut, G. W. E. (1961). Water-soluble vitamins. II. (Folic acid, riboflavin, thiamine, vitamin B₁₂). *Annu Rev Biochem* 30, 409-446
- Plaut, G. W. E. (1963). Studies on the nature of the enzymic conversion of 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine to riboflavin. *JBiol Chem* **238**, 2225-43.
- Plaut, G. W. E. (1971). In *Comprehensive Biochemistry* (Florkin, M. & Stotz, E. H., eds.), pp. 11-45. Elsevier, Amsterdam.
- Plaut, G. W. E. & Harvey, R. A. (1971). Enzymic synthesis of riboflavine. *Methods Enzymol.* 18(Pt. B), 515-38.
- Rajeswari, S. R., Jonnalagadda, V. S. & Jonnalagadda, S. (1999). Purification and characterization of flavokinase from Neurospora crassa. *Indian J Biochem Biophys* 36(3), 137-42.
- Read, S. M. & Northcote, D. H. (1981). Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie blue G dye-binding assay for protein. *Anal Biochem* 116(1), 53-64.
- Rowan, T. & Wood, H: C. S. (1963). The biosynthesis of riboflavin. Proc Chem Soc 1963, 21-22.
- Rowan, T. & Wood, H: C. S. (1968). The biosynthesis of pteridines. Part V. The synthesis of riboflavin from pteridine precursors. *J Chem Soc (Commun)* **1968**, 452-458.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(12), 5463-7.
- Santos, M. A., Jimenez, A. & Revuelta, J. L. (2000). Molecular characterization of FMN1, the structural gene for the monofunctional flavokinase of Saccharomyces cerevisiae. J Biol Chem 275(37), 28618-24.
- Scatchard, G. (1949). The attractions of proteins for small molecules. *Ann N Y Academ Sci* **51**, 660-672.
- Scheuring, J. (1992). ¹⁹F-NMR-Untersuchungen zur Funktion von Riboflavinsynthase, Lumazinsynthase und Lumazinprotein. *Dissertation, Technische Universität München*

- Scheuring, J., Cushman, M. & Bacher, A. (1995). Elimination of trifluormethyl group from 6,7-bis(trifluoromethyl)-8-ribityllumazines. Stereoselective catalysis by the lumazine synthase of *Bacillus subtilis*. J Org Chem **60**, 243-245.
- Scheuring, J., Fischer, M., Cushman, M., Lee, J., Bacher, A. & Oschkinat, H. (1996). NMR analysis of site-specific ligand binding in oligomeric proteins. Dynamic studies on the interaction of riboflavin synthase with trifluoromethyl-substituted intermediates. *Biochemistry* 35(30), 9637-46.
- Scheuring, J., Lee, J., Cushman, M., Oschkinat, H & Bacher, A. (1993). ¹⁹F NMR studies on lumazine protein from *Photobacterium phosphoreum*. in "*Flavins and Flavoproteins*", Ed. K. Yagi, Walter de Gruyter, pp. 75-78.
- Scheuring, J., Lee, J., Cushman, M., Patel, H., Patrick, D. A. & Bacher, A. (1994). (Trifluoromethyl)lumazine derivatives as ¹⁹F NMR probes for lumazine protein. *Biochemistry* 33(24), 7634-40.
- Scheuring, J., Kugelbrey, K., Weinkauf, S., Cushman, M., Bacher, A. & Fischer, M. (2001).
 ¹⁹F NMR Ligand Perturbation Studies on 6,7-Bis(trifluoromethyl)-8-ribityllumazine-7-hydrates amd the Lumazine Synthase Complex of *Bacillus subtilis*. Site-Directed Mutagenesis Changes the Mechanism and the Stereoselectivity of the Catalyzed Haloform-Type Reaction. *J Org Chem* 66, 3811-3819.
- Schott, K., Kellermann, J., Lottspeich, F. & Bacher, A. (1990a). Riboflavin synthases of Bacillus subtilis. Purification and amino acid sequence of the alpha subunit. J Biol Chem 265(8), 4204-9.
- Schott, K., Ladenstein, R., Koenig, A. & Bacher, A. (1990b). Structure of the lumazine synthase/riboflavin synthase complex of Bacillus subtilis: crystallization of hollow reconstituted .beta.60 capsids. *Chem Biol Pteridines, 1989 Proc Int Symp Pteridines Folic Acid Deriv* **9th**, 340-3.
- Sedlmaier, H., Muller, F., Keller, P. J. & Bacher, A. (1987). Enzymatic synthesis of riboflavin and FMN specifically labeled with 13C in the xylene ring. Z Naturforsch C 42(4), 425-9.
- Sgamarella, V., van de Sande, J, H. & Koharana, H. G. (1979). Studies on the polynucleotides. C. A novel joining reaction catalysed by the T4-polynucleotideligase. *Proc Natl Acad Sci* USA 67, 1448-1475.
- Sobhanaditya, J. & Rao, N. A. (1981). Plant flavokinase. Affinity-chromatographic procedure for the purification of the enzyme from mung-bean (Phaseolus aureus) seeds and

conformational changes on its interaction with orthophosphate. *Biochem J* 197(1), 227-32.

- Solovieva, I. M., Kreneva, R. A., Polanuer, B. M., Kozlov Iu, I. & Perumov, D. A. (1998).
 [Cloning and biochemical identification of the ribR gene in Bacillus subtilis]. *Genetika* 34(6), 839-42.
- Solovieva, I. M., Kreneva, R. A., Leak, D. J. & Perumov, D. A. (1999). The ribR gene encodes a monofunctional riboflavin kinase which is involved in regulation of the Bacillus subtilis riboflavin operon. *Microbiology* **145**(Pt 1), 67-73.
- Stüber, D., Matile, H. & Garotta, G. (1990). System for a high level production in Escherichia coli and rapid purification of recombinant proteins: application to epitope mapping, preparation of antibodies and structure function analysis. *Immunological Methods* Vol. IV 121-152
- Truffault, V., Coles, M., Diercks, T., Abelmann, K., Eberhardt, S., Luttgen, H., Bacher, A. & Kessler, H. (2001). The solution structure of the N-terminal domain of riboflavin synthase. *J Mol Biol* **309**(4), 949-960.
- Vervoort, J., Müller, F., Mayhew, S. G., van den Berg, W. A., Moonen, C. T. & Bacher, A. (1986). A comparative carbon-13, nitrogen-15, and phosphorus-31 nuclear magnetic resonance study on the flavodoxins from Clostridium MP, Megasphaera elsdenii, and Azotobacter vinelandii. *Biochemistry* 25(22), 6789-99.
- Wacker, H., Harvey, R. A., Winestock, C. H. & Plaut, G. W. E. (1964). 4-(1'-D-Ribitylamino)-5-amino-2,6-dihydroxypyrimidine, the second product of the riboflavine synthetase reaction. *J Biol Chem* 239(10), 3493-7.
- Wang, A. (1992). I Chuan Hsueh Pao 19, 362-368.
- Whitby, L. G. (1953). Biochem J 54, 437-442.
- Winestock, C. H. & Plaut, G. W. E. (1961). Synthesis and properties of certain substituted lumazines. *J Org Chem* **26**, 4456-4462.
- Wu, M., Repetto, B., Glerum, D. M. & Tzagoloff, A. (1995). Cloning and characterization of FAD1, the structural gene for flavin adenine dinucleotide synthetase of Saccharomyces cerevisiae. *Mol Cell Biol* 15(1), 264-71.
- Zamenhof, P. J. & Villarejo, M. (1972). Construction and properties of Escherichia coli strains exhibiting α -complementation of β -galactosidase fragments in vivo. *J Bacteriol* **110**, 171-178.