

Max-Planck-Institut für Biochemie
Abteilung Strukturforschung

**Röntgenkristallographische Untersuchung von Proteinen
der Biosynthese von Riboflavin und Tetrahydrofolat**

Stefanie Bauer

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

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

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

Die Dissertation wurde am 15.9.2004 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 4.11.2004 angenommen.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 2002 bis September 2004 in der Abteilung für Strukturforschung am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried unter der Anleitung von Prof. Dr. Robert Huber durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Robert Huber möchte ich danken für die Möglichkeit, diese Arbeit unter seiner Anleitung durchzuführen, vor allem jedoch für die große Freiheit, die die Arbeit zu einer sehr angenehmen Erfahrung werden ließ. Die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Abteilung mit hervorragenden wissenschaftlichen Arbeitsbedingungen anzufertigen, war ein großes Privileg.

Herrn Prof. Dr. Adelbert Bacher möchte ich für die gute und stets angenehme Zusammenarbeit sowie seine ständige Diskussionsbereitschaft danken.

Im Weiteren gilt mein Dank all den Mitarbeitern des Arbeitskreises von Prof. Bacher, die zu meiner Arbeit beigetragen haben, insbesondere Dr. PD Markus Fischer, Dr. Kristina Kemter, Dr. Anne-Kathrin Schott und Dr. Stefanie Echt.

Bei Dr. PD Stefan Steinbacher, Dr. Stefan Gerhardt und Dr. Gerd Bader möchte ich mich für ihre Unterstützung und Hilfsbereitschaft, zum Teil auch aus der Ferne, bedanken.

Danken möchte ich auch Renate Rüller, Monika Bumann und Monika Schneider, sowie Werner Dersch und Otmar Paul für die Unterstützung bei bürokratischen und technischen Problemen.

Allen ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern der Abteilung Strukturforschung möchte ich für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre danken. Dies gilt insbesondere für Susanne Stanitzek, Dr. Werner Atzenhofer, Dr. Martin Augustin, Dr. Iris Fritze, Dr. Daniela Jozic, Dr. Rupert Lang, Dr. Stefan Riedl, Marianne Braun und Dr. Christine Breitenlechner.

Besonders danke ich meinen Freunden außerhalb des Labors, Simone, Hoffi, Stefan, Peter und Siffl und den beiden Harloffs für die langjährige Freundschaft.

Zuletzt gilt mein Dank meinen Eltern und natürlich Matthi für den Rückhalt und die Unterstützung über die Jahre hinweg, auch wenn ich manchmal etwas grantig war.

Veröffentlichungen, die Teile dieser Arbeit beinhalten:

Bauer, S., Huber, R., Steinbacher, S., Kemter, K., Bacher, A. and Fischer, M. (2002). The Biosynthesis of Flavocoenzymes: Crystal structure of *Schizosaccharomyces pombe* riboflavin kinase. In *Flavins and Flavoproteins, Proceedings of the International Symposium, 14th*, Cambridge, United Kingdom, July 14-18, (Chapman, S., Perham, R., Scrutton, N., eds.), 33-38 (2002).

Bauer S., Kemter, K., Bacher, A., Huber, R., Fischer, M. and Steinbacher, S. (2003). Crystal Structure of *Schizosaccharomyces pombe* Riboflavin Kinase Reveals a Novel ATP and Riboflavin-Bindung Fold. *Journal of Molecular Biology* **326**, 1463-1473.

Bauer S., Schott, A.-K., Illarionova, V., Bacher, A., Huber, R. and Fischer, M. (2004). Biosynthesis of Tetrahydrofolate in Plants: Crystal Structure of 7,8-Dihydroneopterin Aldolase from *Arabidopsis thaliana* Reveals a Novel Aldolase Class. *Journal of Molecular Biology* **339**, 967-979.

Echt, S., Bauer, S., Steinbacher, S., Huber, R., Bacher, A. and Fischer, M. (2004). Potential Anti-infective Targets in Pathogenic Yeasts: Structure and Properties of 3,4-Dihydroxy-2-butanone 4-phosphate Synthase of *Candida albicans*. *Journal of Molecular Biology* **341**, 1085-1096.

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	4
2.1	Riboflavin-Biosynthese	4
2.1.1	3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase	7
2.1.2	Riboflavin-Kinase	8
2.2	Tetrahydrofolat-Biosynthese	11
2.3	Röntgenstrukturanalyse von Proteinen	15
2.3.1	Überblick	15
2.3.2	Kristallisation	17
2.3.3	Beugung von Röntgenstrahlen an Kristallen	17
2.3.4	Temperaturfaktor	20
2.3.5	Berechnung der Elektronendichte	21
2.3.6	Lösung des Phasenproblems	22
3	Material und Methoden	28
3.1	Proteinchemische Methoden	28
3.1.1	Sequenzanalyse und -vergleich	28
3.1.2	Konzentrierung von Proteinen	28
3.1.3	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	28
3.1.4	Massenspektrometrie	29
3.2	Kristallographische Methoden	29
3.2.1	Kristallisation	29
3.2.2	Datensammlung	30
3.2.3	Datenauswertung	30
3.2.4	Phasierung	30
3.2.5	Modellbau und Verfeinerung	31

3.2.6	Modellanalyse und graphische Darstellung	32
4	Ergebnisse	33
4.1	<i>Candida albicans</i> 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase . .	33
4.1.1	Kristallisation	33
4.1.2	Datensammlung und Strukturlösung	33
4.1.3	Modellbau, Verfeinerung und Qualität des Atommodelles . .	36
4.1.4	Strukturbeschreibung	38
4.1.5	Struktur des aktiven Zentrums und Ligandenbindung	39
4.1.6	Strukturvergleich	42
4.1.7	Diskussion	44
4.2	Riboflavin-Kinase aus <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	46
4.2.1	Kristallisation	46
4.2.2	Datensammlung und Strukturlösung	48
4.2.3	Modellbau, Verfeinerung und Qualität des Atommodelles . .	52
4.2.4	Strukturbeschreibung	54
4.2.5	Beschreibung des aktiven Zentrums	57
4.2.6	Die Bindung des zweiwertigen Metallions	63
4.2.7	Reaktionsmechanismus	65
4.2.8	Strukturvergleich und Diskussion	66
4.3	<i>Arabidopsis thaliana</i> 7,8-Dihydroneopterin Aldolase	69
4.3.1	Kristallisation	69
4.3.2	Datensammlung und Strukturlösung	70
4.3.3	Modellbau, Verfeinerung und Qualität des Atommodelles . .	71
4.3.4	Strukturbeschreibung	73
4.3.5	Die Struktur des aktiven Zentrums	77
4.3.6	Strukturvergleich	79

4.3.7	Vergleich der Reaktionsmechanismen von DHNA und Klasse	
	I Aldolasen	81
4.3.8	Diskussion	85
5	Abkürzungen	87
	Literatur	89

1 Zusammenfassung

Essentielle Enzyme der Riboflavin-Biosynthese und des Folat-Stoffwechsels spielen eine wichtige Rolle als potentielle *Target*-Proteine bei der Entwicklung neuer inhibitorischer Wirkstoffe in der Medizin.

Ziel der Arbeit war, durch röntgenkristallographische Untersuchungen an Enzymen dieser Stoffwechselwege, detaillierte strukturelle Kenntnisse ihrer Reaktionszentren zu erlangen und somit die Basis zu einem rationalen *Drug-Design* zu ermöglichen.

3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase aus *Candida albicans*

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmalig die Kristallstruktur der 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase aus einer humanpathogenen Hefe beschrieben werden. Die Magnesium-abhängige 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase setzt einen der beiden Ausgangsstoffe der Riboflavin-Biosynthese, Ribulose-5-phosphat, zu 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat um. Die Kristallstruktur der 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase aus *Candida albicans* konnte mittels PATERSON-Suchmethode mit dem Modell aus *E. coli* gelöst werden. Das Protein wurde in seiner apo-Form und in Anwesenheit des Substrates Ribulose-5-phosphat kristallisiert und die Struktur mittels *Molecular Replacement* gelöst. Die beiden Atommodelle wurden bei einer Auflösung von 1.6 bzw. 1.7 Å auf einen R-Faktor von 19.2% und 18.4% und einen freien R-Faktor von 21.9% und 21.8% verfeinert. Ein Vergleich der Substratbindung zu den bekannten Strukturen aus *Magnaporthe grisea* und *Methanococcus jannaschii* offenbarte eine neue, offene Konformation des, für das aktive Zentrum dieses Enzymes, essentiellen sauren Loops, der in Anwesenheit von divalenten Metallionen meist in einer geschlossenen Konformation vorliegt.

Riboflavin-Kinase aus *Schizosaccharomyces pombe*

Die essentiellen Redox Co-Faktoren Riboflavin-Monophosphat (FMN) und Flavinadeninindinukleotid (FAD) werden von ihrem Vorläufer Riboflavin in aufeinander folgenden Reaktionen, welche durch die Metall-abhängige Riboflavin-Kinase und die FAD-Synthetase katalysiert werden, synthetisiert. In eukaryotischen Organismen liegt die Riboflavin-Kinase als monofunktionelles Enzym vor, während in allen bisher bekannten bakteriellen Organismen Riboflavin-Kinase und FAD-Synthetase als bifunktionelles Enzym vorliegen.

In der vorliegenden Arbeit wird die 1.6 Å Kristallstruktur der *Schizosaccharomyces pombe* Riboflavin Kinase beschrieben. Das monomere Enzym repräsentiert eine neue Familie Phosphorylgruppen-übertragender Enzyme. Die Charakterisierung des aktiven Zentrums gelang durch Aufklärung der dreidimensionalen Struktur von Komplexen der Riboflavin-Kinase mit ADP, FMN und Zink. Ein Vergleich des ADP-Komplexes mit der apo-Form des Enzymes zeigt signifikante strukturelle Umlagerungen im Bereich einer kurzen α -Helix bei der ADP-Bindung. Im Gegensatz hierzu werden bei der Bindung von Riboflavin keine merklichen Veränderungen beobachtet. Die Ribityl-Seitenkette wird vermutlich durch einen flexiblen Bereich (*flap II*) bedeckt. Der Diphosphat-Rest des ADPs wird von einem Glycin-reichen Loop (*flap I*) und Teilen der kurzen α -Helix bedeckt. Die ungewöhnliche Metall-Bindungsstelle beinhaltet zusätzlich zur Phosphatgruppe des ADPs, nur den streng konservierten Rest Thr45. Dies könnte die Bevorzugung von Zink gegenüber Magnesium *in vitro* erklären.

7,8-Dihydroneopterin Aldolase aus *Arabidopsis thaliana*

7,8-Dihydroneopterin Aldolase (DHNA) katalysiert eine Retro-Aldol Reaktion, bei der als Produkt 6-Hydroxymethyl-7,8-dihydroneopterin entsteht, ein biosynthetischer Vorläufer des Vitamins Tetrahydrofolat. In der Datenbank konnten drei Isoformen der DHNA aus *A. thaliana* gefunden werden, die sich in den *Leader*-Sequenzen unterscheiden. Bei zwei Isoformen der DHNA konnte zusätzlich zur katalytischen Aktivität eine Epimerase-Aktivität nachgewiesen werden.

Das Enzym wurde in seiner apo-Form kristallisiert und die Struktur mittels PATERSON-Suchmethode unter Verwendung der bekannten Struktur aus *Staphylococcus aureus* als Suchmodell gelöst und bis zu einer Auflösung von 2.2 Å verfeinert. In der vorliegenden Arbeit wird erstmalig die Kristallstruktur einer pflanzlichen 7,8-Dihydroneopterin Aldolase beschrieben.

Das Enzym bildet ein D₄-symmetrisches Homooktamer. Jede Polypeptidkette besteht aus einer Domäne, welche ein antiparalleles viersträngiges β -Faltblatt und zwei lange α -Helices enthält. Acht Monomere bilden zusammen zwei Ringe, die wiederum zu einem Hohlzylinder angeordnet sind. In allen acht Untereinheiten konnte ein Purin-Derivat im jeweiligen aktiven Zentrum identifiziert werden.

Die dreidimensionale Faltung der Untereinheiten der DHNA zeigt eine große Ähnlichkeit zu den Faltungsmotiven der 7,8-Dihydroneopterintriphosphat Epimerase, der GTP Cyclohydrolase I und der Pyruvoyltetrahydropterin Synthase, welche alle an der Biosynthese pterinartiger Co-Faktoren beteiligt sind. Des Weiteren besteht eine große strukturelle Homologie zu beiden Domänen der Urat Oxidase. Mit Ausnahme der Dihydroneopterintriphosphat-Epimerase kann jedoch keine sequenzielle Homologie festgestellt werden. Aufgrund struktureller und mechanistischer Unterschiede der DHNA im Vergleich zu Aldolasen der Klassen I und II, wird eine neue Aldolase Klasse vorgeschlagen.

2 Einleitung

2.1 Riboflavin-Biosynthese

Riboflavin (Vitamin B_2) ist in Form der Flavocoenzyme FMN und FAD an vielen Redoxreaktionen beteiligt (Bacher, 1991). Eine große Anzahl von Redoxenzymen wie z.B. die Acyl-CoA-Dehydrogenase der β -Oxidation, die NADH-Dehydrogenase der Atmungskette, die Succinat-Dehydrogenase des Citratzyklus oder die Monoaminoxidasen der Flavoproteine sind auf die Co-Enzymformen von Riboflavin angewiesen. Des Weiteren sind Flavocoenzyme an einer Vielzahl anderer physiologischer Prozesse wie Phototropismus (Briggs and Huala, 1999; Salomon *et al.*, 2001; Crosson and Moffat, 2001), Biolumineszenz (Meighen, 1991; O’Kane and Prasher, 1992; Meighen, 1993) und DNA-Photoreparatur (Thompson and Sancar, 2002) beteiligt. Riboflavin wird in Pflanzen und vielen Mikroorganismen synthetisiert. Höhere Organismen müssen das Vitamin jedoch mit der Nahrung aufnehmen. Aus diesem Grund bietet der Biosyntheseweg des Riboflavins einen geeigneten Ansatzpunkt zur Entwicklung neuer Antibiotika. Ein Mangel an Riboflavin kann beim Menschen unter anderem zu Stomatitis, Dermatitis und hypochromer Anämie führen. Da Riboflavin jedoch in sehr vielen Lebensmitteln vorhanden ist, treten oben genannte Folgeerscheinungen eher selten auf.

Die Riboflavin-Biosynthese (Abbildung 1) wurde detailliert in Eubakterien und Pilzen untersucht und ist weitestgehend aufgeklärt (Young, 1986; Bacher *et al.*, 1996, 2001).

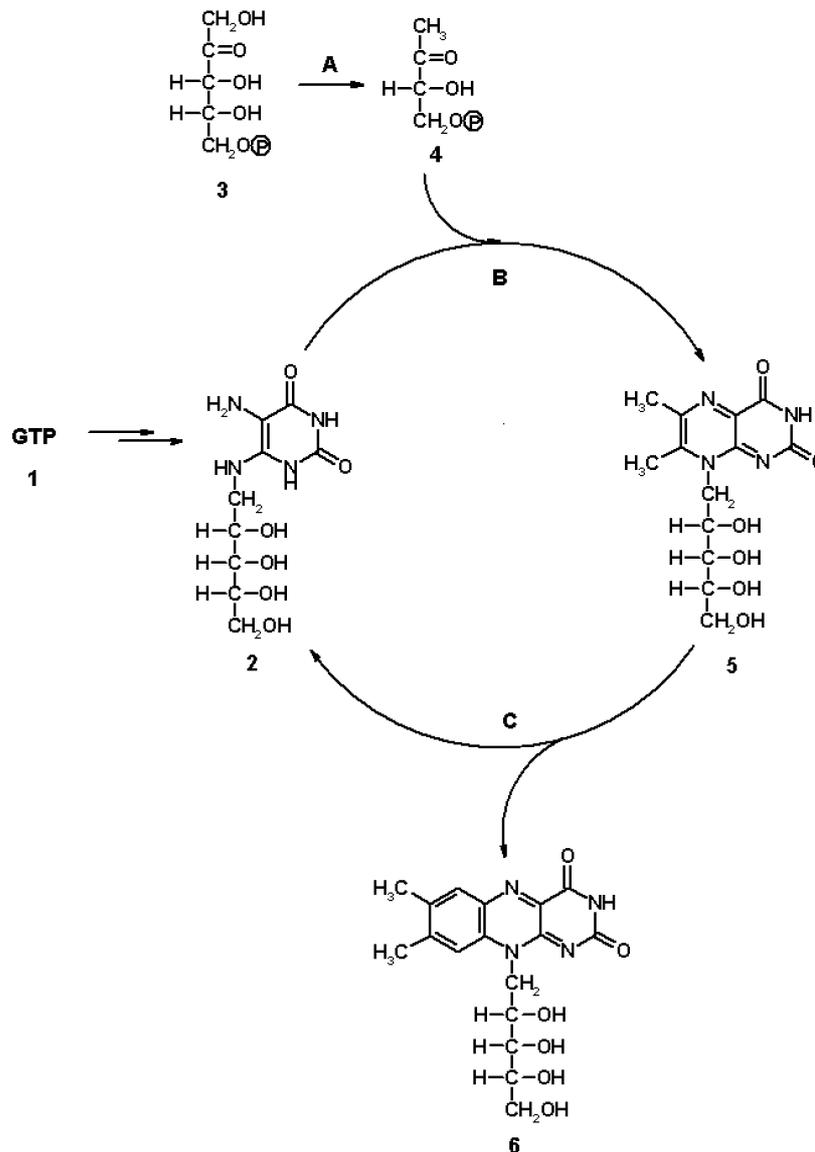


Abbildung 1: Riboflavin-Biosynthese. **1** Guanosintriphosphat (GTP), **2** 5-Amino-6-ribitylamino-2,4-pyrimidindion, **3** Ribulose-5-phosphat, **4** 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat, **5** 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin, **6** Riboflavin, **A** 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase, **B** Lumazin Synthase, **C** Riboflavin Synthase.

Die GTP-Cyclohydrolase II katalysiert einen der beiden Eingangsschritte der Riboflavin-Biosynthese. Sie setzt GTP (**1**) zu 2,5-Diamino-6-ribosylamino-4(3*H*)-pyrimidindion-5'-monophosphat um (Foor and Brown, 1975; Plaut and Har-

vey, 1971). Das Produkt der GTP-Cyclohydrolase II wird durch die Desaminase/Reduktase zu 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (**2**) umgesetzt. Die Reihenfolge der beiden Reaktionen hängt vom jeweiligen Organismus ab. Während Prokaryoten zuerst den Pyrimidinring desaminieren und dann die Ribosylseitenkette reduzieren (Burrows and Brown, 1978), findet in Pilzen die Reduktion des Zuckers vor der Desaminierung statt (Nielsen and Bacher, 1981). Die Reihenfolge in Pflanzen und Archaea ist derzeit noch nicht bekannt. Das Produkt der Desaminase/Reduktase-Reaktion wird vermutlich von einer unspezifischen Phosphatase hydrolysiert, bevor es von der 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin Synthase **B** mit einer C₄-Einheit zu 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin (**5**) kondensiert wird (Neuberger and Bacher, 1986; Volk and Bacher, 1988; Kis *et al.*, 1995).

Durch den Einbau ¹³C-markierter Vorstufen in wachsende Kulturen von *Ashbya gossypii* konnte gezeigt werden, daß die C₄-Einheit regiospezifisch in Lumazin eingebaut wird (Bacher *et al.*, 1983). Es konnte weiterhin nachgewiesen werden, daß Ribulose-5-phosphat (**3**) ein direkter Vorläufer der C₄-Einheit ist (Volk and Bacher, 1988, 1990). Volk und Bacher konnten schließlich 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat (**4**) als den C₄-Körper identifizieren. Das Enzym, das die Umsetzung von Ribulose-5-phosphat zu 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat katalysiert, ist die 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase (DHBPS)(**A**). Im letzten Schritt der Riboflavin-Biosynthese erfolgt die Bildung von 7,8-Dimethyl-10(D-1-ribityl)-isoalloxazin (**6**) (Riboflavin) aus zwei Molekülen 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin. Diese Dismutasereaktion wird von der Riboflavin Synthase (**C**) katalysiert. Das zusätzlich entstehende 5-Amino-6-ribitylamino-2,4-(1*H*,3*H*)-pyrimidindion wird in den Biosyntheseweg zurückgeführt (Harvey and Plaut, 1966; Plaut, 1960; Plaut *et al.*, 1970; Plaut and Harvey, 1971; Wacker *et al.*, 1964). In der Bilanz werden für den Aufbau des Xylen-Ringes von Riboflavin demnach zwei Moleküle L-3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat und ein Molekül GTP verbraucht.

2.1.1 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase

3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase (DHBPS) liefert die Bausteine für die Zusammensetzung des Xylen-Ringes von Riboflavin (Volk and Bacher, 1988, 1990, 1991; Fischer *et al.*, 2003) durch die Umsetzung von Ribulose-5-phosphat (Ru5P) zu 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat als zweites Substrat der 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin Synthase. Je nach Organismus liegen DHBPS und GTP-Cyclohydrolase II entweder als bifunktionelles Enzym, oder in Form zweier getrennter monofunktionaler Enzyme vor (Richter *et al.*, 1992). Die monofunktionelle DHBPS aus z.B. *E. coli* liegt als Homodimer mit einer Masse von 46 kDa vor. Nach der Klonierung und Charakterisierung der DHBPS aus *E. coli* (Richter *et al.*, 1992) konnten in jüngster Zeit die Kristallstrukturen der Enzyme aus *E. coli* (Liao *et al.*, 2001), *Magnaporthe grisea* (Liao *et al.*, 2002) und *Methanococcus jannaschii* (Steinbacher *et al.*, 2003) gelöst werden. Auf Basis dieser Daten, sowie der gerichteten Mutagenese an dem Enzym aus *M. jannaschii* (Fischer *et al.*, 2002), wurde folgender Reaktionsmechanismus postuliert.

Der erste Schritt, der von der DHBPS katalysierten Reaktion (Abbildung 2) stellt die Bildung des Endiolintermediates **8** aus Ru5P (**7**) nach Abstraktion eines Protons dar. Aufgrund der Koordination des Carbonylsauerstoffes von C2 an Metall II ergibt sich eine *cis*-Konformation des 2,3-Endioles. Die Protonierung der 1 OH-Gruppe und anschließender Eliminierung von Wasser führt zur Bildung des 2,3-Diketons **10** durch Tautomerisierung des Endioles **9**. Eine sigmatrope Umlagerung der Phosphormethylengruppe liefert das verzweigte Intermediat **11**. Ermöglicht wird diese Umlagerung vermutlich durch den elektronenziehenden Charakter der Carbonylgruppe an C2 und die kompakte Geometrie des Substrates durch die Koordination von O2, O3 und O4 an die beiden Metalle. Die Eliminierung des Formiates unter Bildung des Aldehydhydrates **12** und die Keto-Enol-Tautomerisierung des resultierenden Endioles **13** - unter Aufnahme eines Protons - beenden die Reaktion.

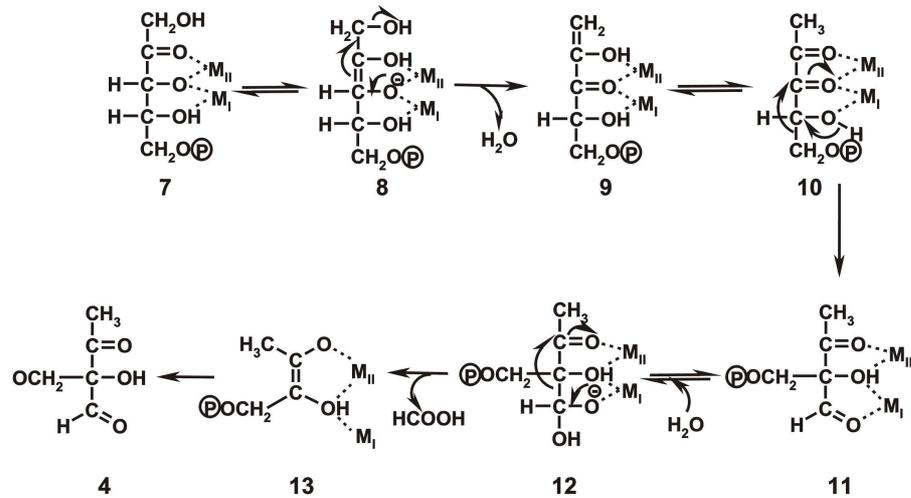


Abbildung 2: Postulierter Mechanismus der 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase.

Candida albicans ist der häufigste humanpathogene Hefepilz. Bei gesunden Menschen kann *Candida* Haut und Schleimhäute befallen, eine eher unangenehme als gefährliche Infektion. Riskanter wird die Infektion bei Patienten, deren Immunsystem geschwächt ist, beispielsweise bei HIV-Patienten, nach Organtransplantationen oder einer Chemotherapie bei Krebserkrankungen. Pathogene Eubakterien (Shavlovsky *et al.*, 1982) und vermutlich auch pathogene Hefen (Shavlovsky *et al.*, 1979) (Oltmanns *et al.*, 1969) können Riboflavin nicht aus der Umwelt aufnehmen und sind daher vollständig auf eine endogene Synthese des Vitamins angewiesen. Bislang gibt es nur wenige Präparate zur Therapie der *Candida*-Infektion. Bei diesen wurden jedoch erhebliche Nebenwirkungen oder Resistenzentwicklungen beobachtet. Die molekulare Charakterisierung des Infektionsvorganges stellt die Grundlage zur Entwicklung neuer Medikamente dar.

2.1.2 Riboflavin-Kinase

Die Flavocoenzyme FMN (Riboflavin-5'-phosphat, Flavinmononukleotid) sowie FAD (Flavinadenindinukleotid) sind in allen zellulären Organismen essentiell. Obwohl

nur Pflanzen und einige Mikroorganismen Riboflavin selbst produzieren können, sind jedoch alle Organismen in der Lage, Riboflavin in die aktiven Flavinnukleotid Co-Faktoren umzuwandeln (Abbildung 3).

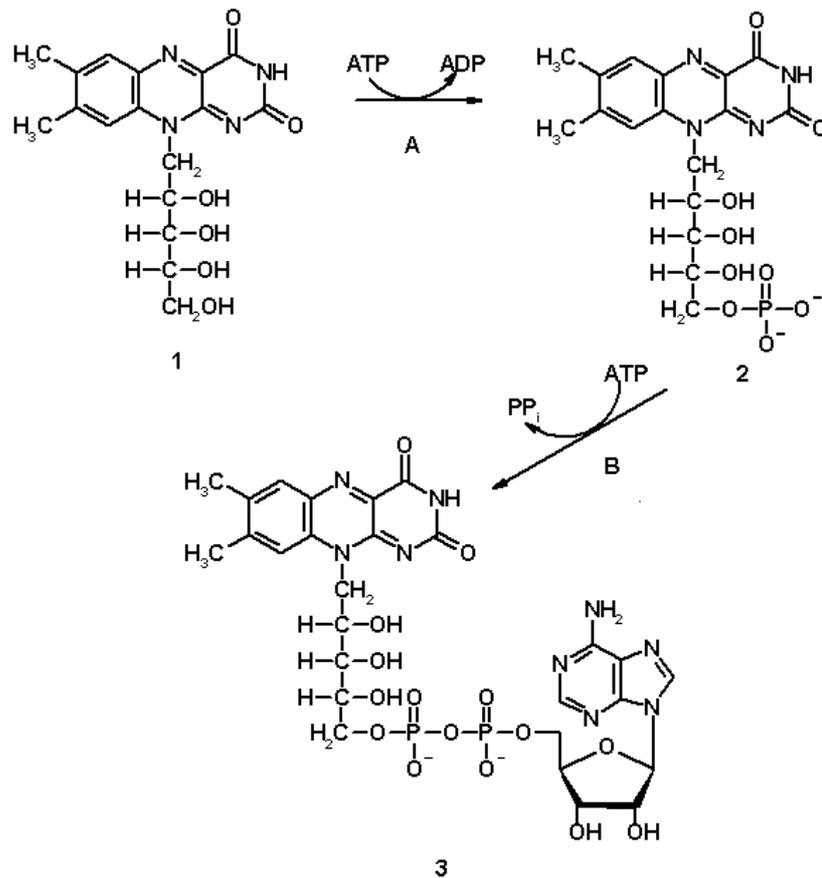


Abbildung 3: Bildung der Co-Faktoren Flavinmononukleotid (FMN; **2**) und Flavinadenindinukleotid (FAD; **3**) unter Katalyse der Enzyme Riboflavin-Kinase **A** und FAD-Synthetase **B**.

Die Riboflavin-Kinase **A** katalysiert die Phosphorylierung von Riboflavin **1** an seiner 5'-OH-Gruppe zu Flavinmononukleotid (FMN) **2**. 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. FMN **2** wird durch die FAD-Synthetase **B** in Flavinadenindinukleotid (FAD) **3** umgewandelt.

Auch diese Reaktion ist eine ATP-abhängige Reaktion, in der eine AMP-Einheit auf das Flavin unter Freisetzung von Pyrophosphat übertragen wird. Beide Reaktionen sind abhängig von zweiwertigen Metallkationen, wie z.B. Mg^{2+} und Zn^{2+} . Allgemein sind Kinasen von großer biologischer Bedeutung und zählen zur großen Gruppe Nukleotid-bindender Proteine, welche in strukturell verwandte Familien unterteilt werden kann (Schulz, 1992; Vetter and Wittighofer, 1999). Während Proteinkinase zusammen mit ihren Gegenspielern, den Phosphatasen, eine zentrale Rolle in der Signaltransduktion sowie anderen regulatorischen Prozessen spielen, sind Kinasen kleiner Moleküle an verschiedensten Prozessen, wie metabolischen Reaktionen, Inaktivierung von Antibiotika, oder der Biosynthese von Co-Faktoren, beteiligt. Eine kürzlich veröffentlichte Studie über die sequenzielle und strukturelle Klassifizierung von Kinasen zeigte, daß 98% aller Sequenzen auf lediglich sieben Faltungsmotiven basieren (Cheek *et al.*, 2002).

Die Riboflavin-Kinase kommt in einer Vielzahl von Organismen vor. In vielen prokaryotischen Organismen sind Riboflavin-Kinase- und FAD-Synthetase-Aktivität jedoch in einem bifunktionellen Enzym vereinigt (Mack *et al.*, 1998; Manstein and Pai, 1986). Im Gegensatz hierzu konnten beide Enzyme in einigen eukaryotischen Organismen, wie z.B. *Saccharomyces cerevisiae* (*FMN1*) und *Schizosaccharomyces pombe*, getrennt voneinander gereinigt werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, daß das *ribR* Gen aus *Bacillus subtilis* ebenfalls eine monofunktionelle Riboflavin-Kinase codiert (Santos *et al.*, 2000; Solovieva *et al.*, 1999).

Wie bei allen Enzymen, die Phosphat-Gruppen übertragen, sind für die Riboflavin-Kinase Aktivität zweiwertige Metallionen unerlässlich. Im Gegensatz jedoch zu den meisten ATP-abhängigen Enzymen, welche Mg^{2+} -Ionen bevorzugen, weist die Riboflavin-Kinase aus Rattenleber eine um den Faktor 1.8 erhöhte Aktivität in Anwesenheit niedriger Konzentrationen von Zn^{2+} -Ionen bei einem pH-Optimum von pH 9.3 auf (Merrill and McCormick, 1980).

Kristallstrukturen der Riboflavin-Kinase als auch der FAD-Synthetase waren zum damaligen Zeitpunkt unbekannt. Mittlerweile konnten die dreidimensionalen Strukturen der humanen Riboflavin-Kinase (Karthikeyan *et al.*, 2003) sowie der Riboflavin-Kinase aus *Thermotoga maritima* (Wang *et al.*, 2003) aufgeklärt werden.

2.2 Tetrahydrofolat-Biosynthese

Folsäure bzw. Folat ist die Vorstufe von Tetrahydrofolat, welches mit seinen Derivaten essentielle Co-Faktoren bei der Übertragung und gegenseitigen Umwandlung von C₁-Kohlenstoff-Einheiten verschiedener Oxidationsstufen darstellt. Letztere kommen in vielen Organismen vor und spielen bei der Biosynthese der Purinbasen, der Biosynthese von Serin und Methionin, sowie bei der Formylierung von Methionyl-*t*RNA eine Rolle (Cossins, 1980, 1997). Substituierte Tetrahydrofolate haben C₁-Einheiten an das N5- oder N10-Stickstoffatom gebunden. So wird z.B. aus Homocystein durch Übertragung einer Methylgruppe vom N5-Tetrahydrofolat Methionin gebildet, wobei das substituierte Tetrahydrofolat hier als C₁-Donor dient. Bei Abbaureaktionen wiederum können Tetrahydrofolate als Akzeptor dienen. Die Hauptquelle dieser C₁-Einheiten stellt die Umwandlung von Serin zu Glycin dar, wobei N5, N10-Methylen-Tetrahydrofolate entstehen. Folsäure kommt somit eine wichtige Rolle bei der Zellproliferation zu.

Während Pflanzen und viele Mikroorganismen Folat selbst produzieren können, sind Säuger auf die Aufnahme über die Nahrung angewiesen (Young, 1986; Neuburger *et al.*, 1996). Unzureichende Versorgung mit dem Vitamin kann bei menschlichen Embryonen zu Neuralrohrdefekten führen und somit die Entwicklung des Zentralnervensystems beeinträchtigen (Feinleib *et al.*, 2001).

In Abbildung 4 ist eine verkürzte Version der Tetrahydrofolat Biosynthese dargestellt.

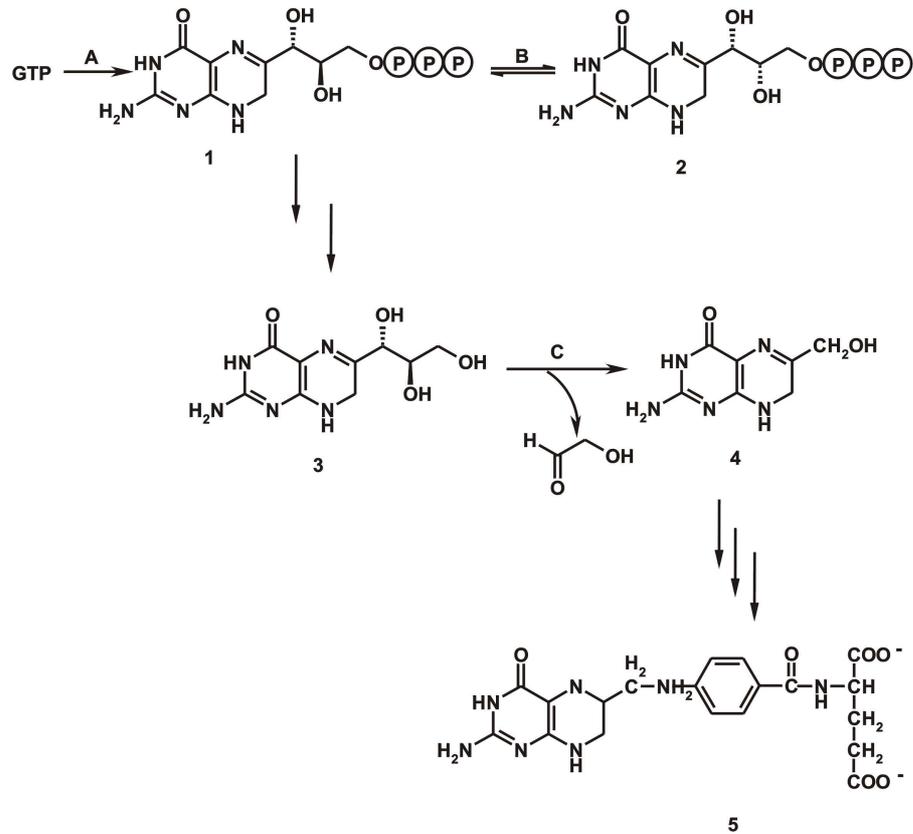


Abbildung 4: Tetrahydrofolat-Biosynthese. **1:** 7,8-Dihydro-D-neopterin-3'-triphosphate; **2** 7,8-Dihydro-L-monapterin-3'-triphosphate; **3** 7,8-Dihydro-D-neopterin; **4** 6-Hydroxymethyl-7,8-dihydropterin; **5:** Tetrahydrofolat; **A:** GTP-Cyclohydrolase I; **B:** 7,8-Dihydroneopterintriphosphat-Epimerase; **C:** 7,8-Dihydroneopterin Aldolase.

Die GTP-Cyclohydrolase I (**A**) katalysiert den ersten Schritt des Aufbaus der Pteridinuntereinheit, dabei wird GTP zu 7,8-Dihydro-D-neopterin-3'-triphosphat **1** unter Abspaltung von Formiat umgesetzt (Nar *et al.*, 1995; Green *et al.*, 1996; Bracher *et al.*, 2001; Schramek *et al.*, 2002; Yim and Brown, 1976; Fan and Brown, 1976). Homologien zur GTP-Cyclohydrolase II, welche den ersten Schritt der Riboflavin-Biosynthese katalysiert, bestehen nicht. Über die nächsten beiden Schritte zu 7,8-Dihydro-D-neopterin **3** ist bislang wenig bekannt. Suzuki und Brown postulierten, daß zur Abspaltung des Triphosphat-Restes von Dihydroneopterintriphosphat zwei

aufeinander folgende, enzymatisch katalysierte Reaktionen nötig sind (Suzuki and Brown, 1974). Der erste Schritt würde demnach durch eine spezifische Dihydro-neopterintriphosphat Pyrophosphatase katalysiert, während die noch verbliebene Phosphatgruppe durch unspezifische Phosphatase-Aktivität entfernt wird. Kürzlich wurde jedoch herausgefunden, daß die Abspaltung von Pyrophosphat *in vitro* allein durch die Anwesenheit zweiwertiger Kationen wie Mg^{2+} und Ca^{2+} katalysiert wird (De Saizieu *et al.*, 1995).

Die Umwandlung von 7,8-Dihydro-D-neopterin **3** zu 6-Hydroxymethyl-7,8-dihydro-neopterin **4** wird durch die 7,8-Dihydroneopterin Aldolase (DHNA) (**C**) katalysiert (Mathis and Brown, 1980; Haussmann *et al.*, 1998; Deng *et al.*, 2000; Illarionova *et al.*, 2002). 6-Hydroxymethyl-7,8-dihydroneopterin **4** wird durch nachfolgende Kondensation mit 4-Aminobenzoat und Glutamat durch Dihydropteroat Synthase und Dihydrofolat Reduktase zu Dihydrofolat umgesetzt (Green *et al.*, 1996; Ortiz and Hotchkiss, 1966; Richey and Brown, 1969; Suckling *et al.*, 1977). Heine und Brown haben in *E. coli* ein Enzym, die 7,8-Dihydroneopterintriphosphat Epimerase (**B**), identifiziert, welches die Epimerisierung von 7,8-Dihydro-D-neopterin-3'-triphosphat (**1**) zu 7,8-Dihydro-L-monapterin-3'-triphosphat (**2**) katalysiert (Heine and Brown, 1975).

Sowohl Dihydropteroat Synthase als auch Dihydrofolat Reduktase stellen wichtige *Targets* bei der Entwicklung neuer antimikrobieller und antiparasitärer Wirkstoffe dar (Achari *et al.*, 1997; Chio *et al.*, 1996). Dihydropteroat Synthase wird durch Sulfonamide, die ersten synthetischen Breitband-Antibiotika, gehemmt, während die Hemmung der Dihydrofolat Reduktase Aktivität mittels Trimethoprim oder Methotrexat erfolgt, welches gegen eine Vielzahl pathogener Bakterien wirksam ist (Singer *et al.*, 1966; Schweitzer *et al.*, 1990; Skold, 2000, 2001). Inhibitoren der frühen Stufen der Tetrahydrofolatbiosynthese sind bisher nicht bekannt.

DHNA konnte aus verschiedenen Prokaryoten und einem Eukaryoten, dem Pilz

Pneumocystis carinii kloniert und charakterisiert werden. Die Enzyme aus *E. coli*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, and *Synechocystis sp.* sind kurze, monofunktionelle Proteine (118-150 Aminosäure-Reste), die Homooktamer bilden (Hausmann *et al.*, 1998; Hennig *et al.*, 1998). Neben der Aldolase-Reaktion konnte bei DHNA aus *E. coli* (FolB) außerdem eine effiziente Katalyse der Epimerisierung des 2'-Kohlenstoffs der Dihydroneopterin-Seitenkette zu 7,8-Dihydromonapterin, und die anschließende Spaltung des letzteren zu 6-Hydroxymethyl-7,8-dihydroneopterin beobachtet werden. Das Genom von *Arabidopsis thaliana* beinhaltet drei Gene (AtFolB1-3) mit einer hohen Ähnlichkeit zu bakteriellen DHNA-Genen, die sich in ihren *Leader*-Sequenzen unterscheiden. Expression und biochemische Charakterisierung zeigte bei zwei dieser drei Isoformen sowohl Aldolase-Aktivität als auch eine deutliche Epimerase-Aktivität (Goyer *et al.*, 2004). Bislang konnte jedoch die metabolische Bedeutung dieser zusätzlichen Aktivität nicht aufgeklärt werden. Das Enzym aus *H. influenzae* zeigt ebenfalls Epimerase-Aktivität, jedoch deutlich schwächer (Hausmann *et al.*, 1998). In *Streptococcus pneumoniae* ist die DHNA Teil eines bifunktionellen Proteines zusammen mit 6-Hydroxymethyl-7,8-dihydroneopterin Pyrophosphokinase, dem nachfolgenden Enzym des Folatstoffwechsels. In *P. carinii* liegt ein trifunktionelles Protein vor, welches zusätzlich zu den beiden genannten Enzymen eine Dihydropteroat-Synthase enthält.

Hennig *et al.* beschreiben die erste Kristallstruktur der DHNA aus *Staphylococcus aureus* und schlagen einen möglichen Reaktionsmechanismus vor (Hennig *et al.*, 1998), der in Übereinstimmung mit der Reaktion, die von Aldolase aus Hasenmuskel katalysiert wird, als Retroaldol-Reaktion interpretiert werden kann (Mathis and Brown, 1970; Hausmann *et al.*, 1998; Illarionova *et al.*, 2002; Hennig *et al.*, 1998). Generell katalysieren Aldolasen C-C Bindungsbildungen und -spaltungen. Aufgrund ihrer Stereospezifität stellen sie attraktive synthetische Katalysatoren dar.

Basierend auf ihrer Art das Zwischenprodukt der Reaktion zu stabilisieren, können Aldolasen in zwei Klassen aufgeteilt werden. Klasse I Aldolasen kommen sowohl in Prokaryoten als auch in Eukaryoten vor, und werden durch die Bildung einer Schiff'schen Base mit dem Substrat charakterisiert (Gefflaut *et al.*, 1995). Aldolasen der Klasse II kommen nur in Prokaryoten und niederen Eukaryoten, wie Hefen, Algen und Pilzen, vor und benötigen für ihre Aktivität zweiwertige Metallionen (Gross *et al.*, 1994; Smith *et al.*, 1980; Szwergold *et al.*, 1995; Rutter, 1960).

2.3 Röntgenstrukturanalyse von Proteinen

Da die Methode der Röntgenkristallographie in verschiedenen Lehrbüchern ausführlich behandelt wird (Blundell and Johnson, 1976; Drenth, 1994; Stout and Jensen, 1989), werden die wichtigsten Grundprinzipien im folgenden nur kurz dargestellt.

2.3.1 Überblick

Für die Analyse der dreidimensionalen Struktur eines Proteines stehen zur Zeit drei etablierte Methoden zur Verfügung. Die Elektronenmikroskopie ermöglicht eine dreidimensionale Darstellung der Oberfläche von Molekülen. Ein atomares Modell der Proteinstruktur liefert die Kernresonanzspektroskopie NMR (*Nuclear Magnetic Resonance*) und die Röntgenkristallographie. Die NMR untersucht Proteine in Lösung und kann somit Informationen über dynamische Prozesse liefern. Eine entscheidende Limitation ist jedoch die Beschränkung auf Proteine mit einem Molekulargewicht von maximal 35 kDa, weshalb für die Strukturanalyse höhermolekularer Proteine oft ausschließlich die Methode der Röntgenkristallographie zur Verfügung steht.

Wilhelm Konrad Röntgen legte, durch seine Experimente mit Kathodenstrahlen und der Entdeckung der nach ihm benannten Röntgenstrahlung, die Grundlagen für die Röntgenstrukturanalyse. Die Diffraction von Röntgenstrahlen an Kristallen

konnte erstmals von Laue und seinen Mitarbeitern (Friedrich *et al.*, 1912) gezeigt werden, und die erste Röntgenstruktur stellte Bragg am Beispiel von Natrium- und Kaliumchlorid-Kristallen vor (Bragg, 1913). Proteinkristalle wurden bereits 1840 erwähnt, aber erst 1934 wurden die ersten Röntgendiffraktionsbilder eines Proteinkristalles veröffentlicht (Bernal and Crowford, 1934). Nachdem gezeigt werden konnte, daß das Prinzip des isomorphen Ersatzes auch für Proteine gilt (Green *et al.*, 1954; Harker, 1956), wurden als erste Proteinstrukturen Myoglobin (Kendrew *et al.*, 1960) und Hämoglobin (Perutz *et al.*, 1960) gelöst.

Die zunehmend große Zahl von Proteinkristallstrukturen - im Juli 2004 waren in der Proteindatenbank in Brookhaven mehr als 26225 Proteinstrukturen hinterlegt - von denen lediglich 15 % durch Kernresonanzmethoden und 2 % durch theoretische Methoden bestimmt wurden - wurde vor allem durch die Entwicklung leistungsfähiger Computer und Programme ermöglicht. In den letzten Jahren haben die neuen Techniken der Molekularbiologie, durch die Bereitstellung großer Mengen nahezu jedes gewünschten Proteines, die Strukturanalyse erheblich stimuliert.

Die wichtigsten Röntgenquellen für die Proteinstrukturanalyse sind Drehanodengeneratoren, meist mit CuK_α -Strahlung (1.542 \AA) und Synchrotrone mit Wellenlängen der Strahlung zwischen 0.7 und 1.8 \AA . Eine charakteristische Eigenschaft von Wellen, und somit auch von Röntgenstrahlung, ist ihre Fähigkeit zur Interferenz, hervorgerufen durch Beugung an einer dreidimensional periodischen Anordnung des zu untersuchenden Einkristalles. Die Proteinstrukturaufklärung durch Röntgenkristallographie ist somit auf die Kristallisierbarkeit des Proteinmaterials angewiesen. Dabei bestehen an das Protein hohe Anforderungen u.a. in Bezug auf Reinheit und Homogenität der Präparation.

2.3.2 Kristallisation

Heutzutage sind verschiedene Methoden zur Erzeugung von Protein-Einkristallen bekannt (McPherson, 1982), von denen der Dampfdiffusionsmethode die weitaus größte Bedeutung zukommt. Bei dieser Methode wird dem hochkonzentrierten Protein ein Fällungsmittel zugesetzt und diese Mischung über einem Reservoir mit höherer Konzentration des Fällungsmittels äquilibriert. Der Konzentrationsgradient zwischen Proteinlösung und Reservoir wird durch die Dampfphase ausgeglichen, was zu einem Aufkonzentrieren des Proteines bis zur Übersättigung führt und im Idealfall ein geordnetes Abscheiden des Proteines aus der Lösung, die Kristallisation desselben, zur Folge hat. Die Ausbildung eines Proteinkristalles ist jedoch stark von den Bedingungen wie pH-Wert, Salzkonzentration, Art des Fällungsmittels, Temperatur usw. abhängig und in keinster Weise vorhersagbar. Dieses vieldimensionale Problem wurde versucht durch faktorielle Ansätze zu lösen (Jancarik and Kim, 1991; Carter and Carter, 1979), stellt aber auch heutzutage noch eines der Nadelöhre der Proteinkristallographie dar, da es rein empirisch, in günstigen Fällen halbempirisch, zu lösen ist.

Ein Kristall ist definitionsgemäß eine dreidimensional periodische Anordnung von Gitterbausteinen. Allgemein wird ein Kristall durch Translation der sogenannten **Elementarzelle** um ganzzahlige Vielfache der Elementarzellvektoren in alle drei Raumrichtungen aufgebaut. Die Elementarzelle wird durch Anwendung aller Symmetrieeoperatoren der jeweiligen kristallographischen Raumgruppe auf die kleinste sich wiederholende Einheit, die **asymmetrische Einheit**, gebildet.

2.3.3 Beugung von Röntgenstrahlen an Kristallen

Trifft Röntgenstrahlung auf einen Kristall, regt ihr oszillierendes elektrisches Feld die Elektronen der Atome im Proteinkristall zur Schwingung mit gleicher Frequenz an. Die Elektronen wirken als oszillierende Dipole und emittieren ihrerseits Se-

kundärstrahlung der gleichen Frequenz. Diese ist für freie Elektronen gegenüber der einfallenden Strahlung um 180° phasenverschoben. Im Normalfall können die Elektronen im untersuchten System als freie Elektronen betrachtet werden, was im Falle der anomalen Streuung (2.3.6) nicht mehr gilt.

Die periodische Anordnung der Elementarzelle hat die Bildung eines Kristallgitters zur Folge. Zur Beschreibung der Beugung werden diesem Gitter sogenannte Netzebenen zugeordnet, die verschiedene Gitterpunkte enthalten. Die Netzebenen werden durch ihre Schnittpunkte mit den Achsen der Elementarzelle identifiziert und durch die sogenannten **Miller-Indizes** bezeichnet. Erfolgt die Streuung kohärent an einer Netzebenenschar des Kristallgitters, so kommt es für einen bestimmten Einfallswinkel Θ zu einem Gangunterschied von einer Wellenlänge λ oder einem ganzzahligen Vielfachen der Wellenlänge $n\lambda$. Damit ist die Bedingung der konstruktiven Interferenz erfüllt. Diese wird durch die **Braggsche Gleichung** beschrieben:

$$\frac{2d\sin\Theta}{\lambda} = n$$

Hierbei ist d der Abstand der Netzebenenscharen, Θ der Winkel zwischen einfallendem Strahl und Netzebenenschar und λ die verwendete Wellenlänge.

Die Beugung von Röntgenstrahlen an den Netzebenenscharen des realen Gitters des Kristalles erzeugt auf diese Weise ein dreidimensionales Gitter von Beugungsmaxima. Da die geometrischen Eigenschaften dieses Gitters zu denen des realen Gitters invers sind, wird es als reziprokes Gitter bezeichnet. Das reziproke Gitter wird aus der Ansammlung der Normalenvektoren von Netzebenenscharen mit der Länge des reziproken Netzebenenabstandes gebildet. Unter Verwendung des reziproken Gitters lässt sich das BRAGGSche Gesetz als Vektordiagramm darstellen (Abbildung 5) (**Ewald-Konstruktion**, (Ewald, 1921)).

Die Reflexionsbedingung ist exakt erfüllt, wenn ein reziproker Gitterpunkt \mathbf{P} die EWALD-Kugel mit dem Radius $1/\lambda$ durchquert. Die Richtung des gebeugten Strah-

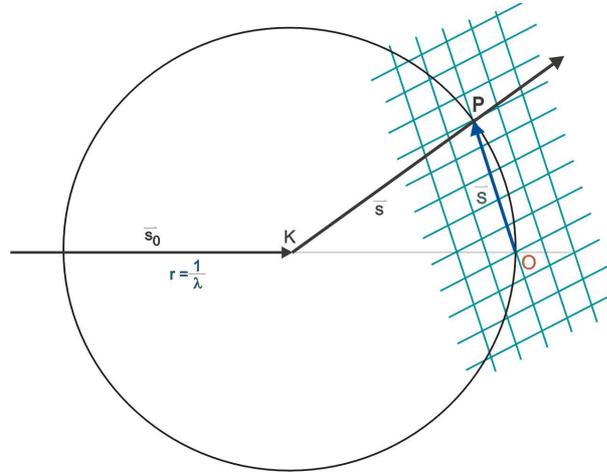


Abbildung 5: EWALD-Konstruktion (Ewald, 1921). Die Richtung des Primärstrahles s_0 geht vom Drehpunkt des Kristalls K zum Ursprung O des reziproken Gitters (grün). Um den Kristallursprung wird eine Kugel mit dem Radius $1/\lambda$ gezeichnet (Ewaldkugel). Der gebeugte Strahl wird durch den Vektor s und ein reziproker Gittervektor durch den Vektor S repräsentiert.

les ergibt sich aus der Verbindung des Kristalldrehpunktes \mathbf{K} mit dem die Kugel durchquerenden reziproken Gitterpunktes \mathbf{P} . Kristallgitter mit identischen Abmessungen beugen demnach auch Röntgenstrahlung in identischer Richtung. Tatsächlich ist die Beugung des Primärstrahls das Ergebnis der Interferenz aller an den Elektronen der Atomhülle gebeugten Röntgenstrahlen. Betrachtet man eine isolierte Elementarzelle, an der sich eine Welle bricht, so ergibt sich ein richtungsabhängiges, kontinuierliches Beugungsbild. Durch die periodische Anordnung des Kristalles können diese Sekundärwellen jedoch nur in bestimmte Richtungen konstruktiv interferieren. Die so erhaltenen Reflexe können durch die komplexen Strukturformfaktoren beschrieben werden. Die Positionen der Atome (oder besser deren Elektronenhüllen) in der Elementarzelle und die komplexen Strukturformfaktoren können durch eine **Fourier-Transformation** hergestellt werden:

$$\vec{F}(h, k, l) = \sum_j f_j e^{2\pi i \vec{r}_j \cdot (h, k, l)}$$

Der Strukturfaktor \vec{F} für den Reflex (hkl) beschreibt die Summe der Streubeiträge über alle Atome j mit den fraktionellen Koordinaten \vec{r}_j in der Elementarzelle; f_j ist der Atomformfaktor, der die Abhängigkeit der Streuintensität vom Streuwinkel und eingestrahelter Wellenlänge an dem jeweiligen Atom repräsentiert und unter Annahme von kugelsymmetrischer Ladungsverteilung (in Abwesenheit von anomaler Streuung) von der Elektronenzahl des jeweiligen Elementes abhängig ist.

2.3.4 Temperaturfaktor

In Abhängigkeit von der Temperatur schwingen die Atome um ihre Gleichgewichtsposition. Die Röntgenstrahlen treffen also in aufeinanderfolgenden Einheitszellen nicht auf identische Atome an exakt der gleichen Position. Dies ist vergleichbar mit einem Röntgenstrahl der auf ein schnell schwingendes Atom trifft. Dabei wird die gestreute Intensität vor allem bei großen Streuwinkeln vermindert, so daß der atomare Formfaktor mit einem temperaturabhängigen Faktor multipliziert werden muß. Die Bewegung der Atome innerhalb der reflektierenden Ebene (hkl) beeinflusst nicht die Intensität des Reflexes (hkl) , sondern nur die Komponente senkrecht zur Ebene, d.h. in Richtung von \vec{S} , zeigt einen Effekt. Im einfachen Fall der isotropen Bewegung ist die Komponente für jeden Reflex (hkl) gleich, und der Korrekturfaktor ergibt sich zu:

$$T(iso) = e^{-B \frac{\sin^2 \Theta}{\lambda^2}}$$

Dabei definiert sich der **Temperaturfaktor B** als eine Funktion des mittleren Abweichungsquadrates \bar{u}^2 :

$$B = 8\pi^2 \times \bar{u}^2$$

Für einen Temperaturfaktor von $B = 30 \text{ \AA}^2$ errechnet sich eine mittlere Verschie-

bung der Atome um ihre Gleichgewichtsposition von 0.62 \AA . Dieser Wert gibt einen Eindruck von der Flexibilität und Unordnung in Proteinstrukturen, die keinesfalls vollkommen starr sind. Wegen dieser Unordnung im Kristall nimmt die Intensität des Beugungsbildes ab einem Beugungswinkel Θ_{max} sehr stark ab. Der entsprechende Abstand der Gitterebenen d_{min} ergibt sich aus dem BRAGG'schen Gesetz:

$$d_{min} = \frac{\lambda}{2\sin\Theta_{max}}$$

wobei d_{min} als Auflösung des Beugungsbildes bezeichnet wird. Die Struktur kann bis zu einer maximalen Auflösung von d_{min} bestimmt werden.

Der Temperaturfaktor B beschreibt eine dynamische Unordnung im Kristall durch die temperaturabhängige Schwingung der Atome und eine statistische Unordnung, die daraus resultiert, daß die Moleküle in unterschiedlichen Einheitszellen nicht exakt die gleiche Position und Orientierung aufweisen. Diese beiden Effekte der Unordnung können nur dann unterschieden werden, wenn Diffraktionsdaten an identischen Einkristallen bei verschiedenen Temperaturen gesammelt werden.

2.3.5 Berechnung der Elektronendichte

Da Röntgenstrahlen an der Atomhülle der Atome gebeugt werden, ergeben sich aus der Strukturanalyse nicht sofort die genauen Atompositionen, sondern die dreidimensionale Verteilung der Elektronen der Atome, die als **Elektronendichteverteilung** bezeichnet wird. Diese Elektronendichteverteilung ρ an jedem Punkt (x,y,z) in einem Kristall kann durch die Gesamtheit der Größen f_j und \vec{r}_j ausgedrückt werden, womit sie sich als inverse FOURIER-Transformierte der Struktur Faktoren ergibt:

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |F_{hkl}| e^{i\varphi_{hkl}} e^{-2\pi i(hx+ky+lz)}$$

Der Phasenwinkel ϕ_{hkl} eines Reflexes, der den Gangunterschied des Reflexes im Vergleich zu einer am Ursprung der Elementarzelle gestreuten Welle angibt, ist hierbei der direkten Messung nicht zugänglich, da aus den integrierten Reflexintensitäten lediglich die Strukturamplituden $|\vec{F}_{hkl}|$, die proportional zu den Quadratwurzeln der gemessenen Intensitäten sind, bestimmt werden können. Diese Unbestimmtheit wird in der Proteinkristallographie als das **Phasenproblem** bezeichnet.

2.3.6 Lösung des Phasenproblems

Das Phasenproblem kann durch die Lokalisierung einer Substruktur gelöst werden. Zur Bestimmung der Substruktur können direkte Methoden (Hauptmann and Karle, 1953) oder PATTERSON-Methoden verwendet werden. Direkte Methoden werden vor allem bei der Phasenbestimmung von Kleinmolekülstrukturen angewandt, sind allerdings bislang noch nicht auf Proteinstrukturen übertragbar. Den PATTERSON-Methoden zur Lösung von Proteinstrukturen liegt eine Funktion zugrunde, die nur von den Strukturfaktoramplituden und nicht von den Phasen abhängig ist, die sogenannte **Patterson-Funktion**:

$$P(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |F_{hkl}|^2 \cos(2\pi[hu + kv + lw])$$

Die Maxima dieser Funktion entsprechen jedoch nicht den Atompositionen, sondern stellen die interatomaren Distanzvektoren dar. Daher entspricht die Symmetrie der PATTERSON-Synthese derjenigen der Elektronendichte ohne jegliche translatorische Symmetrieelemente mit Hinzufügen eines Inversionszentrums. Bedingt durch die kristallographischen Symmetrieelemente der jeweiligen Raumgruppe kommt es in bestimmten Bereichen dieser Dichtekarte zu einer Häufung von Distanzvektoren. Diese Bereiche werden **Harker-Ebenen** genannt.

Aufgrund der großen Anzahl von Atomen in einem Protein ist es jedoch nicht möglich aus der PATTERSON-Synthese direkt auf die Proteinstuktur zu schlie-

ßen und somit ein Modell für die initiale Phaseninformation zu erhalten. Statt dessen müssen Methoden angewandt werden, in denen Patterson-Synthesen von einfacheren Substrukturen interpretiert werden, um die Phaseninformation für die Proteinstruktur abzuleiten (SIR/MIR, MAD). Des Weiteren können experimentelle Patterson-Synthesen mit theoretischen verglichen werden, um ein ausreichend homologes Modell zur initialen Phasierung zu platzieren (MR).

Isomorpher Ersatz

Bei der Methode des isomorphen Ersatzes werden ein Datensatz eines nativen Proteinkristalles („NATI“) und in den meisten Fällen mehrere Datensätze unabhängiger isomorpher Schweratom-Derivate („DERI“) aufgenommen. Notwendige Eigenschaft eines verwendbaren Derivates ist vollständige Isomorphie der Proteinanordnung im Kristall und die geordnete Bindung von Schweratomen im kristallisierten Protein. In guter Näherung kann dann davon ausgegangen werden, daß die Differenzen in den bestimmten Strukturfaktoramplituden ($\Delta|\vec{F}|$) von DERI und NATI allein auf Differenzen in den Strukturen zurückzuführen sind, also auf die in dem DERI-Kristall zusätzlich vorhandenen Schwermetallatome.

Eine aus den $\Delta|\vec{F}|$ berechnete PATTERSON-Synthese sollte also nur die interatomaren Distanzvektoren der Schweratome beinhalten und deshalb durch ein geeignetes Schweratommodell interpretierbar sein, vorausgesetzt, die Anzahl der gebundenen Schweratome ist nicht zu hoch. Dies ist in der Praxis aufgrund der wesentlich geringeren Anzahl der Schwermetallatome im Vergleich zu den Proteinatomen möglich. Durch Vergleich von Nativ-, Derivat- und Differenzstrukturfaktoramplituden mit den komplexen Struktur Faktoren aus dem Schweratommodell können initiale Phasenwinkel für die Proteinstruktur Faktoren bestimmt werden. In manchen Fällen lassen sich so bereits mit einem Derivat hinreichend genaue Proteinphasen bestimmen (*Single Isomorphous Replacement*, SIR). Oft sind dazu jedoch mindestens zwei

unabhängige Derivate nötig (*Multiple Isomorphous Replacement*, MIR).

Abbildung 6 zeigt die Ermittlung initialer Phasenwinkel durch MIR.

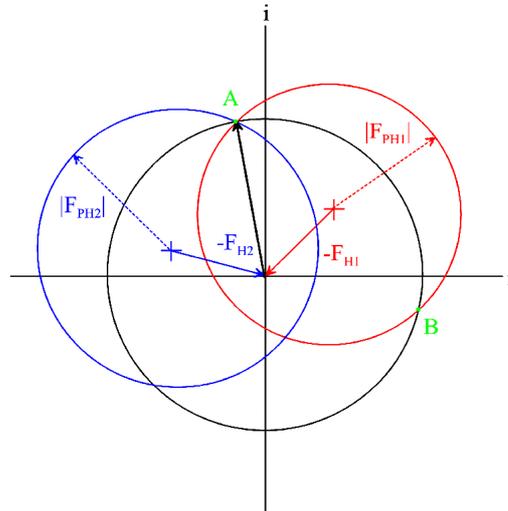


Abbildung 6: Harkerkonstruktion (Harker, 1956). Um den Ursprung wird ein Kreis mit dem Radius $|FP|$ für den jeweiligen Reflex gezeichnet (schwarz). Um $-\vec{F}_{H1}$ (Lage und damit Phase des Schwermetalls sind bekannt) wird ein weiterer Kreis mit dem Radius $|F_{PH1}|$ gezeichnet. Die beiden Schnittpunkte A und B ergeben zwei Möglichkeiten für \vec{F}_P . Mit einem zweiten Derivat kann diese Prozedur wiederholt werden und so die eindeutige Phase des Reflexes bestimmt werden (Schnittpunkt A).

Molekularer Ersatz

Bei der Methode des Molekularen Ersatzes, auch Faltmolekülmethode oder „*Molecular Replacement*“ (MR) genannt (Hoppe, 1957; Rossmann and Blow, 1962; Huber, 1965), liegt bereits ein Atommodell einer bekannten Kristallstruktur mit hinreichender Ähnlichkeit zum untersuchten Modell vor. Aus den Koordinaten des bekannten Suchmodells können nach Positionierung in der zu lösenden Struktur die Strukturfaktoramplituden $|\vec{F}_{calc}|$ und die Phasen Φ_{calc} berechnet werden. Mit den Modellphasen und den experimentell erhaltenen Strukturfaktoramplituden $|\vec{F}_{obs}|$ kann eine PATTERSON-Dichte $P(x,y,z)$ für die zu bestimmende Kristallstruktur berechnet werden.

Da sich in der Regel Raumgruppe und Orientierung des Suchmodelles in der Elementarzelle von der zu untersuchenden Struktur unterscheiden, muß das Suchmodell korrekt in der neu bestimmten Elementarzelle der unbekannt Struktur positioniert werden. Dieses sechsdimensionale Suchproblem lässt sich in jeweils drei Rotations- und Translationsvariable zerlegen. Die beiden Sätze von PATTERSON-Vektoren aus den gemessenen Strukturfaktoramplituden $|\vec{F}_{obs}|$ und aus den berechneten $|\vec{F}_{calc}|$ der Modellkoordinaten werden in einer Produktfunktion korreliert. Dabei wird der eine Vektorensatz in einer Rotationsfunktion in kleinen Winkelschritten um alle drei Achsen gegen den zweiten Satz gedreht. In einer eindeutigen Lösung der Rotationsfunktion werden die Vektoren innerhalb des Moleküles (Selbstvektoren) zur Deckung gebracht. Nach der korrekten Orientierung in der Rotation erfolgt die Positionierung durch eine anschließende Translation in allen drei Raumrichtungen der Elementarzelle, wozu die Kreuzvektoren zwischen den verschiedenen Molekülen eingesetzt werden. Durch FOURIER-Transformation lassen sich anschließend die Phasen berechnen. Als Faustregel gilt, daß diese Methode funktioniert, wenn die Homologie der Aminosäuresequenzen der beiden Proteine hoch und die r.m.s. Abweichung der Ca -Positionen der zwei Strukturen $< 1 \text{ \AA}$ ist.

Multiple anomale Dispersion

Eine weitere Möglichkeit zur Lösung des Phasenproblems bietet das Phänomen der anomalen Streuung. Die Elektronen, an denen die Streuung erfolgt werden normalerweise in guter Näherung als freie Elektronen beschrieben. Dies gilt in der Nähe der Absorptionskante eines Elements nicht mehr. Die inneren Elektronen interagieren mit dem Nukleus, so daß der gestreute Strahl nicht mehr die Phasendifferenz von 180° aufweist.

Bei der Bestimmung von Proteinphasen durch Multiple Anomale Dispersion (MAD) wird die Eigenschaft von Schweratomen als anomaler Streuer in Proteinkristallen ausgenutzt. Dazu wird Röntgenstrahlung mit variabler Wellenlänge (Synchrotronstrahlung) an der spezifischen Absorptionskante der Schweratome verwendet. In der Nähe dieser Absorptionskante des Elementes findet keine elastische Streuung der Elektronen statt. Wechselwirkung der Synchrotronstrahlung mit dem Atomkern, durch Ionisation eines Elektrons aus der K-Schale, bedingt eine Phasenverschiebung (anomale Streuung oder Dispersion), die sich von der Phasenverschiebung elastischer Streuung (180°) unterscheidet. Der Atomformfaktor ist somit nicht mehr länger eine reelle, sondern eine komplexwertige Zahl.

Dieses bedingt, daß die **Friedel-Partner** \vec{F}_{hkl} und \vec{F}_{-h-k-l} (Reflexe mit identischen Strukturformamplituden und Phasenwinkeln mit umgekehrten Vorzeichen) weder betragsmäßig noch in ihrem Phasenwinkelbetrag identisch sind, also die Strukturformfaktoren \vec{F}_{hkl} und \vec{F}_{-h-k-l} keine komplex-konjugierten Zahlen mehr sind (siehe Abbildung 7). Dadurch kann aus den Amplitudendifferenzen (**Bijovet-Differenzen**) dieser Reflexe eine PATTERSON-Synthese errechnet werden, aus der sich ein Modell der Substruktur aller bei einer bestimmten Wellenlänge anomal streuenden Atome erstellen läßt.

Analog zum MIR-Fall können in einem MAD-Experiment durch eine HARKER-Konstruktion initiale Proteinphasenwinkel bestimmt werden (siehe Abbildung 8).

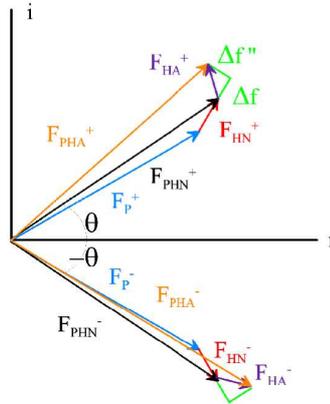


Abbildung 7: Der Einfluß der anomalen Dispersion auf Strukturfaktoren mit entgegengesetzten Vorzeichen für den Phasenwinkel. Ohne anomale Streuung gilt $F_{PHN}^+ = F_{PHN}^-$. Diese Strukturfaktoren setzen sich aus einem Beitrag des Proteines F_P und einem „normalen“ Beitrag F_{HN} des Schweratoms zusammen. Im Falle anomaler Streuung addiert sich eine reale Komponente Δf in Verlängerung zu F_{HN} und senkrecht dazu eine imaginäre Komponente $\Delta f''$, die stets einen kleinen Phasenwinkel dazu addiert. Als Folge davon weisen die kombinierten Strukturfaktoren aus „normalen“ und „anormalen“ Beiträgen F_{PHA}^+ und F_{PHA}^- sowohl unterschiedliche Amplituden als auch Phasenwinkel auf.

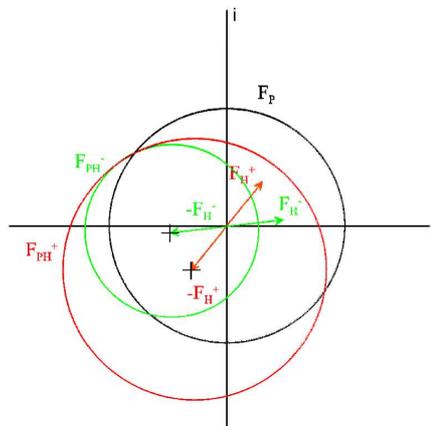


Abbildung 8: Vereinfachte Harkerkonstruktion, die die Ableitung eines eindeutigen Phasenwinkels mit Hilfe der anomalen Streuung erlaubt. Der Vektor für die „normalen“ Strukturfaktoramplituden ist mit F_P gegeben. Die beiden BIJOVET-Paare sind mit F_H^+ und F_H^- gekennzeichnet. F_H^- ist vereinfacht mit einem Phasenwinkel mit entgegengesetztem Vorzeichen dargestellt, damit sich die drei Kreise in einem Punkt schneiden. Im MAD Experiment wird F_P durch Messung eines remote Datensatzes bestimmt, dessen Wellenlänge weit von der Absorptionskante entfernt ist.

3 Material und Methoden

Soweit nicht ausdrücklich anders erwähnt, wurden alle verwendeten Chemikalien von den Firmen Aldrich (Steinheim), Fluka (Ulm), Merck (Darmstadt), Riedel-de-Häen (Seelze) oder Sigma (Deisenhofen) mit dem Reinheitsgrad p.a. bezogen.

3.1 Proteinchemische Methoden

3.1.1 Sequenzanalyse und -vergleich

Proteinsequenzen wurden aus der EMBL Datenbank (www.ebi.ac.uk) und aus der Swissprot Datenbank (www.expasy.ch) erhalten. Sequenzen wurden mit dem GCG Programmpaket (GCG, 1998) analysiert.

3.1.2 Konzentrierung von Proteinen

Die Aufkonzentrierung von Proteinen erfolgte durch Ultrafiltration in Zentrifugationskonzentratoren des Typs Centriprep und Centricon (Millipore) an YM5 oder YM10 Membranen durch Zentrifugation bei 3000-5000 x g.

3.1.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentration von Proteinen in Lösung wurde mit der Methode nach Bradford (Bradford, 1976) photometrisch bei 595 nm bestimmt. Dazu wurde eine Eichgerade mit BSA in den Konzentrationen 0,1 bis 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ im Absorptionsbereich von 0 bis 1,2 erstellt. 200 μl Bradfordreagenz (BioRad, München) wurden mit 1 bis 50 μl Probenlösung versetzt und mit Wasser auf 1 ml Volumen aufgefüllt. Die Extinktion bei 595 nm wurde nach 5 minütiger Inkubationszeit bei RT photometrisch bestimmt.

3.1.4 Massenspektrometrie

Die relativen Molekularmassen der gereinigten Wildtyp Riboflavin Kinase, 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase und der 7,8-Dihydroneopterin Aldolase wurden an einem Triple-Quadrupol Ionenspray-Massenspektrometer API365 (Fa. SciEx, Thornhill, Ontario, Kanada) bestimmt. Eine Eichung der m/z-Skala wurde mit Ammonium-Addukten von Polypropylenglykol-Oligomeren durchgeführt. Aus den m/z-Peaks aller erzeugten Molekülionen mit multipler Ladung wurden die durchschnittlichen Molekularmassen ermittelt (Covey *et al.*, 1988; Mann *et al.*, 1989). Die Spektren wurden freundlicherweise von Frau Elisabeth Weyher-Stingl am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried erstellt und ausgewertet.

3.2 Kristallographische Methoden

3.2.1 Kristallisation

Die Kristallisationsansätze erfolgten nach der Dampfdiffusionsmethode (McPherson, 1982) im sitzenden Tropfen *Sitting drop* in CrysChem Platten (Charles Supper Company). Die CrysChem Platten werden mit transparenter Klebefolie (CrystalClear, MancoInc., Avon, USA) verschlossen. Der Kristallisationsverlauf wird über mehrere Monate bei 20 °C verfolgt. Für das *Screening* einer großen Anzahl von Kristallisationsbedingungen wird das Prinzip des *sparse matrix sampling* angewandt (Carter and Carter, 1979; Jancarik and Kim, 1991). Dabei werden jeweils 2 μ l (10 mg/ml) Proteinlösung mit 2 μ l des Kristallisationspuffers vermischt und gegen 300 μ l Reservoirlösung äquilibriert. In weiteren Versuchen kommen verschiedene Präzipitanzen (u.a. PEG verschiedener Molekulargewichte, MPD, Ammoniumsulfat, NaCl, Natriumcitrat) variiert gegen verschiedene pH-Werte, sowie unterschiedliche Additive (Hampton Research, USA) zum Einsatz.

3.2.2 Datensammlung

Kristalle wurden zur Messung von Raumtemperaturdaten in silanisierte Glaskapillaren von 0.7 mm Durchmesser gesaugt und mit Löschpapierstreifen oder dünn ausgezogenen Glaskapillaren vollständig vom Lösungsmittel befreit. Um ein Austrocknen zu verhindern wurden beide Seiten der Kapillare mit Reservoirlösung gefüllt und mit Dentalwachs (Richter&Hoffmann Harvard Dental GmbH) verschlossen. Die Kapillaren wurden auf einem Goniometerkopf fixiert und mit Drehwinkeln von $0.5 - 3^\circ$ auf der Drehanode (Rigaku RU-200, 50 kV, 100 mA) vermessen. Detektiert wurde mit einer MARResearch *Imageplate*.

Zur Messung von *cryo*-Daten wurden die Kristalle in Schlaufen aus Zahnseide (Hampton Research) geangelt, in den jeweiligen Cryopuffer eingelegt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Gemessen wurden die Kristalle am Max-Planck-Institut mit Kupfer- K_α -Röntgenstrahlung ($\lambda = 1.542 \text{ \AA}$) mit einer *Imageplate* (Marresearch, Hamburg), die auf einem Röntgendrehanodengenerator (Rigaku RU-200, Tokio, Japan; Leistung 50 kV, 100 mA) montiert war.

3.2.3 Datenauswertung

Die Bestimmung der Kristallorientierung, der Raumgruppe und der Elementarzelle erfolgte mit zwei verschiedenen Programmpaketen. Je nach Datenqualität wurde entweder das HKL Programmpaket (Otwinowski and Minor, 1997) benutzt oder die Indizierung der Daten und die Bestimmung der Reflexintensitäten wurden mit MOSFILM (Leslie, 1998) durchgeführt. Die Datenreduktion erfolgte dann mit dem Programm SCALA und TRUNCATE (CCP4, 1994).

3.2.4 Phasierung

Die Bestimmung von Schweratomlagen erfolgte mit dem Programm SHELXS (Sheldrick *et al.*, 1993). Die Verfeinerung der Schweratomparameter sowie die Berechnung

von Proteinphasen wurden mit dem Programm MLPHARE (Otwinowski and Minor, 1997) durchgeführt. Der Molekulare Ersatz wurde mit AMORE (Navaza, 1994) durchgeführt.

3.2.5 Modellbau und Verfeinerung

Atommodelle wurden auf einer SILICON GRAPHICS *work station* mit dem Programm MAIN (Turk, 1992) in die Elektronendichtekarten eingepaßt. Hierbei wurde die Realraum-Verfeinerungsoption benutzt, um eine möglichst gute Anpassung an die Elektronendichte zu erhalten. Die Atommodelle wurden mit CNS verfeinert (Brünger, 1998). Als Zielfunktion wurde der kristallographische R-Faktor minimiert, wobei geometrische Parameter (Engh and Huber, 1991) berücksichtigt wurden, da die Zahl der Observablen im Verhältnis zur Anzahl der verfeinerten Parameter in der Proteinkristallographie im allgemeinen nicht ausreichend überbestimmt ist. Das Gewichtsverhältnis zwischen kristallographischem und geometrischem Term wurde dabei zu Beginn der Verfeinerung bestimmt und mit fortschreitender Qualität des Modelles schrittweise erhöht. Um ein objektives Kriterium für den Erfolg der Verfeinerungsrechnungen zu haben, wurden 5 % bzw. 10 % der Reflexe zufällig ausgewählt und als TEST-Satz nicht in die Verfeinerung einbezogen (Brünger, 1992). Der so berechnete freie R-Faktor, im Regelfall 5 % höher als der kristallographische R-Faktor, warnt dabei vor einer Überanpassung des Atommodelles an die Daten. Positionelle Verfeinerung und *simulated annealing* (SA) alternierten mit visueller Inspektion der Elektronendichte und manuellem Einpassen bis zu einem Absinken des R-Faktors auf 30 %. Danach wurden Wassermoleküle automatisiert mit CNS eingebaut. Im Anschluss an die Koordinatenverfeinerung wurden individuelle Temperaturfaktoren verfeinert. Dabei wurden Einschränkungen auferlegt für direkt verknüpfte Atome und für über einen Winkel verknüpfte Atome, jeweils für Haupt- und Seitenketten. Die Zielwerte der Standardabweichungen betragen dabei $1,5\sigma$ (Hauptkette)

und $2,0\sigma$ (Seitenkette) für benachbarte Atome und $2,0\sigma$ (Hauptkette) und $2,5\sigma$ (Seitenkette) für über Winkel verknüpfte Atome.

3.2.6 Modellanalyse und graphische Darstellung

Die Molekülgeometrien wurden mit dem Programm PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) auf Datenkonsistenz überprüft und geometrisch analysiert. Überlagerungen und *least square fits* von Koordinaten wurden mit TOP3D (CCP4, 1994) durchgeführt.

Sekundärstrukturelemente wurden mit dem Programm STRIDE (Frishman and Argos, 1995) zugeordnet. Die Ligandenmodelle von Ribulose-5-Phosphat und Guanin wurden mit dem Programm SYBYL Version 6.4 (Tripos Inc., St. Louis, USA 1997) generiert und energetisch minimiert.

Zur graphischen Darstellung von Molekülmodellen wurden die Programme BOBSCRIPT (Esnouf, 1997), MOLSCRIPT (Kraulis, 1991) und Swiss-PdbViewer (www.expasy.ch/spdv) benutzt. Zur Darstellung von Sequenzvergleichen wurde das Programm ALSCRIPT (Barton, 1993) angewandt.

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

4 Ergebnisse

4.1 *Candida albicans* 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase

4.1.1 Kristallisation

Die DHBPS aus *C. albicans* wurde in einem rekombinanten *E. coli* Stamm als funktionelles Protein überexprimiert (Echt, 2004) und freundlicherweise von Herrn Dr. Markus Fischer von der Technischen Universität München zur Verfügung gestellt. Das Protein wurde mit Konzentrationen im Bereich von 17-34 mg/ml in *Sitting drop* Kristallisationsexperimenten eingesetzt. Je 3 μ l des aufkonzentrierten Proteines wurden mit 1 μ l der optimierten Präzipitanslösung 85 mM Na-Citrat, pH 5,0 und 17% (w/v) PEG 8000 versetzt und gegen 300 μ l Bodenpuffer der selben Bedingung bei 20°C äquilibriert. Aus diesen Ansätzen wuchsen nach ca. 24 Std. röntgentaugliche Proteinkristalle bis zu einer Größe von etwa 120 μ m x 100 μ m x 70 μ m heran. Kristalle sowie das Diffraktionspattern der *C. albicans* DHBPS sind in Abbildung 9 gezeigt.

Die Kristalle der nativen, apo-Form der DHBPS wurden zur Charakterisierung von Substratkomplexen in *Soaking*-Kristallisationsexperimenten eingesetzt. Dabei wurden die Kristalle in einer 2 mM D-Ribulose-5-phosphat (Ru5P) Substratlösung für 5 Minuten *gesoakt*.

4.1.2 Datensammlung und Strukturlösung

Zur Datensammlung unter Cryo-Bedingungen (100 K) wurden Kristalle der apo-Form der DHBPS und die mit Ru5P *gesoakten* Kristalle in einen Tropfen aus Mutterlauge/17,5% Glycerin überführt. Die Indexierung der jeweiligen Diffraktionsdaten zeigte eine triklone Gittermetrik mit den Gitterkonstanten $a = 40, 44 \text{ \AA}$,

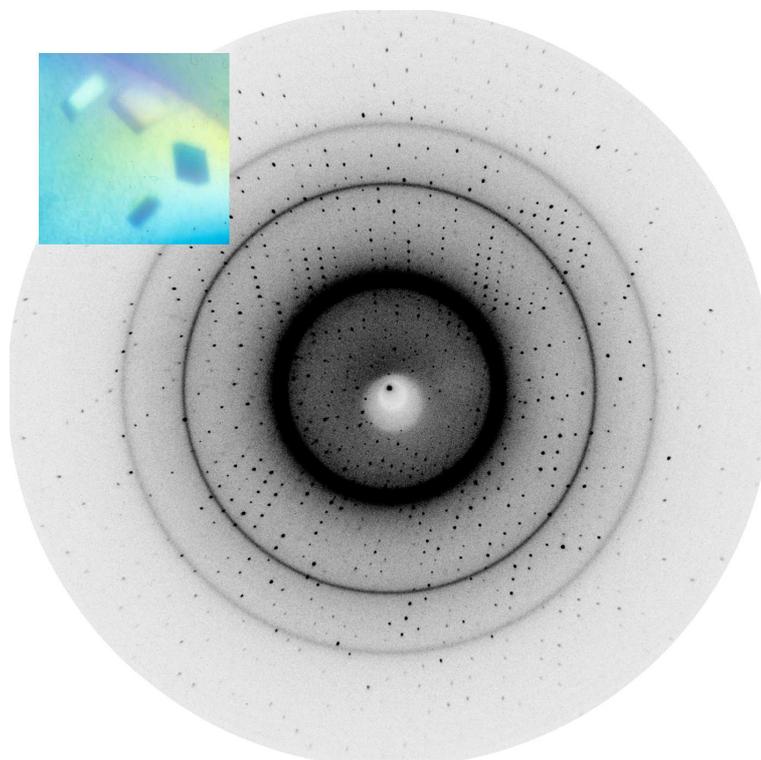


Abbildung 9: Diffraktionsmuster (maximale Auflösung: 1,6 Å, Rotation: 1,0°, Wellenlänge $\lambda = 1,542 \text{ \AA}$) und Kristalle der *C. albicans* DHBPS in 85 mM Na-Citrat pH 5,0 und 17% PEG 8000.

$b = 48,13 \text{ \AA}$, $c = 59,80 \text{ \AA}$ und $\alpha = 66,23^\circ$, $\beta = 71,98^\circ$, $\gamma = 89,86^\circ$. Die Datensätze der apo-Form und des Substrat-Komplexes sind somit zueinander absolut isomorph. In beiden Fällen konnten vollständige Datensätze der apo-DHBPS und der Ru5P/DHBPS bis zu einer maximalen Auflösung von 1,6 Å (apo), bzw 1,7 Å (Ru5P) gesammelt werden. Diese triklinische Kristallform enthält ein DHBPS-Dimer in der asymmetrischen Einheit mit einem Solvensgehalt von 44% (Matthews, 1968). Die apo-Struktur wie auch die Ru5P-Komplexstruktur der *C. albicans* DHBPS wurden mit Hilfe der PATTERSON-Suchmethode (*Molecular Replacement*) mit dem Programm AMORE (Navaza, 1994) gelöst. In beiden Fällen wurden Daten in einem Auflösungsbereich von 15-3,5 Å verwendet. Zur Lösung der apo-Kristallstruktur diente die *E. coli* DHBPS Struktur (PDB-ID: 1G57) als

Suchmodell. Die korrekte *Replacement* Lösung wurde nachfolgend in einer Suche der Substrat-Komplexstruktur eingesetzt. Eine F_o - F_c -Fouriersynthese wies eindeutig ein gebundenes Ru5P Substratmolekül in beiden Untereinheiten des Dimers in der asymmetrischen Einheit auf.

Die Ergebnisse der Datenprozessierung sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

	nativ	Ru5P
Raumgruppe	P1	P1
Zellkonstanten		
a	40,4	40,2
b	48,1	47,9
c	59,8	59,8
α	66,2	66,4
β	71,9	72,3
γ	89,8	89,9
Auflösungsbereich [\AA]	20,0-1,6	20,0-1,7
gemessene Reflexe	165698	128699
unabhängige Reflexe	43264	39461
Multiplizität	3,8	3,2
R_{merge}^a [%]	5,9	3,2
Vollständigkeit [%]	84,4	77,3

$$^a R_{merge} = \sum_{hkl} [(\sum_i |I_i - \langle I \rangle|) / \sum_i I_i].$$

Tabelle 1: Übersicht zur Datenprozessierung.

4.1.3 Modellbau, Verfeinerung und Qualität des Atommodelles

Die sehr gute Qualität der gemessenen Daten bis zu einer Auflösung von 1,6 Å ermöglichte den Einbau von 90 % der insgesamt 408 Aminosäuren des nativen Dimers der *C. albicans* DHBPS bereits im ersten Zyklus des manuellen Modellbaus unter Verwendung des Programmes MAIN (Turk, 1992). Nach einer anschließenden *Rigid body* Minimierung und einem *Simulated annealing* bei 2500 K wurde das Modell schließlich mit dem Programm CNS unter Verwendung des maximum-likelihood Algorithmus (Brünger, 1998) verfeinert. Das Substrat wurde mit dem Programm SYBYL gebaut und die Parametersätze berechnet, die als *Restraints* in der Verfeinerung verwendet wurden. In iterativen Zyklen von Modellbau, Einbau von Wassermolekülen und Verfeinerung des Atommodelles, gefolgt von einer abschließenden individuellen B-Faktorverfeinerung, konvergierte der kristallographische R-Faktor bei 18,4 % ($R_{free} = 21,8\%$).

Während aller Stadien der Verfeinerung war für die interne Region von Asn78 bis His83 keine Elektronendichte in diesem Bereich sichtbar. Dieser ungeordnete Teil des Proteins wurde nicht in das finale Atommodell eingebaut und lässt auf eine hohe Flexibilität dieser Region schließen. In beiden monomeren Untereinheiten waren die beiden N-terminalen Reste Met und Thr ebenfalls nicht geordnet. Das final verfeinerte, dimere Atommodell der apo-Form der DHBPS enthält somit 390 der insgesamt 408 Aminosäuren. Die bis zu einer maximalen Auflösung von 1,7 Å berechnete experimentelle Elektronendichte der DHBPS komplexiert mit Ru5P war ebenfalls von sehr guter Qualität. Die hohe Flexibilität der internen Region von Asn78 bis His83 zeigte sich, wie schon in der apo-Struktur, auch in der Substrat-Komplexstruktur. Auch hier sind die beiden N-terminalen Aminosäuren nicht geordnet.

Eine Überprüfung der Bindungsgeometrien der Proteinhauptkette der *C. albicans* DHBPS zeigte, daß sich 88,9 % (nativ) bzw. 89,9 % (Ru5P) aller Aminosäuren (Gly-

ein und Prolin ausgenommen) in den am meisten bevorzugten Bereichen befinden, während 11,1 % (nativ) bzw. 10,1 % (Ru5P) in zusätzlich erlaubten Bereichen liegen. Keine Aminosäure zeigt eine Bindungsgeometrie, die in den weitläufig erlaubten, oder verbotenen Bereich der Ramachandran-Statistik (Ramachandran and Sasisekharan, 1968) fallen würde. Die Qualität des verfeinerten Modelles wurde mit dem Programm PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) überprüft.

Die Verfeinerungsstatistik der beiden Datensätze ist in Tabelle 2 gezeigt.

	nativ	Ru5P
Anzahl Proteinatome	3034	3034
Anzahl Wassermoleküle	692	672
Anzahl Ligandenatome	-	27
R-Faktor ^a [%]	19,2	18,4
R _{free} ^b [%]	21,9	21,8
r.m.s.-Abweichung vom Idealwert der		
Bindungslängen [Å]	0,005	0,005
Bindungswinkel [°]	1,19	1,27
Mittlerer B-Faktor, Protein [Å ²]	12,9	12,1
Mittlerer B-Faktor, Ligand [Å ²]	-	27,8
Mittlerer B-Faktor, Solvens [Å ²]	28,3	28,0
(ΦΨ) Winkel Verteilung im		
bevorzugten Bereich [%]	88,9	89,9
zusätzlich erlaubten Bereich [%]	11,1	10,1
^a R-Faktor = $\frac{\sum_{hkl \subset W} F_{obs} - k F_{calc} }{\sum_{hkl \subset W} F_{obs} }$		
^b R _{free} = $\frac{\sum_{hkl \subset T} F_{obs} - k F_{calc} }{\sum_{hkl \subset T} F_{obs} }$		

Tabelle 2: Übersicht zur Datenprozessierung und Verfeinerung.

4.1.4 Strukturbeschreibung

In Übereinstimmung mit den Strukturen der Enzyme aus *E. coli* (Liao *et al.*, 2001), *M. grisea* (Liao *et al.*, 2002) und *M. jannaschii* (Steinbacher *et al.*, 2003) liegt die DHBPS aus *Candida albicans* als $\alpha+\beta$ Homodimer mit einer Größe von 46 kDa vor. Abbildung 10 zeigt eine Ribbondarstellung des DHBPS-Dimeres mit dem gebundenen Ribulose-5-phosphat.

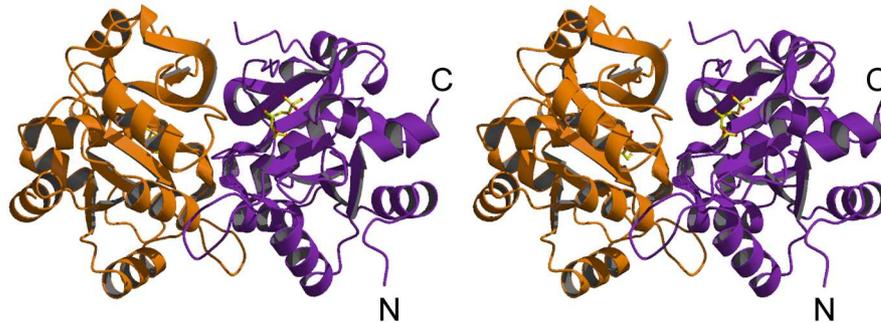


Abbildung 10: Stereodarstellung der Struktur der DHBPS aus *C. albicans* mit dem gebundenen Substrat Ribulose-5-phosphat.

Die Interaktion der beiden Monomere beruht hauptsächlich auf hydrophoben Wechselwirkungen im Bereich der Dimer-Kontaktfläche. Die jeweiligen N- und C-Termini eines jeden Monomers liegen somit an den entgegengesetzten Enden des Dimeres. Jedes Monomer besteht aus sieben Helices, die ein zentrales acht-strängiges gemischtes β -Faltblatt umgeben. Dieses zentrale Faltblattmotiv ist in sich um etwa 180° verdreht und zeigt komplexe und relativ ungewöhnliche Konnektivitäten. So enthält das Faltblatt drei Überkreuzungen. Die erste Überkreuzung verbindet das C-terminale Ende von Strang S2 mit dem N-terminalen Ende von Strang S3. Der C-Terminus vom Strang S3 wird durch die zweite Überkreuzung mit dem N-Terminus von S4, während der C-terminale Teil vom Strang S7 mit dem N-terminalen Teil von

Strang S8 durch die dritte Überkreuzung verbunden wird. Jede dieser Überkreuzungen weist eine einzelne α -Helix von zwei bis drei Umdrehungen auf, die sich alle auf derselben Seite des β -Faltblatts befinden. Zwischen dem C-terminalen Ende von S4 und dem N-terminalen Ende von S5 liegt ein Bereich von 6 Aminosäure-Resten, der sich aufgrund fehlender Elektronendichte in hohem Maße flexibel erweist. Bei diesem Bereich handelt es sich um einen Loop, der zwei verschiedene Orientierungen einnehmen kann. In den bekannten Strukturen von *M. jannaschii* und *M. grisea*, mit und ohne Liganden, führt dies zu einer offenen bzw. geschlossenen Konformation des aktiven Zentrums. Diese Umlagerung zu einer geschlossenen Konformation des aktiven Zentrums bei der Ligandierung spielt wahrscheinlich eine entscheidende Rolle bei der Zugangskontrolle des Substrates zum aktiven Zentrum (Liao *et al.*, 2002; Steinbacher *et al.*, 2003). Der saure Loop von Asp24 bis Asp34, der maßgeblich an der Ligandenbindung beteiligt ist und in beiden apo-Strukturen der *M. grisea* und *M. jannaschii* DHBPS sehr flexibel ist, erweist sich sowohl in der nativen wie auch in der Komplex-Struktur der *C. albicans* DHBPS als hoch geordnet. Dieser Loop, der ebenfalls in einer offenen bzw. geschlossenen Konformation vorliegen kann, zeigt hier für die apo-Form und den Ru5P-Komplex ein und dieselbe Konformation.

Ein Vergleich der *C. albicans* DHBPS-Struktur mit den bereits bekannten Strukturen der DHBPS aus *E. coli*, *M. grisea* und *M. jannaschii* offenbarte eine große strukturelle Ähnlichkeit. Die Strukturen konnten mit r.m.s.-Abweichungen von 0.86 Å (*M. grisea*), 1.22 Å (*M. jannaschii*) und 1.03 Å (*E. coli*) für 188 (*M. grisea*), 168 (*M. jannaschii*) und 186 (*E. coli*) C α -Atome überlagert werden.

4.1.5 Struktur des aktiven Zentrums und Ligandenbindung

Das aktive Zentrum der *C. albicans* DHBPS konnte mittels Strukturdaten des Protein/Ru5P-Komplexes charakterisiert werden.

Die beiden topologisch äquivalenten aktiven Zentren des Enzymes liegen an der Dimer-Kontaktfläche und werden jeweils hauptsächlich von den Resten eines Monomeres gebildet. Diese Reste entstammen vor allem dem zentralen β -Faltblatt und dem N-Terminus der α -Helix von Arg142 bis Thr146, welche den zentralen Rest His145 beiträgt. Der saure Loop des aktiven Zentrums von Asp25 bis Asp34, sowie Glu166 und Tyr87 sind weitere wichtige Bestandteile des aktiven Zentrums. Die Reste Thr99 und His128 tragen durch das jeweils andere Monomer zum aktiven Zentrum bei.

Abbildung 11 zeigt die Ru5P-Bindungsstelle von *C. albicans* mit der finalen $2F_o - F_c$ -Elektronendichte über dem gebundenen Molekül.

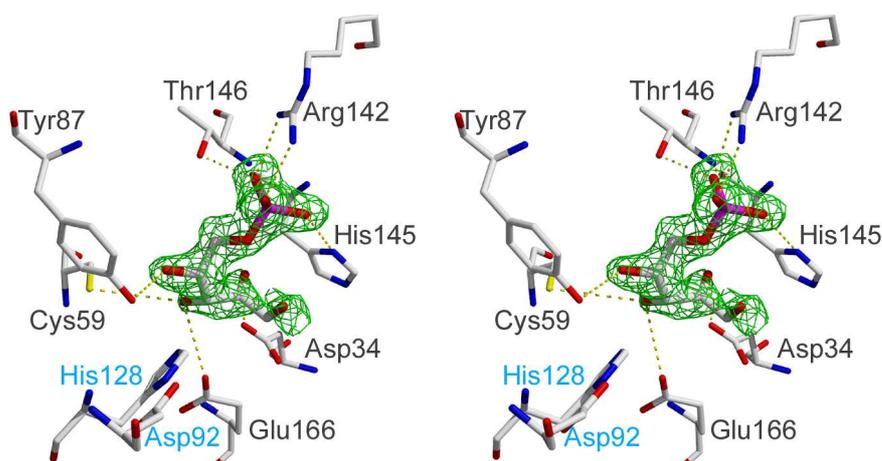


Abbildung 11: Stereoabbildung des aktiven Zentrums der 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase aus *C. albicans* mit dem gebundenen Ribulose-5-phosphat. Die blau gekennzeichneten Reste gehören zum benachbarten Monomer. Die $2F_o - F_c$ -Elektronendichte ist bei 1σ konturiert.

Die Fixierung des C1-C2-Teiles von Ru5P erfolgt durch Asp34, welches eine Wasserstoffbrücke zum C2-Carbonylsauerstoffatom ausbildet. Die C3-Hydroxylgruppe des Liganden wird durch Wasserstoffbrücken-Wechselwirkungen zwischen Glu166 und Cys59 stabilisiert, während die Stabilisierung der C4-Hydroxylgruppe durch eine Wasserstoffbrücke zu Tyr87 erfolgt. Die Phosphatgruppe des Liganden wird durch

Wasserstoffbrücken zu den Seitenketten von Thr85, Arg142, His145 und Thr146 stabilisiert. Alle Wechselwirkungen finden zwischen dem Liganden und den Seitenketten dieser konservierten Aminosäuren statt.

Die Konformation des aktiven Zentrums mit gebundenem Ru5P unterscheidet sich nicht von derjenigen der nativen Struktur. Aufgrund der fehlenden Metallionen liegt vermutlich ein unphysiologischer Bindungsmodus für den Liganden vor, der sich von dem der Komplexstruktur der *M. jannaschii* DHBPS unterscheidet. Beiden Komplexen gemeinsam ist jedoch die strukturelle Zusammensetzung der Phosphatbindungsstelle.

In Abbildung 12 ist eine Überlagerung der aktiven Zentren der DHBPS aus *C. albicans* und *M. jannaschii* gezeigt.

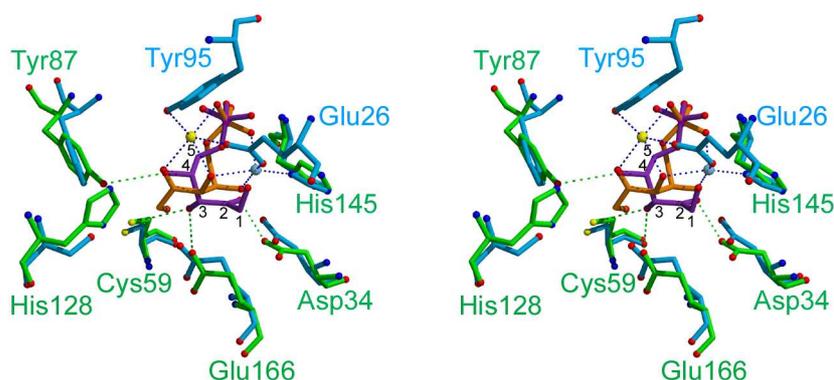


Abbildung 12: Vergleich der aktiven Zentren der DHBPS aus *C. albicans* (grün) und aus *M. jannaschii* (blau): Die Überlagerung zeigt zwei verschiedene Konformationen für das gebundene Ribulose-5-phosphat (*C. albicans*: violett; *M. jannaschii*: orange). Für die DHBPS aus *M. jannaschii* sind die Wechselwirkungen mit den gebundenen Metallionen gezeigt.

Die Ribulosegruppe des Liganden bindet deutlich verschieden an das Enzym, verglichen mit dem gemodellten Komplex aus *M. grisea* (Daten nicht gezeigt) und dem experimentellen Komplex der Mutante H147S aus *M. jannaschii*. In diesen Strukturen bildet das Cystein eine Wasserstoffbrücke zur C1-Hydroxylgruppe und

das Aspartat zur C4-Hydroxylgruppe. Das Histidin, welches in *M. jannaschii* gegen ein Serin ausgetauscht wurde, bildet eine Wasserstoffbrücke zu einem der Phosphat-Sauerstoffatome aus. In *M. jannaschii* wechselwirkt es vermutlich mit der C1-Hydroxylgruppe. Tyr87 (Tyr94 in *M. grisea*), wechselwirkt mit dem C2-Carbonylsauerstoffatom des Liganden. In *M. jannaschii* entspricht dieser Rest einem Phenylalanin, welches lediglich hydrophobe Beiträge leistet. Nur das Glutamat zeigt die gleichen Wechselwirkungen wie in den beiden anderen Komplexen. Auch die Phosphatgruppe wird auf dieselbe Weise stabilisiert wie in *M. jannaschii*. Die Bindungsaffinität für das Substrat Ru5P wird größtenteils durch die Wechselwirkungen der Phosphatgruppe mit der gut definierten Phosphat-Bindungsstelle charakterisiert. Das Substrat kann daher auch in Abwesenheit zweiwertiger Metallionen an das aktive Zentrum binden. Ist Ru5P an Metallionen im aktiven Zentrum von *M. jannaschii* gebunden, liegt es in einer kompakten Geometrie vor. Diese ermöglicht es, daß C5 zu C3 wandern kann und letztendlich C4 als Formiat freigesetzt wird.

4.1.6 Strukturvergleich

Die Überlagerung des nativen Enzymes und des Ru5P-Komplexes zeigt keine signifikanten konformellen Umlagerungen des sauren Loops (*flap I*). Sowohl in der *M. jannaschii* als auch in der *M. grisea* Struktur werden zwei verschiedene Konformationen dieses Loops, eine offene und eine geschlossene, beobachtet. In den ligand-freien Strukturen zeigt dieser Loop vom aktiven Zentrum weg. In den Komplexen schließt dieser *flap I* den Hohlraum des aktiven Zentrums ab und interagiert jeweils direkt mit den Metall-Ionen über die streng konservierten Reste E26 (*M. jannaschii*) und E37 (*M. grisea*). In *C. albicans* liegt dieser Loop in einer Konformation vor, die mit keiner der oben genannten Konformationen für die *M. jannaschii* und *M. grisea* Strukturen kompatibel ist. Da dieser Loop vom aktiven Zentrum weg zeigt, wird diese Konformation im Komplex und in der ligand-freien Struktur als

offen bezeichnet. Der zweite Loop (*flap II*) um Rest 78 bis 83 wird ebenfalls in zwei Konformationen in den oben genannten Strukturen beobachtet. Dies steht jedoch im Gegensatz zu den beiden *C. albicans* Strukturen (nativ und Ru5P-Komplex), in denen diese Region nicht durch die Elektronendichte definiert ist. In *M. jannaschii* ist ein Einschub von 16 Resten Teil dieses Loops, welcher in den anderen DHBPS in dieser Länge nicht beobachtet wird (Abbildung 13).

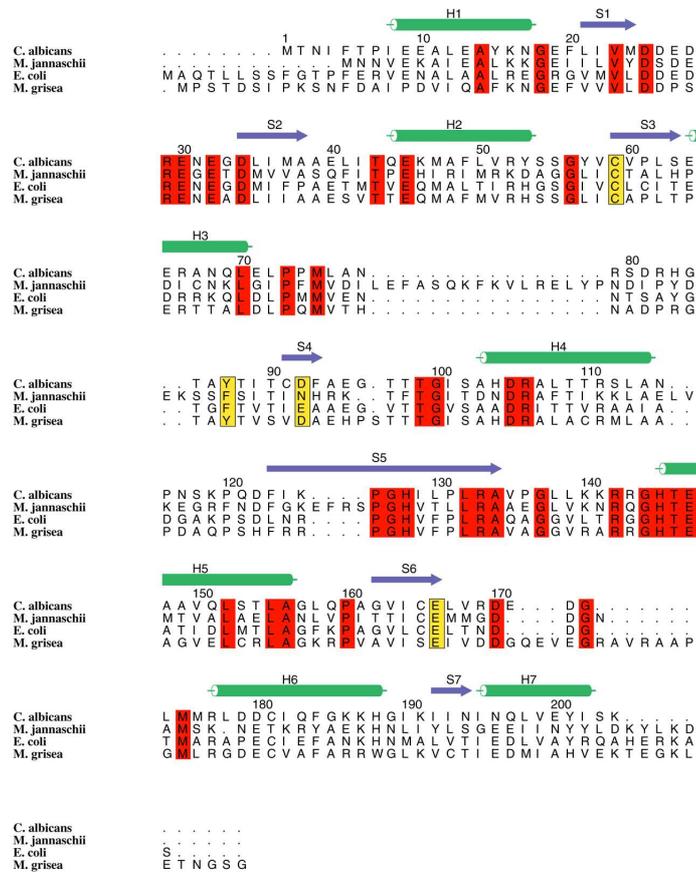


Abbildung 13: Sequenzalignment der 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase aus *C. albicans* und den anderen bekannten Strukturen. Mutierte Reste sind gelb hinterlegt. Konservierte Reste sind rot dargestellt. Über dem Alignment sind die Sekundärstrukturelemente des Enzymes aus *C. albicans* gezeigt.

Dieser sogenannte *flap II* wird ebenfalls in einer offenen und einer geschlossenen Konformation für die ligand-freien Enzyme und die Komplexe aus *M. jannaschii* und *M. grisea* beobachtet.

Abbildung 14 zeigt einen Vergleich des *C. albicans* Ru5P-Komplexes und der Komplexe aus *M. jannaschii* (blau) und *M. grisea* (grün) hinsichtlich der Konformationen des sauren Loops (*flap I*) und des Loops um die Reste 78 bis 83 (*flap II*).

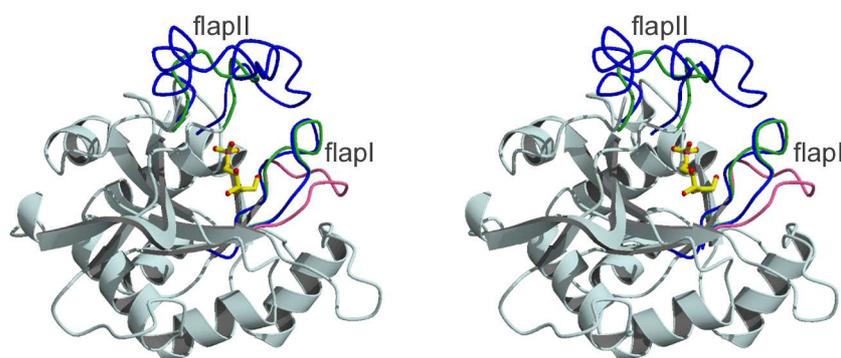


Abbildung 14: Überlagerung der Komplex-Strukturen der DHBPS aus *C. albicans* (grau) und *M. jannaschii* (grün). Der saure Loop der *C. albicans* DHBPS ist in pink dargestellt. Es ist nur das Substrat Ru5P (gelb) des *C. albicans* Komplexes gezeigt.

4.1.7 Diskussion

3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase katalysiert die Umsetzung von Ribulose-5-phosphat zu 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat und liefert somit den zweiten Ausgangsstoff der Riboflavin-Biosynthese. In der vorliegenden Arbeit konnte sowohl die Struktur der nativen *C. albicans* 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthase, als auch eine Komplex-Struktur mit dem Substrat Ribulose-5-phosphat in Abwesenheit des katalytisch notwendigen Mg^{2+} gelöst werden. Die Struktur der *C. albicans* DHBPS weist die gleiche Faltung auf wie die entsprechenden Enzyme aus

E. coli, *M. grisea* und *M. jannaschii*. Aufgrund des fehlenden zweiwertigen Metallions ergibt sich ein nichtphysiologischer Bindungsmodus für das Substrat, der sich von dem, in *M. jannaschii* beobachteten, unterscheidet. Aufgrund der Tatsache, daß Ru5P auch in Abwesenheit von Metallionen gebunden wird, wird die Vermutung bestätigt, daß das Metall nicht zur Substratbindung benötigt wird (Kelly *et al.*, 2001).

Ein Strukturvergleich der bekannten DHBPS-Strukturen aus *C. albicans*, *E. coli*, *M. grisea* und *M. jannaschii* offenbart deutliche Konformationsunterschiede im Bereich des katalytisch aktiven sauren Loops. Dieser als *flap I* bezeichnete Bereich liegt sowohl in der apo-Form, als auch im Substratkomplex der *C. albicans* DHBPS in derselben, offenen Konformation vor. Im Gegensatz hierzu wird der saure Loop in den apo-Strukturen der *M. grisea* und *M. jannaschii* in einer verschiedenen offenen Konformation beobachtet. In diesen Enzymen war dieser Bereich in der Elektronendichtekarte teilweise nur schlecht definiert. Erst in Anwesenheit eines Liganden und der Metallionen ergab sich eine geordnete, geschlossene Konformation. In *C. albicans* war die Elektronendichtekarte von *flap I* hingegen von Beginn an sehr gut definiert. In der geschlossenen Konformation erfolgt die Metallbindung durch die konservierten Reste Glu26 (*M. jannaschii*) bzw. Glu37 (*M. grisea*) (Steinbacher *et al.*, 2003; Liao *et al.*, 2002) des sauren Loops. Die alleinige Anwesenheit des Substrates Ru5P kann nicht die Stabilisierung der geschlossenen Konformation des sauren Loops vermitteln. Dies wird erst durch die Bindung zweiwertiger Metallionen ermöglicht.

4.2 Riboflavin-Kinase aus *Schizosaccharomyces pombe*

Die Struktur der nativen Riboflavin-Kinase aus *Schizosaccharomyces pombe* wurde bereits zuvor gelöst (Bauer, 2001). Der Vollständigkeit halber und zum besseren Verständnis wird im Folgenden jedoch nochmals auf die Kristallisation, Strukturlösung und Beschreibung der nativen Struktur eingegangen.

4.2.1 Kristallisation

Apo-Form der Riboflavin-Kinase

Die Riboflavin-Kinase aus *S. pombe* wurde in einem rekombinanten *E. coli* Stamm als funktionelles Protein überexprimiert (Kemter, 2002) und freundlicherweise von Herrn Dr. Markus Fischer von der Technischen Universität München zur Verfügung gestellt. Für die Kristallisation wurde die Proteinlösung (20 mM Tris/HCl pH 8,0 und 100 mM NaCl) über Membranen der Ausschlußgrenze 10 kDa auf die gewünschte Konzentration von 10 mg/ml eingestellt. Je 2 μ l des aufkonzentrierten Proteines wurden in *Sitting drop* Kristallisationsexperimenten mit der gleichen Menge der optimierten Präzipitanslösung 100 mM Mes/NaOH pH 6,5, 200 mM Magnesiumacetat und 20 % (w/v) PEG 8000 versetzt und gegen 300 μ l Bodenpuffer der selben Bedingung bei 20°C äquilibriert. Aus diesen Ansätzen wuchsen nach ca. 24 Std. röntgentaugliche Proteinkristalle bis zu einer Größe von etwa 100 μ m x 80 μ m x 50 μ m heran (Abbildung 15).

Soaking und Co-Kristallisationsexperimente

Die Kristalle der nativen, apo-Form der Riboflavin-Kinase wurden in einer Reihe von *Soaking* Experimenten zur Erlangung verschiedener Substrat-Komplexe eingesetzt. Dazu wurden Einkristalle in den entsprechenden 2 bis 10 mM Substratlösungen von Riboflavin, FMN, ADP und ATP über einen Zeitraum von 2 Std. *gesoakt*

und anschließend vermessen. Eine kristallographische Analyse der verwendeten apo-Kristalle ergab jedoch, daß symmetrieverwandte Moleküle der Kristallform P6₁22 einen Zugang zur potentiellen Bindungsstelle für die verwendeten Substrate blockieren. Da in Lösung die Bindungsstelle der Riboflavin-Kinase freizugänglich sein sollte, wurden die entsprechenden Substrat-Proteinkomplexe (2 mM Riboflavin bzw. FMN, ADP oder ATP und 10 mg/ml Proteinlösung) zuvor angesetzt und anschließend in Co-Kristallisationsexperimenten pipettiert.

Co-Kristalle des Komplexes ADP/Ribflavin-Kinase wuchsen nach einer Woche aus 50 mM NaKHPO₄ und 20-22 % PEG 8000 bei 20 °C. Diese ADP-Komplex Kristalle wurden in weiterführenden *Soaking*-Experimenten mit 2 mM FMN und 5 mM ZnCl₂ eingesetzt, da bei der kristallographischen Analyse ihrer Kristallform P1 eine Zugänglichkeit der Substratbindungsstelle beobachtet werden konnte. In einer F_o-F_c-Fouriersynthese eines ternären ADP/FMN-Komplexes konnte ein gebundenes FMN identifiziert und eingebaut werden, während ein gut definiertes Zn-Atom in einer Differenz-Fouriersynthese eines ADP/Zn-Komplexes lokalisiert werden konnte. Kristalle der *S. pombe* Riboflavin-Kinase sind in Abbildung 15 gezeigt.

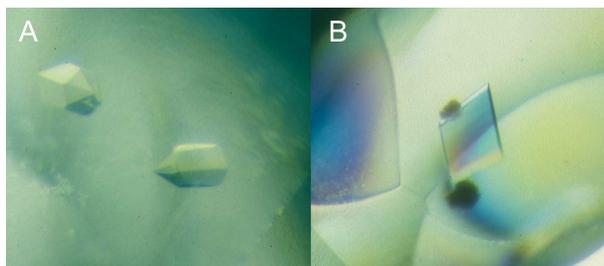


Abbildung 15: A: Kristalle der nativen Riboflavin-Kinase in 0.1 M Mes/NaOH pH 6.5, 0.2 M MgAc, 20 % PEG 8000. B: ADP Co-Kristalle in 50 mM NaKHPO₄, 21 % PEG 8000.

4.2.2 Datensammlung und Strukturlösung

Ein Datensatz der Ribflavin-Kinase wurde mit Graphit-monochromatisierter Cu-K $_{\alpha}$ -Röntgenstrahlung ($\lambda = 1.542 \text{ \AA}$) auf einem *Image Plate* Detektor an einem Einkristall gemessen. Dafür wurden die Kristalle in einen Tropfen aus Mutterlauge/30% PEG 400 überführt, nach kurzer Äquilibrationszeit in einem „Cryoloop“ geerntet, sofort auf der Meßapparatur montiert und in einem Stickstoffstrom bei 100 K schockgefroren. Die Kristalle der nativen *S. pombe* Riboflavin-Kinase zeigen eine hexagonale Gittermetrik mit den Gitterkonstanten $a = b = 70,3 \text{ \AA}$, $c = 141,3 \text{ \AA}$ und $\alpha = \beta = 90^\circ$, $\gamma = 120^\circ$. Die Datenreduktion ergab die Raumgruppe **P6 $_1$ 22**. Der erste native Datensatz der Riboflavin-Kinase beinhaltet gemessene Reflexe bis zu einer Auflösung von 2.9 \AA . Die hexagonalen Kristalle enthalten ein Molekül in der asymmetrischen Einheit, entsprechend 53% Solvensgehalt. Das Verhältnis von Zellvolumen zu molekularer Masse V_m beträgt $2.62 \text{ \AA}^3/\text{Da}$ und liegt im für Proteine typischen Rahmen von $1.6 - 3.6 \text{ \AA}^3/\text{Da}$ (Matthews, 1968).

Ein Diffraktionsbild des nativen Datensatzes ist in Abbildung 16 gezeigt.

Da bis zu diesem Zeitpunkt keine Struktur der Riboflavin-Kinase aus anderen Organismen, oder homologe Strukturen bekannt waren, mussten zur Lösung des Phasenproblems mittels MIR Schweratomderivate gesucht werden. Hierfür wurden verschiedene Kristalle der apo-Form bei 20°C mit 2 mM Thiomersal ($\text{C}_9\text{H}_9\text{HgNaO}_2\text{S}$), 2 mM 2,6-Bischloromercuri-4-nitrophenol, 2 mM Tantalbromid ($\text{Ta}_6\text{Br}_{14}$), oder mit einer Mischung aus 2 mM Thiomersal und 2 mM 2,6-Bischloromercuri-4-nitrophenol über einen Zeitraum von zwei bis drei Tagen *gesoakt*. Die Diffraktionsdaten aller Schweratomderivate mit einer Auflösung von 3.0 bis 3.8 \AA wurden bei 16°C aufgenommen.

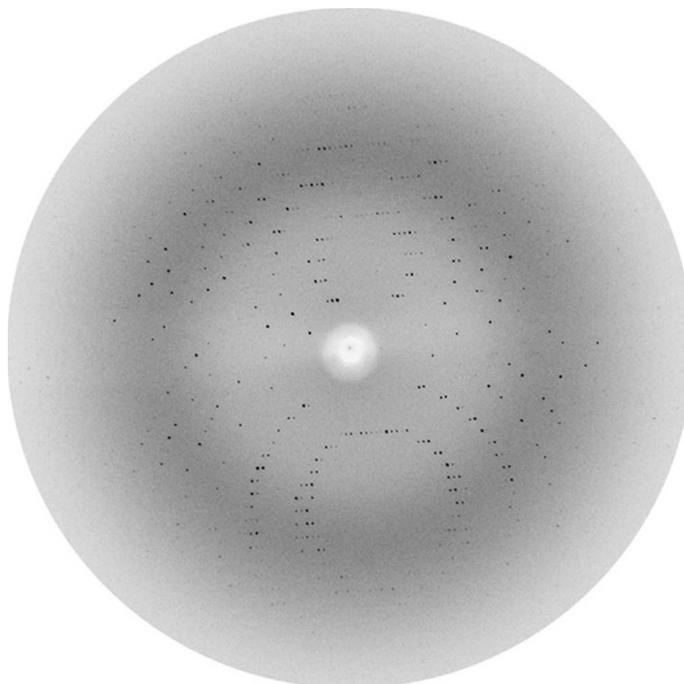


Abbildung 16: Diffraktionsbild des nativen Proteinkristalls der Riboflavin-Kinase. Die Auflösung beträgt am Plattenrand 2.9 \AA (Rotation: 1° , Wellenlänge: $\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$).

Tabelle 3 zeigt die verschiedenen *Soaking*-Experimente zum Erhalten von Schweratomderivaten der Riboflavin-Kinase.

Schwermetallverbindung	Konzentration	Soakingdauer
Thiomersal ($\text{C}_9\text{H}_9\text{HgNaO}_2\text{S}$)	2 mM	2 Tage
2,6-Bischloromercury-4-nitrophenol	2 mM	3 Tage
$\text{Ta}_6\text{Br}_{14} \cdot 8\text{H}_2\text{O}$	gesättigt	2 Tage
Thiomersal + BCMNP	je 2 mM	3 Tage

Tabelle 3: Bedingungen zur Darstellung von Schweratomderivatkristallen.

Die Bestimmung der Raumgruppe, die Verfeinerung der Zellparameter und die Integration der Daten erfolgte mit dem Programm MOSFLM (Leslie, 1998). Initia-

le Schweratompositionen für das Thiomersal-Derivat wurden mit dem Programm SHELXS (Sheldrick *et al.*, 1993) identifiziert, wohingegen alle weiteren Schweratompositionen durch Vergleich verschiedener Differenz-Fourierdichtekarten analysiert werden konnten. Die Schweratomparameter wurden mit dem Programm MLPHARE (Otwinowski and Minor, 1997) verfeinert. Die Berechnung der Phasen wurde in einem Auflösungsbereich von 20 bis 3.0 Å durchgeführt.

Tabelle 4 zeigt die Ergebnisse der Datenprozessierung der Schweratomderivate und der nativen Datensätze.

	NativI	TM^a	BP^b	TaBr^c	TM+BP	NativII
Raumgruppe	<i>P</i> 6 ₁ 22					
Auflösungsbereich [Å]	20-2,9	20-3,0	20-3,8	20-3,5	20-3,0	20-2,1
Unabhängige Reflexe	4906	4435	2596	2294	4442	11946
R_{merge}^d [%]	8,8	9,6	16,1	12,5	9,0	9,9
Vollständigkeit [%]	98,6	99,4	98,5	90,7	97,8	97,3
Multiplizität	6,6	5,0	3,4	6,1	6,8	8,8
R_{iso}	-	27,5	23,5	10,4	24,7	-
R_{Cullis}	-	0,93	0,63	0,90	0,66	-

^a Thiomersal.

^b 2,6-Bis-chloromercury-4-nitrophenol.

^c Ta₆Br₁₄.

^d $R_{merge} = \sum_{hkl} [(\sum_i |I_i - \langle I \rangle|) / \sum_i I_i]$;

$R_{iso} = \sum |F_{PH} - F_P| / \sum F_P$;

R_{Cullis} = r.m.s. lack of closure / r.m.s. isomorphe Differenzen;

Phasing power $\langle |F_H| \rangle /$ r.m.s. lack of closure.

Tabelle 4: Übersicht zur Datensammlung und Phasierung der Schweratomderivate und der nativen Datensätze.

Die Diffraktionsdaten der ADP Co-Kristalle wurden ebenfalls mit Graphit-mono-chromatisierter Cu-K α -Röntgenstrahlung ($\lambda = 1.542 \text{ \AA}$) auf einem *Image Plate* Detektor gemessen. Die Kristalle wurden zur Messung unter Cryo-Bedingungen in einen Tropfen aus Mutterlauge/30 % PEG 400 überführt und, wie oben beschrieben, montiert und schockgefroren. Die ADP Co-Kristalle der Riboflavin-Kinase weisen eine triklone Gittermetrik auf mit den Gitterkonstanten $a = 38,8 \text{ \AA}$, $b = 45,8 \text{ \AA}$, $c = 51,9 \text{ \AA}$, $\alpha = 90,7^\circ$, $\beta = 111,0^\circ$ und $\gamma = 97,3^\circ$. Der Datensatz des ADP-Komplexes enthält gemessene Reflexe bis zu einer Auflösung von $2,0 \text{ \AA}$. Für den Erhalt weiterer Komplexverbindungen wurden die ADP Co-Kristalle mit 2 mM FMN und 5 mM ZnCl $_2$ *gesoakt* und ebenfalls unter Cryo-Bedingungen gemessen. Die Datensätze dieser Komplexverbindungen enthalten gemessene Reflexe bis zu einer Auflösung von $2,45 \text{ \AA}$ (ADP+FMN) bzw. $1,6 \text{ \AA}$ (ADP+Zn). Eine Datenreduktion ergab für alle ADP Komplex-Kristalle die Raumgruppe P1. Die ADP Co-Kristalle enthalten zwei Monomere in der asymmetrischen Einheit, entsprechend 45 % Solvensgehalt und einem Matthews-Koeffizienten von $2.25 \text{ \AA}^3/Da$. Die Strukturen der Komplexverbindungen der Riboflavin-Kinase wurden mit Hilfe der PATTERSON-Suchmethode (*Molecular Replacement*) mit dem Programm AMORE (Navaza, 1994) gelöst. Hierfür wurden Daten in einem Auflösungsbereich von 15 - $3,5 \text{ \AA}$ verwendet. Dabei diente die zuvor mittels MIR gelöste native Kristallstruktur der Riboflavin-Kinase als Suchmodell.

Tabelle 5 zeigt die Ergebnisse der Datensammlung und Phasierung der Komplexverbindungen.

	ADP	ADP+FMN	ADP+Zn
Raumgruppe	P1	P1	P1
Auflösungsbereich [\AA]	20-2,0	20-2,45	20-1,6
Unabhängige Reflexe	21249	11694	42651
R_{merge}^d [%]	6,1	4,1	4,3
Vollständigkeit [%]	95,1	96,6	92,5
Multiplizität	3,2	2,2	3,0

$$^d R_{merge} = \sum_{hkl} [(\sum_i |I_i - \langle I \rangle|) / \sum_i I_i];$$

Tabelle 5: Übersicht zur Datensammlung und Phasierung der Komplexverbindungen.

4.2.3 Modellbau, Verfeinerung und Qualität des Atommodelles

Die sehr gute Qualität der gemessenen Daten bis zu einer Auflösung von 2,1 \AA ermöglichte den Einbau von 90 % der 163 Aminosäuren der apo-Form der *S. pombe* Riboflavin-Kinase bereits im ersten Zyklus des manuellen Modellbaus unter Verwendung des Programmes MAIN (Turk, 1992). Nach einer anschließenden *Rigid body* Minimierung und einem *Simulated annealing* bei 2500 K wurde das Modell schließlich mit dem Programm CNS unter Verwendung des maximum-likelihood Algorithmus (Brünger1998) verfeinert. Für die Verfeinerung der Substrate wurden aus der PDB Parametersätze der Co-Faktoren berechnet, die als *Restraints* in den Verfeinerungen verwendet wurden. In iterativen Zyklen von Modellbau, Einbau von Wassermolekülen und Verfeinerung des Atommodells gefolgt von einer abschließenden individuellen B-Faktorverfeinerung konvergierte der kristallographische R-Faktor bei 22,0 % ($R_{free} = 26,6$ %).

Die Verfeinerungsstatistik ist in Tabelle 6 gezeigt.

	NativII	ADP	ADP+FMN	ADP+Zn
Auflösungsbereich	20-2,1	20-2,0	20-2,45	20-1,6
Reflexe im <i>working set</i>	11269	20211	11079	40509
Reflexe im <i>test set</i>	611	1038	602	2142
R_{cryst}^a [%]	22,0	23,8	22,7	21,9
R_{free}^b [%]	26,6	27,3	28,3	25,2
Anzahl Proteinatome (ohne H)	1149	2533	2533	2533
Anzahl Solvensatome (ohne H)	129	154	192	270
Anzahl Ligandenatome (ohne H)		53	115	55
r.m.s.d				
Bindungslängen [\AA]	0,010	0,007	0,010	0,008
Bindungswinkel [$^\circ$]	1,3	1,7	1,3	1,3
(Φ , Ψ)-Winkel Verteilung im bevorzugten Bereich [%]	89,1	89,8	86,7	92,2
zusätzlich erlaubten Bereich [%]	10,9	8,9	13,3	7,2

$$^a R_{cryst} = \sum_{hkl \subset W} ||F_{obs}| - k|F_{calc}|| / \sum_{hkl \subset W} |F_{obs}|;$$

$$^b R_{free} = \sum_{hkl \subset T} ||F_{obs}| - k|F_{calc}|| / \sum_{hkl \subset T} |F_{obs}|.$$
Tabelle 6: Verfeinerungsstatistik.

Während aller Stadien der Verfeinerung war für die interne Region von Val82 bis Ser94 keine Elektronendichte in diesem Bereich sichtbar. Dieser ungeordnete Teil des Proteines wurde nicht in das finale Atommodell eingebaut und lässt auf eine hohe Flexibilität dieser 12 Aminosäuren langen Region schließen. Obwohl der generelle Verlauf des Proteinrückgrates für die Reste Glu123 bis Tyr126 im Loop-Bereich zwischen dem Strang S6 und der langen Helix H3 anfangs nur schlecht in der initialen Elektronendichte definiert war, konnte die entsprechende Primärsequenz im Laufe der Verfeinerung eindeutig zugeordnet werden. Somit enthält das final verfei-

nernte Atommodell der apo-Form der Riboflavin-Kinase 142 der 163 Aminosäuren der Peptidsequenz.

Die berechneten experimentellen Elektronendichten der Riboflavin-Kinase komplexiert mit ADP (2,0 Å), ADP/FMN (2,45 Å) und ADP/Zn (1,6 Å) waren von weitaus besserer Qualität. War die interne Region zwischen Val82 und Ser94 in der apo-Kristallstruktur noch gänzlich ungeordnet, konnte diese Region in den Komplexstrukturen eindeutig in die Elektronendichte eingebaut werden, so daß das finale Atommodell einer jeden Komplexverbindung aus 154 Aminosäuren besteht.

Eine Überprüfung der Bindungsgeometrien der Proteinhauptkette der apo-Form der *S. pombe* Riboflavin-Kinase sowie der drei Komplexe zeigte, daß sich 89.1% (Apo), 89.8% (ADP), 86.7% (ADP+FMN), sowie 92.2% (ADP+Zn) aller Aminosäuren (Glycin und Prolin ausgenommen) in den am meisten bevorzugten Bereichen befinden, während 10.9% (apo), 8.9% (ADP), 13.3% (ADP+FMN) bzw. 7.2% (ADP+Zn) in zusätzlich erlaubten Bereichen liegen. Keine Aminosäure zeigt eine Bindungsgeometrie, die in den weitläufig erlaubten, oder verbotenen Bereich der Ramachandran-Statistik (Ramachandran and Sasisekharan, 1968) fallen würde. Die Qualität des verfeinerten Modelles wurde mit dem Programm PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) überprüft.

4.2.4 Strukturbeschreibung

Die aus 163 Aminosäuren bestehende Primärstruktur der Riboflavin-Kinase aus *Schizosaccharomyces pombe* ordnet sich zu einer Sekundärstrukturabfolge der Topologie S1, H1, S2, H2, S3, S4, S5, S6, H3, H4. Besonders die N-terminalen Reste vor Strang S1 erweisen sich in den Kristallstrukturen in hohem Maße ungeordnet. Die Faltblattstränge S1 und S2 sind durch eine sechs Aminosäuren lange α -Helix H1 verbunden. Dieser Bereich von Aminosäure 32 bis 47 zeichnet sich besonders durch das Auftreten streng konservierter Sequenzmotive GFGRG und LG-X-PTAN in den

4 ERGEBNISSE

verschiedenen Organismen aus.

Ein Sequenzvergleich der *S. pombe* Riboflavin Kinase mit den Sequenzen verschiedener Organismen ist in Abbildung 17 gezeigt.

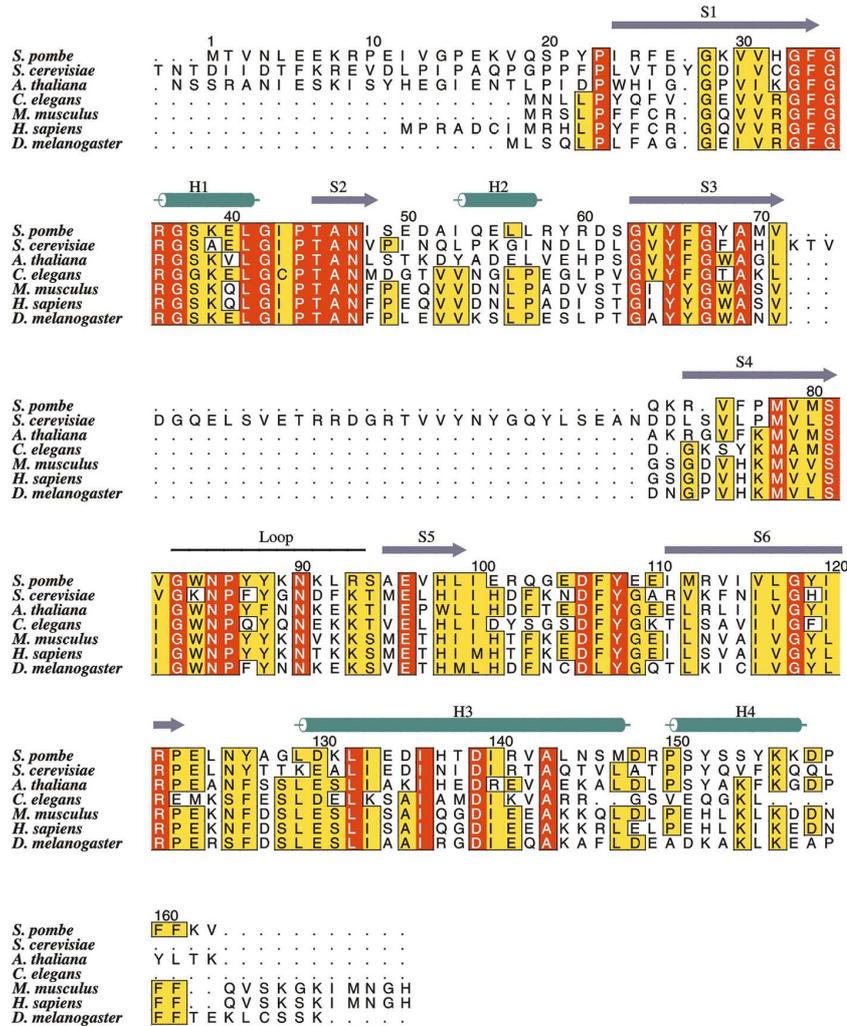


Abbildung 17: Vergleich der Aminosäuresequenzen der *S. pombe* Riboflavin-Kinase mit den Sequenzen verschiedener Organismen. Konservierte Reste sind rot, homologe Aminosäuren sind gelb dargestellt. Über dem Alignment sind die Sekundärstrukturelemente der Riboflavin-Kinase aus *S. pombe* abgebildet. Die Nummerierung bezieht sich auf die Sequenz des Proteins aus *S. pombe*.

Die nachfolgenden Strangmotive S3, S4 und S5, S6 sind durch einen aus 11 Aminosäuren (Gly82 bis Ser94) bestehenden flexiblen Loop getrennt. Der C-terminale

Bereich der Riboflavin-Kinase weist überwiegend helikale Motive auf. Die α -Helix H3 erstreckt sich mit einer Länge von $17,1 \text{ \AA}$ über 18 Aminosäuren von Leu129 bis Met147 und geht rechtwinklig in eine 3/10-Helix H4 am C-Terminus des Proteins über. In der räumlichen, dreidimensionalen Anordnung dieser Sekundärstrukturelemente kommt der C-Terminus entgegengesetzt zur Orientierung des N-Terminus zu liegen. Damit ergibt sich ein Durchmesser für die Tertiärstruktur der Riboflavin-Kinase von ca. 36 \AA , deren räumliche Struktur in Abbildung 18 gezeigt ist.

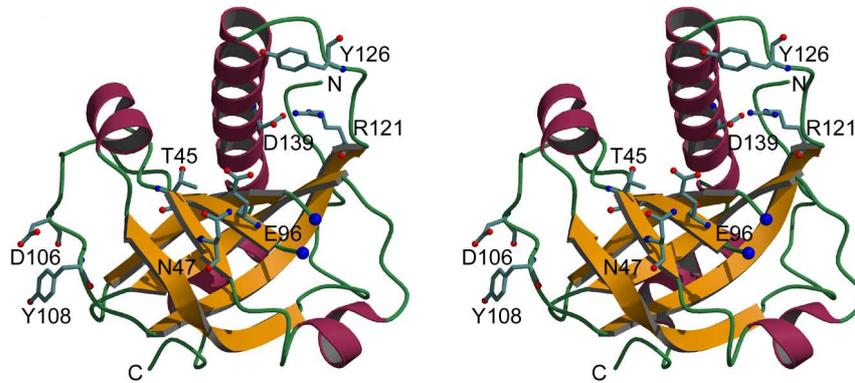


Abbildung 18: Stereodarstellung der Kristallstruktur der Riboflavin-Kinase aus *S. pombe*. β -Faltblattstrukturen sind orange, Helix-Motive rot dargestellt. Die eingezeichneten Aminosäuren stellen hoch konservierte Reste in verschiedenen Organismen dar.

Das dominierende Motiv ist ein zentrales β -Faltblattmotiv (orange), welches von zwei α -Helices (rot) flankiert wird. Das zentrale Faltblatt kann durch zwei übereinander liegende, vier-strängige antiparallele β -Faltblattstrukturen beschrieben werden, die zu einem Faß-Motiv (β -barrel) verdreht sind. Das oben liegende, fünf-strängige β -Faltblatt der Topologie S1, S2, S5, S4, S3 dieses *barrels* stellt zudem die Plattform für die Substratbindung dar. Zwischen den beiden Strängen S1 und S2 liegt, die für die ATP-Bindung essentielle, relativ kurze α -Helix H1 (Aminosäure 36 bis 41). Das darunter liegende, zweite Faltblatt des *barrels* ist aus vier β -Strängen der Topologie S1, S6, S4, S3 zusammengesetzt. Die Stränge S1, S3 und S4 sind an

beiden Faltblattmotiven des *barrels* beteiligt. In den Kristallstrukturen der ADP Co-Komplexe konnte die Konformation des, in der apo-Form ungeordneten, flexiblen Loops, eindeutig charakterisiert werden. Dieser flexible Loop (Aminosäuren 83 bis 93) verbindet die Stränge S4 und S5 und liegt in direkter Nachbarschaft zur FMN Bindungsstelle, wodurch eine mögliche Beteiligung an der Katalyse dieser Loop-Region in Betracht gezogen werden kann.

4.2.5 Beschreibung des aktiven Zentrums

Die Lage des aktiven Zentrums der Riboflavin-Kinase konnte anhand von *Soaking*-Experimenten mit FMN an ADP Co-Kristallen aufgeklärt und weiterführend charakterisiert werden.

In Abbildung 19 ist die Kristallstruktur eines ternären Komplexes der *S. pombe* Riboflavin-Kinase mit ADP und FMN gezeigt.

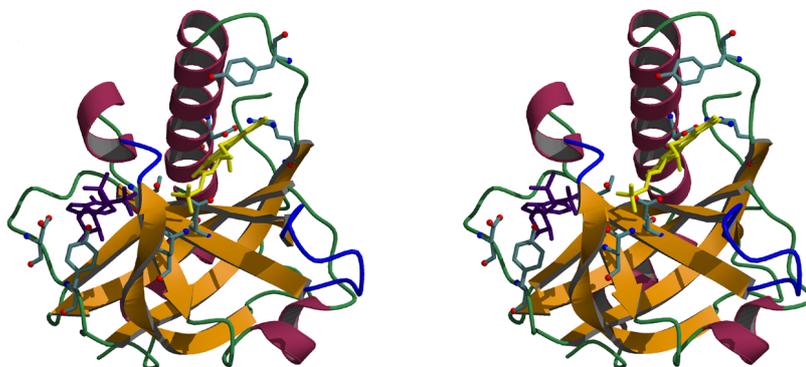


Abbildung 19: Stereoabbildung des ADP/FMN-Komplexes der *S. pombe* Riboflavin-Kinase. ADP ist violett, FMN ist gelb dargestellt.

Das aktive Zentrum der Riboflavin-Kinase kann in zwei Bindungsstellen für jeweils ATP und Riboflavin unterteilt werden, welche durch die gebundenen Reaktionsprodukte ADP und FMN charakterisiert werden.

Bindung von Riboflavin

Die Bindungsstelle von Riboflavin wird vom N-terminalen Bereich der α -Helix H3 und der Loop-Region, die H3 mit dem Strang S6 verbindet, gebildet. In der Kristallstruktur wird der Isoalloxazin-Ring von FMN an dieser Stelle in einer überwiegend hydrophoben Tasche gebunden.

Abbildung 20 zeigt die detaillierte FMN-Produktbindung in der Riboflavin-Bindungsstelle.

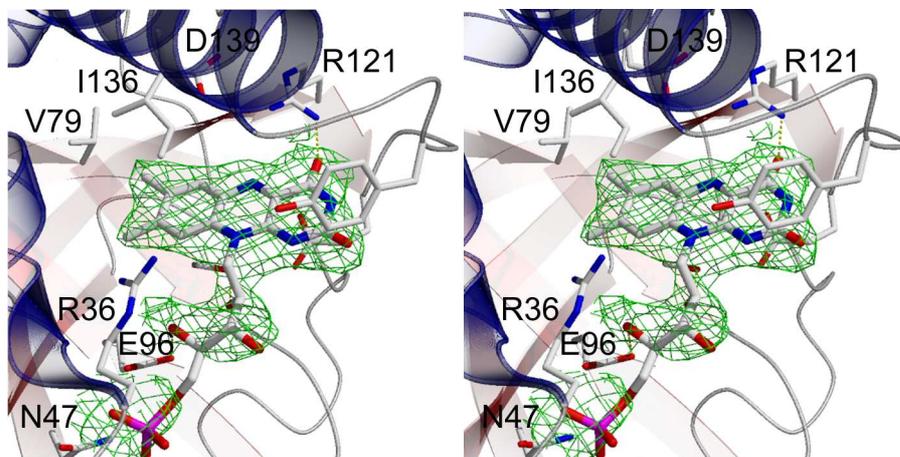


Abbildung 20: Stereoabbildung der Bindungsstelle von FMN. Die $2F_o - F_c$ Elektronendichte des Liganden ist bei 1σ konturiert.

Der Dimethylbenzylring des Isoalloxazin-Trizyklus ist in einer hydrophoben Umgebung, die aus den Resten Val79, Tyr126, Leu129, Leu132 und Ile136 besteht, gebunden. Der Dioxypyrimidin-Teil des Ringsystemes ist dagegen über eine Wasserstoffbrückenbindung des O4-Carbonylsauerstoffs zur Amidino-Seitenkette des konservierten Restes Arg121 stabilisiert. Des Weiteren ist die Hauptketten Amid-Gruppe von Leu124 maßgeblich an dieser Stabilisierung durch Wechselwirkungen zur O4- und N3H-Funktion des Isoalloxazin-Ringsystemes beteiligt.

Eine detaillierte Beschreibung aller Wechselwirkungen wird in Abbildung 21 gegeben.

ben.

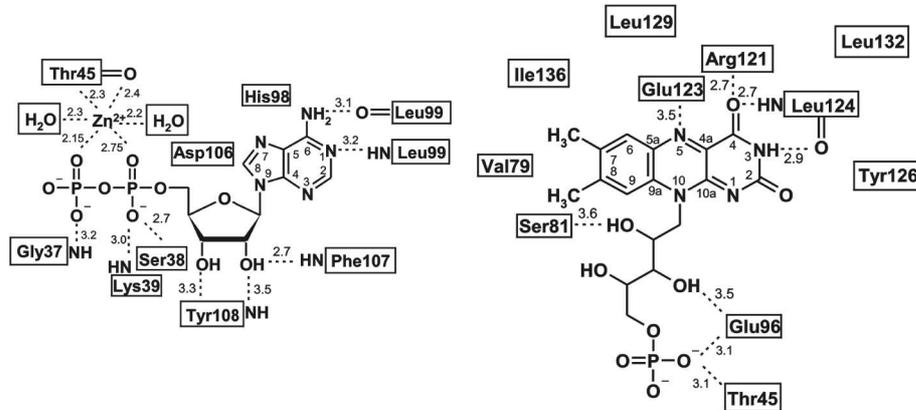


Abbildung 21: Schematische Darstellungen der Wechselwirkungen der Riboflavin-Kinase mit den Produkten ADP (links) und FMN (rechts).

Die Phosphoribityl-Seitenkette von FMN liegt in einer hydrophilen Tasche, ist allerdings in der Elektronendichtekarte beinahe vollständig ungeordnet. Dennoch scheint diese eine gestreckte Konformation einzunehmen, wodurch ein enger Kontakt zwischen dem β -Phosphat von ADP in der ATP-Bindungsstelle und der Phosphatgruppe der Phosphoribityl-Seitenkette in direkter Nachbarschaft zum konservierten Rest Asn47 entsteht. Die in diesem Bereich liegende Aminosäure Glu96 ist ebenfalls in verschiedenen Organismen streng konserviert und stabilisiert durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zu OH3 der Ribitylkette und zur 5'-Phosphoryl-Gruppe die gestreckte Konformation der Seitenkette. Weiterhin ist die Seitenkette von Ser81 im H-Brückenkontakt zur Hydroxylgruppe OH2 bei der Bindung der Ribitylseitenkette beteiligt.

Dieser Bereich des Phosphoryl-Transfers wird vom Loop zwischen Strang S1 und Helix H1 bedeckt. Dieser Glycin reiche Bereich umfasst die Reste Gly33 bis Gly37 und wird als *flap I* bezeichnet. In der Umgebung von Gly35 weist der *flap I*-Bereich eine sehr schwach definierte Elektronendichtekarte auf. Möglicherweise ist eine Bestim-

mung der exakten Loop-Konformation des *flap I* durch benachbarte Kristallkontakte erschwert, da in der hexagonalen Kristallform die Bindungsstellen vollständig durch symmetrieverwandte Moleküle blockiert sind.

Eine weitere Besonderheit der Riboflavin-Bindungsstelle der *S. pombe* Riboflavin-Kinase stellt die Tatsache dar, daß die Phosphozucker-Seitenkette bei der Bindung von FMN in starkem Maße dem umgebenden Lösungsmittel (Solvens) ausgesetzt ist. Dieses ist für Enzyme der Enzymklasse Phosphoryl-Gruppen übertragender Enzyme eher ungewöhnlich. Im Allgemeinen verhindert ein gewisser Schutzmechanismus der Enzyme die unkontrollierte ATP-Hydrolyse der Phosphozucker-Seitenkette ihrer Substrate (Vetter and Wittighofer, 1999). Dieser Schutzmechanismus wird durch große Domänen-Umlagerungen innerhalb der Enzyme erreicht. Auch durch eine Umlagerung flexibler Loop-Strukturen, ähnlich dem Glycin reichen Loop der Protein-Kinasen, kann dieser Schutz vor einer Hydrolyse gewährleistet werden. Bei der Riboflavin-Kinase aus *S. pombe* könnte diese schützende Aufgabe dem Loop-Bereich von Aminosäure Ser81 bis Ser94, der den Strang S4 mit dem Strang S5 verbindet, übernehmen. Dieser Bereich der Riboflavin-Kinase wird als *flap II* bezeichnet und zeichnet sich durch die Anwesenheit des konservierten Peptidmotives Ser-Xaa-Gly-Asn-Pro-Xaa-Xaa-Xaa-Asn aus. Da dieses Sequenzmotiv in allen Organismen zu finden ist, liegt die Vermutung nahe, daß dieser Bereich eine wichtige strukturelle oder katalytische Funktion erfüllt.

Bindung von ATP

Die ATP-Bindungsstelle der *S. pombe* Riboflavin-Kinase wird durch die Bindung von ADP charakterisiert. Die Bindungsstelle kann somit eindeutig in der Nähe der Helix H1, den benachbarten Loop-Bereichen zwischen S1 und H1 und zwischen H1 und S2, sowie dem Loop zwischen Strang S5 und S6 lokalisiert werden.

Abbildung 22 zeigt die detaillierte ADP-Produktbindung in der ATP-Bindungsstelle.

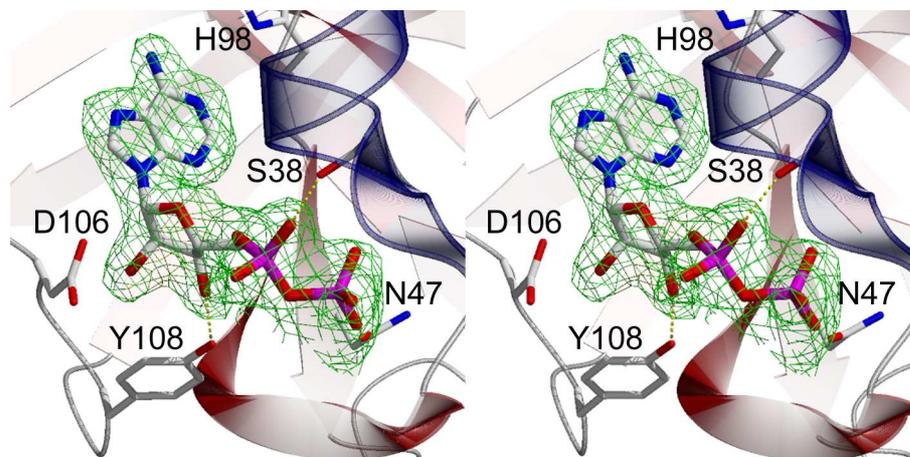


Abbildung 22: Stereoabbildung der Bindungsstelle von ADP. Die $2F_o - F_c$ Elektronendichte des Liganden ist bei 1σ konturiert.

Die Bindung des Adenosyl-Ringes von ADP wird überwiegend durch Wasserstoffbrückenbindungen der Protein Hauptkette in der Bindungstasche etabliert. Dabei bilden das N1-Ringatom und die 6-Aminogruppe des ADPs jeweils eine H-Brücke mit der Hauptketten Amid- und der Carbonyl-Gruppe der Aminosäure Leu99 aus. Die Ribosyl-Teil von ADP wird in einer hydrophilen Region gebunden. Dabei werden Wechselwirkungen des Ribosyl-Zuckers der ADP Seitenkette durch eine H-Brückenbindung zur Aminofunktion der Lys39 Seitenkette ausgebildet. Des Weiteren formt der O4-Sauerstoff des Ribosyl-Zuckers van-der-Waals Kontakte zu den Aminosäuren Lys39 und Asp106. Weiterhin wird die Bindung des Ribosyl-Rings durch H-Brückenbindungen der 2OH-Gruppe des Zuckers mit den Hauptketten Amid-Gruppen der Reste Phe107 und Tyr108 stabilisiert. Zusätzlich befindet sich die 3OH-Gruppe des Zuckers im H-Brückenkontakt zu der Hauptketten Amid-Gruppe von Tyr108. Die Diphosphoryl-Gruppe von ADP wird durch Wasserstoffbrückenbindungen der Seitenketten Amino-Gruppe von Lys39 mit einem der $P\alpha$ -Sauerstoffatome und der Bindung der Peptidfunktion von Glu37 zu einem der $P\beta$ -Sauerstoffatome der Phosphorylgruppe in der Tasche gebunden. Für eine

detaillierte Beschreibung aller Wechselwirkungen siehe Abbildung 21.

Ein struktureller Vergleich der apo-Form der Riboflavin-Kinase mit ihren Komplexstrukturen zeigt eine signifikante Umlagerung im Bereich der Helix H1 und dem Loop zwischen S5 und S6 durch die Ligandierung von FMN und ADP (Abbildung 23).

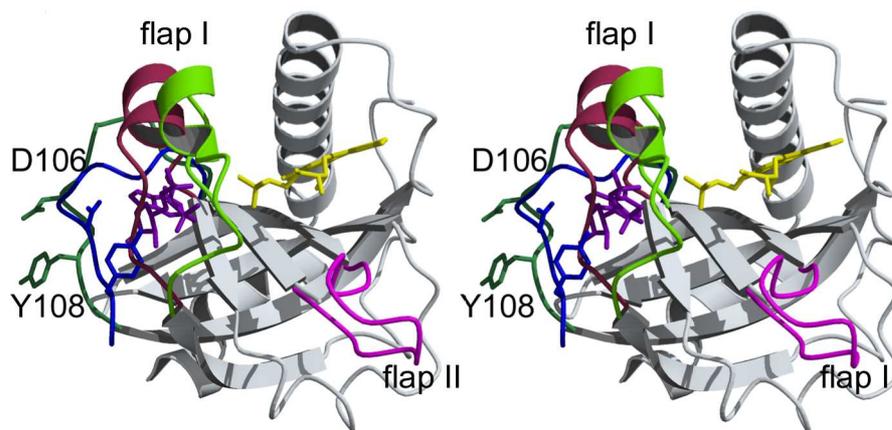


Abbildung 23: Vergleich von ligand-freier (rot und dunkelgrün) und ADP-gebundener (hellgrün und blau) Konformation der Riboflavin-Kinase. In Abwesenheit von Nukleotiden dreht sich *flap I* in die Adenosin-Bindungsstelle. Konservierte Reste, die ihre Konformation aufgrund der ADP-Bindung ändern, sind als *ball-and-stick*-Modell gezeigt. Asp106 und Tyr108 dienen der Fixierung des Ribose-Restes. *Flap II* ist pink dargestellt.

An dieser strukturellen Umordnung der ATP-Bindungsstelle sind maßgeblich einige Glycin Reste, die sich am N- und C-terminalen Bereich der Helix H1 befinden, beteiligt. Aufgrund mangelnder Seitenketten-Wechselwirkungen dieser Reste mit dem Liganden wird die Flexibilität dieses Bereiches erhöht. Des Weiteren ist bei der dynamischen Formation der ATP Bindungsstelle der komplette Bereich der Aminosäuren His32 bis Asn47 beteiligt. Dieser Bereich erscheint im Sequenzvergleich der Riboflavin-Kinase verschiedener Organismen (Abbildung 17) mit dem Sequenzmotiv Gly-Xaa-Pro-Thr-Ala-Asn hoch konserviert. Die Aminosäure Xaa repräsentiert einen relativ großen hydrophoben Rest (Ile) oder Cys wie im Falle der Riboflavin-Kinase aus *C. elegans*.

Die Bindungsstellen für ATP und Riboflavin der *S. pombe* Riboflavin-Kinase entsprechen sehr gut der Verteilung ihrer - im Sequenzmotiv anderer Organismen konservierten - Aminosäurereste, die über die gesamte Substrat-Bindungsplattform des zentralen Faltblattes verteilt sind (Abbildung 18). Zusätzlich zu Asn47 und Glu96 im Bereich des Phosphoryl-Transfers sind weitere Aminosäuren, die an der Bindung von Riboflavin (Arg121 und Asp139), ATP (His98, Asp106 und Tyr1108) und des zweiwertigen Metallions (Thr45) beteiligt sind, konserviert.

4.2.6 Die Bindung des zweiwertigen Metallions

Phosphorylgruppen übertragende Enzyme haben einige Gemeinsamkeiten, wie z.B. Carboxylsäuren als Metall-Liganden und eine Base zur Aktivierung des Substrates (Vetter and Wittighofer, 1999). Die Riboflavin-Kinase zeigt eine Aktivität in Anwesenheit von Mg^{2+} und anderen divalenten Metallionen, weist jedoch mit Zn^{2+} -Ionen die höchste Aktivität auf. Im Bereich des aktiven Zentrums konnten nur drei strikt konservierte Reste gefunden werden, die als Metall-Liganden fungieren können: Thr45, Asn47 und Glu96. Einer der ADP-enhaltenden Co-Kristalle wurde mit Zn^{2+} *gesoakt*, wovon Daten bis 1.6 \AA aufgenommen wurden. Diese zeigen eine gut definierte Metall-Bindungsstelle (Abbildung 24).

Das Zink-Ion wird von Sauerstoffatomen der α - und β -Phosphatgruppen, sowie der Carbonylgruppe und der Hydroxylgruppe von Thr45 koordiniert. Des Weiteren koordinieren zwei Wassermoleküle an das Zn-Ion, wodurch eine verzerrt oktaedrische Geometrie entsteht, wie sie auch für Mg^{2+} beobachtet wird. Interessanterweise sind die benachbarten Reste Glu96 und Asn47 nicht an der Metall-Bindung beteiligt. Diese Reste dienen vermutlich der Stabilisierung der Ribityl-Seitenkette, oder fungieren als Base während der Phosphoryl-Übertragung. Für letztere Aufgabe scheint Glu96 ideal positioniert zu sein. Die Seitenkette von Asn47 liegt in zwei Konformationen vor, die jedoch beide einen zu großen Abstand hinsichtlich einer Koordination

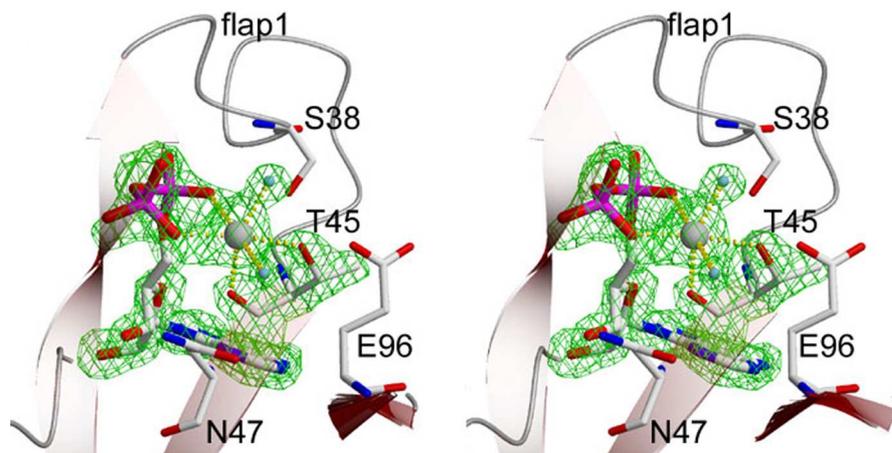


Abbildung 24: Stereoabbildung des aktiven Zentrums mit gebundenem Zn^{2+} , ADP und FMN. Die $2F_o-F_c$ Elektronendichte der beiden Liganden ist bei 1σ konturiert.

an das Metallion aufweisen.

Betrachtet man die Geometrien des Komplexes, scheint es, als ob das Wassermolekül, welches dem Carbonyl-Sauerstoffatom von Thr45 gegenüberliegt, die Stelle des γ -Phosphatsauerstoffatoms im Metall-ATP Komplex einnimmt. Der kürzeste Abstand zwischen dem freien β -Phosphatsauerstoffatom zu diesem Wassermolekül beträgt 3.7 \AA , während der Abstand zu dem äquatorialen Wassermolekül 5.1 \AA beträgt. Die Stabilisierung der γ -Phosphatgruppe könnte über zusätzliche Wasserstoffbrücken zu Amidgruppen der Hauptkette im Bereich von *flap I* erfolgen. Auch Asn47 könnte hierbei eine Rolle spielen.

An der Metall-Bindung sind sowohl die Hydroxyl-Gruppe der Seitenkette, als auch die Carbonyl-Gruppe der Hauptkette von Thr45 beteiligt. Dieser Bindungsmodus ist relativ ungewöhnlich, da im allgemeinen nur die Hydroxyl-Gruppe der Seitenkette von Serin- bzw. Threonin-Resten als Ligand für Mg^{2+} dient, wie z.B. bei der F_1 -ATPase (Abrahams *et al.*, 1994), oder bei GTP-Bindeproteinen (Vetter and Wittighofer, 1999). In diesen Fällen wird eine zweizählige Koordination mit dem β - und γ -Phosphatgruppen der Nukleotide beobachtet. Es liegen keine experimen-

tellen Daten vor, die belegen, daß die Riboflavin-Kinase tatsächlich auch *in vivo* Zn^{2+} verwendet. Eine gesteigerte Aktivität um einen Faktor von 1.8 verglichen mit Mg^{2+} (Merrill and McCormick, 1980) kann leicht durch eine leichtere Verfügbarkeit des letzteren ausgeglichen werden. Der Absolutwert für die Konzentration an Zink, die sogenannte „Zink-Quote“, liegt in *E. coli* bei 0.2 mM und wird von den Bakterienzellen streng reguliert (Outten and O’Halloran, 2001). Die absolute zelluläre Mg^{2+} -Konzentration hingegen, liegt zwischen 14 bis 20 mM für die meisten Säugetierzellen, wovon 0.25 bis 1 mM als freies Mg^{2+} und ca. 90% ATP in Form von MgATP vorliegen (Romani and Maguire, 2002).

4.2.7 Reaktionsmechanismus

Im Allgemeinen verläuft die Übertragung einer Phosphorylgruppe über einen „*in-line*“-Angriff des Nukleophils auf das γ -Phosphat von ATP. Dies kann entweder mit einem assoziativen, oder einem dissoziativen Übergangszustand beschrieben werden. Der fünfwertige Übergangszustand des assoziativen Mechanismus zeigt eine Nettoladung von -3 der Phosphorylgruppe, während der Metaphosphat-Übergangszustand des dissoziativen Mechanismus eine Ladung von -1 aufweist. Diese Ladungen werden häufig durch positiv geladenen Reste stabilisiert (Matte *et al.*, 1998). Die Geometrie des aktiven Zentrums der Riboflavin-Kinase erlaubt klar einen „*in-line*“-Angriff der 5'-Hydroxylgruppe von FMN auf das γ -Phosphat von ATP (Abbildung 25).

Im Bereich des aktiven Zentrums der Riboflavin-Kinase ist kein konservierter basischer Aminosäure-Rest zu finden. Nur Arg36 von *flap I* stellt einen durchwegs konservierten Rest dar, der in Richtung der Phosphat-Gruppe zeigt. Andere basische Reste, wie His32 und Lys39, liegen zwar in der Nähe des β -Phosphates bzw. der Ribose, sind jedoch nicht konserviert. Des Weiteren sind letztere Reste nicht optimal positioniert um mit dem β -Phosphat zu interagieren. His32 liegt 6.8 Å von der β -Phosphat-Gruppe entfernt. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß

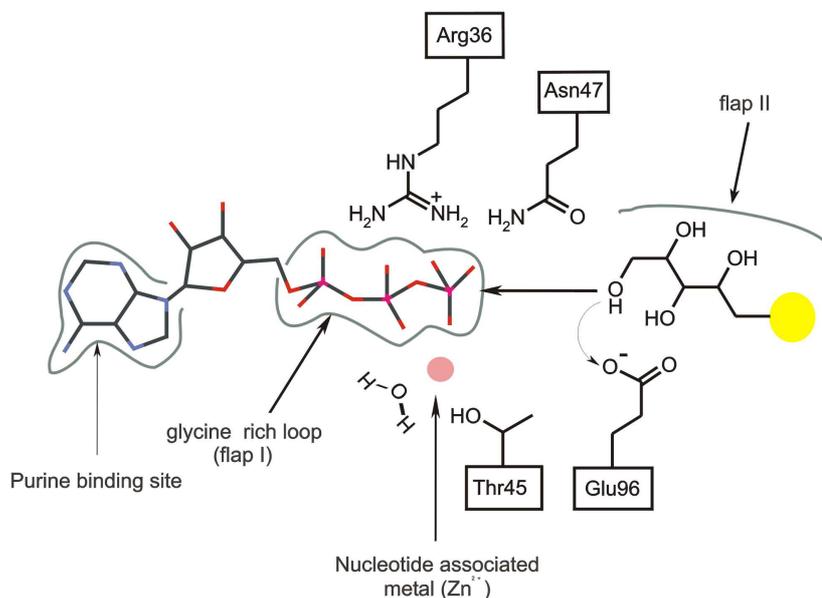


Abbildung 25: Möglicher Reaktionsmechanismus der Riboflavin-Kinase.

an der Stabilisierung des Übergangszustands Reste von *flap II* beteiligt sind, wie z.B. Lys89, Lys91 und Arg93. Jedoch stellt Arg93 am C-terminalen Teil des Loops den einzigen konservierten basischen Rest dar, welchem daher auch eine strukturelle Funktion zugeordnet werden könnte. Diese Ergebnisse lassen auf einen direkten Angriff der, durch Glu96 aktivierten, 5'-Ribitylhydroxyl-Gruppe auf das Metallkoordinierte β -Phosphat schließen. Vorausgegangene Untersuchungen an Mutanten der Riboflavin-Kinase aus *Schizosaccharomyces pombe* konnten zeigen, daß die Mutation Glu96Gln die Aktivität signifikant vermindert (Kemter, 2002).

4.2.8 Strukturvergleich und Diskussion

Die Suche nach Strukturhomologen der Riboflavin-Kinase mit dem Programm DALI (Holm and Sander, 1993) offenbarte eine relativ hohe topologische Faltungsähnlichkeit der Riboflavin-Kinase zu einer Mehrzahl an Domänenabschnitten von Proteinen in der Datenbank. Eine Überlagerung der Riboflavin-Kinase mit den Struk-

turen der Phthalatdioxygenase Reduktase (Correll *et al.*, 1992), Flavohämoprotein (Ermler *et al.*, 1995), Flavodoxin Reduktase (Ingelmann *et al.*, 1997) und F1-ATPase (Abrahams *et al.*, 1994) erbrachte übereinstimmend in allen Strukturen einzig das zentrale β -barrel als gemeinsames Faltungsmotiv. Im Gegensatz zur *S. pombe* Riboflavin-Kinase weisen Phthalatdioxygenase Reduktase, Flavohämoprotein und Flavodoxin jedoch eine typisch Rossmann-ähnliche $\alpha\beta\alpha$ -Faltung auf. Dabei kommt die FAD Co-Faktorbindungsstelle am topologischen Umkehrpunkt der $\alpha\beta\alpha$ -Faltung zu liegen. Diese Rossmann-ähnliche Faltung lässt sich allerdings nicht mit der Struktur der Riboflavin-Kinase zur Deckung bringen, so daß auch die Lage der FAD-Bindungsstellen voneinander abweichen. Des Weiteren konnten ähnliche β -barrel Domänen in den α - und β -Untereinheiten der F1-ATPase mit der Struktur der *S. pombe* Riboflavin-Kinase überlagert werden. Jedoch zeigte die weitere Analyse das diese im Zentrum des ATPase Oligomers liegende Nukleotid-Bindungsstellen in keiner Weise eine Gemeinsamkeit zur ATP-Bindungsstelle der Riboflavin-Kinase aufwies (Braig *et al.*, 2000).

Ein charakteristisches Sequenzmotiv aller Nukleotid-bindenden Proteine liegt im Bereich der ATP-bindenden Helix H1. Dieser Bereich erscheint in der Fähigkeit ATP Co-Faktoren zu binden in hohem Maße mobil und geht bei der Nukleotid-Bindung eine Konformationsumlagerung ein. Den streng konservierten Resten Thr45 und Asn47 im folgenden β -Strang S2, geht ein Glycin-reicher Bereich voraus (Gly33-Xaa-(Gly)-(Arg, Lys)-Gly-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Gly-Xaa-Pro-Thr-Ala-Asn). Während das invariable Motiv Gly-Xaa-Pro-Thr-Ala-Asn charakteristisch ist für alle Riboflavin-Kinasen, unterscheidet sich der Glycin-reiche Bereich deutlich von dem entsprechenden Bereich anderer, in der PROSITE-Datenbank hinterlegten, Nukleotid-bindenden Proteine (Falquet *et al.*, 2002). Diese Proteine enthalten größtenteils den sogenannten „P-Loop“, oder auch Walker A Motiv (Walker, 1982) genannt. Dieses Motiv ist durch die Sequenz Gly/Ala-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Gly-Lys(Xaa)-Ser/Thr bestimmt,

wobei Xaa häufig ein Glycin repräsentiert.

Mittlerweile konnten die dreidimensionalen Strukturen der Riboflavin-Kinase aus *H. sapiens* (Karthikeyan *et al.*, 2003) und aus *Thermotoga maritima* (Wang *et al.*, 2003) gelöst werden. Während die Proteine aus *S. pombe* und *H. sapiens* Ein-Domänen-Enzyme sind, setzt sich die Struktur der *T. maritima* Riboflavin-Kinase aus zwei Domänen zusammen. Die C-terminale Domäne enthält ein sechssträngiges antiparalleles β -Faltblatt und offenbart somit eine gewisse Ähnlichkeit zur Struktur aus *S. pombe* (r.m.s.-Abweichung 1.47 \AA über 88 C_α -Atome). Die N-terminale Domäne weist mit einem typischen Nukleotidbindungsmotiv in Form einer Rossmann-Faltung keinerlei strukturelle Ähnlichkeit zur Riboflavin-Kinase auf.

Die Struktur der humanen Riboflavin-Kinase wurde im Komplex mit MgADP, sowie in Form eines ternären Komplexes mit ADP, FMN und Mg^{2+} gelöst. Eine Kristallstruktur der apo-Form des Enzymes aus *H. sapiens* ist bislang unbekannt. Die Enzyme aus *S. pombe* und *H. sapiens* haben eine Sequenzidentität von 44% und eine Überlagerung des ADP/FMN-Komplexes aus *S. pombe* mit dem ternären Komplex aus *H. sapiens* verdeutlicht die große Ähnlichkeit der beiden Strukturen (r.m.s.-Abweichung 1.08 \AA über 123 C_α -Atome). Der flexible Loop-Bereich *flap II* im ternären Komplex der humanen Struktur liegt, im Gegensatz zur *S. pombe* Riboflavin-Kinase, in einer sogenannten „geschlossenen“ Konformation vor. Diese konformelle Änderung des Loops gewährleistet in der humanen Struktur eine exakte Positionierung der Ribityl-Kette von FMN. Weiterhin ist in dieser „geschlossenen“ Form eine gute Solvensabschirmung des Co-Faktors gegeben. Eine unkontrollierte ATP-Hydrolyse wird somit möglicherweise beeinträchtigt oder gar verhindert. Im Gegensatz zur „geschlossenen“ Konformation liegt dieser Loop-Bereich in der *S. pombe* Struktur in einer vergleichsweise „offenen“ Konformation vor. Durch diese „offene“ Form der Co-Faktorbindungsstelle geht der Schutz vor einer ATP-Hydrolyse verloren.

4.3 *Arabidopsis thaliana* 7,8-Dihydroneopterin Aldolase

4.3.1 Kristallisation

Gereinigte DHNA aus *A. thaliana* (Schott, 2003) wurde mit einer Konzentration von 11,5 mg/ml in *Sitting drop* Kristallisations-Experimenten eingesetzt und bei 20°C gegen 0,1 M Tris/HCl pH 7,2 und 21 % (w/v) PEG 2000 Monomethylether (MME) und zusätzlich 0,5 μ l 115 mM C-HEGA-11 (Cyclohexylbutanoyl-N-hydroxyethylglucamid) äquilibriert. Nach etwa einem Tag konnten röntgentaugliche Kristalle bis zu einer Größe von etwa 80 μ m x 80 μ m x 80 μ m geerntet werden. Kristalle sowie ein Diffraktionsbild der *A. thaliana* DHNA sind in Abbildung 26 gezeigt.

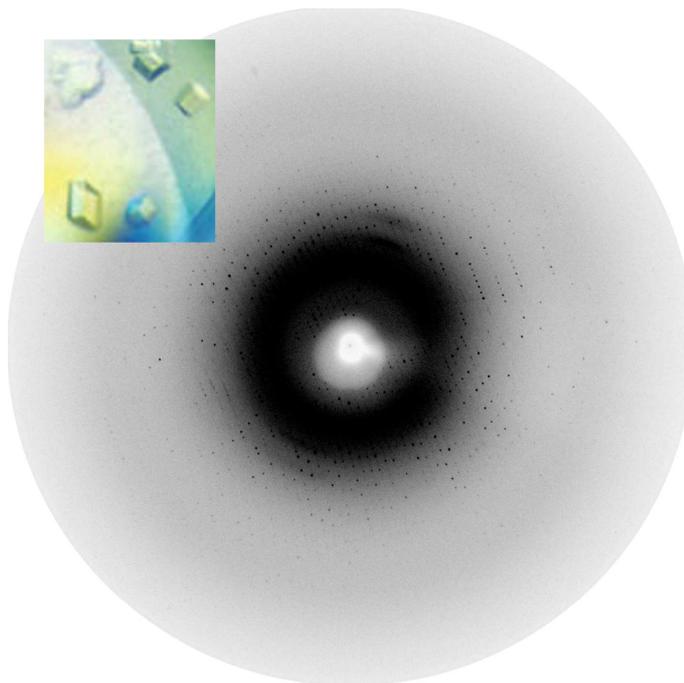


Abbildung 26: Diffraktionsbild (maximale Auflösung: 2,2 Å, Rotation: 1,0°, Wellenlänge $\lambda=1.5418$ Å) und Kristalle der *A. thaliana* DHNA in 0,1 M Tris/HCl pH 7,2, 21 % PEG 2000 MME und 115 mM C-HEGA-11.

4.3.2 Datensammlung und Strukturlösung

Zur Datensammlung unter Cryo-Bedingungen (100 K) wurden Kristalle der *A. thaliana* 7,8-Dihydroneopterin Aldolase in einen Tropfen aus Perfluorpolyether überführt. Die Indexierung der Diffraktionsdaten zeigte eine triklin Gittermetrik mit den Gitterkonstanten $a=63,55 \text{ \AA}$, $b=84,22 \text{ \AA}$, $c=89,05 \text{ \AA}$ und $\alpha=90,14^\circ$, $\beta=89,99^\circ$, $\gamma=76,17^\circ$. Der vollständige Datensatz beinhaltet Reflexe bis zu einer maximalen Auflösung von $2,2 \text{ \AA}$ (siehe Abbildung 26). Eine Analyse der Matthews-Parameter erbrachte das Vorhandensein zweier DHNA Oktamere in der asymmetrischen Einheit, entsprechend einem Solvensgehalt von 42%. Die Bestimmung der Raumgruppe, die Verfeinerung der Zellparameter und die Integration der Daten erfolgte mit dem HKL-Programmpaket Denzo und Scalepack (Otwinowski and Minor, 1997).

Tabelle 7 zeigt die Ergebnisse der Datenprozessierung.

Die Struktur der *A. thaliana* DHNA wurde mit Hilfe der PATTERSON-Suchmethode (*Molecular Replacement*) mit dem Programm AMORE (Navaza, 1994) gelöst. Hierfür wurden Daten bis zu einer Auflösung von $3,5 \text{ \AA}$ verwendet. Dabei diente die bekannte Kristallstruktur der DHNA aus *Staphylococcus aureus* (PDB-ID: 1DHN) als Suchmodell. In der Rotationssuche konnten beide Oktamere eindeutig orientiert werden. Hierbei zeichneten sich beide Lösungen mit Korrelationskoeffizienten (CC) von 9,0 und 8,7 gegenüber einer nächstmöglichen, falschen Orientierung (CC = 3,9) ab. In der anschließenden Translationssuche wurden beide Rotationslösungen in der asymmetrischen Einheit positioniert. Die korrekte Positionierung hob sich eindeutig mit einem Korrelationskoeffizienten von 12,6 gegen die nächstmögliche Position mit einem CC = 4,8 ab.

Raumgruppe	P1
Einheitszelle	
a	63,55
b	84,22
c	89,05
α	90,14
β	89,99
γ	76,17
Auflösungsbereich [\AA]	20.0-2,2
gemessene Reflexe	240705
unabhängige Reflexe	86882
Multiplizität	2,7
R_{merge}^a [%]	9,0
Vollständigkeit [%]	95,5
$^a R_{merge} = \sum_{hkl} [(\sum_i I_i - \langle I \rangle) / \sum_i I_i]$.	

Tabelle 7: Übersicht zur Datensammlung und Phasierung.

4.3.3 Modellbau, Verfeinerung und Qualität des Atommodelles

Die sehr gute Qualität der gemessenen Daten bis zu einer Auflösung von 2,2 \AA ermöglichte den Einbau von mehr als 90 % aller 2016 Aminosäuren der beiden Oktamere der *A. thaliana* DHNA im ersten Zyklus des manuellen Modellbaus unter Verwendung des Programmes Main (Turk, 1992). Nach einer anschließenden *Rigid body* Minimierung und einem *Simulated annealing* bei 2500 K wurde das Modell schließlich mit dem Programm CNS unter Verwendung des maximum-likelihood Algorithmus (Brünger, 1998) verfeinert. Der Ligand wurde mit dem Programm SYBYL gebaut und die Parametersätze berechnet, die als *Restraints* in der Verfei-

nerung verwendet wurden. In iterativen Zyklen von Modellbau, Einbau von Wassermolekülen und Verfeinerung des Atommodelles gefolgt von einer abschließenden individuellen B-Faktorverfeinerung konvergierte der kristallographische R-Faktor bei 19,5 % ($R_{free} = 25,8\%$).

Das Monomer der rekombinanten *A. thaliana* DHNA besteht aus 126 Aminosäureresten, die mit Ausnahme der letzten fünf, eine gut definierte Elektronendichte zeigen. Die Elektronendichte der letzten drei Reste war in keiner Untereinheit definiert, während Asn121 und Thr122 in den einzelnen Untereinheiten verschieden gut definiert waren. Abgesehen von einigen Resten an der Proteinoberfläche war der Großteil der Seitenketten deutlich durch die Elektronendichtekarte definiert. Das finale Modell des DHNA-Oktamers besteht aus 975 Aminosäureresten.

Die Qualität des verfeinerten Modelles wurde mit dem Programm PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) überprüft. Dabei liegen die Bindungsgeometrien von 91,1 % aller Aminosäuren (Glycin und Prolin ausgenommen) in den am meisten bevorzugten Bereichen. Während nur 8,9 % der Aminosäuren in den zusätzlich erlaubten Bereichen liegen. Keine Aminosäure zeigt eine weitläufig erlaubte, oder gar verbotene Bindungsgeometrie in dieser Ramachandran-Statistik (Ramachandran and Sasisekharan, 1968).

Die Verfeinerungsstatistik ist in Tabelle 8 gezeigt.

Auflösungsbereich	20-2,2
Reflexe (working set)	82949
Reflexe (test set)	3837
R-Faktor ^a [%]	19,5
R _{free} ^b [%]	25,8
Anzahl Proteinatome	15312
Anzahl Solvensatome	929
Anzahl Ligandenatome	224
Mittlerer B-Faktor, Protein [\AA^2]	22,3
Mittlerer B-Faktor, Ligand [\AA^2]	19,6
Mittlerer B-Faktor, Solvens [\AA^2]	24,8
r.m.s.-Abweichung vom Idealwert der	
Bindungslängen [\AA]	0,007
Bindungswinkel [$^\circ$]	1,32
^a R-Faktor = $\sum_{hkl \subset W} F_{obs} - k F_{calc} / \sum_{hkl \subset W} F_{obs} $	
^b R _{free} = $\sum_{hkl \subset T} F_{obs} - k F_{calc} / \sum_{hkl \subset T} F_{obs} $	

Tabelle 8: Verfeinerungsstatistik.

4.3.4 Strukturbeschreibung

Die aus 126 Aminosäuren bestehende Primärstruktur der DHNA aus *A. thaliana* ist in Analogie zu der bereits bekannten Struktur aus *S. aureus* (Hennig *et al.*, 1998) zu einer einzigen Domäne bestehend aus einem vier-strängigen antiparallelen β -Faltblatt (S1, S2, S3 und S4) und zwei langen α -Helices, H4 und H5, gefaltet (Abbildung 27). Das DHNA-Monomer hat eine ellipsoidale Form der Größe $50 \text{ \AA} \times 25 \text{ \AA} \times 25 \text{ \AA}$.

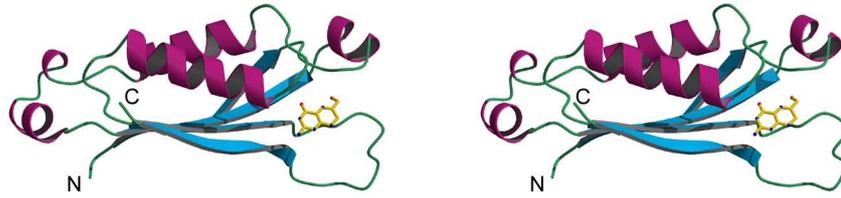


Abbildung 27: Stereoabbildung der *A. thaliana* 7,8-Dihydroneopterin Aldolase mit dem gemodelten Produkt 6-Hydroxymethyl-7,8-dihydroneopterin.

Die Loops, die die Stränge S1 und S2, sowie den Strang S2 und die Helix H4 verbinden, enthalten zwei weitere kurze helikale Segmente, H1 (AS 19-24) und H2 (AS 38-44). Des Weiteren liegt eine kurze 3_{10} -Helix, H3 (AS 47-49), zwischen H2 und der langen Helix H4. Das vier-strängige β -Faltblatt besteht aus den Resten 3-13, 26-35, 92-99 und 112-119. Die beiden langen α -Helices (H4, AS 53-65 und H5, AS 72-86) liegen beide auf der selben Seite parallel zu dem vier-strängigen β -Faltblatt. Der hydrophobe Kern des Moleküls wird von unpolaren Resten der beiden langen α -Helices und des β -Faltblatts gebildet.

DHNA ist ein D_4 -symmetrisches Homooktamer mit der Form eines hohlen Zylinders, der sich aus zwei ringförmigen Tetrameren zusammensetzt. Die 16 antiparallelen β -Stränge der vier symmetrieverwandten Polypeptidketten bilden zusammen ein, durch ein Netzwerk aus Wasserstoffbrücken stabilisiertes, β -barrel, das von einem Ring aus Helices umrandet wird (Abbildung 28).

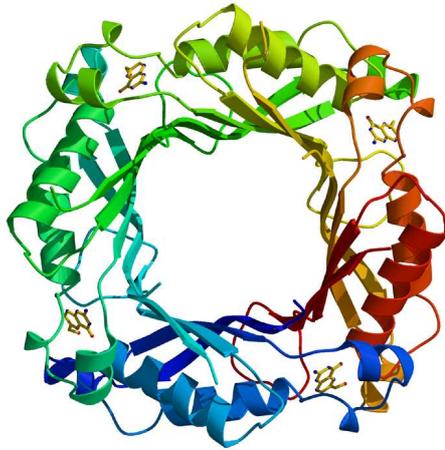


Abbildung 28: Ribbondarstellung des DHNA-Tetrameres mit dem gemodellten Produkt in allen vier aktiven Zentren.

Sechs Wasserstoffbrücken der Hauptkette vom N-terminalen Strang S1 (AS 3-11) zum C-terminalen Strang S4 (AS 107-113), sowie eine Salzbrücke zwischen Asp2 und Arg18 stabilisieren die Wechselwirkungen benachbarter Untereinheiten im Tetramer. Des Weiteren wird das Tetramer durch hydrophobe Wechselwirkungen der Seitenketten von Leu24, Tyr12, Leu104 und Ala103 stabilisiert, wobei Leu104, Ala103 und Leu24 mit Tyr12 und Leu24 der benachbarten Untereinheiten wechselwirken. Das ringförmige Tetramer hat einen Durchmesser von 60 \AA und eine Höhe von 25 \AA und umschließt eine hydrophile Pore von 30 \AA im Durchmesser. Durch die Tetramerisierung wird eine Fläche von ca. 2136 \AA^2 , entsprechend 29.2% der Fläche eines Monomeres bedeckt.

Das Oktamer weist eine C_2 -Symmetrie auf, die durch die „Kopf-an-Kopf“-Anordnung zweier Tetramere in Form eines hohlen Zylinders, hervorgerufen wird (Abbildung 29).

Die Stabilisierung dieser Zusammensetzung wird hauptsächlich durch hydrophobe Wechselwirkungen verschiedener Seitenketten hervorgerufen. In diesem Falle werden nur 690 \AA^2 (entsprechend 9,5% der Oberfläche eines Monomeres) durch die Oligo-

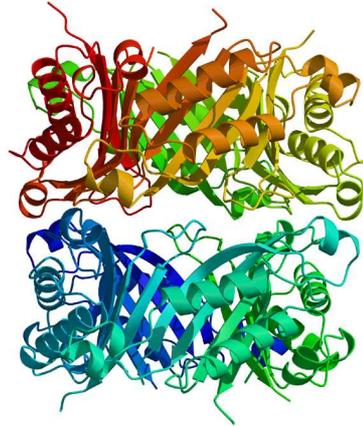


Abbildung 29: Oktamer der *A. thaliana* DHNA.

merisierung bedeckt, was die Dominanz der intra-Tetramer über die inter-Tetramer Wechselwirkungen verdeutlicht.

Die beiden DHNA-Strukturen aus *A. thaliana* und *S. aureus* weisen eine große strukturelle Ähnlichkeit auf und können mit einer r.m.s.-Abweichung von $0,72 \text{ \AA}$ zwischen 117 $C\alpha$ -Atomen überlagert werden (Abbildung 30).

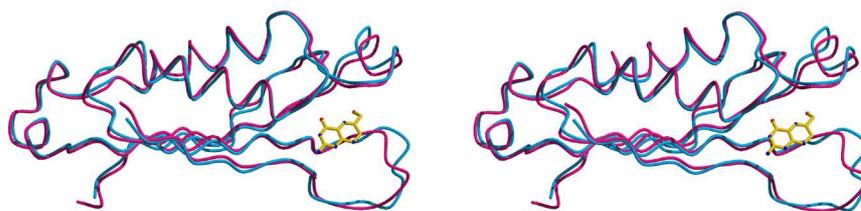


Abbildung 30: Überlagerung der DHNA-Strukturen aus *A. thaliana* (rot) und aus *S. aureus* (blau).

4.3.5 Die Struktur des aktiven Zentrums

Die acht topologisch äquivalenten Substratbindungsstellen liegen jeweils an der Kontaktfläche zwischen zwei benachbarten Untereinheiten des Tetrameres. In allen acht aktiven Zentren konnte ein gebundenes Guanin-Molekül durch die sehr gut definierte F_o-F_c -Elektronendichte eindeutig identifiziert werden. In der Kristallisation wurden jedoch weder Co-Kristallisations- noch *Soaking*-Experimente zur Erlangung von Guanin/DHNA-Komplexstrukturen eingesetzt. Daher liegt die Annahme sehr nahe, daß das Guanin mit hoher Affinität in das aktive Zentrum der DHNA bindet, da es selbst durch die Proteinpräparation nicht abgetrennt werden konnte (Abbildung 31).

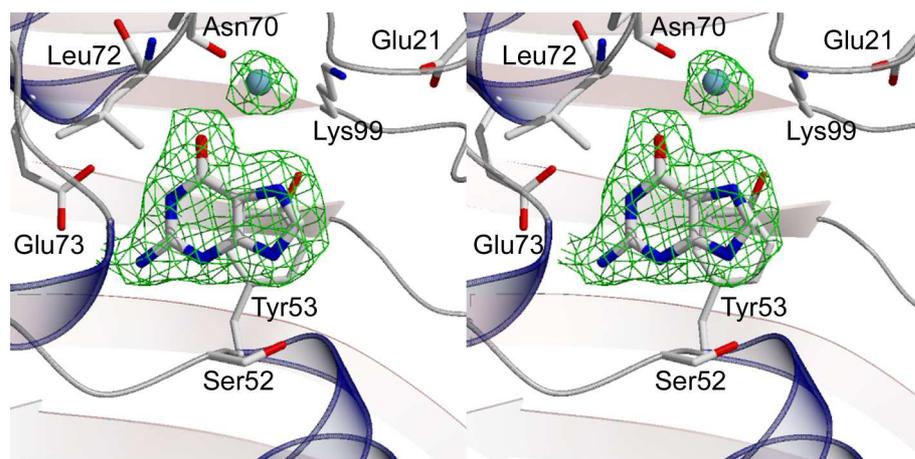


Abbildung 31: Stereoabbildung des aktiven Zentrums der *A. thaliana* DHNA. Es ist die $2F_o-F_c$ Elektronendichte (konturiert bei 1σ) für Guanin sowie für das gebundene Wassermolekül gezeigt. Ser52 und Tyr53 gehören zur benachbarten Untereinheiten.

Die Lokalisierung des Pyrimidin-Ringes entspricht dem allgemeinen Bindungsmotiv, wie es in anderen Enzymen der Tetrahydrobiopterin-Biosynthese beobachtet wird. Da sowohl Substrat als auch Produkt, der von der DHNA katalysierten Reaktion, einen Pyrimidin-Ring beinhalten, kann auf einen ähnlichen Bindungsmodus für diese Liganden in DHNA geschlossen werden. 7,8-Dihydroneopterin wurde auf der

Basis von Guanin in die Bindungsstelle gemodelt. Eine Analyse der gemodelten Bindungsverhältnisse von 7,8-Dihydroneopterin zeigt, dass hauptsächlich die Helix H1 (Glu21) und der N-terminale Teil der Helix H4 (Leu72 und Glu73) einer DHNA Untereinheit an der Bindung beteiligt sind. Weiterhin wird die Bindung durch den C-terminalen Teil vom Strang S3 (Lys99) und des Loops zwischen den Helices H3 und H4 (Asn70) stabilisiert. Eine benachbarte Untereinheit der DHNA beteiligt sich an der Bildung des aktiven Zentrums mit dem C-terminalen Bereich der Helix H3 (Tyr53) und dem Loop zwischen Helix H2 und Helix H3 (Ser52). Von diesen Resten des aktiven Zentrums sind Lys99, Glu21 und Asn70 direkt an der Bindung der Hydroxyl-Seitenkette des Dihydroneopterin-Liganden beteiligt. Des Weiteren wird der Ligand indirekt über eine Fixierung eines gebundenen Wassermoleküls durch die Reste Asn70 und Lys99 gebunden. Der Pyrimidin-Ring von 7,8-Dihydroneopterin wird in einer hydrophoben Tasche gebunden, die durch die Reste Val36, Leu38, Tyr53 und Val54, sowie Leu71 und Leu72 einer benachbarten DHNA Untereinheit gebildet wird (Abbildung32).

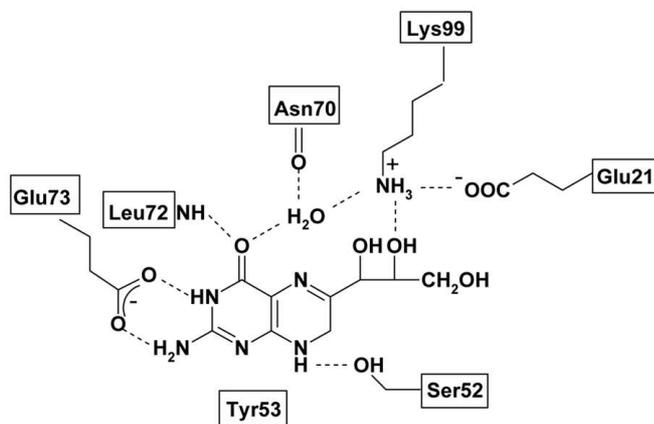


Abbildung 32: Schematische Darstellung der 7,8-Dihydroneopterin-Bindung in DHNA. Ser52 und Tyr53 gehören zur benachbarten Untereinheit.

Die N1H-Gruppe und die freie Aminogruppe des Pterin-Ringes des Liganden bilden

jeweils eine Wasserstoffbrückenbindung mit der Carboxylat-Seitenkettenfunktion von Glu73 aus. Zusätzlich befindet sich das Pterin-Ringatom N10H der Liganden in einem H-Brückenabstand zur Hydroxylgruppe von Ser52. Die Carbonyl-Funktion O2 des Liganden ist in H-Brückenbindungen zur Amid-Gruppe von Leu72 und einem Wassermolekül gebunden. Dieses Wassermolekül bildet weiterhin ein H-Brückennetzwerk zur Hauptketten-Carbonylgruppe von Asn70 und der Seitenkette von Lys99 aus. Die Orientierung der Seitenkette von Lys99 wird durch Ausbildung einer Salzbrücke mit Glu21 stabilisiert. Diese Orientierung von Lys99 bedingt somit eine Wechselwirkung mit der Hydroxyl-Seitenkette des Pterin-Liganden.

4.3.6 Strukturvergleich

Die $\beta\beta\alpha\alpha\beta\beta$ -Faltung der 7,8-Dihydroneopterin Aldolase aus *A. thaliana* zeigt eine hohe topologische Ähnlichkeit zu 7,8-Dihydroneopterintriphosphat Epimerase (Ploom *et al.*, 1999), 6-Pyruvoyltetrahydropterin Synthase (PTPS) (Nar *et al.*, 1994), der C-terminalen Domäne der GTP-Cyclohydrolase I (AS 94-238) (Nar *et al.*, 1995) und zu beiden Domänen der Urat-Oxidase (UO1 und UO2) (Colloch *et al.*, 1997). Diese Enzyme gehören, mit Ausnahme der Urat Oxidase, zur Superfamilie der Enzyme der Tetrahydrobiopterin-Biosynthese. Dihydroneopterintriphosphat Epimerase katalysiert die reversible Epimerisierung von C2' zu Dihydromapterintriphosphat aus Dihydroneopterintriphosphat. GTP-Cyclohydrolase I katalysiert die Umwandlung von Guanosintriphosphat zu Dihydronepterintriphosphat und PTPS wandelt Dihydroneopterintriphosphat in 6-Pyruvoyltetrahydrobiopterin um. Die Urat Oxidase katalysiert die Umwandlung von Harnsäure in Allantoin im Biosyntheseweg von Purin. Sie alle binden Purin- oder Pterin-Derivate an topologisch ähnlichen Bindungsstellen zwischen benachbarten Untereinheiten. Allerdings weisen lediglich zwei Mitglieder dieser Superfamilie, DHNA und 7,8-Dihydroneopterintriphosphat Epimerase, eine sequenzielle Übereinstimmung von

mehr als 20% auf, während zwischen den anderen oben erwähnten Enzymen keine nennenswerte Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz zu erkennen ist. Lediglich ein Glutamat-Rest (Glu73 in *A. thaliana* DHNA), der als Anker zur Fixierung des Pyrimidin-Ringes dient, ist allen diesen Enzymen gemein. In Domäne 2 der Urat Oxidase ist dieser Rest ein Glutamin.

In Abbildung 33 ist ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der *A. thaliana* DHNA mit dem Enzym aus *S. aureus* und der 7,8-Dihydroneopterintriphosphat Epimerase aus *E. coli* gezeigt.

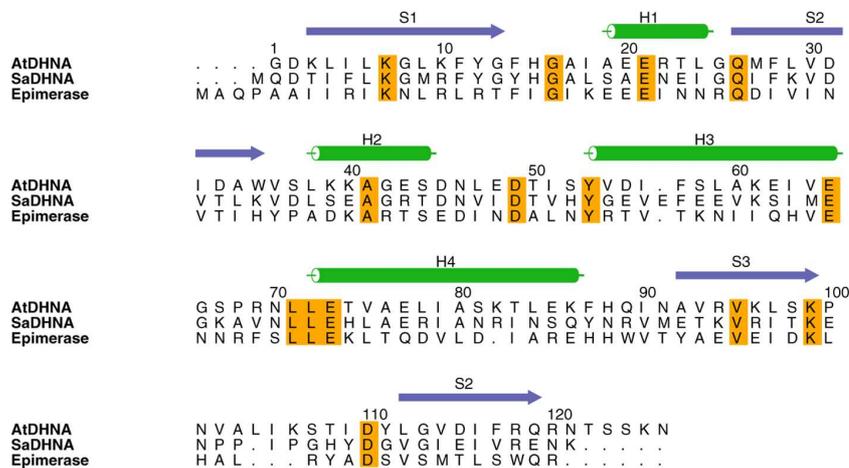


Abbildung 33: Vergleich der Aminosäuresequenzen der DHNA aus *A. thaliana* mit den Sequenzen der DHNA aus *S. aureus* und der 7,8-Dihydroneopterintriphosphat Epimerase aus *E. coli*. Konservierte Reste sind gelb unterlegt. Über dem Alignment sind die Sekundärstrukturelemente der DHNA aus *A. thaliana* abgebildet (α -Helices: grün; β -Faltblattstränge: blau).

Sechs von sieben katalytisch aktiven Aminosäure-Resten sind streng konserviert zwischen Epimerase und DHNA; der einzige signifikante Unterschied im aktiven Zentrum der beiden Enzyme ist die Triphosphat-Bindungsstelle der Epimerase. Die große Ähnlichkeit der Bindungsstellen der DHNA aus *A. thaliana*, aus *S. aureus* und der Epimerase aus *E. coli* wird in Abbildung 34 verdeutlicht.

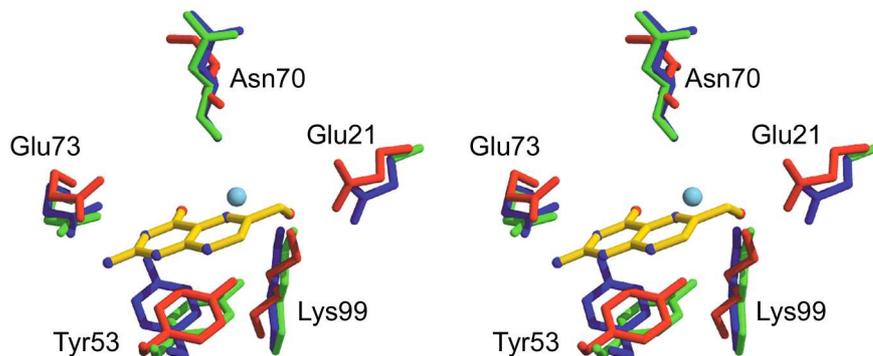


Abbildung 34: Überlagerung der katalytisch aktiven Reste von DHNA aus *A. thaliana* (grün), *S. aureus* (blau) und 7,8-Dihydroneopterintriphosphat Epimerase aus *E. coli* (rot) mit dem gemodelten Reaktionsprodukt 6-Hydroxymethyl-7,8-dihydroneopterin und dem gebundenen Wassermolekül. In 7,8-Dihydroneopterintriphosphat Epimerase ist Asn70 gegen ein Serin ausgetauscht.

4.3.7 Vergleich der Reaktionsmechanismen von DHNA und Klasse I Aldolasen

Je nach unterschiedlicher Stabilisierung ihrer Reaktionzwischenprodukte werden Aldolasen in zwei Enzym-Hauptklassen unterteilt. Aldolasen der Klasse I sind durch die Bildung einer Schiff'schen Base als Zwischenprodukt der Reaktion charakterisiert. Klasse II Aldolasen dagegen benötigen ein Metall als Co-Faktor zur Stabilisierung des Zwischenproduktes. Aldolasen der Klasse II werden daher auch als Metalloaldolasen bezeichnet. Die Aktivität der DHNA aus *A. thaliana* ist weder von zweiwertigen Metallionen abhängig noch wird das Reaktionsprodukt durch einen Schiff'schen Base Übergangszustand gebildet. Eine Klassifizierung der DHNA aus *A. thaliana* in die Klasse I oder II ist somit nicht zulässig. Die Enzyme der Familie der Klasse I Aldolasen besitzen keine Aminosäuresequenzhomologie untereinander und katalysieren somit eine Vielzahl an verschiedenen Aldolspaltungs- bzw. Kondensationsreaktionen.

Jedoch zeichnen sich alle Klasse I Enzymreaktionen durch die Bildung eines kovalenten Intermediates (Schiff'sche Base) zwischen einem Lysin-Rest des Enzymes und

einem Carbonyl-Kohlenstoffatom des Substrates aus. Einige Enzyme dieser Klasse I wurden mittels Röntgenkristallographie untersucht, und die dreidimensionalen Strukturen der Fructose-1,6-bisphosphat Aldolase (FBPA) (Choi *et al.*, 2001)(Sygusch *et al.*, 1987), der Transaldolase B (Jia *et al.*, 1996), der 2-Keto-3-desoxy-6-phosphogluconat Aldolase (KDPGA) (Mavridis and Tulinsky, 1976), der Typ I 3-Dehydroquinase (Gourley *et al.*, 1999), der D-2-Desoxyribose-5-phosphat Aldolase (DRPA) (Heine *et al.*, 2001), der N-Acetylneuraminat Lyase (Izard *et al.*, 1994) und der Dihydrodipicolinat Synthase (DHDPS) (Mirwaldt, 1995) sind bekannt. Die Untereinheiten dieser Enzyme weisen alle eine klassische TIM β/α -Faltung und eine C-terminale Region, die an der Substratbindung beteiligt ist, auf. Ursprünglich wurde angenommen, daß Asp33 in FBPA die einleitende Carbinolamin-Hydroxylgruppe (C2) protoniert, wobei Tyr363 das α -Proton auf das Carbonyl (C3 in DHAP) abstrahiert. Kürzlich konnte jedoch gezeigt werden, daß Glu187 der Aldolase aus menschlichem Muskel als katalytische Säure und Asp33 als katalytische Base in Analogie mit den entsprechenden Glu96 und Asp17 der Transaldolase B (Jia *et al.*, 1996) und Asp187 und Asp188 der DHDPS (Mirwaldt, 1995) fungieren. In der KDPG-Aldolase aus *E. coli* fungiert vermutlich Glu45 als katalytische Base (Wymer *et al.*, 2001; Allard *et al.*, 2001). Sowohl in N-Acetylneuraminat Lyase und Typ I 3-Dehydroquinase nimmt ein Histidin (His79 und His143) vermutlich letztere Rolle ein.

Eine Überlagerung der Enzyme der Klasse I zeigte, daß, mit Ausnahme der Transaldolase B, alle reaktiven Lysin-Reste nicht nur auf dem gleichen Strang, sondern auch hinsichtlich des Zentrums des *barrels* an der gleichen Stelle liegen. Die Bindungsstellen der Klasse I Enzyme scheinen alle eine ähnliche Konstellation der katalytischen Reste aufzuweisen, die exakte Konfiguration variiert jedoch von Enzym zu Enzym. Von daher ist anzunehmen, daß keine einheitliche geometrische Anordnung der katalytischen Reste für die Aldolase-Aktivität notwendig ist.

Der Reaktionsmechanismus der Klasse I Aldolasen ist in Abbildung 35 zu sehen.

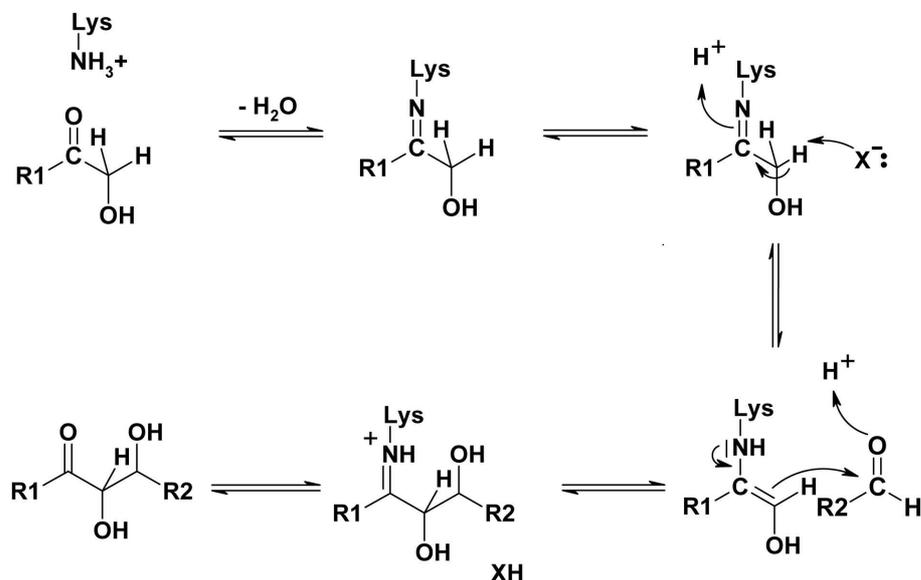


Abbildung 35: Reaktionsmechanismus der Klasse I Aldolasen mit X als nukleophiler Gruppe.

Da keine Kristallstruktur eines Substrat- oder Produktkomplexes der *A. thaliana* vorliegt, basiert der folgende Reaktionsmechanismus auf Vergleichen der aktiven Zentren und Bindungsmoden anderer Enzyme der Folat-Biosynthese, vor allem der 7,8-Dihydroneopterintriphosphat-Epimerase und der DHNA aus *S. aureus*. *A. thaliana* DHNA kann sowohl L-*threo*-Dihydroneopterin als auch D-*erythro*-Dihydroneopterin als Substrate zur Bildung von 6-Hydroxymethyl-7,8-dihydroneopterin verwenden. Das Enzym kann jedoch auch die Epimersierung des C2' von Dihydroneopterin und Dihydroneopterin mit nennenswerter Geschwindigkeit katalysieren.

Ein möglicher Reaktionsmechanismus ist in Abbildung 36 zu sehen.

Das Proton der 2'-Hydroxylgruppe wird von Lys99 abstrahiert, wodurch die Spaltung der C1'-C2'-Bindung unter Bildung eines Enamin-ähnlichen Intermediates **2**, welches durch Tautomerisierung in das Carbinol-ähnliche Produkt **3** umge-

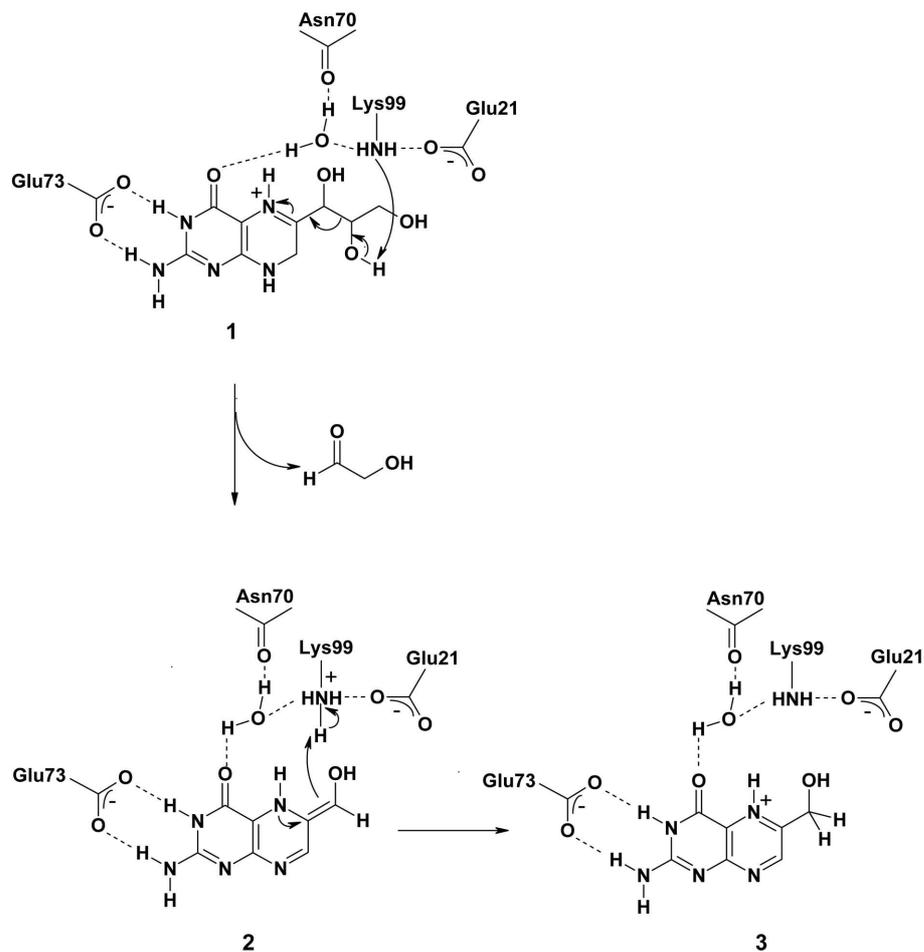


Abbildung 36: Möglicher Reaktionsmechanismus der *A. thaliana* DHNA. **1:** 7,8-Dihydroneopterin, **2:** Enamin-Intermediat, **3:** 6-Hydroxymethyl-7,8-dihydroneopterin.

wandelt werden kann, initiiert wird. Die Epimerisierung kann als eine nicht-stereospezifische Reihe aus Retroaldol-Spaltung gefolgt von einer Aldol-Addition interpretiert werden. Wie bereits gezeigt, sind die Mechanismen der DHNA und der 7,8-Dihydroneopterintriphosphat Epimerase sehr ähnlich (Hausmann *et al.*, 1998), abgesehen davon, daß das Carbinol-ähnliche Intermediat von der Epimerase nicht wieder freigesetzt werden kann.

Das Substrat **1** der DHNA kann als intramolekulare Schiff'sche Base gesehen werden, wobei die Schiff'sche Base einen Teil des Dihydropyrazin-Ringes des

Dihydroneopterin-Systemes bildet. Tatsächlich entsteht dieses Schiff'sche Base Motiv in Dihydroneopterin biosynthetisch bei der Kondensation der Carbonylgruppe mit einer Aminogruppe in der mehrstufigen Reaktion, die von der GTP-Cyclohydrolase I katalysiert wird (Schramek *et al.*, 2002). Daher wird die Bildung einer intermolekularen Schiff'schen Base mit einem Lysin-Rest des Enzymes nicht benötigt. Es muss jedoch bemerkt werden, daß der Pyrazin-Ring des Substrates hydrolytisch geöffnet werden kann und die daraus resultierende Carbonylgruppe dann eine Schiff'sche Base mit dem Enzym bilden kann. Diese Reaktionssequenz würde eine reversible Transiminierung darstellen. Die Natur des Liganden, der in den Enzym-Kristallen vorliegt, ist bislang unbekannt.

Aus struktureller Sicht kann gesagt werden, daß alle Aldolasen der Klassen I und II, deren Strukturen bestimmt wurden, eine klassische TIM β/α -Faltung mit einer C-terminalen Region, die an der Substratbindung beteiligt ist, aufweisen. Die Struktur der DHNA wird hingegen durch eine $\beta\beta\alpha\alpha\beta\beta$ -Faltung ellipsoidaler Form und einem aktiven Zentrum an der Kontaktfläche zwischen benachbarten Untereinheiten charakterisiert. Die Aldolase $\beta\beta\alpha\alpha\beta\beta$ -Faltung tritt auch in 7,8-Dihydroneopterintriphosphat Epimerase, GTP-Cyclohydrolase I, 6-Pyruvoyltetrahydropterin Synthase und Urat Oxidase auf. Diese Enzyme katalysieren jedoch, mit Ausnahme der 7,8-Dihydroneopterintriphosphat Epimerase, keine Aldol-Reaktionen.

4.3.8 Diskussion

7,8-Dihydroneopterin Aldolase (DHNA) katalysiert eine Retroaldolreaktion zur Bildung von 6-Hydroxymethyl-7,8-dihydroneopterin aus 7,8-Dihydroneopterin. Des Weiteren katalysiert das Enzym aus *A. thaliana* die Epimerisierung von 7,8-Dihydroneopterin zu 7,8-Dihydrimonapterin mit nennenswerter Geschwindigkeit. Letzteres Produkt kann ebenfalls in einer Retroaldol-Reaktion zu 6-Hydroxymethyl-

7,8-dihydroneopterin umgesetzt werden. In der vorliegenden Studie konnte die erste Struktur dieses Enzymes aus einem pflanzlichen Organismus aufgeklärt werden. Die dreidimensionale Struktur der DHNA aus *A. thaliana* weist eine große Homologie zu verschiedenen Enzymen der Tetrahydrobiopterin-Biosynthese auf (7,8-Dihydroneopterintriphosphat Epimerase, 6-Pyruvoyltetrahydropterin Synthase, GTP-Cyclohydrolase I, Urat Oxidase), welche jedoch mit Ausnahme der 7,8-Dihydroneopterintriphosphat Epimerase keine nennenswerte sequenzielle Homologie zur DHNA offenbaren. 90 % aller katalytisch aktiven Reste sind streng konserviert zwischen diesen beiden Enzymen. Einzig das Bindungsmotiv der Phosphat-Einheit der Epimerase unterscheidet die aktiven Zentren. Alle diese Enzyme haben jedoch einen konservierten Glutamat-Rest (Glutamin in UO2) in ihrem aktiven Zentrum zur Fixierung des Pyrimidin-Ringes gemein.

In allen Untereinheiten war eine gut definierte Elektronendichte im aktiven Zentrum zu finden, die auf einen Guanin-Liganden hindeutet, der jedoch nicht manuell zugefügt wurde, sondern vermutlich während der vollständigen Isolierung und Reinigung des Proteines mitgetragen wurde. Daher liegt die Annahme sehr nahe, daß das Guanin mit hoher Affinität in das aktive Zentrum der DHNA bindet, da es selbst durch die Proteinpräparation nicht abgetrennt werden konnte.

Aldolasen im allgemeinen können in zwei Klassen unterteilt werden. Enzyme der Klasse I sind durch die Bildung einer Schiff'schen Base zwischen einem Lysin-Rest des Enzymes und der Carbonyl-Gruppe des Substrates charakterisiert. Aldolasen der Klasse II hingegen benötigen ein zweiwertiges Metallion als Co-Faktor. Aufgrund der unterschiedlichen Reaktionsmechanismen und einer komplett andersartigen Faltung der DHNA wird angenommen, daß die DHNA sowohl mechanistisch als auch strukturell eine neue Klasse von Aldolase-Enzymen repräsentiert.

5 Abkürzungen

% (w/v)	Gewichtsprozent
% (v/v)	Volumenprozent
Å	Ångström ($1 \text{ Å} = 10^{-10}\text{m}$)
ADP	Adenosin-5'-Diphosphat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
BP	2,6-Bischloromercuri-4-nitrophenol
CC	Korrelationskoeffizient
C-HEGA-11	Cyclohexylbutanoyl-N-hydroxyethylglucamid
DHBPS	3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-Phosphat Synthase
DHNA	7,8-Dihydroneopterin Aldolase
DHDPS	Dihydrodipicolinat-Synthase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DRPA	D-2-Desoxyribose-5-phosphat Aldolase
FBPA	Fructose-1,6-bisphosphat Aldolase
FAD	Flavinadenindinukleotid
FMN	Flavinmononukleotid
GTP	Guanosin-5-triphosphat
kDa	(kilo)Dalton
KDPGA	2-Keto-3-desoxy-6-phosphogluconat Aldolase
M	Molar
MAD	Multiple Anomale Dispersion
MES	Morpholinoethansulfonsäure
MIR	<i>Multiple Isomorphous Replacement</i>
MR	<i>Molecular Replacement</i>
PDB	Protein Database

5 ABKÜRZUNGEN

PEG	Polyethylenglykol
PTPS	6-Pyruvoyl-Tetrahydropterin-Synthase
rms	Mittleres Abweichungsquadrat
RT	Raumtemperatur
Ru5P	Ribulose-5-Phosphat
SA	<i>Simulated annealing</i>
TM	Thiomersal ($C_9H_9HgNaO_2S$)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt

Literatur

- Abrahams, J. P., Leslie, A. G. W., Lutter, R., and Walker, J. E. (1994). Structure at 2.8-angstrom resolution of f1-atpase from bovine heart-mitochondria. *Nature*, **370**, 621–628.
- Achari, A., Somers, D. O., Champness, J. N., Bryant, P. K., and Rosemand, Stammers, D. K. (1997). Crystal structure of the anti-bacterial sulfonamide drug target dihydropteroate synthase. *Nat. Struct. Biol.*, **4**, 490–497.
- Allard, J., Grochulski, P., and Sygusch, J. (2001). Covalent intermediate trapped in 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate (kdpG) aldolase structure at 1.95 Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **98**, 3679–3684.
- Bacher, A. (1991). *Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes*, pages 215–259. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Bacher, A., Le Van, Q., Buehler, M., Keller, P. J., and Floss, H. G. (1983). Biosynthesis of riboflavin. origin of the xylen ring. *Chem. Biol. Pteridines, Proc. Int. Symp. Pteridines Folic Acid Deriv.: Chem. Biol. Clin. Aspects, 7th*, pages 699–703.
- Bacher, A., Eberhardt, S., and Richter, G. (1996). *Escherichia and Salmonella*, volume 1, Washington, D.C. Biosynthesis of riboflavin, pages 657–664.
- Bacher, A., Eberhardt, S., Eisenreich, W., Fischer, M., Herz, S., and Illarionova, B. t. (2001). Biosynthesis of riboflavin. *Vitam. Horm.*, **61**, 1–49.
- Barton, G. J. (1993). Alscript a tool to format multiple sequences alignments. *Protein Eng.*, **6**, 37–40.
- Bauer, S. (2001). *Isolierung und enzymatische Charakterisierung von Isopentenyltransferase aus A. tumefaciens, Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse*

LITERATUR

- von *Riboflavin-Kinase aus S. pombe*. Master's thesis, Technische Universität München.
- Bernal, J. D. and Crowford, D. (1934). X-ray photographs of crystalline pepsin. *Nature*, **133**, 794–795.
- Blundell, T. and Johnson, L. (1976). *Protein Crystallography*. Academic Press, London.
- Bracher, A., Schramek, N., and Bacher, A. (2001). Biosynthesis of pteridines. stopped-flow kinetic analysis of gtp cyclohydrolase i. *Biochemistry*, **40**, 7896–7902.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgramm quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248–254.
- Bragg, W. L. (1913). The structure of some crystals as indicated by their diffraction of x-rays. *Proc. Roy. Soc. Sect. A*, **89**, 248–277.
- Braig, K., Menz, R. I., Montgomery, M. G., Leslie, A. G. W., and Walker, J. E. (2000). Structure of bovine mitochondrial f-1-atpase inhibited by mg(2+)adp and aluminium fluoride. *Struct. Fold. Des.*, **8**, 567–573.
- Briggs, W. R. and Huala, E. (1999). Blue-light photoreceptors in higher plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **15**, 33–62.
- Burrows, R. B. and Brown, G. M. (1978). Presence in *Escherichia coli* of a deaminase and a reductase involved in biosynthesis of riboflavin. *J. Bacteriol.*, **136**, 657–667.
- Carter, C. W. and Carter, C. W. (1979). Protein crystallization using incomplete factorial experiments. *J. Biol. Chem.*, **254**, 12219–12223.

LITERATUR

- Cheek, S., Zhang, H., and Grshin, N. V. (2002). Sequence and structure classification of kinases. *J. Mol. Biol.*, **320**, 855–881.
- Chio, L. C., Bolyard, L. A., Nasr, M., and Queener, S. F. (1996). Identification of a class of sulfonamides highly active against dihydropteroate synthase from *Toxoplasma gondii*, *Pneumocystis carinii*, and *Mycobacterium avium*. *Agents Chemother.*, **40**, 727–733.
- Choi, K. H., Shi, J., Hopkins, C. E., Tolan, D. R., and Allen, K. N. (2001). Snapshots of catalysis: the structure of fructose-1,6-(bis)phosphate aldolase covalently bound to the substrate dihydroxyacetone phosphate. *Biochemistry*, **40**, 13868–13875.
- Colloch, N., El Hajji, M., Bachet, B., L’Hermite, G., Schiltz, M., and Prang, T. t. (1997). Crystal structure of the protein drug urate oxidase-inhibitor complex at 2.05 Å resolution. *Nat. Struct. Biol.*, **4**, 947–952.
- Correll, C. C., Batie, C. J., Ballou, D. P., and Ludwig, M. L. (1992). Phthalate dioxygenase reductase: a modular structure for electron transfer from pyridine nucleotides to [2Fe2S]. *Science*, **258**, 1604–1610.
- Cossins, E. A. (1980). *The Biochemistry of Plants*, volume 2, page 365. Academic Press, New York.
- Cossins, E. A. (1997). Folates and one-carbon metabolism in plants and fungi. *Phytochemistry*, **45**, 437–452.
- Covey, T. R., Bonner, R., Shushan, B. I., and Henion, J. (1988). The determination of protein, oligonucleotide and peptide molecular weights by ion-spray mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Sp.*, **2**, 249–256.
- Crosson, S. and Moffat, K. (2001). Structure of a flavin-binding plant photoreceptor

- domain: Insights into light-mediated signal transduction. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **98**(6), 2995–3000.
- De Saizieu, A., Vankan, P., and von Loon, A. P. G. M. (1995). Enzymatic characterization of *Bacillus subtilis* gtp cyclohydrolase i. evidence for a chemical dephosphorylation of dihydroneopterin triphosphate. *Biochem. J.*, **306**, 371–377.
- Deng, H., Callender, R., and Dale, G. E. (2000). A vibrational structure of 7,8-dihydroneopterin bound to dihydroneopterin aldolase. *J. Biol. Chem.*, **275**, 30139–30143.
- Drenth, J. (1994). *Principles of protein X-ray crystallography*. Springer Verlag, New York.
- Echt, S. (2004). *Biochemische und strukturelle Charakterisierung von Enzymen der Riboflavin-, Catecholamin- und Folsäurebiosynthese sowie des Calvin-Zyklus*. Phd-thesis, Technische Universität München.
- Engh, R. A. and Huber, R. (1991). Accurate bond and angle parameters for x-ray protein-structure refinement. *Acta Cryst. A*, **47**, 392–400.
- Ermler, U., Siddiqui, R. A., Cramm, R., and Friedrich, B. (1995). Crystal structure of the flavohemoglobin from *Alcaligenes eutrophus* at 1.75 Å resolution. *EMBO J.*, **14**, 6067–6077.
- Esnouf, R. M. (1997). An extensively modified version of molscript that includes greatly enhanced coloring capabilities. *J. Mol. Graph. Model.*, **15**, 132–134.
- Ewald, P. P. (1921). Das „reziproke“ gitter in der strukturtheorie. *Zeitschrift für Kristallographie*, **56**, 129–156.

- Falquet, L., Pagni, M., Bucher, P., Hulo, N., Sigrist, C. J., Hofmann, K., and Bairoch, A. (2002). The prosite database, its status in 2002. *Nucl. Acids Res.*, **30**, 235.
- Fan, C. L. and Brown, G. M. (1976). Partial purification and properties of guanosine triphosphate cyclohydrolase from *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Genet.*, **14**, 259–270.
- Feinleib, M., Beresford, S. A., Bowman, B. A., Mills, J. L., Rader, J. I., Selhub, J., and Yetley, E. A. (2001). Folate fortification for the prevention of birth defects. *Am. J. Epidemiol.*, **154**, 60–69.
- Fischer, M., Haase, I., Feicht, R., Richter, G., Gerhardt, S., and Changeux, J. P. t. (2002). Biosynthesis of riboflavin 6,7-dimethyl-8-ribityllumazin synthase of *Schizosaccharomyces pombe*. *Eur. J. Biochem.*, **269**, 519–526.
- Fischer, M., Haase, I., Kis, K., Meining, W., Ladenstein, R., Cushman, M., and Bacher, A. (2003). enzyme catalysis via control of activation entropy: site-directed mutagenesis of 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase. *J. Mol. Biol.*, **326**, 783–793.
- Foor, F. and Brown, G. M. (1975). Purification and properties of guanosine triphosphate cyclohydrolase ii from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **250**, 3545–3551.
- Friedrich, W., Knipping, P., and Laue, M. (1912). Sitzungsberichte der methamatisch-physikalischen klasse der königlichen bayerischen akademie der wissenschaften zu münchen. Technical report.
- Frishman, D. and Argos, P. (1995). Knowledge-based protein secondary structure assignment. *Proteins: Struct. Funct. Genet.*, **23**, 566–579.

- Gefflaut, T., Blonski, C., Perie, J., and Willson, M. (1995). Class i aldolases: substrate specificity, mechanism, inhibitors and structural aspects. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **63**, 301–340.
- Gourley, D. G., Shrive, A. K., Polikarpov, I., Krell, T., Coggins, J. R., Hawkins, A. R., Isaacs, N. W., and Sawyer, L. (1999). The two types of 3-dehydroquinase have distinct structures but catalyze the same overall reaction. *Nat. Struct. Biol.*, **6**, 521–525.
- Goyer, A., Illarionova, V., Roje, S., Fischer, M., Bacher, A., and Hanson, A. (2004). Folate biosynthesis in higher plants. cDNA cloning, heterologous expression, and characterization of dihydroneopterin aldolases. *Plant Physiol.*, **134**(1), 103–111.
- Green, D. W., Ingram, V. M., and Perutz, M. F. (1954). The structure of hemoglobin iv. sign determination by isomorphous replacement method. *Proc. Roy. Soc. Sect. A*, **225**, 287–307.
- Green, J. M., Nichols, B. P., and Matthews, R. G. (1996). *Escherichia coli and Salmonella typhimurium*, volume 1, pages 665–673. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Gross, W., Bayer, M. G., Schnarrenberger, C., Gebhart, U. B., Maier, T. L., and Schenk, H. (1994). Two distinct aldolases of class ii type in cyanoplasts and in the cytosol of the alga cyanophora paradoxa. *Plant Physiol.*, **105**, 1393–1398.
- Harker, D. (1956). The determination of the phases of the structure factors on noncentrosymmetric crystals by the method of double isomorphous replacement. *Acta. Cryst.*, **9**, 1–9.
- Harvey, R. A. and Plaut, G. W. E. (1966). Riboflavin synthase from yeast: Properties of complexes of the enzyme with lumazine derivatives and riboflavin. *J. Biol. Chem.*, **241**, 2120–2136.

LITERATUR

- Hauptmann, H. and Karle, J. (1953). *Solution of the phase problem. 1. The centrosymmetric crystal*. Polycrystal Book Service, Pittsburgh.
- Haussmann, C., Rohdich, F., Schmidt, E., Bacher, A., and Richter, G. (1998). Biosynthesis of pteridines in *Escherichia coli*. structural and mechanistic similarity of dihydroneopterin triphosphate epimerase and dihydroneopterin aldolase. *J. Biol. Chem.*, **273**, 17418–17424.
- Heine, A., DeSantis, G., Luz, J. G., Mitchell, M., Wong, C.-H., and Wilson, I. A. (2001). Observation of covalent intermediates in an enzyme mechanism at atomic resolution. *Science*, **294**, 369–374.
- Heine, M. C. and Brown, G. M. (1975). Enzymatic epimerization of d-erythro-dihydroneopterin triphosphate to l-threo-dihydroneopterin triphosphate. *Biochim. Biophys. Acta*, **411**, 236–249.
- Hennig, M., D’Arcy, A., Hampele, I. C., Page, M. G. P., Oefner, C., and Dale, G. E. (1998). Crystal structure and reaction mechanism of 7,8-dihydroneopterin aldolase from *Staphylococcus aureus*. *Nat. Struct. Biol.*, **5**, 357–362.
- Holm, L. and Sander, C. (1993). Protein structure comparison by alignment of distance matrices. *J. Mol. Biol.*, **233**, 123–138.
- Hoppe, W. (1957). Die faltmolekülmethode: eine neue methode zur bestimmung der kristallstruktur bei ganz oder teilweise bekannten molekülstrukturen. *Acta Cryst.*, **10**, 750–751.
- Huber, R. (1965). Die automatisierte faltmolekülmethode. *Acta Cryst.*, **19**.
- Illarionova, V., Eisenreich, W., Fischer, M., Haumann, C., Römisch, W., Richter, G., and Bacher, A. (2002). Biosynthesis of tetrahydrofolate: stereochemistry of dihydroneopterin aldolase. *J. Biol. Chem.*, **277**, 28841–28847.

- Ingelmann, M., Bianchi, V., and Eklund, H. (1997). The three-dimensional structure of flavodoxin reductase from *Escherichia coli* at 1.7 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, **268**, 147–157.
- Izard, T., Lawrence, M. C., Malby, R. L., Lilley, G. G., and Colman, P. M. (1994). The three-dimensional structure of n-acetylneuraminate lyase from *Escherichia coli*. *Structure*, **2**, 361–369.
- Jancarik, J. and Kim, S.-H. (1991). Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. *J. Appl. Cryst.*, **24**, 409–411.
- Jia, J., Huang, W., Schorken, U., Sahm, H., Sprenger, G. A., Lindqvist, Y., and Schneider, G. (1996). Crystal structure of transaldolase b from *Escherichia coli* suggests a circular permutation of the α/β barrel within the class i aldolase family. *Structure*, **4**, 715–724.
- Karthikeyan, S., Zhou, Q., Mseeh, F., Grishin, N. V., Osterman, A. L., and Zhang, H. (2003). Crystal structure of human riboflavin kinase reveals a β barrel fold and a novel active site arch. *Structure*, **11**, 1–20.
- Kelly, M. J., Ball, L. J., Krieger, C., Yu, Y., Fischer, M., Schiffmann, S., Schmieder, P., Kuhne, R., Bermel, W., Bacher, A., Richter, G., and Oschkinat, H. (2001). The nmr structure of the 47-kda dimeric enzyme 3,4-dihydroxy-2-butanone-4-phosphate synthase and ligand binding studies reveal the location of the active site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**(23), 13025–13030.
- Kemter, K. (2002). *Untersuchungen zur Riboflavin Synthase und Flavokinase aus verschiedenen Organismen*. Phd-thesis, Technische Universität München.
- Kendrew, J. C., Dickerson, R. E., Strindberg, B. E., Hart, R. C., and Davies, D. R. (1960). Structure of myoglobin; a three-dimensional fourier synthesis at 2 Å resolution. *Nature*, **185**, 422–427.

- Kis, K., Volk, R., and Bacher, A. (1995). Biosynthesis of riboflavin. studies on the reaction mechanism of 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase. *Biochemistry*, **34**, 2883–2892.
- Kraulis, P. J. (1991). Molscript: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J. Appl. Crystallog.*, **24**, 946–950.
- Laskowski, R. A., McArthur, M. W., Moss, D. S., and Thornton, J. M. (1993). Procheck - a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Crystallog.*, **26**, 283–291.
- Leslie, A. G. W. (1998). *MOSFLM 6.0 edit*. Cambridge, UK.
- Liao, D.-I., Calabrese, J. C., Wawrzak, Z., Viitanen, P. V., and Jordan, D. B. (2001). Crystal structure of 3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase of riboflavin biosynthesis. *Structure*, **9**, 11–18.
- Liao, D.-I., Zheng, Y.-J., Viitanen, P. V., and Jordan, D. B. (2002). Structural definition of the active site and catalytic mechanism of 3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase. *Biochemistry*, **41**, 1795–1806.
- Mack, M., van Loon, A. P., and 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**, 950–955.
- Mann, Y., Meng, M., and Fenn, C. K. (1989). Interpreting mass spectra of multiply charged ions. *Anal. Chem.*, **61**, 1702–1708.
- Manstein, D. J. and Pai, E. F. (1986). Purification and characterization of fad synthetase from *Brevibacterium ammoniagenes*. *J. Biol. Chem.*, **261**, 16169–16173.

LITERATUR

- Mathis, J. B. and Brown, G. M. (1970). Dihydroneopterin aldolase from *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.*, **66**, 556–560.
- Mathis, J. B. and Brown, G. M. (1980). The biosynthesis of folic acid. xi. purification and properties of dihydroneopterin aldolase. *J. Biol. Chem.*, **245**, 3015–3025.
- Matte, A., Tari, L. W., and Delbaere, L. T. J. (1998). How do kinases transfer phosphoryl groups. *Structure*, **6**, 413–419.
- Matthews, B. W. (1968). Solvent content of protein crystals. *J. Mol. Biol.*, **33**, 491–497.
- Mavridis, I. M. and Tulinsky, A. (1976). The folding and quaternary structure of trimeric 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconic aldolase at 3.5 Å resolution. *Biochemistry*, **15**, 4410–4417.
- McPherson, A. (1982). *Preparation and analysis of protein crystals*. John Wiley and Sons, New York.
- Meighen, E. A. (1991). Molecular biology of bacterial bioluminescence. *Microbiol. Rev.*, **55**, 123–142.
- Meighen, E. A. (1993). Bacterial bioluminescence: organization, regulation, and application of the lux genes. *FASEB J.*, **7**, 1016–1022.
- Merrill, A. H. and McCormick, D. B. (1980). Affinity chromatographic purification and properties of flavokinase (atp:riboflavin 5'-phosphotransferase) from rat liver. *J. Biol. Chem.*, **255**, 1335–1338.
- Nar, H., Huber, R., Heizmann, W., C., Thöny, B., and Bürgisser, D. (1994). Three-dimensional structure of 6-pyruvoyl tetrahydropterin synthase, an enzyme involved in tetrahydrobiopterin biosynthesis. *EMBO J.*, **13**, 1255–1262.

- Nar, H., Huber, R., Auerbach, G., Fischer, M., Hösl, C., and Ritz, H. t. (1995). Active site topology and reaction mechanism of gtp cyclohydrolase i. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 12120–12125.
- Navaza, J. (1994). Amore: an automated package for molecular replacement. *Acta Crystallog. sect. A*, **50**, 157–163.
- Neuberger, G. and Bacher, A. (1986). Biosynthesis of riboflavin. enzymatic formation of 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine by heavy riboflavin synthase from *Bacillus subtilis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **139**, 1111–1116.
- Neuburger, M., Rebeille, F., Jourdain, A., Nakamura, S., and Douce, R. (1996). Mitochondria are a major site for folate and thymidylate synthesis in plants. *J. Biol. Chem.*, **271**, 9466–9472.
- Nielsen, P. and Bacher, A. (1981). Biosynthesis of riboflavin. characterization of the product of the deaminase. *Biochim. Biophys. A*, **662**, 312–317.
- O’Kane, D. J. and Prasher, D. C. (1992). Evolutionary origins of bacterial bioluminescence. *Mol. Microbiol.*, **6**, 443–449.
- Oltmanns, O., Bacher, A., Lingens, F., and Zimmermann, F. K. (1969). Biochemical and genetic classification of riboflavin deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.*, **105**, 306–313.
- Ortiz, P. J. and Hotchkiss, R. D. (1966). The enzymatic synthesis of dihydrofolate and dihydropteroate in cell-free preparations from wild-type and sulfonamide-resistant pneumococcus. *Biochemistry*, **5**, 67–74.
- Otwinowski, Z. and Minor, W. (1997). Proceedings of x-ray diffraction data collected in oscillations mode. *Methods Enzymol.*, **276**, 307–326.

LITERATUR

- Outten, C. E. and O'Halloran, T. V. (2001). Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis. *Science*, **292**, 2488–2492.
- Perutz, M. F., Rossmann, M. G., Cullis, A. F., Muirhead, H., Will, G., and North, A. C. T. (1960). Structure of haemoglobin; a three dimensional fourier synthesis at 5.5 Å resolution, obtained by x-ray analysis. *Nature*, **185**, 416–422.
- Plaut, G. W., Beach, R. L., and Aogaichi, T. (1970). Studies on the mechanism of elimination of protons from the methyl groups of 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine by riboflavin synthetase. *Biochemistry*, **9**, 771–785.
- Plaut, G. W. E. (1960). Studies on the stoichiometry of the enzymatic conversion of 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine to riboflavin. *J. Biol. Chem.*, **235**, 2225–2243.
- Plaut, G. W. E. and Harvey, R. A. (1971). The enzymatic synthesis of riboflavin. *Methods Enzymol.*, **18**, 515–538.
- Ploom, T., Haumann, C., Hof, P., Steinbacher, S., Bacher, A., Richardson, J., and Huber, R. (1999). Crystal structure of 7,8-dihydroneopterin triphosphate epimerase. *Structure*, **7**, 509–516.
- Ramachandran, G. N. and Sasisekharan, V. (1968). Conformation of polypeptides and proteins. *Advan. Protein Chem.*, **23**, 283–437.
- Richey, D. P. and Brown, G. M. (1969). The biosynthesis of folic acid. ix. purification and properties of the enzymes required for the formation of dihydropterin acid. *J. Biol. Chem.*, **244**, 1582–1592.
- Richter, G., Volk, R., Krieger, C., Lahm, H. W., Röthlisberger, U., and Bacher, A. (1992). Biosynthesis of riboflavin. cloning, sequencing and expression of the gene code for 3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **174**(12), 4050–4056.

- Romani, A. M. P. and Maguire, M. E. (2002). Hormonal regulation of mg^{2+} transport and homeostasis in eukaryotic cells. *BioMetals*, **15**, 271–283.
- Rossman, M. G. and Blow, D. M. (1962). The detection of subunits within the crystallographic asymmetric unit. *Acta Cryst.*, **15**, 24–31.
- Rutter, W. J. (1960). Aldolase. *Enzymes*, **5**, 341–372.
- Salomon, M., Eisenreich, W., Durr, H., Schleicher, E., Knieb, E., and Massey, V. t. (2001). An optomechanical transducer in the blue light receptor phototropin from *Avena sativa*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **98**, 12357–12361.
- Santos, M. A., Jimenez, A., and Revuelta, J. L. (2000). Molecular characterization of *fmn1*, the structural gene for the monofunctional flavokinase of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **275**, 28618–28624.
- Schott, A.-K. (2003). *Biochemische und strukturelle Charakterisierung von Enzymen der Riboflavin- und Folsäurebiosynthese*. Phd-thesis, Technische Universität München.
- Schramek, N., Bracher, A., Fischer, M., Auerbach, G., Nar, H., Huber, R., and Bacher, A. (2002). Reaction mechanism of gtp cyclohydrolase i: single turnover experiments using a kinetically competent reaction intermediate. *J. Mol. Biol.*, **316**, 829–837.
- Schulz, G. (1992). Binding of nucleotides by proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **2**, 61–67.
- Schweitzer, B. I., Dicker, A. P., and Bertino, J. R. (1990). Dihydrofolate reductase as a therapeutic target. *FASEB J.*, **4**, 2441–2452.

- Shavlovsky, G. M., Sibirny, A. A., Kshanovskaya, B. V., Koltun, L. V., and Logvinenko, E. M. (1979). Regulation of flavogenesis in riboflavin-dependent *Escherichia coli* mutants. *Mikrobiologiya*, **51**, 986–992.
- Shavlovsky, G. M., Teslyar, G. E., and Strugovshchikova, L. P. (1982). Regulation of flavogenesis in riboflavin-dependent *Escherichia coli* mutants. *Mikrobiologiya*, **51**, 986–992.
- Sheldrick, G. M., Dauter, Z., Wilson, K. S., Hope, H., and Sieker, L. C. (1993). The application of direct methods of patterson interpretation to high-resolution native protein data. *Acta Crystallog. sect. D*, **49**, 18–23.
- Singer, S., Elion, G. B., and Hitchings, G. H. (1966). Resistance to inhibitors of dihydrofolate reductase in strains of *Lactobacillus casei* and *Proteus vulgaris*. *J. Gen. Microbiol.*, **42**, 185–196.
- Skold, O. (2000). Sulfonamide resistance: mechanisms and trends. *Drug Resist Updat*, **3**, 155–160.
- Skold, O. (2001). Resistance of trimethoprim and sulfonamides. *Vet Res*, **32**, 261–273.
- Smith, G. M., Mildvan, A. S., and Harper, E. T. (1980). Nuclear relaxation studies of the interaction of substrates with a metalloaldolase from yeast. *Biochemistry*, **19**, 1248–1255.
- Solovieva, I. M., Kreneva, R. A., Leak, D. J., and Perumov, D. A. (1999). The *ribR* gene encodes a monofunctional riboflavin kinase which is involved in regulation of *Bacillus subtilis* riboflavin operon. *Microbiol.*, **145**, 67–73.
- Steinbacher, S., Schiffmann, S., Richter, G., Huber, R., Bacher, A., and Fischer, M. (2003). Structure of 3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase from

- Methanococcus jannaschii* in complex with divalent metal ions and the substrate ribulose 5-phosphate. *J. Biol. Chem.*, **278**, 42256–42265.
- Stout, G. and Jensen, L. (1989). *X-ray structure determination*. John Wiley, New York.
- Suckling, C. J., Sweeney, J. R., and Wood, H. C. (1977). Dihydropteroate synthase: purification by affinity chromatography and mechanism of action. *J. Chem. Soc.*, **4**, 439–442.
- Suzuki, Y. and Brown, G. M. (1974). The biosynthesis of folic acid. xii. purification and properties of dihydroneopterin triphosphate pyrophosphohydrolase. *J. Biol. Chem.*, **249**, 2405–2410.
- Sygyusch, J., Beaudry, D., and Allaire, M. (1987). Molecular architecture of rabbit skeletal muscle aldolase at 2.7 Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 7846–7850.
- Szwergold, B. S., Ugurbil, K., and Brown, T. R. (1995). Properties of fructose-1,6-bisphosphate aldolase from *Escherichia coli*: an nmr analysis. *Arch. Biochem. Biophys.*, **317**, 244–252.
- Thompson, I. J. and Sancar, A. (2002). Photolyase/cryptochrome blue-light photoreceptors use photon energy to repair dna and reset the circadian clock. *Oncogene*, **21**, 9043–9056.
- Turk, D. (1992). *Weiterentwicklung eines Programmes für Molekülgraphik und Elektronendichte-Manipulation und seine Anwendung auf verschiedene Protein-Strukturaufklärungen*. Phd-thesis, Technische Universität München.
- Vetter, I. R. and Wittighofer, A. (1999). Nucleoside triphosphate-binding proteins: different scaffolds to achieve phosphoryl transfer. *Q. Rev. Biophys.*, **32**, 1–56.

LITERATUR

- Volk, R. and Bacher, A. (1988). Biosynthesis of riboflavin. the structure of the four-carbon precursor. *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 3651–3653.
- Volk, R. and Bacher, A. (1990). Studies on the 4-carbon precursor in the biosynthesis of riboflavin. *J. Biol. Chem.*, **265**, 19479–19485.
- Volk, R. and Bacher, A. (1991). Biosynthesis of riboflavin. *J. Biol. Chem.*, **266**(31), 20610–20618.
- Wacker, H., Harvey, R. A., Winestock, C. H., and Plaut, G. W. E. (1964). 4-(1'-d-ribitylamino)-5-amino-2,6-dihydroxypyrimidine, the second product of the riboflavin synthetase reaction. *J. Biol. Chem.*, **239**, 3493–3497.
- Wang, W., Kim, R., Jancarik, J., Yokota, H., and Kim, S.-H. (2003). Crystal structure of a flavin-binding protein from *Thermotoga maritima*. *Proteins*, **52**, 633–635.
- Wymer, N., Buchanan, L. V., Henderson, D., Mehta, N., Bottig, C. H., and Pociavsek, L. (2001). Directed evolution of a new catalytic site in 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate aldolase from *Escherichia coli*. *Structure*, **9**, 1–10.
- Yim, J. J. and Brown, G. M. (1976). Characteristics of guanosine triphosphate cyclohydrolase i purified from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **251**, 5087–5094.
- Young, D. W. (1986). The biosynthesis of the vitamins thiamin, riboflavin, and folic acid. *Nature Prod. Rep.*, **3**, 395–419.