

Institut für Organische Chemie und Biochemie der  
Technischen Universität München

## **Coenzym-Isotopologe als spektroskopische Sonden**

Werner Römisch

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. Univ.-Prof. Dr. Dr. A. Bacher |
|                          | 2. Univ.-Prof. Dr. A. Gierl      |
|                          | 3. Univ.-Prof. Dr. S. Weinkauff  |

Die Dissertation wurde am 03.11.05 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die Fakultät für Chemie am 12.12.05 angenommen.

*Meinen Eltern*

Die experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation wurden von Februar 2001 bis September 2005 am Lehrstuhl für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität München durchgeführt.

---

## Danksagung

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Dr. Adelbert Bacher danke ich herzlich für die vielseitige und interessante Themenstellung, die immer gewährte Unterstützung und die stete Hilfsbereitschaft bei der Betreuung und Förderung dieser Arbeit.

Den Teilprojektleitern Herrn Prof. Dr. Gerald Richter, Herrn Priv.-Doz. Dr. Markus Fischer und Herrn Dr. Wolfgang Eisenreich danke ich für die fachliche Begleitung und Betreuung der einzelnen Projekte. Herrn Dr. Markus Fischer danke ich insbesondere für die Synthese und Klonierung zahlreicher Gene der Ribioflavinbiosynthese und die Bereitstellung der entsprechenden Enzyme. Bei Herrn Dr. Wolfgang Eisenreich möchte ich mich für die Einführung in die experimentelle NMR-Spektroskopie und seine stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft bedanken.

Herrn Priv.-Doz. Dr. Stefan Weber und Herrn Dr. Erik Schleicher von der Freien Universität Berlin danke ich für die hervorragende Kooperation in den Bereichen ENDOR- und IR-Spektroskopie sowie für die theoretische Behandlung quantenmechanischer Fragestellungen. Dr. Joachim Heberle und seinen Mitarbeitern vom Forschungszentrum Jülich danke ich für die Messung der IR- und Ramanspektren isotopologer FMN-Liganden in rekonstituierten LOV2-Domänen.

Meinen Kollegen Frau Dr. Stefanie Echt, Frau Dr. Ilka Haase, Herrn Dr. Boris Illarionov, Frau Dr. Victoria Illarionova, Frau Dr. Kristina Kemter, Frau Dr. Lilla Margl, Frau Dr. Susanne Schiffmann, Herrn Dr. Erik Schleicher, Frau Dr. Anne-Kathrin Schott, Herrn Dr. Nicholas Schramek, Herrn Alexander Fiedler, Frau Monika Joshi, Herrn Stefan Kraut und Frau Sabine Saller danke ich für die sehr gute Zusammenarbeit in verschiedenen gemeinsamen Projekten.

Herrn Richard Feicht, Frau Heidi Hofner, Herrn Sebastian Schwamb und Herrn Thomas Wojtulewicz danke ich herzlich für ihre technische Unterstützung bei der Proteinreinigung sowie molekularbiologischen und proteinchemischen Arbeiten.

Frau Astrid König bin ich für ihre Unterstützung im Bereich organische Synthese dankbar. Frau Dr. Sabine Amslinger und Herrn Dr. Stefan Hecht danke ich für viele hilfreiche Diskussionen in diesem Arbeitsgebiet.

Herrn Fritz Wendling danke ich für seine professionelle Hilfe bei Computer- und HPLC-Problemen.

Den Laborkollegen Dr. Boris Illarionov, Dr. Victoria Illarionova, Astrid König, Martina Winkler und Sabrina Wölfl sowie den (ehemaligen) Kollegen aus dem Nachbarlabor Dr. Erik Schleicher, Dr. René Mühlberger, Dr. Rudolf Robelek, Stefan Czogalla, Heidrun Herrmann, Oliver Latz, Oliver Ladebeck, Monika Joshi und nicht zuletzt Heidi Hofner danke ich von Herzen für ihre freundschaftliche Aufnahme in die Laborgemeinschaft und ihre stete Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Meinen Jahrespraktikanten von der agrartechnischen Berufsschule Landsberg Sebastian Drechsler, Michaela Schuster und Thomas Walczak sowie allen studentischen Praktikanten danke ich für ihre Hilfe und engagierte Mitarbeit.

Dr. Petra Adam, Dr. Tanja Radykewicz, Dr. Johannes Kaiser, Ferdinand Zepeck, Christine Schwarz und Heidi Hofner sei an dieser Stelle für die Organisation der "Terpenessen", des Kanu-Ausflugs auf der Isar und sonstiger gemeinschaftlicher Laboraktivitäten gedankt.

Allen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern der Mensagruppe sowie allen weiteren nicht genannten Kollegen danke ich für die gute Zusammenarbeit, zahlreiche anregende Diskussionen und das freundliche Klima am Lehrstuhl.

Meinen Freunden und Bergkameraden Sabine Amslinger, Holger Apelt, Stefan Hecht, Petra Adam, Ralf Laupitz, Ferdinand Zepeck, Christina Junge, Silke Marsch und Lilla Margl danke ich für viele schöne Stunden auch abseits des Laboralltags.

Meinen Eltern, Tücsöknek und allen "schlechten Gewissen" danke ich ganz besonders herzlich für die vielen Motivationshilfen und ihre stete Unterstützung beim Anfertigen dieser Arbeit.

Nagyon köszönök mindent édes tücsököm.

---

## Publikationsliste

- Richter, G., Weber, S., Römisch, W., Bacher, A., Fischer, M. und Eisenreich, W. (2005) Photochemically induced dynamic nuclear polarization in a C450A mutant of the LOV2 domain of the *Avena sativa* blue-light receptor phototropin. *J. Am. Chem. Soc.* (im Druck).
- Römisch, W., Illarionov, B., Richter, G., Bacher, A., Fischer, M. und Eisenreich, W. (2005) Stable isotope labeled flavocoenzymes as probes for flavoprotein spectroscopy: Preparation and use of random and ordered libraries. *Flavins and Flavoproteins 2005*, Proc. Int. Symp. **15**, Shonan Village, Japan (im Druck).
- Richter, G., Bacher, A., Weber, S., Römisch, W., Joshi, M., Fischer, M. und Eisenreich, W. (2005) Studies of the Photocycle of the Blue-Light Receptor Phototropin. Observation of Nuclear-Spin Polarization by Solution  $^{13}\text{C}$ -NMR. *Flavins and Flavoproteins 2005*, Proc. Int. Symp. **15**, Shonan Village, Japan (im Druck).
- Hecht, S., Richter, G., Bacher, A., Joshi, M., Römisch, W., Greiner, G., Frank, R., Weber, S., Eisenreich, W. und Fischer, M. (2005) Photocycle of a blue light receptor LOV2 domain reconstituted with 5-deaza-FMN. *Flavins and Flavoproteins 2005*, Proc. Int. Symp. **15**, Shonan Village, Japan (im Druck).
- Fischer, M., Eicht, S., Bauer, S., Steinbacher, S., Huber, R., Kraut, S., Römisch, W., Eisenreich, W., Haase, I. und Bacher, A. (2005) Potential antiinfective targets in pathogenic yeasts. GTP cyclohydrolase II and 3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase of *Candida albicans*. *Flavins and Flavoproteins 2005*, Proc. Int. Symp. **15**, Shonan Village, Japan (im Druck).
- Fischer, M., Illarionov, B., Römisch, W., Bacher, A. und Eisenreich, W. (2005) Evolution of riboflavin biosynthesis: Structures and reaction mechanisms of riboflavin synthases from eubacterial and archaeal kingdom. *Flavins and Flavoproteins 2005*, Proc. Int. Symp. **15**, Shonan Village, Japan (im Druck).
- Fischer, M., Römisch, W., Haase, I., Feicht, R., Schramek, N., Köhler, P., Schieberle, P., Saller, S., Illarionov, B., Eisenreich, W. und Bacher, A. (2005) Vitamin B<sub>2</sub> biosynthesis in plants. The pyrimidine deaminase and the riboflavin synthase of *Arabidopsis*

- thaliana*. *Flavins and Flavoproteins 2005*, Proc. Int. Symp. **15**, Shonan Village, Japan (im Druck).
- Fischer, M., Chatwell, L., Römisch, W., Eisenreich, W., Huber, R., Krojer, T. und Bacher, A. (2005) Biosynthesis of riboflavin. Stereochemistry and X-ray structure of 2,5-diamino-6-ribitylamino-4(3*H*)-pyrimidinone 5'-phosphate synthase of *Methanococcus jannaschii*. *Flavins and Flavoproteins 2005*, Proc. Int. Symp. **15**, Shonan Village, Japan (im Druck).
- Fischer, M., Römisch, W., Illarionov, B., Eisenreich, W. und Bacher, A. (2005) Structures and reaction mechanisms of riboflavin synthases of eubacterial and archaeal origin. *Biochem. Soc. Trans.*, **33**, 780-784.
- Fischer, M., Schott, A.-K., Römisch, W., Ramsperger, A., Augustin, M., Fidler, A., Bacher, A., Richter, G., Huber, R. und Eisenreich, W. (2004) Evolution of Vitamin B<sub>2</sub> Biosynthesis. A Novel Class of Riboflavin Synthase in Archaea. *J. Mol. Biol.* **343**, 267-278.
- Fischer, M., Römisch, W., Saller, S.; Illarionov, B., Richter, G., Rohdich, F., Eisenreich, W. und Bacher, A. (2004) Evolution of Vitamin B<sub>2</sub> Biosynthesis: Structural and Functional Similarity Between Pyrimidine Deaminases of Eubacterial and Plant Origin. *J. Biol. Chem.* **279**, 36299-36308.
- Richter, G., Römisch, W., Schleicher, E., Fischer, M., Bacher, A., Eisenreich, W., Salomon, M., Knieb, E., Dürr, H., Rüdiger, W., Massey, V., Müller, F., Weber, S. (2002) NMR studies on the mechanism of the blue light receptor phototropin from *Avena sativa*. *Flavins and Flavoproteins 2002*, Proc. Int. Symp. **14**, Cambridge, United Kingdom 719-724.
- Fischer, M., Römisch, W., Schiffmann, S., Eisenreich, W., Richter, G., Bacher, A., Steinbacher, S., Huber, R., Oschkinat, H. und Kelly, M. (2002) Studies on the mechanism of 3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase of the archaeon *Methanococcus jannaschii*. *Flavins and Flavoproteins 2002*, Proc. Int. Symp. **14**, Cambridge, United Kingdom, 167-173.
- Römisch, W., Eisenreich, W., Richter, G. und Bacher, A. (2002) Rapid One-Pot Synthesis of Riboflavin Isotopomers. *J. Org. Chem.* **67**, 8890-8894.

- 
- Fischer, M., Römisch, W., Schiffmann, S., Kelly, M., Oschkinat, H., Steinbacher, S., Huber, R., Eisenreich, W., Richter, G. und Bacher, A. (2002) Biosynthesis of Riboflavin in Archaea. Studies on the Mechanism of 3,4-Dihydroxy-2-butanone-4-phosphate Synthase of *Methanococcus jannaschii*. *J. Biol. Chem.* **277**, 41410-41416.
- Illarionova, V., Eisenreich, W., Fischer, M., Haussmann, C., Römisch, W., Richter, G., und Bacher, A. (2002) Biosynthesis of tetrahydrofolate. Stereochemistry of dihydro-neopterin aldolase. *J. Biol. Chem.* **277**, 28841-28847.



# Inhaltsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| <b>1 Einleitung</b>   | 1  |
| 1.1 Riboflavin  | 1  |
| 1.2 Riboflavinbiosynthese   | 2  |
| 1.3 Isotopmarkierung  | 5  |
| <b>2 Material und Methoden</b>  | 8  |
| 2.1 Material  | 8  |
| 2.1.1 Geräte  | 8  |
| 2.1.2 Wissenschaftliche Software  | 10 |
| 2.1.3 Chemikalien und Enzyme  | 11 |
| 2.1.4 Oligonukleotide   | 11 |
| 2.1.5 Bakterienstämme und Plasmide  | 12 |
| 2.1.6 Puffer und Lösungen   | 12 |
| 2.1.7 Medien für Bakterienkulturen  | 16 |
| 2.2 Molekularbiologische Methoden   | 18 |
| 2.2.1 Plasmidisolierung   | 18 |
| 2.2.1.1 Schnellisolierung durch Hitzeschock - Minipräparation   | 18 |
| 2.2.1.2 Plasmidisolierung mittels Peqlab Plasmid Miniprep Kit   | 19 |
| 2.2.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA   | 20 |
| 2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)   | 20 |
| 2.2.4 Agarosegelelektrophorese  | 22 |
| 2.2.5 Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen und PCR- Reaktions-<br>ansätzen mit Peqlab Gel Extraction Kit und Peqlab Cycle-Pure Kit | 23 |
| 2.2.6 Restriktion und Ligation  | 23 |
| 2.2.6.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen  | 23 |
| 2.2.6.2 Ligation von DNA Fragmenten   | 24 |
| 2.2.7 Kompetente Zellen und Transformation  | 25 |
| 2.2.7.1 Herstellung chemisch kompetenter Zellen   | 25 |
| 2.2.7.2 Transformation nach Hanahan   | 25 |
| 2.2.7.3 Herstellung elektrokompeter Zellen  | 26 |
| 2.2.7.4 Elektrotransformation   | 26 |

|   |    |
|---|----|
| 2.3 Proteinchemische Methoden   | 27 |
| 2.3.1 Stammhaltung  | 27 |
| 2.3.2 Anzucht von Mikroorganismen   | 27 |
| 2.3.2.1 Allgemeines   | 27 |
| 2.3.2.2 Testanzucht mit SDS-Aufschluß   | 28 |
| 2.3.2.3 Anzucht in Schüttelkolben   | 28 |
| 2.3.2.4 Anzucht im Fermenter  | 29 |
| 2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)  | 29 |
| 2.3.3.1 Allgemeines   | 29 |
| 2.3.3.2 Glycin-System   | 31 |
| 2.3.3.3 Färbung   | 32 |
| 2.3.4 Proteinreinigung  | 32 |
| 2.3.4.1 Ultraschallaufschluß  | 32 |
| 2.3.4.2 Ionenaustauschchromatographie   | 33 |
| 2.3.4.3 Nickelchelate-Affinitätschromatographie   | 34 |
| 2.3.4.4 Konzentrationsbestimmung  | 35 |
| 2.3.4.5 Proteinkonzentration durch Ultrafiltration  | 35 |
| 2.4 Spektroskopische Methoden   | 36 |
| 2.4.1 NMR-Spektroskopie   | 36 |
| 2.4.2 IR-Spektroskopie  | 36 |
| 2.5 Enzymatische Synthesen  | 37 |
| 2.5.1 Ribulose-5-phosphat   | 37 |
| 2.5.2 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat  | 38 |
| 2.5.3 Guanosin-5'-triphosphat   | 38 |
| 2.5.4 Riboflavin  | 39 |
| 2.5.4.1 Xylolring-Markierungen aus Glukose-Isotopologen   | 39 |
| 2.5.4.2 Stickstoff-Markierung und stochastische Bibliotheken aus 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin-Isotopologen | 40 |
| 2.5.4.3 Ribitylseitenketten Markierung aus GTP-Isotopologen   | 40 |
| 2.5.5 Flavinmononukleotid (FMN)   | 41 |
| 2.5.6 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin   | 41 |
| 2.6 Organisch Chemische Synthesen   | 42 |
| 2.6.1 D-Riboseoxim  | 42 |

|  |           |
|--|-----------|
| 2.6.2 D-Ribitylamin  | 42        |
| 2.6.3 4-Chloruracil  | 43        |
| 2.6.4 4-Chlor-5-nitrouracil  | 43        |
| 2.6.5 5-Nitroso-6-ribitylamino-2,4(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i> )-pyrimidindion            | 43        |
| 2.6.6 5-Nitro-6-ribitylamino-2,4(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i> )-pyrimidindion              | 44        |
| 2.6.7 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i> )-pyrimidindion              | 44        |
| 2.6.8 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin  | 45        |
| 2.6.9 Barbitursäure  | 45        |
| 2.6.10 1-(D-Ribitylamino)-2-phenylazo-4,5-dimethylbenzol                             | 45        |
| 2.6.11 Riboflavin  | 46        |
| 2.6.12 Xanthin   | 46        |
| 2.6.13 Xanthin   | 46        |
| 2.7 Enzymassays  | 48        |
| 2.7.1 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat-Synthase                                    | 48        |
| 2.7.2 GTP-Cyclohydrolase II  | 48        |
| 2.7.3 GTP-Cyclohydrolase III   | 49        |
| 2.7.4 Pyrimidin-Desaminase   | 49        |
| 2.7.5 Reduktase  | 50        |
| <b>3 Ergebnisse</b>  | <b>51</b> |
| 3.1 Klonierung, Expression und Reinigung von Enzymen                                 | 51        |
| 3.2 Synthese isotopologer Verbindungen   | 55        |
| 3.2.1 Guanosin-5'-triphosphat  | 55        |
| 3.2.2 Riboflavin und FMN   | 58        |
| 3.2.2.1 Organische Synthese  | 58        |
| 3.2.2.2 Biotechnologische Verfahren  | 60        |
| 3.2.2.3 Enzymatische Synthesen   | 62        |
| 3.2.2.4 NMR-Spektroskopie  | 70        |
| 3.2.3 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin  | 73        |
| 3.3 Kernmagnetische Resonanz-Spektroskopie an LOV2-Domänen pflanzlicher Phototropine | 75        |
| 3.3.1 Allgemeines  | 75        |

|   |     |
|---|-----|
| 3.3.2 Konformationelle Modulation des FMN-Liganden im Photozyklus der LOV2-Domäne von <i>Adiantum capillus veneris</i> .....          | 76  |
| 3.3.3 Photochemisch induzierte dynamische Kernspinpolarisation in der C450A Mutante der LOV2-Domäne von <i>A. sativa</i> .....        | 81  |
| 3.3.4 Elektron-Kern-Doppelresonanz-Spektroskopie an der C450A Mutante der LOV2-Domäne von <i>A. sativa</i> .....                      | 86  |
| 3.4 Schwingungsspektroskopie an Flavin-Cofaktoren und Flavoproteinen .....  | 90  |
| 3.5 NMR-Spektroskopische Untersuchungen an Enzymen der Riboflavinbiosynthese .....  | 100 |
| 3.5.1 Untersuchungen zum Mechanismus der 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat-Synthase aus <i>M. jannaschii</i> .....                   | 100 |
| 3.5.2 Studien zur Kinetik der GTP-Cyclohydrolase II aus <i>Candida albicans</i> und <i>Candida glabrata</i> .....                     | 109 |
| 3.5.3 NMR-spektroskopische Charakterisierung der Reaktion einer archaealen GTP-Cyclohydrolase III .....                               | 114 |
| 3.5.4 Studien zur pflanzlichen Riboflavinbiosynthese an der Pyrimidin-Desaminase aus <i>A. thaliana</i> .....                         | 119 |
| 3.5.5 Mechanistische Untersuchungen an den Reduktasen aus <i>M. jannaschii</i> , <i>C. glabrata</i> und <i>Aquifex aeolicus</i> ..... | 126 |
| 3.5.6 Nachweis der Regiospezifität einer pentameren, archaealen Riboflavin-Synthase .....   | 134 |
| <b>4 Diskussion</b> .....   | 139 |
| 4.1 Synthese isotopologer Verbindungen .....  | 139 |
| 4.2 Spektroskopische Untersuchungen an Flavoproteinen .....   | 143 |
| 4.3 Enzyme der Riboflavinbiosynthese .....  | 148 |
| <b>5 Zusammenfassung</b> .....  | 154 |
| <b>6 Literatur</b> .....  | 158 |

## Abkürzungsverzeichnis

|                  |   |
|------------------|---|
| 2KG              | 2-Ketoglutarat                                    |
| 6PGDH            | 6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase                   |
| AAS              | Atomabsorptions Spektroskopie                     |
| ADP              | Adenosin-5'-diphosphat                            |
| AMP              | Adenosin-5'-monophosphat                          |
| Amp <sup>r</sup> | Ampicillin-Resistenz                              |
| APS              | Ammoniumperoxodisulfat                            |
| ATP              | Adenosin-5'-triphosphat                           |
| bp               | Basenpaare  |
| CD               | Circulardichoisimus                               |
| CIDNP            | Chemical Induced Dynamically Nuclear Polarisation |
| $\delta$         | chemische Verschiebung                            |
| dATP             | 2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat                  |
| dCTP             | 2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat                   |
| DEAE             | Diethylaminoethyl                                 |
| DFT              | Dichte-Funktional-Theorie                         |
| dGTP             | 2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat                  |
| DNA              | Desoxyribonukleinsäure                            |
| dNTP             | Desoxynukleotidtriphosphat                        |
| dTTP             | 2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat                  |
| DTT              | 1,4-Dithiothreitol                                |
| EDTA             | Ethylendiamintetraacetat                          |
| ENDOR            | Elektron-Kern-Doppelresonanz                      |
| EPR              | Elektronenparamagnetische Resonanz                |
| FAD              | Flavinadenindinukleotid                           |
| FMN              | Flavinmononukleotid                               |
| FPLC             | Fast Protein Liquid Chromatography                |
| FTIR             | Fourier-Transform Infrarotspektroskopie           |
| G6PDH            | Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase                  |
| GK               | Glukokinase                                       |
| GluDH            | Glutamat-Dehydrogenase                            |

---

|                   |  |
|-------------------|--|
| GMP               | Guanosin-5'-monophosphat   |
| GTP               | Guanosin-5'-triphosphat  |
| HIV               | Humanes Immunschwäche-Virus  |
| HK                | Hexokinase   |
| HOMO              | Highest occupied molecular orbital                                 |
| HMQC              | Heteronuclear multiple quantum coherence                           |
| HPLC              | High performance liquid chromatography                             |
| Hz                | Hertz  |
| Idi               | Isopentenyl-pyrophosphate-Isomerase                                |
| INADEQUATE        | Incredible Natural Abundance Double Quantum<br>Transfer Experiment |
| IPTG              | Isopropyl- $\beta$ -thiogalactopyranosid                           |
| IR                | Infrarot   |
| ISC               | Inter System Crossing  |
| J                 | skalare Kopplungskonstante   |
| LB-Medium         | Luria-Bertani Medium   |
| LED               | Light Emitting Diode   |
| LOV               | Light Oxygen Voltage   |
| MBP               | Maltosebindeprotein  |
| MCS               | Multiple Cloning Site  |
| NAD <sup>+</sup>  | Nicotinamidadenindinucleotid                                       |
| NADH              | Nicotinamidadenindinucleotid (reduziert)                           |
| NADP <sup>+</sup> | Nicotinamidadenindinucleotid-2'-phosphat                           |
| NADPH             | Nicotinamidadenindinucleotid-2'-phosphat (reduziert)               |
| NTA               | Nitrilotriessigsäure   |
| NMR               | Nuclear Magnetic Resonance   |
| OD                | optische Dichte  |
| ori               | Origin of Replication  |
| PAGE              | Polyacrylamid Gelelektrophorese                                    |
| PCR               | Polymerase Chain Reaction  |
| PEP               | Phosphoenolpyruvat   |
| PMSF              | Phenylmethansulfonylfluorid  |
| PP <sub>i</sub>   | anorganisches Pyrophosphat   |

---

|       |  |
|-------|--|
| ppm   | parts per million                        |
| PRI   | Phosphoribosyl-Isomerase                 |
| PRPP  | 5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat          |
| RNA   | Ribonukleinsäure                         |
| SDS   | Natriumdodecylsulfat                     |
| Taq   | <i>Thermus aquaticus</i>                 |
| TCA   | Trichloressigsäure                       |
| TEMED | Tetramethylethylendiamin                 |
| TOCSY | Total Correlation Spectroscopy           |
| Tris  | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan         |
| U     | Uniform                                  |
| UpM   | Umdrehungen pro Minute                   |
| UV    | Ultraviolett                             |
| XGPRT | Xanthin/Guanin-Phosphoribosyltransferase |
| XMP   | Xanthosin-5'-monophosphat                |

# 1 Einleitung

## 1.1 Riboflavin

Riboflavin (Vitamin B<sub>2</sub>) ist in Form der Flavocoenzyme FMN und FAD an vielen elektronenübertragenden Prozessen in Zellen beteiligt (Müller, 1992). Dabei ist das reversible Redoxsystem des Isoalloxazin-Ring-Systems (Abb.1.1) der eigentlich chemisch aktive Teil des Flavinmoleküls. Der Chinonzustand der oxidierten Form kann über einen Semichinon-zustand zum entsprechenden Hydrochinonzustand reduziert werden. Daher können Flavine sowohl an zahlreichen 1-Elektronen- als auch 2-Elektronen-Transferprozessen beteiligt sein (Massey, 2000).

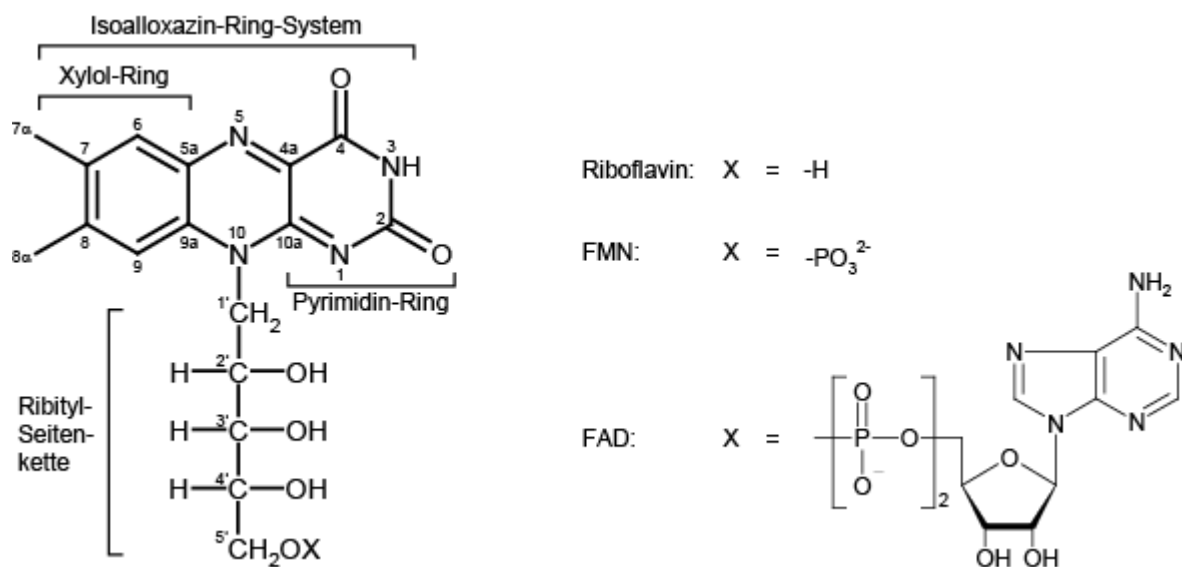


Abb. 1.1: Riboflavin und seine Coenzymformen FMN und FAD.

Darüber hinaus spielen Flavine eine wichtige Rolle bei einigen Nicht-Redox-Prozessen, wie der DNA-Photoreperatur (Sancar, 1994), der Biolumineszenz mariner Mikroorganismen (Lee, 1985; O’Kane *et al.*, 1992), der Blaulichtrezeption in Pflanzen (Briggs *et al.*, 1999) und der lichtabhängigen Synchronisation zeitlich gesteuerter Rythmen (Cashmore *et al.*, 1999).

Riboflavin wird von Pflanzen und vielen Mikroorganismen hergestellt, während Vertebraten und andere höhere Organismen auf eine externe Versorgung mit dem Vitamin über die Nahrung angewiesen sind (Müller *et al.*, 1988). Wiederkäuer sind in der Lage, das von ihrer Darmflora erzeugte Vitamin B<sub>2</sub> aufzunehmen. Hauptquelle für die menschliche Ernährung



sind Gemüse und Milch. Die empfohlene tägliche Dosis für Vitamin B<sub>2</sub> beträgt 1.8 mg (Kraut, 1960). Obwohl Flavocoenzyme im menschlichen Stoffwechsel eine essentielle Rolle spielen, sind Mangelerscheinungen, die auf unzureichende Versorgung mit Riboflavin zurückzuführen sind, wie Stomatitis, Dermatitis und hypochrome Anämie (Foy *et al.*, 1977), nur selten zu beobachten (Bacher *et al.*, 2000).

Viele humanpathogene Mikroorganismen (z.B. *Enterobacteriaceae*) sind zwingend auf die endogene Riboflavinsynthese angewiesen, da sie das Vitamin bzw. die davon abgeleiteten Coenzyme aufgrund fehlender Transportsysteme nicht aus dem umgebenden Milieu aufnehmen können. Daher könnten sich Inhibitoren für Enzyme der Riboflavinbiosynthese als potentielle Antibiotika eignen.

Riboflavin wird industriell in großen Mengen als Additiv für die Futter- und Nahrungsmittel-Industrie produziert. Biotechnologische Fermentationsverfahren haben hier die klassische organische Synthese weitgehend abgelöst (Bacher *et al.*, 2000). Dabei wurden ursprünglich Stämme eingesetzt, die bereits von Natur aus mehr Riboflavin produzieren als sie für ihren Stoffwechsel benötigen (Demain, 1972). Zwei große Hersteller bedienen sich heute Fermentationsverfahren mit dem Ascomyceten *Ashbya gossypii* (BASF) und dem gram positiven Bakterium *Bacillus subtilis* (DSM). Das fortschreitende Verständnis der Riboflavinbiosynthese in Mikroorganismen führte in den letzten 50 Jahren zu einer stetigen Verbesserung dieser industriellen Prozesse.

## 1.2 Riboflavinbiosynthese

Die Aufklärung des Riboflavin-Biosyntheseweges war über fünf Jahrzehnte Gegenstand intensiver Forschungen und wurde in zahlreichen Übersichtsartikeln zusammengefasst (Plaut *et al.*, 1961; 1974; Brown *et al.*, 1963; 1975; 1982; 1987; Young, 1972; Bacher *et al.*, 1975; 1996; 2000; 2001). Schon 1952 konnte McLaren zeigen, dass die Riboflavinproduktion von *Eremothecium ashbyii* durch Zugabe von Purin-Derivaten zum Kulturmedium stimuliert werden kann. Durch zahlreiche Einbauexperimente wurde in den folgenden Jahren bewiesen, dass Riboflavin aus einem Purin gebildet wird. Die Bestimmung von Guanin als genauen Purinvorläufer gelang Bacher und Mailänder (1973). Die Ribitylseitenkette des Riboflavins stammt aus dem Riboserest des Guanosins (Mailänder und Bacher, 1976). Foor und Brown (1975 und 1980) sowie Shavlovsky *et al.* (1976 und 1980) konnten zeigen, dass der direkte

Vorläufer der Riboflavinbiosynthese Guanosin-5'-triphosphat ist. Später wurde ermittelt, dass der Xylolring des Riboflavinmoleküls aus zwei unsymmetrischen C<sub>4</sub>-Einheiten aufgebaut wird, die sich vom Ribulose-5-phosphat als Vorstufe ableiten (Bacher *et al.*, 1983; Volk und Bacher, 1988; 1990). Die beiden Vorläufermoleküle aus dem Nukleotid-Stoffwechsel bzw. dem Pentosephosphatweg, GTP und Ribulose-5-phosphat, sind im Verhältnis 1:2 am Aufbau eines Riboflavinmoleküls beteiligt.

Abbildung 1.2 fasst die einzelnen Schritte der Riboflavinbiosynthese zusammen. Nach Isolierung der GTP-Cyclohydrolase II (**a**) aus *Escherichia coli* (Foor und Brown, 1975) konnte gezeigt werden, dass dieses Enzym den Imidazolring von GTP (**1**) öffnet und das Kohlenstoffatom C-8 als Formiat sowie anorganisches Pyrophosphat von der 5'-Position abspaltet. Das Produkt 2,5-Diamino-6-ribosylamino-4(3*H*)-pyrimidinon-5'-phosphat (**2**) wird an Position 2 hydrolytisch desaminiert und die Ribosylseitenkette in einer NADPH abhängigen Reaktion zum Ribitylrest reduziert. In Eubakterien ist die Reaktion der Pyrimidin-Desaminase (**b**) der erste Schritt vor der anschließenden Reduktase-Reaktion (**c**) (Burrows und Brown, 1978). In Hefen erfolgt zunächst die Reduktion des Zuckers und danach erst die Desaminierung (Bacher und Lingens, 1970; Hollander und Brown, 1979; Nielsen und Bacher, 1981). Die Reihenfolge der Reaktionsschritte in Pflanzen und Archaea war zu Beginn dieser Arbeit noch unbekannt.

Das gemeinsame Intermediat 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1,3*H*)-pyrimidinon-5'-phosphat (**5**) wird auf bisher unbekanntem Wege dephosphoryliert und reagiert unter dem katalytischen Einfluß der 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin-Synthase (**e**) mit 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat (**8**) zu 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin (**9**) (Neuberger und Bacher, 1986; Kis *et al.*, 1995). Der zweite Reaktionspartner wird, wie bereits erwähnt, in einer ungewöhnlichen, von der 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat-Synthase (**d**) katalysierten, intramolekularen Umlagerungsreaktion aus Ribulose-5-phosphat (**7**) erzeugt, wobei das C-4 Atom als Formiat abgespalten wird. (Volk und Bacher, 1988; 1990).

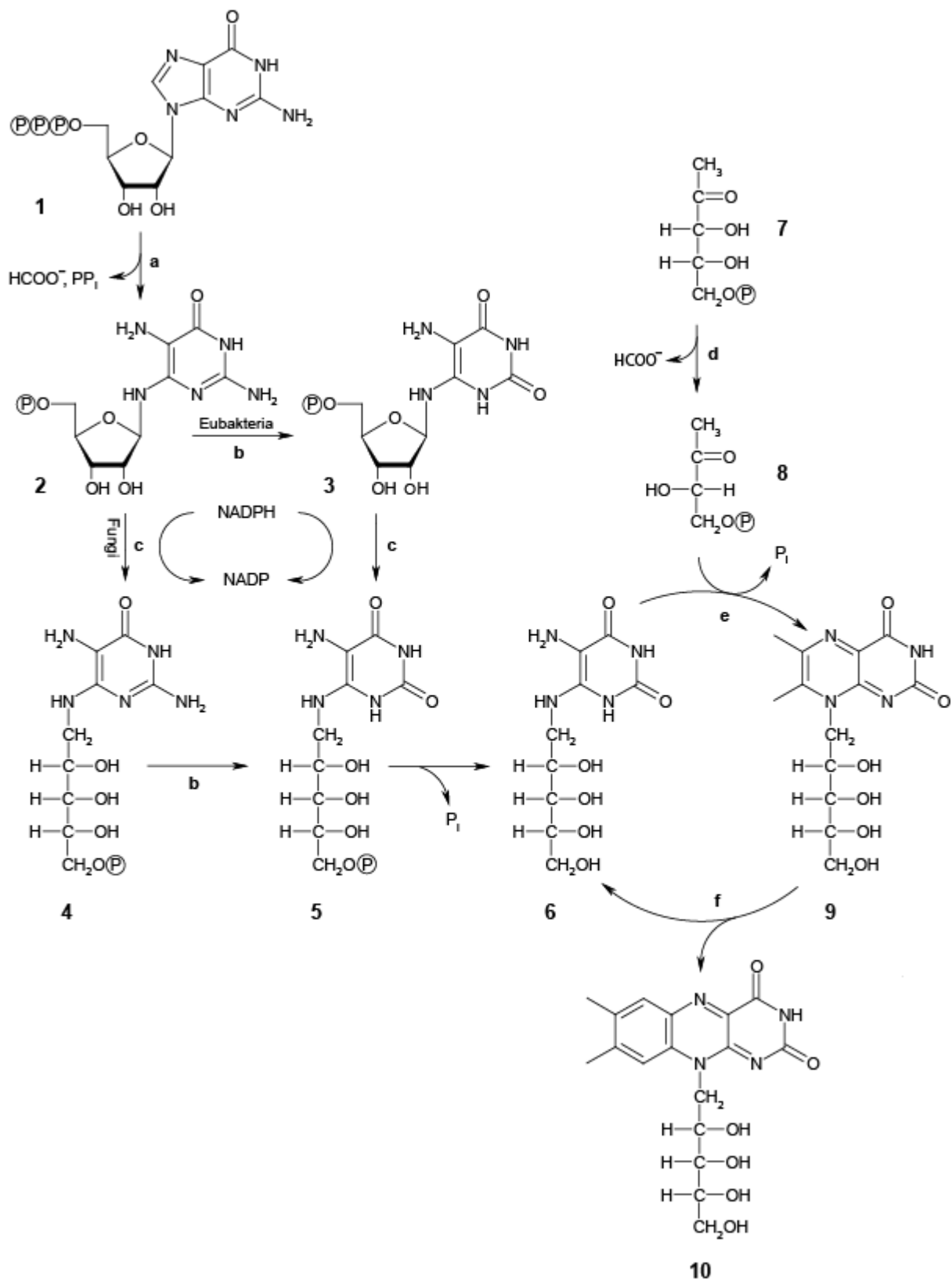


Abb. 1.2: Riboflavinbiosynthese. a: GTP-Cyclohydrolase II, b: Pyrimidin-Desaminase, c: Ribosyl-Reduktase, d: 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat-Synthase, e: 6,7-Dimethyl-8-riboitylumazin-Synthase, f: Riboflavin-Synthase

Die Lumazinsynthese aus *B. subtilis* ist eine Hohlkugel mit Ikosaedergeometrie und einem Molekulargewicht von ca. 1 MDa, die als Dodekamer von pentameren Untereinheiten beschrieben werden kann (Schott *et al.*, 1990a; 1990b). Im Inneren dieser Hohlkugel kann sich ein Trimer von Untereinheiten der Riboflavin-Synthase (**f**) befinden, an welche die Produkte der Lumazin-Synthase in einem als *substrate channeling* beschriebenen Prozess weitergegeben werden (Kis und Bacher, 1995). Die Riboflavinsynthase katalysiert die Reaktion zweier Moleküle 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin in antiparalleler Anordnung, wobei die Kohlenstoffatome 6, 6 $\alpha$ , 7 und 7 $\alpha$  des einen Moleküls auf das andere übertragen werden und somit den Xylol-Ring des Riboflavins (**10**) aufbauen (Plaut, 1960; 1963; Wacker *et al.*, 1964; Beach und Plaut, 1970). Neben Riboflavin entsteht bei dieser Reaktion auch das Intermediat 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (**6**), welches für die Synthese eines weiteren Lumazinmoleküls regeneriert wird.

Sowohl Pflanzen und Mikroorganismen, die selbst in der Lage sind Riboflavin zu produzieren, als auch andere Organismen, die wie der Mensch Riboflavin als Vitamin benötigen, müssen dieses noch in die aktiven Coenzymformen FMN (Riboflavin-5'-phosphat, Flavinmononukleotid) sowie FAD (Flavinadenindinukleotid) (Abb. 1.1) umwandeln. Flavokinasen katalysieren die ATP abhängige Phosphorylierung von Riboflavin an seiner 5'-Position. In einem zweiten Schritt wird das FMN-Molekül über eine Phosphodiesterbrücke mit einer AMP-Einheit verknüpft, welche durch Pyrophosphatabspaltung aus ATP hervorgeht. Dieser Schritt wird von einer FAD-Synthase katalysiert. In tierischen Zellen, Hefen und Pflanzen werden beide Reaktionen durch zwei getrennte Enzyme katalysiert, während bakterielle Mikroorganismen bifunktionelle Enzyme mit Flavokinase und FAD-Synthase Aktivität besitzen (Bacher, 1991).

### 1.3 Isotopmarkierung

Die essentielle Bedeutung der vom Vitamin B<sub>2</sub> abgeleiteten Flavocoenzyme für alle Organismen besteht in ihrer zentralen Rolle in der Redox-Biochemie und in einigen Nicht-Redox-Prozessen. Die Eigenschaften der Flavincofaktoren können allerdings durch die Proteinumgebung in einem spezifischen Flavoprotein über einen weiten Bereich beeinflusst werden. Die Beobachtung des Zustands von Flavocoenzymen durch verschiedene physikalische Techniken ist daher entscheidend für die mechanistische Analyse von Flavoproteinen.

Die NMR-Spektroskopie wurde bereits extensiv für mechanistische Studien an Flavoproteinen genutzt (Müller, 1992; Müller und Moonen, 1982; Vervoort *et al.*, 1986; Fleischmann *et al.*, 2000; Salomon *et al.*, 2001). Dieser Ansatz erfordert die Markierung des Flavincofaktors mit Stabilisotopen um die Selektivität und Sensitivität der NMR-Detektion zu erhöhen. Die Stabilisotopmarkierung kann auch als Grundlage für zeitaufgelöste Infrarot- und Raman-Spektroskopie von Flavoproteinen dienen und substantielle Beiträge zu Elektronenspinresonanz Experimenten liefern, die kernspinsensitive Methoden wie ENDOR benutzen (Kurreck *et al.*, 1984; Edmondson, 1985; Martinez *et al.*, 1997; Kay *et al.*, 1999; Morris und Bienstock, 1986; Murgida *et al.*, 2001; Weber *et al.*, 2001a; Nishina *et al.*, 1998).

Im Idealfall stehen dafür eine Reihe von Proteinproben zur Verfügung, welche verschiedene an spezifischen Positionen isotopmarkierte Flavocoenzyme enthalten. In der Literatur wurden zwar einige synthetische Verfahren zur Herstellung von Riboflavin-Isotopologen beschrieben, aber die Produktion einer hinreichenden Bibliothek von Isotopologen ist äußerst mühsam und zeitaufwendig (Van Schagen und Müller, 1981; Vervoort *et al.*, 1986; Sedlmaier *et al.*, 1987).

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die bisherigen Methoden zur Synthese isotopmarkierter Flavine um einen enzymatischen bzw. enzym-assistierten Ansatz erweitert werden. Beide Vorstufen der Riboflavinbiosynthese, GTP und Ribulose-5-phosphat, lassen sich auf enzymatischem Wege, über die Verwendung einer ganzen Reihe kommerziell erhältlicher isotopmarkierter Glukosemoleküle als Substrate, in markierter Form herstellen (Bracher *et al.*, 1998; Tolbert und Williamson, 1997; Bouhss *et al.*, 1995; Römisch, 2000; Wong *et al.*, 1980; Volk und Bacher, 1991; Richter *et al.*, 1997).

Die benötigten Enzyme der Riboflavinbiosynthese, des Pentosephosphatweges und des Nukleotid-Stoffwechsels sollten mit hohen Ausbeuten in rekombinanten *E. coli* Stämmen exprimiert werden. Für eine schnelle unkomplizierte Reinigung größerer Mengen dieser Enzyme war die Expression als Fusionsprotein mit "His-tag" oder Maltosebindeprotein wünschenswert. Über eine anschließende Parallelsynthese-Strategie sollten verschiedene Flavin-Isotopologe über einfache Multikomponenten Multienzym Reaktionen aus verschieden markierten Glukosemolekülen auf schnellem Wege und ohne Isolierung von Zwischenprodukten zugänglich gemacht werden. Dieses äußerst variable Konzept erlaubt außerdem durch Weglassen einzelner Enzyme sämtliche Intermediate der Riboflavinbiosynthese in Form von isotopologen Verbindungen herzustellen. Diese sollten als Substrate

für detaillierte mechanistische Untersuchungen an den nachfolgenden Enzymen der Riboflavinbiosynthese oder auch anderer Stoffwechselwege, wie dem Pentosephosphatweg oder der Folatbiosynthese eingesetzt werden.

Der spektroskopischen Charakterisierung der Flavin-Isotopologen sollten in enger Kooperation mit anderen Mitgliedern des Arbeitskreises Untersuchungen zur Wechselwirkung des jeweiligen Cofaktors mit verschiedenen Apoproteinen folgen. Als Beispiele hierfür seien genannt: Die für die Phototaxis von Pflanzen verantwortliche LOV2-Domäne des Phototropins, die für die DNA-Reperatur von Thymindimeren verantwortliche DNA-Photolyase, die Flavokinase aus *Schizosaccharomyces pombe*, die Idi2 als ein Enzym des alternativen Terpenbiosyntheseweges, sowie das Lumazinprotein, welches die Fluoreszenz der Luziferase in marinen Bakterien moduliert und 6,7-Dimethyl-8-ribitylumazin als Cofaktor bindet.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

|                             |   |
|-----------------------------|---|
| Acrylamid-Gelelektrophorese | Elektrophoresekammer und Gießstand für SE 250 Mighty Small (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA)  |
| Agarose-Gelelektrophorese   | Kammer und Gelträger (Appligene, Heidelberg)  |
| Autoklaven                  | VST 50/70 E (Zirbus, Bad Grund)<br>20 L Sanoklav (Wolf, Geislingen)   |
| Brutschrank                 | Thermoinkubator (Heraeus, Frankfurt am Main)  |
| Elektroporator              | Gene Pulser mit Pulse Controller (Biorad, München)<br>EQUIBIO EasyjecT Optima (Peqlab, Erlangen)  |
| Eppendorf-Zentrifuge        | A14 (Jouan, Unterhaching)<br>Microfuge Lite (Beckmann, München)   |
| Fermenter                   | BioFlo 3000 BENCH-TOP Fermenter (New Brunswick Sci., N.J., USA)   |
| FPLC-Anlage                 | Steuereinheit GP 10, Fraktionssammler RefiFrac, optische Einheit Monitor Uvicord SII, Conductivity Monitor, Pumpen P-500, Mixer 0,6 ml, Gradientenventil PSV-50, Injektionsventil V-7 und Zweikanalschreiber REC 102, (Pharmacia, Freiburg) |
| Gefriertrockner             | Alpha 1-4 (Christ, Osterode/Harz)   |
| Heizblock                   | TECHNE DRI - Block DB-2A (Gesellschaft für Laborgeräte, Wertheim)   |
| HPLC-Anlage                 | Autosampler AS-100 (Biorad, München), HPLC-Pumpe K-1001 und UV-Vis Filter-Photometer mit 254 nm Filter (Knauer, Berlin), Einkanalschreiber REC 101 (Pharmacia, Freiburg), Reversed Phase Säulen (Schambeck, Bad Honnef)                     |
| IR-Spektrometer             | 1600 series FTIR (Perkin Elmer, Norwalk, USA)   |
| Kühlzentrifugen             | Sorvall Superspeed RC2B, RC5B und RC5B Plus mit den Rotoren   |

---

|                        |   |
|------------------------|---|
|                        | GS3, GSA, SS34 und SE12 (Sorvall Inc., Newton, Connecticut, USA)  |
| Küvetten               | Hellma-Quarzküvetten QS 1 cm (Hellma, Müllheim in Baden)  |
| Leuchttisch            | für SDS-Gele (DESAGA GmbH, Heidelberg)  |
| NMR-Spektrometer       | Bruker AC 250, AM 360 und DRX 500 (Bruker, Karlsruhe)   |
| pH-Meter               | E603 mit Standard-Glaselektrode (Deutsche Metrohm, Filderstadt)   |
| Proteinreinigung       | GradiFrac-Fraktionssammler und Steuereinheit, Monitor UV-1 optische Einheit, Monitor UV-1 Kontrolleinheit, Schlauchpumpe P-1, Mixer 0.6 ml, Gradientenventil PSV-50, Zweikanalschreiber REC 102, sowie:<br><br>HiLoad: GP (Gradient Programmer)-10 Steuereinheit mit Fraktionssammler RediFrac, Monitor Uvicord S II optische Einheit, Schlauchpumpe P-1, Mixer 0.6 ml, Gradientenventil PSV-50, Injektionsventil V-7, und Zweikanalschreiber REC 102 (Pharmacia, Freiburg) |
| Schlauchpumpe          | Watson Marlow 502S Petrogas (Berlin)  |
| Schütter               | PsychoTherm Controlled Environment Incubator Shaker (New Brunswick Scientific, N.J., USA), IKA-Vibrax-VXR (Goeddecke, Ingolstadt), Lab Shaker, Certomat MO und Certomat R (B. Braun, Melsungen), Fanal M58-Schüttler (Mühlenbauanstalt und Maschinenfabrik, Frankenhausen am Kyffhäuser) und Innova 4230 Refrigerated Inkubator Shaker (New Brunswick Scientific, N.J., USA)  |
| Spannungsquelle        | EPS 500/400 und EPS 600/400 (Pharmacia, Freiburg)   |
| Spektralphotometer     | Novaspec II (Pharmacia, Freiburg)<br>Ultrospec Plus (Pharmacia, Freiburg)   |
| Thermocycler           | Primus TC-9600HPL (MWG-Biotech, Ebersberg)<br>GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer, Norwalk, USA)  |
| Tischkühlzentrifuge    | GS-15R - Zentrifuge mit den Rotoren F2402 und S4180 (Beckmann, München) und Biofuge primoR (Heraeus, Frankfurt am Main)   |
| Tischzentrifuge        | Reagenzglaszentrifuge (Hettich, Tuttlingen)   |
| Ultrafiltrationskammer | Rührzelle 50 ml (Amicon, Witten a.d. Ruhr)  |



---

|                    |   |
|--------------------|---|
| Ultraschallgerät   | Branson Sonifier 250 (Branson SONIC Power Company, Danbury, USA)  |
| UV-Leuchttisch     | 312 nm (Bachhofer, Reutlingen)  |
| Vakuumpumpe        | MZ 2C (Vakuubrand, Wertheim)  |
| Vakuum-Zentrifuge  | Roto-Vac 3 (Biotech-Fischer, Reiskirchen)   |
| Videodokumentation | Kamera Kaiser RA1 und RS 1 BioPrint und Mitsubishi Video Copy Processor (Fröbel Labortechnik, Wasserburg) |

## 2.1.2 Wissenschaftliche Software

Microsoft® Excel 2002 inkl. Solver Add-In (Microsoft Corporation, Redmond, USA):

Auswertung und Darstellung von IR-Spektren, kinetischen Messdaten und allgemeinen Diagrammen; numerische Lösung von Differenzialgleichungen.

XWINNMR 3.0 und 1D/2D WinNMR 5.0 (Bruker-Daltonik GmbH, Bremen):

Aufnahme, Auswertung und Darstellung von 1D und 2D NMR-Spektren.

HyperChem™ 7.51 (Hypercube Inc., Gainesville, USA)

Geometrieoptimierung von Molekülen, Berechnung von IR-Spektren mit den semiempirischen Methoden MINDO3 und PM3.

Gaussian® 03W inkl. GaussView 3.0 (Gaussian Inc., Pittsburgh, USA)

Geometrieoptimierung von Molekülen, Berechnung von IR-Spektren mittels Dichtefunktional-Theorie Methode B3LYP 6-31G.

Omiga 2.0 (Oxford Molecular Ltd., Oxford, Großbritannien)

Analyse von DNA und Proteinsequenzen.

MDL ISIS™/Draw 2.5 (MDL Information Systems Inc., San Leandro, USA)

Zeichnen von chemischen Formeln und Reaktionsschemata.

Dev-C++ 4.9.9.1 (Bloodshed Software, [www.bloodshed.net](http://www.bloodshed.net))

Programmierumgebung für die Erstellung eigener Programme zur IR-Spektren-Auswertung und Fermentersteuerung.

### 2.1.3 Chemikalien und Enzyme

Chemikalien und Enzyme wurden von den Firmen Sigma-Aldrich (Taufkirchen), VWR (Darmstadt), Acros Organics (Schwerte), Boehringer (Mannheim), Roche (Basel), Serva (Heidelberg), Promega (USA), Applied Biosystems (Weiterstadt), Biomol (Hamburg), New England Biolabs (Schwalbach im Taunus), Eurogentech (Belgien), Gibco-BRL (Eggenstein), Peqlab (Erlangen), Qiagen (Hilden), Cambridge Isotope Laboratories (USA), Omicron Biochemicals (USA) und Euriso-top (Saarbrücken) bezogen.

### 2.1.4 Oligonukleotide

Bei der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) wurden folgende Oligonukleotide synthetisiert:

|              |   |
|--------------|---|
| guaA-Bam     | 5'-GAA TAA GGA TCC ATG ACG GAA AAC ATT CAT-3'   |
| guaA-Pst     | 5'-CAT TCA TAC TGC AGG GTC AAA TCA TTC CCA-3'   |
| ecogmk1-Eco  | 5'-CGA AAG GAA TTC ATG GCT CAA GGC AC-3'        |
| ecogmk2-Bam  | 5'-CAT GAT ACT GGG ATC CGG TTC AGT CTG C-3'     |
| ecopr1-Eco   | 5'-CCT GAG GTT GAA TTC ATG CCT GAT ATG AAG-3'   |
| ecopr2-Bam   | 5'-TAA TGT TGG ATC CGT GAG CGC ATC ATC-3'       |
| ec-mut-1     | 5'-TGA GGT TTT GGA TCC ATG AAT CAG ACG CTA-3'   |
| ec-mut-2     | 5'-AAC CGA AGC CTG CAG CAA CTT CGG TTT CTT-3'   |
| ec-ribD-1    | 5'-GAG GAC GGA TCC ATG CAG GAC GAG TAT TAC-3'   |
| ec-ribD-2    | 5'-CGT AAG CTT CTT CCC TTT CGA GCC GGG AGA-3'   |
| pykA_Bam     | 5'-ACG GAG GGA TCC ATG TCC AGA AGG CTT CG-3'    |
| pykA_Hind    | 5'-TTC GCC GCA TCC GGC AAC AAG CTT ACT C-3'     |
| ypcA_Bam     | 5'-AGG TTA GGA TCC ATG GCA GCC GAT CGA AAC-3'   |
| ypcA_Pst     | 5'-TGT CAA CTC CTG CGA TCT GCA GTT CAC TTC-3'   |
| yqjJ_Bam     | 5'-GAG GTA GGA TCC ATG AAA ACA AAC CAA CAA-3'   |
| yqjJ_Kpn     | 5'-AAG GAG ATT GTG GTA CCT TTG TTC AGC GTA-3'   |
| glck_bs_Bam  | 5'-TAA GGT GGG ATC CAT GGA CGA GAT AT-3'        |
| glck_bs_Hind | 5'-TCA TTT ACA CAA GCT TAA CAA TTT TGA TGT T-3' |

## 2.1.5 Bakterienstämme und Plasmide

Für molekularbiologische Arbeiten wurden nur Derivate des Stammes *E. coli* K12 verwendet. Sie sind im Folgenden aufgelistet:

| Stamm          | Genotyp  | Herkunft oder Referenz                            |
|----------------|--|---|
| XL1-Blue       | <i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac</i> [F', <i>proAB, lacI<sup>q</sup>ZΔM15, Tn10</i> (Tet <sup>r</sup> )] | Stratagene, Heidelberg;<br>(Bullock et al., 1987) |
| M15<br>[pREP4] | <i>lac, ara, gal, mtl, recA<sup>+</sup>, uvr<sup>+</sup></i> , [pREP4: <i>lacI, kan<sup>r</sup></i> ]                              | Stüber et al, 1990;<br>Zamenhof et al, 1972       |
| BL21           | F', <i>ompT, hsdS<sub>B</sub></i> ( <i>r<sub>B</sub><sup>-</sup>, m<sub>B</sub><sup>+</sup></i> ), <i>dcm, gal</i> , (DE3)         | Promega Corporation,<br>Madison, USA              |

Als Expressionsvektoren wurden die Plasmide pNCO113 (Stüber *et al.*, 1990; Richter *et al.*, 1997), pQE30 (Quiagen, Hilden) und pMal-c2X (New England Biolabs, Schwalbach im Taunus), verwendet. Auf dem Plasmid pREP4 ist das Repressorprotein LacI und eine Kanamycin-Resistenz kodiert.

## 2.1.6 Puffer und Lösungen

Soweit nicht anders angegeben, beziehen sich alle Angaben auf einen Liter.

|                           |   |
|---------------------------|---|
| Ethidiumbromid-Lösung:    | 1 µg/ml   |
| Ligase Puffer:            | 250 mM Tris-HCl, pH 7.6<br>50 mM Magnesiumchlorid<br>5 mM Adenosin-5'-triphosphat<br>5 mM Dithiothreitol<br>25 % (w/v) Polyethylenglykol-8000 |
| PCR-Puffer (10x) (Gibco): | 100 mM Tris-HCl, pH 8.8<br>500 mM Kaliumchlorid<br>15 mM Magnesiumchlorid<br>1 % Triton X-100   |

---

|                            |  |
|----------------------------|--|
| Probenpuffer für DNA-Gele: | 50 % (w/v) Glycerin<br>0.25 % (w/v) Xylencyanol<br>0.25 % (w/v) Bromphenolblau<br>in TE - Puffer       |
| Saline:                    | 0.9 % (w/v) Natriumchlorid, autoklaviert   |
| STET-Puffer für Minipreps: | 50 mM Tris-HCl, pH 8.0<br>50 mM EDTA-Na <sub>2</sub><br>8 % (w/v) Saccharose<br>5 % (w/v) Triton X-100 |
| TAE - Puffer (50 x) für    | 2 M Tris-Acetat, pH 8.2  |
| Agarosegelelektrophorese:  | 0.1 M EDTA-Na <sub>2</sub>   |

Lösungen für Plasmidisolierung mit Peqlab E.Z.N.A.<sup>®</sup> Plasmid Miniprep Kit:

|                                |   |
|--------------------------------|---|
| Lösung I zum Suspendieren:     | 50 mM Tris-HCl, pH 8.0<br>10 mM EDTA<br>40 µg/ml RNase A  |
| Lösung II zur Lyse:            | 200 mM Natronlauge<br>1 % (w/v) Natriumdodecylsulfat      |
| Lösung III zur Neutralisation: | 3 M Kaliumacetat,<br>mit Essigsäure auf pH 5.5 einstellen |
| HB-Puffer:                     | Waschen der HiBind <sup>®</sup> -DNA-Säule                |
| DNA-Waschpuffer:               | Waschen der HiBind <sup>®</sup> -DNA-Säule                |

Puffer für Restriktion von DNA mit Restriktionsendonukleasen:

|                     |  |
|---------------------|--|
| NEB 1-Puffer (10x): | 10 mM Bis-Tris-Propan-HCl, pH 7.0<br>10 mM Magnesiumchlorid<br>1 mM Dithiothreitol |
| NEB 2-Puffer (10x): | 10 mM Tris-HCl, pH 7.9<br>50 mM Natriumchlorid<br>10 mM Magnesiumchlorid           |

---

|                      |  |
|----------------------|--|
|                      | 1 mM Dithiothreitol  |
| NEB 3-Puffer (10x):  | 50 mM Tris-HCl, pH 7.9<br>100 mM Natriumchlorid<br>10 mM Magnesiumchlorid<br>1 mM Dithiothreitol |
| NEB 4-Puffer (10x):  | 20 mM Tris-Acetat, pH 7.9<br>50 mM Kaliumacetat<br>10 mM Magnesiumacetat<br>1 mM Dithiothreitol  |
| Gibco React 1 (10x): | 50 mM Tris-HCl, pH 8.0<br>10 mM Magnesiumchlorid   |
| Gibco React 2 (10x): | 50 mM Tris-HCl, pH 8.0<br>10 mM Magnesiumchlorid<br>50 mM Natriumchlorid                         |
| Gibco React 3 (10x): | 50 mM Tris-HCl, pH 8.0<br>10 mM Magnesiumchlorid<br>100 mM Natriumchlorid                        |

#### Lösungen und Puffer für die Proteingelektrophorese (Glycin-System):

Alle Lösungen zum Gießen des Gels wurden filtriert und entgast.

|   |   |
|---|---|
| Acrylamid-Lösung (40/3)<br>(T=40 %; C=3 %): | 194 g Acrylamid<br>6 g N,N'-Methylen-bisacrylamid<br>auf 500 ml Wasser    |
| APS-Lösung:                                 | 10 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat   |
| Elektrophoresepuffer:                       | 25 mM Tris<br>192 mM Glycin<br>0.1 % (w/v) Natriumdodecylsulfat<br>pH 8.3 |
| Entfärber I:                                | 500 ml Methanol<br>100 ml Essigsäure                                      |

---

|                                 |   |
|---------------------------------|---|
|                                 | auf 1 Liter Wasser  |
| Entfärber II:                   | 300 ml Methanol<br>100 ml Essigsäure<br>auf 1 Liter Wasser  |
| Färbelösung:                    | 5 g Coomassie-Blue R-250<br>450 ml Methanol<br>100 ml Essigsäure<br>auf 1 Liter Wasser  |
| Probenpuffer für SDS-Gele (3x): | 60 mM Tris-HCl, pH 6.8<br>5 % (w/v) Natriumdodeylsulfat<br>30 % (w/v) Glycerin<br>10 % (w/v) Saccharose<br>3 % (w/v) $\beta$ -Mercaptoethanol<br>0.5 % (w/v) Bromphenolblau |
| Sammelgelpuffer (2x)            | 250 mM Tris-HCl, pH 6.8<br>0.2 % (w/v) Natriumdodecylsulfat   |
| Trenngel-Puffer (4x):           | 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8<br>0.4 % (w/v) Natriumdodecylsulfat  |

#### Lösungen und Puffer für die Proteinanalytik:

|                   |  |
|-------------------|--|
| Bradford-Puffer:  | 2 g sekundäres Natriumphosphat<br>0.6 g primäres Natriumphosphat<br>7 g Natriumchlorid<br>0.2 g Natriumazid<br>auf 1 Liter Wasser, pH 7.2            |
| Bradford-Reagenz: | 0.1 g Coomassie Blue G-250<br>100 ml 85 % Phosphorsäure<br>50 ml Ethanol<br>auf 1 Liter Wasser<br>Über Nacht rühren, filtrieren und bei 4 °C lagern. |

Puffer für die Nickelchelate-Affinitätschromatographie:

|                            |  |
|----------------------------|--|
| Lyse-Puffer:               | 50 mM primäres Natriumphosphat<br>300 mM Natriumchlorid<br>10 mM Imidazol<br>pH 8.0 mit Natronlauge einstellen |
| Wasch-Puffer:              | wie Lyse-Puffer<br>20 mM Imidazol  |
| Elutionspuffer:            | wie Lyse-Puffer<br>250 mM Imidazol   |
| stringenter Elutionspuffer | wie Lyse-Puffer<br>500 mM Imidazol   |
| Puffer zum Beladen:        | 100 mM Nickelsulfat  |
| Regenerierpuffer:          | 100 mM EDTANa <sub>2</sub> -NaOH<br>1 M Natriumchlorid   |

### 2.1.7 Medien für Bakterienkulturen

Die einzelnen Bestandteile werden in entionisiertem Wasser gelöst und bei 121 °C und 1.3 bar 20 Minuten autoklaviert. Für die Bereitung von Agarplatten wird dem Medium vor dem Autoklavieren 2 % (w/v) Agar-Agar zugesetzt. Die angegebenen Antibiotika werden jeweils in 1 - 2 ml sterilem Wasser suspendiert und dem Medium nach dem Autoklavieren zugegeben.

|                                    |   |
|------------------------------------|---|
| Luria-Bertani Medium (LB):         | 10 g Caseinhydrolysat<br>5 g Hefeextrakt<br>5 g Natriumchlorid  |
| SOC-Medium<br>für Elektroporation: | 10 g Caseinhydrolysat<br>5 g Hefeextrakt<br>5 g NaCl<br>2.5 mM KCl<br>10 mM MgCl <sub>2</sub><br>10 mM MgSO <sub>4</sub><br>20 mM Glukose |

---

|  |   |
|--|---|
| M9-Mineral-Medium<br>für <i>E. coli</i> :      | 10 % (v/v) M9-Salzkonzentrat<br>0.4 % (v/v) Vitamin-Mix<br>0.1 % (v/v) Spurenelement-Mix<br>5 g Glucose (Stocklösung 500 g/l)<br>1 g NH <sub>4</sub> Cl (Stocklösung 200 g/l)<br>0.138 g MgSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O (Stocklösung 138 g/l)<br>5.5 mg CaCl <sub>2</sub> (Stocklösung 5.5 g/l)                 |
| Mineral-Medium für<br><i>B. subtilis</i> RB50: | 10 % (v/v) TSS<br>0.4 % (v/v) Vitamin-Mix<br>0.1 % (v/v) Spurenelement-Mix<br>1.0 % (v/v) Aminosäure-Mix<br>5 g Glucose (Stocklösung 500 g/l)<br>1 g NH <sub>4</sub> Cl (Stocklösung 200 g/l)<br>0.138 g MgSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O (Stocklösung 138 g/l)<br>5.5 mg CaCl <sub>2</sub> (Stocklösung 5.5 g/l) |
| M9-Salzkonzentrat (10x):                       | 120 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub><br>30 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub><br>5 g NaCl<br>auf 1 Liter Wasser, pH 7.5  |
| TSS-Salzkonzentrat (10x):                      | 3.5 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub><br>60 g Tris-Base<br>auf 1 Liter Wasser, pH 7.4   |
| Vitamin-Mix (250x):                            | 20 mg Pyridoxamin-Hydrochlorid<br>10 mg Thiamin-Hydrochlorid<br>20 mg para-Aminobenzoessäure<br>20 mg Calcium-Pantothenat<br>5 mg Biotin<br>10 mg Folsäure<br>100 mg Cyanocobalamin (1/1000 Mannit-Verreibung)<br>20 mg Riboflavin bei nicht markierten Anzuchten<br>auf 1 Liter Wasser, sterilfiltriert              |



---

|   |   |
|---|---|
| Spurenelemente-Mix (1000x):                           | 16 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$<br>15 g $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$<br>27 g $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$<br>37.5 g $\text{FeCl}_3$<br>40.8 g Na-citrat<br>84 mg $\text{Zn-acetat} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$<br>50 mg $\text{Na}_2\text{-EDTA}$<br>auf 1 Liter Wasser |
| Aminosäure-Mix (100x)<br>für <i>B. subtilis</i> RB50: | Je 1.5 g/l Alanin, Leucin, Valin, Arginin, Lysin,<br>Prolin, Isoleucin, Methionin, Tyrosin und Histidin.<br>Tryptothan wird einzeln sterilfiltriert.  |
| Antibiotika:  | 170 mg/l Ampicillin-Trihydrat<br>15 mg/l Kanamycinsulfat  |

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1 Plasmidisolierung

#### 2.2.1.1 Schnellisolierung durch Hitzeschock - Minipräparation:

Diese Methode wurde bevorzugt herangezogen, um frisch transformierte Bakterienzellen auf das Vorhandensein des Plasmids zu überprüfen und dieses gegebenenfalls einem analytischen Restriktionsverdau zu unterziehen. Die isolierte DNA kann zur Identifizierung des Plasmids, für Restriktionsanalysen und Gelelektrophoresen sowie in Transformationen eingesetzt werden.

Zellen, die das zu isolierende Plasmid enthalten, wurden auf Agar-Platten ausgestrichen und über Nacht bebrütet. Die Zellen wurden mit dem Spatel von der Platte abgenommen und in 300  $\mu\text{l}$  STET-Puffer suspendiert. 10  $\mu\text{l}$  frisch bereitete Lysozymlösung (10 mg/ml) wurden zu der Zellsuspension gegeben, diese 30 Sekunden bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 90 Sekunden im Wasserbad gekocht. Zelltrümmer und Proteine wurden 15 Minuten lang in der Eppendorf-Zentrifuge bei 14000 UpM abzentrifugiert, der Überstand in

ein anderes Reaktionsgefäß dekantiert. Um die DNA zu fällen, wurde der Überstand mit 200 µl Isopropanol versetzt und 10 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen. Es folgte eine 15-minütige Zentrifugation in der Eppendorf-Zentrifuge bei 14000 UpM. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 200 µl eiskaltem 70%igem Ethanol gewaschen und für ca. 15 Minuten an der Luft getrocknet. Die DNA darf dabei nicht zu trocken werden, da sie sich sonst schlecht in Wasser löst. Anschließend wurde das Pellet in 20 µl bidestilliertem Wasser aufgenommen.

Mit dieser Methode ließen sich Mengen bis etwa 1 µg Plasmid-DNA gewinnen, die mit Protein und RNA verunreinigt waren.

### 2.2.1.2 Plasmidisolierung mittels Peqlab Plasmid Miniprep Kit:

Eine frische Über-Nacht-Kultur des *E. coli*-Stammes mit dem zu isolierenden Plasmid wurde 15 Minuten bei 5000 UpM abzentrifugiert. Das benötigte Volumen richtete sich nach der Kopienzahl der Plasmide pro Zelle. Für ein High-copy-number-Plasmid wurden 5 ml, für ein Low-copy-number-Plasmid 10 ml eingesetzt. Das Bakterienpellet wurde in 250 µl Lösung I resuspendiert. Um die Zellen aufzuschließen, wurde 250 µl Lösung II zugegeben und die Mischung 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde durch mehrmaliges Umschwenken des Röhrchens gründlich gemischt. Zu heftiges Rühren und Schütteln wurde dabei vermieden, da dies die Zellwand so sehr schädigt, dass auch genomische DNA freigesetzt wird. Die Zugabe von 350 µl Lösung III bewirkte die Neutralisierung des Gemisches und fällte überschüssiges Natriumdodecylsulfat als unlösliches Kaliumsalz aus. Nach 10-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zelltrümmer und denaturiertes Protein bei 15000 UpM für 15 Minuten in der Tischkühlzentrifuge abgetrennt. Der Überstand wurde auf eine HiBind®-DNA-Säule mit Silikamembran aufgetragen und 1 Minute bei 4000 UpM zentrifugiert. Das Säulchen mit einer Bindungskapazität von 25 µg Plasmid-DNA wurde je einmal mit 500 µl HB-Puffer und 750 µl DNA-Waschpuffer gewaschen, anschließend getrocknet und die DNA dann mit 50 - 100 µl sterilem Wasser eluiert.

## 2.2.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Die starke UV-Absorption der Purine und Pyrimidine bei Wellenlängen von 250 bis 280 nm wurde zur Konzentrationsbestimmung mit dem UV-Photometer ausgenutzt. Bei 260 nm wurde die Extinktion einer DNA-Lösung gegen den Nullwert von Wasser gemessen. Für eine Berechnung der Konzentration ist die Kenntnis des Extinktionskoeffizienten nötig, der sich bei bekannter Sequenz für einzelsträngige DNA wie folgt abschätzen lässt (Hanahan, 1985):

$$\epsilon_{260} = (A \cdot 15200) + (G \cdot 12012) + (C \cdot 7050) + (T \cdot 8400) \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

A, G, C und T geben die Anzahl der entsprechenden Nukleotide in der Sequenz an; als Einheit für den Extinktionskoeffizienten ergibt sich [ $\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ]. Diese Methode wurde verwendet, um die Konzentration von Oligonukleotiden zu messen.

## 2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde verwendet, um bestimmte DNA-Fragmente *in vitro* exponentiell zu amplifizieren. Die doppelsträngige DNA wurde zunächst thermisch 5 Minuten bei 95 °C denaturiert. An die nunmehr einzelsträngige DNA lagern sich synthetische Oligonukleotide von 20 - 40 Basen an die Stelle des DNA-Stranges bzw. Gegenstranges an, die ihrer eigenen Sequenz komplementär ist. Dies wird als Primer-Annealing bezeichnet und erfolgt in Abhängigkeit von der Sequenz und Länge des Primers bei einer Temperatur von 45 - 55 °C innerhalb von 1 Minute. Die Primer wurden so ausgewählt, dass sie eine bestimmte Zielsequenz umfassen, und dabei zu Strang bzw. Gegenstrang komplementär sind.

Eine DNA-Polymerase synthetisiert, ausgehend von dem kurzen Primer-Matrizen-Hybrid, den komplementären Strang. Thermostabile DNA-Polymerasen erlauben es, diese Temperaturabfolge mehrfach zu wiederholen, da sie den Denaturierungsschritt bei 95 °C ohne Aktivitätsverlust überstehen. Die optimale Arbeitstemperatur der hier verwendeten DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* liegt bei 72 °C. Die Dauer des Polymerisationsschrittes richtete sich nach der Länge des Amplifikates; für 1000 Nukleotide wurde 1 Minute benötigt.

Durch mehrmaliges Durchlaufen des PCR-Zyklus - Denaturieren, Primer-Annealing, Polymerisation - war eine Amplifikation der gewünschten Zielsequenzen möglich, die durch die Auswahl der Primer bestimmt wurden. Abschließend wurden durch eine einmalige acht-

minütige Inkubation bei 72 °C eventuell noch unvollständige Amplifikate durch die Polymerase vervollständigt.

Falls Primer eingesetzt wurden, die nur zum Teil komplementär zu ihrer Zielsequenz waren und Veränderungen einbrachten oder ein Stück DNA anfügten, wurde die Annealing-Temperatur herabgesetzt.

Ein typischer PCR-Reaktionsansatz enthielt:

|           |   |
|-----------|---|
| 10 µl     | PCR-Puffer (10x)  |
| 8 µl      | dNTP-Mix (je 200 µM Endkonzentration von dATP, dCTP, dGTP und dTTP) |
| 6 µl      | 25 mM Magnesiumchlorid (Endkonzentration: 1.5 mM Mg <sup>2+</sup> ) |
| 1 µl      | je Primer (10 pmol)   |
| 1 µl      | DNA-Matrize   |
| 1 µl      | Taq-DNA-Polymerase  |
| ad 100 µl | bidest. Wasser  |

Folgendes Programmschema wurde verwendet:

| Funktion             | Temperatur | Dauer |             |
|----------------------|------------|-------|-------------|
| Denaturieren         | 95 °C      | 5 min |             |
| Aufschmelzen der DNA | 95 °C      | 1 min | } 30 Zyklen |
| Primer-Annealing     | 50 °C      | 1 min |             |
| Primer-Verlängerung  | 72 °C      | 1 min |             |
| Komplementierung     | 72 °C      | 8 min |             |
| danach               | 4 °C       |       |             |

Nach der Reaktion mußten die Ansätze, bevor das erhaltene Fragment in enzymatische Reaktionen eingesetzt werden konnte, mit dem Cycle-Pure Kit (Peqlab, Erlangen) gereinigt werden (Kapitel 2.2.5).

## 2.2.4 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese wurde zur präparativen oder analytischen Trennung von DNA-Fragmenten, zu deren Größenbestimmung, Mengenabschätzung und Reinheitsüberprüfung eingesetzt. Aufgrund ihrer negativen Ladung bewegt sich die DNA im Spannungsfeld auf die Anode zu, wobei kleine Moleküle schneller wandern als große. Eine Bestimmung der Fragmentgröße wird durch die Verwendung eines DNA-Molekulargewichts- Standards (peqgold, Peqlab Biotechnologie GmbH) möglich. Der verwendete Molekulargewichtsmarker enthält Fragmente folgender Größe in bp: 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100.

Zur Herstellung des Gels wurde die, auf eine Endkonzentration von 0.8 - 3.0 % eingewogene Agarose in TAE-Puffer unter Rühren gekocht, bis eine klare, schlierenfreie Lösung entstand. Nach Abkühlung auf etwa 50 - 60 °C wurde die Agarose-Lösung in einen vorbereiteten, mit einem Kamm versehenen Gelträger gegossen. Nach etwa 20 Minuten war die Lösung zum Gel verfestigt. Der Gelträger wurde in die Elektrophorese-Kammer eingesetzt und diese mit TAE-Puffer so hoch befüllt, dass das Gel vollständig mit Puffer bedeckt war. Die DNA-Proben wurden inzwischen vorbereitet, indem sie mit 10 Vol.% Probenpuffer vermischt wurden, der das Befüllen der Geltaschen erleichtert. Nach Entfernen des Kammes konnten DNA-Proben von 5 - 20 µl Auftragsvolumen in die Geltaschen pipettiert werden. Für das Auftragen größerer Volumina aus präparativen Ansätzen wurden mehrere Zähne des Kammes mit Folie abgeklebt und so eine große Tasche erzeugt. Die angelegte Spannung lag zwischen 80 und 120 Volt. Bei 100 V Spannung und vollständiger Ausnutzung der Trennstrecke von ca. 10 cm erfordert die Elektrophorese ca. 90 min. Die im Probenpuffer enthaltenen Farbmarker Bromphenolblau und Xylencyanol machen den Fortschritt der Elektrophorese sichtbar. Das Gel wurde 20 Minuten in Ethidiumbromid-Lösung der Konzentration 1 µg/ml gefärbt. Ethidiumbromid geht eine Interkalationsverbindung mit DNA ein, deren Fluoreszenz es ermöglicht, die Banden im UV-Licht zu photographieren oder für die weitere Verwendung auszuschneiden.

## 2.2.5 Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen und PCR-Reaktionsansätzen mit Peqlab Gel Extraction Kit und Peqlab Cycle-Pure Kit:

Um DNA-Fragmente aus Agarosegelen zu isolieren oder nach enzymatischen Reaktionen zu reinigen wurde mit HiBind®-Silikagel-Säulchen der Firma Peqlab (Erlangen) gearbeitet, die für Tischzentrifugen geeignet sind. Im Falle einer Reinigung aus Agarosegelstücken wurden zunächst 4 µl DNA-Binde-Puffer pro mg Agarose zu dem Gelstück gegeben und die Mischung bei 55 °C im Wasserbad erwärmt, bis sich die Agarose gelöst hatte. Diese Lösung wurde auf ein Peqlab-Zentrifugensäulchen aufgegeben und für eine Minute mit der Tischzentrifuge bei 14000 UpM in ein Eppendorf-Auffanggefäß zentrifugiert. Hierbei bindet die DNA an das Säulenmaterial. Der Durchlauf wurde verworfen. Die Säule wurde mit 750 µl DNA-Waschpuffer beladen, der bei 14000 UpM durchzentrifugiert wurde. Nach dem Entleeren des Auffanggefäßes wurde nochmals zentrifugiert, um letzte Reste des Waschpuffers zu entfernen, und dann ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß unter die Säule gegeben. Anschließend wurden je nach erwarteter DNA-Menge 30 - 50 µl bidestilliertes Wasser auf die Säule aufgetragen, 5 Minuten inkubiert und die DNA durch 1-minütige Zentrifugation bei 14000 UpM eluiert.

Die Reinigung von PCR-Ansätzen, Restriktions- oder Ligationsreaktionen erfolgte entsprechend, wobei die Erwärmung entfiel und anstatt DNA-Bindepuffer, das vier- bis fünffache Volumen CP-Puffer zu dem Ansatz gegeben wurde.

## 2.2.6 Restriktion und Ligation

### 2.2.6.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen:

Es wurden die Restriktionsendonukleasen mit den passenden Inkubationspuffern der Firmen New England Biolabs (Schwalbach im Taunus) und Gibco-BRL (Eggenstein) verwendet.

Für einen analytischen DNA-Verdau wurden typischerweise 100 - 300 ng DNA in 2 - 5 µl Lösung, 2 µl Puffer (10x) und 1 - 5 units Restriktionsendonuklease eingesetzt. Der Restriktionsansatz wurde mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt. Die Inkubationszeit betrug 1 Stunde bei 37 °C. Für präparative Ansätze wurden 1 - 10 µg DNA in 2 - 40 µl

Lösung, 10 Vol. % Puffer (10x) und 5 - 40 units Restriktionsendonuklease verwendet. Je nach eingesetzter DNA-Menge wurde das Gesamtvolumen mit Wasser auf bis zu 100 µl erhöht und die Inkubationszeit bis zu 4 Stunden verlängert.

Doppelrestriktionen mit zwei Enzymen, die den gleichen Puffer tolerieren, wurden gleichzeitig durchgeführt. Bei mangelnder Aktivität des einen Enzyms im Puffer des anderen, wurde die DNA nach der ersten Restriktion mittels Cycle-Pure Kit von Peqlab gereinigt und das Eluat für die zweite Restriktion eingesetzt.

| Verwendete Enzyme | Erkennungssequenz | Puffer                |
|-------------------|-------------------|-----------------------|
| <i>Bam</i> HI     | 5'-G GATCC-3'     | React 3 Gibco         |
| <i>Eco</i> RI     | 5'-G AATTC-3'     | React 3 Gibco         |
| <i>Hind</i> III   | 5'-A AGCTT-3'     | React 1 Gibco / NEB 2 |
| <i>Kpn</i> I      | 5'-GGTAC C-3'     | NEB 1                 |
| <i>Pst</i> I      | 5'-CTGCA G-3'     | NEB 3                 |

#### 2.2.6.2 Ligation von DNA Fragmenten:

DNA-Ligationen wurden mit dem "Rapid-DNA"-Ligationskit der Firma Boehringer (Mannheim) durchgeführt. DNA-Ligase aus dem *Bacteriophagen T4* katalysiert die ATP-abhängige Bildung von Phosphodiester-Bindungen zwischen 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatenden doppelsträngiger DNA-Moleküle. Es werden sowohl überhängende als auch stumpfe Enden miteinander verbunden. Intermolekulare und intramolekulare Reaktionen sind gleichermaßen möglich. Die zu ligierenden DNA-Fragmente Vektor und Insert wurden im molekularen Verhältnis 1:1 bis 1:5 in die Ligation eingesetzt.

Ein typischer Ligationsansatz enthielt

- 1-2 µl Vektor, entsprechend 50 -100 ng DNA
- 1-2 µl Insert, entsprechend 10 - 60 ng DNA
- auf 8 µl bidest. Wasser
- 2 µl Puffer 2 (DNA Dilutions-Puffer)
- 10 µl Puffer 1 (T4 DNA Ligations-Puffer)
- 1 µl Ligase (5 units/µl)

Der Ansatz wurde bei Raumtemperatur für 15 bis 20 Minuten inkubiert.

## 2.2.7 Kompetente Zellen und Transformation

Sowohl bei der High-Efficiency-Methode nach Hanahan (1983) als auch beim Elektroporationsverfahren wurden Zellen zunächst kompetent gemacht, dann aliquotiert und in flüssigem Stickstoff gelagert. Für eine Transformation wurde ein Aliquot entnommen und langsam auf Eis aufgetaut. Die Zellen dürfen nicht wärmer als 4 °C werden, um Einbußen bei der Transformationsrate zu vermeiden. Alle hierfür benötigten Puffer wurden vorgekühlt bzw. auf Eis gelagert.

### 2.2.7.1 Herstellung chemisch kompetenter Zellen:

Mit 5 ml einer 10 ml Vorkultur, die über Nacht bei 37 °C gezogen wurde, wurden 500 ml LB-Medium beimpft, das 10 mM Mg<sup>2+</sup> enthielt. Die Kultur wurde bis zu einer optischen Dichte (OD<sub>600</sub>) von 0.5 bei 37 °C bebrütet, was 2 - 3 Stunden erforderte. Anschließend wurden die Zellen, nach 15-minütigem Abkühlen auf Eis, im Rotor GSA 20 Minuten abzentrifugiert (2300 UpM, 4 °C). Das überstehende Medium wurde möglichst vollständig entfernt, das Pellet in 100 ml kaltem RF1-Puffer resuspendiert und 15 Minuten auf Eis gelagert. Die Zellen wurden abzentrifugiert (Rotor GSA, 2300 UpM, 4 °C, 20 Minuten), der RF1-Puffer wurde verworfen und das Pellet in 10 ml kaltem RF2-Puffer suspendiert. Nach weiteren 15 Minuten auf Eis konnten die Zellen in sterile Kryo-Gefäße zu 200 µl bzw. 1 ml aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren werden.

### 2.2.7.2 Transformation nach Hanahan:

Die kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Zu einem 200 µl - Aliquot wurden zwischen 100 pg und 100 ng Plasmid-DNA gegeben, wobei das zugefügte Volumen 20 µl nicht übersteigen sollte. Nach kurzem Mischen wurden die Zellen eine Stunde auf Eis gelagert, anschließend 90 Sekunden lang bei 42 °C erhitzt und erneut 2 Minuten auf Eis gestellt. Dann wurden 800 µl LB-Medium, das 10 mM Mg<sup>2+</sup> enthält, zugegeben und bei 37 °C eine Stunde lang inkubiert. Dabei werden die Resistenzgene auf dem Plasmid exprimiert, die anschließend eine Selektion ermöglichen. Hier ist wichtig, dass das verwendete Medium nicht das Antibiotikum enthalten darf, das dem Resistenzgen auf dem zur Transformation verwendeten Plasmid entspricht. Nach diesem Inkubationsschritt wurden



10 - 100  $\mu$ l Zellsuspension direkt aus dem Expressionsmedium auf selektive Agarplatten ausplattiert. Sollten größere Volumina ausplattiert werden, so wurde kurz abzentrifugiert und in 50  $\mu$ l steriler 0.9 % Saline wieder aufgenommen.

### 2.2.7.3 Herstellung elektrokompetenter Zellen:

1 l Medium wurde mit 10 ml einer frischen Über-Nacht-Kultur angeimpft und unter Schütteln bei 37 °C bebrütet, bis die optische Dichte (600 nm) einen Wert von 0.5 erreichte, was der mittleren logarithmischen Wachstumsphase entspricht. Anschließend wurde die Kultur in eisgekühlte, sterile GS3-Zentrifugenbecher gefüllt, 20 Minuten auf Eis gekühlt und im auf 4 °C gekühlten Rotor GS3 bei 4000 UpM 20 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Pellet mit wenig eiskaltem, sterilem, 10 % Glycerin ohne zu Suspendieren übergossen und dieses erneut dekantiert. Auf diese Weise läßt sich auch restliches LB-Medium entfernen. Dann wurde das Pellet in einem Liter kaltem, 10 % Glycerin resuspendiert und wieder abzentrifugiert (s.o.). Diese Prozedur wurde noch zweimal wiederholt, wobei das Pellet das erste Mal in in 500 ml, das zweite Mal in 20 ml eiskaltem, sterilem 10 % Glycerin resuspendiert wurde. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde das Pellet in einem endgültigen Volumen von 2 - 3 ml eiskaltem, sterilem 10 % Glycerin suspendiert. Die Zellenkonzentration sollte  $1-3 \cdot 10^{10}$  Zellen betragen. Die Suspension wurde zu 50 bzw. 200  $\mu$ l in sterile, kältebeständige Gefäße aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

### 2.2.7.4 Elektrotransformation:

Für die Elektrotransformation wurden die Parameter der verwendeten Elektroporen auf folgende Bedingungen eingestellt:

|             |  |
|-------------|--|
| Kapazität:  | 25 $\mu$ F   |
| Widerstand: | 200 $\Omega$   |
| Spannung:   | 2.5 kV bei Küvetten mit 2 mm Spaltbreite<br>1.8 kV bei Küvetten mit 1 mm Spaltbreite |

Elektrokompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut; die Elektroporationsküvetten wurden auf Eis vorgekühlt. 40  $\mu$ l der Zellsuspension wurden mit 10 pg - 100 ng Plasmid-DNA vermischt,

wobei das zugefügte Volumen 2  $\mu\text{l}$  nicht überstieg. Dann wurde die Mischung aus kompetenten Zellen und DNA in die Elektroporationsküvette überführt und durch Schütteln der Suspension auf den Küvettenboden gebracht und die Küvette samt dem Küvettenhalter so in die Elektroporationskammer eingeschoben, dass Kontakt zu den Elektroden bestand. Anschließend wurde ein Puls mit den oben genannten Parametern appliziert und die Zellen sofort in 1 ml SOC-Medium suspendiert. Zur phänotypischen Expression wurden die Zellen eine Stunde bei 37 °C geschüttelt. Abschließend wurde die Zellsuspension auf Selektivnährböden ausplattiert und über Nacht bei 37 °C bebrütet.

## 2.3 Proteinchemische Methoden

### 2.3.1 Stammhaltung

Bakterienkulturen auf Agarplatten wurden nach nächtlichem Bebrüten bei 4 °C gelagert. Alle vier Wochen wurden sie auf frisches Medium überimpft. Die Kulturen wurden dabei durch Zugabe des jeweiligen Antibiotikums unter ständigem Selektionsdruck gehalten.

Sollte eine Kultur für längere Zeit aufbewahrt werden, so war eine Lagerung in flüssigem Stickstoff oder bei -80 °C erforderlich. 5 ml einer über Nacht gewachsenen Kultur wurden abzentrifugiert, der Überstand verworfen, die Zellen mit 1 ml einer autoklavierten Mischung von LB-Medium und Glycerin im Verhältnis 1:1 resuspendiert, in sterile Kryotubes abgefüllt und in flüssigem Stickstoff oder im Tiefkühlschrank bei -80 °C gelagert.

### 2.3.2 Anzucht von Mikroorganismen

#### 2.3.2.1 Allgemeines

Zur Anzucht auf Agarplatten wurden die Zellen entweder als Zellsuspensionen ausplattiert oder mit der Impföse von einer anderen Platte übertragen. Anschließend wurde über Nacht bei 37 °C bebrütet. Durch Verdünnung der Zellsuspensionen bzw. Verdünnungsaustrich ergaben sich Einzelkulturen.

Flüssigkulturen bis 5 ml LB-Medium wurden im Reagenzglas angezogen. Die Anzucht größerer Volumina erfolgte in Erlenmeyerkolben (100 ml - 2 l) im Schüttelinkubator. Anzuchten mit höherer Zelldichte wurde im Fermenter (1 - 2 l) unter kontrollierten Bedingungen durchgeführt. Das Wachstum der Bakterien wurde durch Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm ( $OD_{600}$ ) gegen steriles Medium bzw. Wasser verfolgt. Die Induktion mit IPTG erfolgte bei Erreichen eines typischen  $OD_{600}$ -Werts in der späten exponentiellen Wachstumsphase. Die Ernte der Kulturen 3 - 5 Stunden nach der Induktion wurde mit Kühlzentrifugen bei 4 °C und 5000 UpM während 20 Minuten durchgeführt.

### 2.3.2.2 Testanzucht mit SDS-Aufschluß

Durch Beimpfen von 3 ml LB-Medium mit Klonen transformierter Zellen stellte man eine Vorkultur her, die man über Nacht bei 37 °C wachsen ließ. Am folgenden Tag wurden zweimal 2.5 ml LB-Medium mit jeweils 50 µl dieser Vorkultur angeimpft und 3 Stunden inkubiert. Alle Medien enthielten dabei die entsprechenden Antibiotika: Ampicillin für die Anzucht von *E. coli* XL1-Blue bzw. Ampicillin und Kanamycin für *E. coli* M15 und *E. coli* BL21. Zu einem der beiden Reagenzgläser wurden 50 µl 100 mM IPTG-Lösung gegeben, so dass dessen Endkonzentration 2 mM betrug. Dann ließ man beide Kulturen weitere 5 Stunden bei 37 °C wachsen. Anschließend wurden die Zellen durch 15-minütiges Zentrifugieren bei 14000 UpM und 20 °C geerntet und mit 0.9 % Saline gewaschen. Die Zellen wurden in 150 µl SDS-Probenpuffer suspendiert und 5 Minuten im siedenden Wasserbad erhitzt. Unlösliche Bestandteile wurden durch kurzes Zentrifugieren in der Tischzentrifuge sedimentiert. Die Proben wurden bei -20 °C gelagert. Diese Art des Zellaufschlusses erfährt das gesamte Zellprotein, das durch Natriumdodecylsulfat in der Hitze solubilisiert wird. Es ist keine Differenzierung in einen löslichen und unlöslichen Proteinanteil möglich.

### 2.3.2.3 Anzucht in Schüttelkolben

Zur Proteinexpression wurde LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika im Verhältnis 1:30 - 1:50 mit frischen Übernachtskulturen von Expressionsklonen transformierter *E. coli* Zellen beimpft und bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Bei einer optischen Dichte von 0.6 bis 0.7, gemessen bei 600 nm, erfolgte die Induktion durch Zugabe von IPTG (Endkonzen-

tration: 2 mM). Die Zellen wurden für weitere 3 - 5 Stunden bei 37 °C bebrütet und durch 20-minütiges Zentrifugieren bei 4 °C und 5000 UpM geerntet. Danach wurde das Zellpellet mit 0.9 % Saline gewaschen und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren.

#### 2.3.2.4 Anzucht im Fermenter

Die Anzucht größerer Zellmengen von *E. coli* Expressionsstämmen bzw. die Kultivierung des Riboflavin produzierenden *B. subtilis* Stamms RB50 erfolgte in 1 - 2.5 l Minimalmedium im Fermenter Bioflo 3000 (New Brunswick Scientific, N.J., USA). Der Fermenter wurde mit M9- bzw. TSS-Salzkonzentrat und Wasser (1:10) autoklaviert. Das jeweilige Minimalmedium wurde vervollständigt und im Verhältnis 1:50 mit Übernachtskultur angeimpft. Der pH-Wert des Mediums wurde während der Fermentation mit 3 M NaOH auf 6.9 reguliert. Desweiteren wurden Temperatur, Luftzufuhr und Rührerdrehzahl kontrolliert. Zu Beginn der Fermentation erfolgte keine zusätzliche Fütterung von Glucose. Nach Verbrauch der im Anfangsmedium enthaltenen Glucose (absinken der O<sub>2</sub>-Konzentration im Medium) wurde die Fütterlösung in exponentiell ansteigender Weise oder feedback-gesteuert in Form einer Pulsfütterung zugeführt. Die Zufuhr von Stickstoff als Ammoniumchlorid konnte variabel an die Glucosefütterung gekoppelt werden. Der Verlauf sämtlicher Prozessparameter wurde von einem unter C++ selbstentwickelten Steuer- und Regelungsprogramm am PC grafisch dargestellt und protokolliert. Die über die serielle Schnittstelle übertragenen Lese- und Steuerbefehle an den Fermenter wurden aus einem früheren QBasic-Programm übernommen (Lüttgen, 2000). Typischer Weise wurde die Zellen nach Erreichen einer OD<sub>600</sub> von etwa 6 - 10 mit 2 mM IPTG induziert und nach Beendigung der Wachstumsphase geerntet, mit Saline gewaschen und bei -20 eingefroren.

### 2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

#### 2.3.3.1 Allgemeines:

Es wurde ein diskontinuierliches System aus einem Sammel- und Trenngel nach Lämmli (1970) verwendet. Die SDS-Elektrophorese trennt ausschließlich nach Molekülgröße. Durch Behandlung mit dem im Probenpuffer enthaltenen anionischen Detergenz Natriumdodecylsulfat werden die Eigenladungen von Proteinen so effektiv überdeckt, dass anionische

Micellen entstehen. Das SDS verbindet sich dabei mit dem Protein in einem bestimmten, konstanten Verhältnis, so dass die spezifische Ladung, d.h. Ladung pro Masse, zum entscheidenden Parameter für die Auftrennung wird. Das zugesetzte 2-Mercaptoethanol hat die Aufgabe, Schwefelbrücken, die zwischen Cysteinen gebildet werden, reduktiv aufzuspalten.

Im Sammelgel sind die Poren so groß, dass sie für die Trennung oder Konzentrierung der Proteine keine Rolle spielen. Der Konzentrierungseffekt wird dadurch verursacht, dass sich im Gel andere Ionen (Leitionen) als im Elektrodengefäß (Folgeionen) befinden. Die effektiven Beweglichkeiten aller an der Elektrophorese beteiligten Ionen verhalten sich dabei wie folgt: Leition > SDS-Protein-Micelle > Folgeion. Das Leition wandert am schnellsten und zieht über die elektrische Feldstärke die Proteine nach, während das Folgeion am langsamsten wandert und die Proteine in entsprechender Weise vor sich herschiebt. So werden die Proteine zu einer schmalen, scharf begrenzten Zone hoher Proteinkonzentration gesammelt.

Das konzentrierte Protein bewegt sich in Richtung Anode, bis es an die Grenzschicht des engporigen Trenngels gelangt. Die Proteine erfahren plötzlich einen hohen Reibungswiderstand, sodass ein Stau entsteht, der zu weiteren Zonenschärfung führt. Das niedermolekulare Leition ist davon nicht betroffen und überholt die Proteine. Die Mobilität der Proteine ist von deren spezifischer Ladung abhängig; die Auftrennung erfolgt nach der spezifischen Ladung bzw. nach der Molekülgröße.

Die proteinhaltigen Bereiche des Gels können durch Anfärben mit Coomassie-Blue-Lösung sichtbar gemacht werden, indem der Farbstoff selektiv an das Protein bindet. Ein Molekulargewichts-Standard erlaubt die Bestimmung der Molmasse. Der verwendete Molekulargewichtsmarker MW-SDS-70L (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) enthält folgende Proteine:

|   | MW in Da |
|---|----------|
| $\alpha$ -Lactalbumin aus Kuhmilch                              | 14.200   |
| Trypsin-Inhibitor aus Sojabohnen                                | 20.100   |
| Trypsinogen, PMSF behandelt                                     | 24.000   |
| Carbo-Anhydrase aus Rindererythrocyten                          | 29.000   |
| Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase<br>aus Kaninchenmuskel | 36.000   |
| Albumin aus Hühnerei  | 45.000   |
| Albumin aus Rinderserum   | 66.000   |

### 2.3.3.2 Glycin-System

Neben dem in dieser Arbeit ausschließlich verwendeten Glycin-System gibt es auch das für kleinere Proteine besser geeignete Tricin-System mit einer höheren Trennleistung. Als Werte zur Charakterisierung der Porengröße und deren Verteilung dienen der T- und C-Wert nach Hjerten. T symbolisiert die totale Acrylamid-Konzentration und errechnet sich nach Gleichung (I); C ist ein Maß für den Vernetzungsgrad und wird nach Gleichung (II) berechnet:

$$(I) \quad T = (A + B) / V \qquad (II) \quad C = B / (A + B)$$

Es bedeuten:

A: enthaltene Masse Acrylamid in g

B: enthaltene Masse N,N'-Methylen-bisacrylamid in g

V: Gesamtvolumen in ml

Das Sammelgel besitzt einen T-Wert von 4 % und einen C-Wert von 3 %. Für das Trenngel betragen die Werte 15 % T und 3 % C. Als Leition fungiert hier Chlorid, als Folgeion das Glycinat-Anion.

Das Trenngel mußte zuerst gegossen werden, weil darauf noch das Sammelgel polymerisiert wurde. Acrylamidlösungen, Gelpuffer und Wasser wurden vor Gebrauch filtriert und entgast. Die hier angegebenen Mengen reichen für zwei Gele der Größe 6 x 8 cm und der Schichtdicke 0.75 mm. Für das Trenngel wurden benötigt:

Trenngel 15 % T, 3 % C:

3.75 ml Acrylamidlösung (40 % T; 3 % C)

2.5 ml Trenngelpuffer (4x; Glycin-System)

3.75 ml Wasser

75 µl Ammoniumperoxodisulfatlösung, 10 %ig

5 µl TEMED

Die o.g. Bestandteile wurden vermischt und zügig in den vorbereiteten Gießstand so eingegossen, dass die Oberkante der Lösung ca. 1 cm unterhalb der Glasplatte zu liegen kam.

Es wurde mit 50% wässrigem Isopropanol überschichtet und eine halbe Stunde gewartet bis das Gel auspolymerisiert war. Dann wurde das Isopropanol-Gemisch abgegossen, der Teflon-Kamm für die Geltaschen eingesetzt und das Sammelgel wie folgt vorbereitet:

Sammelgel 4 % T, 3 % C:

0.5 ml Acrylamidlösung (40 % T; 3 % C)

2.5 ml Sammelgelpuffer (2x; Glycin-System)

2.0 ml Wasser

75 µl Ammoniumperoxodisulfatlösung, 10 %ig

5 µl TEMED

Die o.g. Bestandteile wurden vermischt und die Lösung bis zum oberen Rand in den Gelgießstand einpipettiert. Man ließ ca. 15 Minuten polymerisieren, nahm den Kamm heraus und pipettierte jeweils ca. 5 - 15 µl der Proteinproben in die Geltaschen ein. Die Elektrophorese erfolgte unter Wasserkühlung bei einer konstanten Stromstärke von 20 mA pro Gel. Hatte die Bande des Bromphenolblau den unteren Rand des Gels erreicht, wurde die Elektrophorese beendet und die Gele gefärbt.

### 2.3.3.3 Färbung

Die Gele wurden eine halbe Stunde in der Färbelösung inkubiert. Die Färbelösung wurde mehrfach wiederverwendet. Anschließend wurden die Gele in der Entfärbelösung I eine Stunde entfärbt; für eine Entfärbung über Nacht wurde die Entfärbelösung II benutzt. Danach konnten die Gele in die Aufbewahrungslösung gegeben werden.

## 2.3.4 Proteinreinigung

### 2.3.4.1 Ultraschallaufschluß

Zur Gewinnung des löslichen Anteils zellulärer Proteine aus Expressionsklonen wurden die Zellen mit Ultraschall aufgeschlossen. Hierzu wurde das Zellpellet in Proteinaufschluß-Puffer resuspendiert und die Mischung auf Eis gekühlt, wobei pro Gramm feuchte Zellmasse 10 ml Puffer verwendet wurden. Zellen aus 20 ml Testanzuchten wurden

in 1 ml Puffer suspendiert. Der Aufschluß erfolgte mit dem Ultraschall-Gerät Sonifier 250 der Firma Branson (USA). Für 1 ml Ansätze wurde dabei der MicroTip-Aufsatz als Spitze verwendet. In diesem Fall wurden die Proben zweimal acht Sekunden auf Stufe 4 beschallt. Größere Mengen Zellsuspension wurden mit "50 - 60 % gepulsten" Ultraschallstößen in 3 Zyklen zu je 30 Pulsen bei Stufe 5 aufgeschlossen. Nach jeder Beschallung wurden die Zellen 5 Minuten auf Eis gekühlt. Die Zelltrümmer wurden anschließend 30 Minuten bei 15000 UpM und 4 °C abzentrifugiert. Der so erhaltene Rohextrakt wurde vorsichtig mit einer Glaspipette aus dem Zentrifugenbecher abgehoben, auf Eis gelagert und umgehend auf das entsprechende Protein aufgearbeitet. Die aus den Testanzuchten erhaltenen Rohextrakte und Zelltrümmer wurden mittels SDS-PAGE auf das gewünschte Protein hin untersucht.

#### 2.3.4.2 Ionenaustauschchromatographie:

Etwa 3 g feuchte Zellmasse wurden in 30 ml Puffer A (20 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 7.1) resuspendiert, mit 3 mg Lysozym, einer Spatelspitze DNase I und RNase A versetzt und eine halbe Stunde bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde, wie oben beschrieben, mit Ultraschall aufgeschlossen und 30 Minuten bei 15000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde sorgfältig mit einer Glaspipette abgehoben und mit demselben Volumen Wasser verdünnt, ggf. der pH-Wert korrigiert und der Rohextrakt auf eine Anionenaustausch-Chromatographiesäule Sepharose-Q ff (*fast flow*) (Pharmacia, Freiburg) aufgetragen, die zuvor mit Puffer A äquilibriert wurde. Bei dem Säulenmaterial handelt es sich um hochvernetztes Agarose, welche quartäre Ammoniumverbindungen als positiv geladene Seitengruppen trägt und dadurch als Anionenaustauscher fungiert. Die Säule wurde zunächst mit Puffer A gewaschen um ungebundene Bestandteile zu entfernen. Die Elution erfolgte anschließend in einem aufsteigenden Kaliumchlorid-Gradienten von 0 - 1 M KCl in einem Volumen von 500 ml. Die Flußrate betrug durchgehend 3 ml/min. Es wurden Fraktionen zu je 10 ml Volumen gesammelt. Als Maß für die Proteinkonzentration wurde die UV-Absorption bei 280 nm aufgezeichnet. Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert, die das gewünschte Protein enthaltenden Fraktionen vereinigt und mittels Ultrafiltration aufkonzentriert.



### 2.3.4.3 Nickelchelate-Affinitätschromatographie

Proteine mit mehreren Histidinresten in Folge binden sehr spezifisch an mit Metallionen beladene Chelatliganden, indem der Imidazolring des Histidinrestes an das Metall koordiniert. Diese Tatsache wird bei der Affinitätschromatographie mit über Chelatliganden immobilisierten Metallionen ausgenutzt. Dadurch wird es ermöglicht, rekombinante Proteine in einem einzigen Schritt zu reinigen (Stüber *et al.*, 1990). Auch Proteine, die unter physiologischen Bedingungen unlöslich sind oder als Einschlusskörper anfallen, können durch vorherige Solubilisierung in 8 M Harnstoff oder 6 M Guanidinium-Hydrochlorid gereinigt werden. Üblicherweise wird in einem Vorversuch geklärt, ob die Reinigung unter nativen oder denaturierenden Bedingungen durchgeführt wird. Die Elution erfolgt unter den hier ausschließlich angewendeten nativen Bedingungen mit Imidazol, das die Histidinreste des rekombinanten Proteins kompetitiv vom Metallatom verdrängt.

#### Vorversuche mit Ni-NTA Spin Kit (Qiagen, Hilden):

20 ml Flüssigkultur eines entsprechenden Klons wurden durch Zentrifugation geerntet und mit 0.9 % Saline gewaschen. Nach dem Resuspendieren in 1 ml Lyse-Puffer wurde mit Ultraschall aufgeschlossen und die Zelltrümmer mit der Zentrifuge sedimentiert. Eine Ni-NTA spin column wurde während zweiminütiger Zentrifugation bei 2000 UpM mit 600 µl Lyse-Puffer äquilibriert. Anschließend wurde die spin column mit 600 µl des klaren Rohextrakts beladen und 10 Minuten bei 4 °C inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren wurde das Säulchen zweimal mit Waschpuffer (600 µl) gespült; die Elution erfolgte mit 150 µl Elutionspuffer. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 2000 UpM während zwei Minuten durchgeführt. Alle Fraktionen wurden gesammelt und mit SDS-PAGE auf das Zielprotein untersucht.

#### FPLC-Reinigung mit Nickelchelate-Affinitätsmaterial:

5 g feuchte Zellmasse wurden in 50 ml Lyse-Puffer resuspendiert und mit Ultraschall aufgeschlossen. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation abgetrennt; der Überstand wurde auf eine mit Lyse-Puffer (Puffer A) äquilibrierte Nickelchelate-Affinitätssäule (Ni-NTA-Chelating-Sepharose) mit einer Geschwindigkeit von 2 ml/min aufgetragen und mit 5 Säulenvolumina Puffer A gewaschen. Danach erfolgte die Elution durch einen aufsteigenden Imidazol-Gradienten von 20 mM (Puffer A) bis 500 mM Imidazol (Puffer B). Die UV-

Absorbtion bei 280 nm wurde ständig aufgezeichnet und ermöglichte die Zuordnung der zu je 5 ml gesammelten Fraktionen. Die Protein enthaltenden Fraktionen wurden mit SDS-PAGE analysiert. Die Regeneration erfolgte durch Spülen mit je 3 Säulenvolumina 0.2 M Natronlauge, Regenerierpuffer und 100 mM Nickelsulfat, jeweils im Gegenstrom.

#### 2.3.4.4 Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung des Gesamtproteins nach Bradford (1976) wurde in einer modifizierten Form nach Read und Northcote (1981) durchgeführt. Proteinlösung und Bradfordpuffer wurden vermischt, so dass sich ein Gesamtvolumen von 50 µl ergab; der Anteil des Bradford-Puffers muß jedoch mindestens 25 µl betragen. Dann wurden 950 µl Bradford-Reagenz hinzugegeben, vermischt und nach 20-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur die optische Dichte bei 595 nm gemessen. Eine Lösung aus 50 µl Bradford-Puffer und 950 µl Bradford-Reagenz diente als Nullwert; als Eichsubstanz wurde Rinderserumalbumin in Bradford-Puffer verwendet.

Die Konzentration gereinigter Proteinlösungen konnte anhand der UV-Absorption bei 280 nm bestimmt werden. Hierzu wurde die Extinktion der Proteinlösung für eine Konzentration von 1 mg Protein/ml und eine Wellenlänge von 280 nm mit einem Computerprogramm abgeschätzt; dabei ging die Aminosäuresequenz inkrementweise in die Berechnung ein. Die Werte dieser Abschätzung können für die einzelnen Proteine dieser Arbeit Tabelle 3.1 entnommen werden. Der Puffer ohne Protein diente als Nullwert; durch Verwendung derselben Küvette fiel die Schichtdicke als Einflußgröße weg.

#### 2.3.4.5 Proteinkonzentration durch Ultrafiltration

Die Ultrafiltration diente der Konzentration von Proteinen. Es wurden Rührzellen der Firma Amicon (Witten/Westfalen) mit 10 ml und 50 ml Volumen verwendet. Das Prinzip besteht darin, dass die proteinhaltige Lösung unter Rühren mit 5 bar Stickstoffüberdruck durch eine Membran gepreßt wird. Die Ausschlußgrenze der Membran wurde je nach Molekulargewicht des Proteins mit 10 kDa - 30 kDa so gewählt, dass das überexprimierte Protein zurückgehalten wurden, Wasser, niedermolekulare Substanzen und kleinere Proteine aber ungehindert durch die Membran hindurchtreten konnten.

## 2.4 Spektroskopische Methoden

### 2.4.1 NMR-Spektroskopie

Für die  $^1\text{H}$ -,  $^2\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ - und  $^{31}\text{P}$ -Kernresonanzspektroskopie standen verschiedene Geräte von Bruker mit einer Magnetfeldstärke von 250, 360 und 500 MHz zur Verfügung. Letzteres wurde vorzugsweise benutzt und lieferte bei 11.75 Tesla  $^1\text{H}$ -Resonanzfrequenzen von 500.13 MHz und  $^{13}\text{C}$ -Resonanzfrequenzen von 125.77 MHz. Für  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren wurde ein  $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ -Dualprobenkopf verwendet. Für alle zweidimensionalen Experimente mit Detektion von Protonen wurde ein inverser  $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -Tripelresonanzprobenkopf benutzt. Eindimensionale Spektren wurden meist am rotierenden (20 Hz), mehrdimensionale Spektren dagegen am stehenden Röhrchen gemessen. Die Proben wurden in der Regel bei 300 K in deuterierten Solvenzien gelöst ( $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$  (10 % v/v),  $\text{D}_2\text{O}$ , DMSO,  $\text{CDCl}_3$ ) in 5 mm NMR-Röhrchen gemessen. Die Spektrenaufnahme und -bearbeitung erfolgte mit einer Bruker-Standardsoftware (XWINNMR 3.0 bzw. 1D/2D-WINNMR 5.0). Die Simulation von Signalen wurde mit NMRSIM (Bruker) durchgeführt. Bei den eindimensionalen Experimenten wurde der Datensatz mit einer Gauß-Lorentz-Funktion multipliziert (gb: 0.01 - 0.2, lb: -1 bis -2). Die Mischzeit im  $^{13}\text{C}$ -TOCSY betrug 60 ms.  $^{13}\text{C}$ -Messungen wurden mittels CPD Protonen-entkoppelt gemessen. 3-(Trimethylsilyl)-1-propansulfonat diente als externer Standard für  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Spektren.

### 2.4.2 IR-Spektroskopie

Festkörper IR-Spektren von Riboflavin und 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin wurden an einem 1600 series FTIR-Spektrometer (Perkin Elmer, Norwalk, USA) gemessen. Dazu wurde in einer Achatreibschale 1 mg getrocknete Substanz mit einer Spatelspitze getrocknetem KBr verrieben und mit einer hydraulischen Presse unter Vakuum mit 10 t Belastung zu einem klaren Pressling geformt. Durch Summierung von 64 Einzelspektren wurden IR-Spektren im Bereich zwischen  $4000$  und  $500\text{ cm}^{-1}$  mit einer Auflösung von  $2\text{ cm}^{-1}$  aufgenommen. Die Übertragung der Spektren auf den PC erfolgte mit einem Terminalprogramm über die serielle Schnittstelle des Spektrometers. Die Umwandlung der binären Rohdaten in ein für die weitere Auswertung mit Microsoft Excel geeignetes x,y-Datenformat, geschah durch ein selbstentwickeltes C++ Programm.

## 2.5 Enzymatische Synthesen

### 2.5.1 Ribulose-5-phosphat

(Wong *et al.*, 1980; Volk und Bacher, 1991; Richter *et al.*, 1997)

Der Ansatz enthielt 100 mM Tris-HCl (pH 7.8), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 1 mM ATP, 30 mM Phosphoenolpyruvat, 1 mM NADP, 50 mM 2-Ketoglutarat, 50 mM NH<sub>4</sub>Cl und 20 mM <sup>13</sup>C-markierte Glukose in 5 ml entgastem, bidestilliertem Wasser sowie je 20 units Hexokinase, Pyruvatkinase, Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase und Glutamat-Dehydrogenase. Der pH-Wert der Lösung wurde mehrfach kontrolliert und bei Bedarf mit NaOH wieder auf 7.8 eingestellt. Nach 30 minütiger Inkubation bei 37 °C wurde der Ansatz zur Entfernung der Enzyme durch eine Ultrafiltrationsmembran (10 kDa) filtriert. Anschließend wurden je 20 units 6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase und Glutamat-Dehydrogenase zugegeben und weitere 30 min bei 37 °C inkubiert. Der Verlauf der Reaktion wurde mittels NMR-Spektroskopie verfolgt. Falls die Lösung nicht sofort für weitere Umsetzungen eingesetzt wurde, wurde sie mit 600 µl Bariumchlorid (1 M) und 2 ml TCA (15 %) versetzt, 2 min gerührt, mit einer gesättigten BaOH-Lösung neutralisiert und zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 40 ml Ethanol und 90 ml Aceton verdünnt und über Nacht bei -20 °C stehen gelassen. Der weiße Niederschlag wurde abzentrifugiert, mit Ethanol gewaschen und im Vakuum getrocknet. Das Bariumsalz von Ribulose-5-phosphat wurde bei -80 °C gelagert.

Bei Verwendung der rekombinanten Glukokinase aus *B. subtilis* konnte der Ultrafiltrationsschritt ausgelassen werden, der Ansatz enthielt in diesem Fall von Anfang an 6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase. Die kommerziell erhältliche Hexokinase enthält dagegen Spuren von Pentosephosphat-Isomerase und -Epimerase, so dass man ohne Ultrafiltration vor dem letzten Reaktionsschritt ein Gemisch an Ribulose-5-phosphat, Ribose-5-phosphat und Xylulose-5-phosphat erhielt. Eine solche Gleichgewichtsmischung von Pentosephosphaten konnte jedoch ohne wesentliche Verluste für die weitere enzymatische Umsetzung zu 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat oder 5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat verwendet werden, da das jeweils benötigte Substrat aus dem Gleichgewicht nachgebildet wurde.

### 2.5.2 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat

(Volk und Bacher, 1991; Richter *et al.*, 1997)

Die enzymatische Synthese von 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat entsprach weitgehend dem unter 2.4.1 geschildertem Verfahren zu Herstellung von Ribulose-5-phosphat. Der Ansatz enthielt zusätzlich 0.5 mg des rekombinant exprimierten Enzyms 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat-Synthase aus *E. coli*. Ein Ultrafiltrationsschritt war hier nicht nötig. Die Reaktions-Lösung wurde entweder direkt verwendet oder das Produkt wie oben beschrieben als Bariumsalz isoliert und gelagert.

### 2.5.3 Guanosin-5'-triphosphat (Bracher *et al.*, 1998; Tolbert und Williamson, 1997;

Bouhss *et al.*, 1995; Römisch, 2000)

In 25 ml Reaktionspuffer (100 mM Tris-HCl (pH 7.8), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT) wurde <sup>13</sup>C-markierte Glukose (100 mg), ATP (15 mg), PEP (845 mg), NAD<sup>+</sup>(18 mg), 2-Ketoglutarat (195 mg) und NH<sub>4</sub>Cl (100 mg) gelöst und der pH-Wert der Lösung auf 8.0 eingestellt. Dem Ansatz wurden folgende Enzyme zugegeben: Hexokinase, Pyruvatkinase, Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase, 6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase, Phosphoriboisomerase, Myokinase (je 50 units) und Glutamat-Dehydrogenase (100 units) sowie die folgenden rekombinanten Enzyme aus *E. coli*: PRPP-Synthase (14 mg), Xanthin/Guanin-Phosphoribosyltransferase (5 mg), GMP-Synthase (6 mg) und Guanylatkinase (4 mg). Xanthin (82 mg) wurde in NaOH (0.5 M) gelöst und über mehrere Stunden aliquotiert zugegeben. Der pH-Wert wurde mehrfach kontrolliert und bei Bedarf auf 7.8 - 8.0 eingestellt. Der Ansatz wurde 48 h bei 37 °C inkubiert.

Der Reaktionsverlauf wurde mittels <sup>13</sup>C-NMR-Spektroskopie beobachtet und bei Bedarf wurden die Enzyme ergänzt, welche die Umsetzung noch nicht abreagierter Intermediate katalysierten. Nach Beendigung der Reaktion wurden ausgefallene Proteine bzw. nicht abreagiertes Xanthin abzentrifugiert. Gelöste Proteine wurden durch Ultrafiltration (10 kDa Membran) aus dem Überstand entfernt. Dieser wurde mit Wasser auf 2 l verdünnt, ein pH-Wert von 3.5 eingestellt und auf eine DEAE Cellulose-Säule (Whatman DE52, 4 x 8 cm) aufgetragen. Diese wurde mit 500 ml Puffer A (30 mM LiCl, pH 3.5) gespült und in einem Gradienten von 7 - 50 % Puffer B (1 M LiCl, pH 6.5) über 1 l Elutionsvolumen entwickelt. Zur vollständigen Elution wurde mit zwei Säulenvolumen Puffer B gespült. Dabei wurde

mittels UV Detektion bei 280 nm ein Chromatogramm des Eluenten aufgenommen. GTP enthaltende Fraktionen wurden vereinigt und lyophilisiert. Der Rückstand wurde mit absolutem Methanol extrahiert. Das Lithiumsalz von GTP, welches sich im Gegensatz zu LiCl in trockenem Methanol nicht löst, wurde abzentrifugiert und im Vakuum getrocknet. Die Ausbeute wurde photometrisch bestimmt ( $\epsilon_{252\text{ nm}} = 13.7\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ) und betrug bis zu 70 % bezogen auf die eingesetzte Glukose, lag im Allgemeinen jedoch im Bereich von 25 - 50 %. Als  $^{13}\text{C}$ -markierte Edukte wurden [ $\text{U-}^{13}\text{C}_6$ ]Glukose, [ $1\text{-}^{13}\text{C}_1$ ]Glukose, [ $3\text{-}^{13}\text{C}_1$ ]Glukose und [ $2\text{-}^{13}\text{C}_1$ ]Xanthin eingesetzt.

## 2.5.4 Riboflavin

### 2.5.4.1 Xylolring-Markierungen aus Glukose-Isotopologen (Römisch *et al.*, 2002)

Eine Lösung aus  $^{13}\text{C}$ -markierter Glukose (500 mg), ATP (30 mg), Phosphoenolpyruvat (610 mg), NADP (40 mg), 2-Ketoglutarat (995 mg),  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (317 mg), Tris-HCl (100 mM),  $\text{MgCl}_2$  (10 mM), DTT (10 mM),  $\text{NaN}_3$  (0.02 %) und frisch hergestelltem 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (Kapitel 2.6.7) in einem Gesamtvolumen von 200 ml wurde mit Argon überschichtet und mit NaOH (3 M) auf pH 7.8 eingestellt. Nach Zugabe von Hexokinase (100 units), Pyruvatkinase (100 units), Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase (50 units), 6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase (50 units), Glutamat-Dehydrogenase (100 units), Phosphoriboisomerase (10 units), 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat-Synthase aus *E. coli* (5 mg), 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin-Synthase aus *B. subtilis* (75 mg) und Riboflavin-Synthase aus *E. coli* (50 mg) wurde der Ansatz 3 Tage unter Schutzgas im Dunklen bei 25 °C inkubiert. Während den ersten Stunden wurde der pH-Wert mehrfach kontrolliert und auf bei Bedarf auf 7.8 eingestellt. Der orange Niederschlag wurde abzentrifugiert und aus Wasser oder Essigsäure (3 M) umkristallisiert. Die vereinigten Mutterlaugen wurden auf eine Florisil-Säule (2.8 x 10 cm) aufgetragen, welche mit 400 ml Wasser und 200 ml Aceton/Wasser (1:4 v/v) gewaschen wurde. Die Elution des gelben Riboflavins erfolgte mit 600 ml Aceton/Wasser (1:1 v/v). Die gelb gefärbten Fraktionen des Eluats wurden vereinigt und zur Kristallisation eingeeengt.

Der geschilderte Ansatz wurde - teils mit Variationen (Inkubation bei 37 °C, eingesetzte Glukosemenge von 20 bis 800 mg, eingesetzte Enzymmengen, rekombinante statt

kommerzielle Enzyme für Glukokinase, Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase, 6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase) - mehrfach wiederholt. Neben [U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]Glukose wurden in den Positionen C-2, C-3, C-4 und C-6 einfach <sup>13</sup>C-markierte Glukose Isotopomere eingesetzt. Das organisch synthetisch gewonnene Pyrimidin-Edukt (Kapitel 2.6.7) wurde unmarkiert sowie als [1'-<sup>13</sup>C<sub>1</sub>]-markierte Verbindung verwendet. Eine Übersicht über die in Ausbeuten von 30 - 50 % hergestellten Isotopologe gibt die Tabelle 3.4). Die Reaktionen konnten jeweils mittels <sup>13</sup>C-NMR-Spektroskopie verfolgt werden, so dass evtl. inaktive Enzyme ergänzt werden konnten. Insbesondere bei den einfach markierten Glukose-Substraten war auf einen hohen Überschuss an Lumazinsynthese zu 3,4-Dihydroxybutanon-4-phosphat-Synthase zu achten, da sonst das symmetrische Zerfallsprodukt 2,3-Butandion zu unselektiven zusätzlichen Markierungen führte.

#### 2.5.4.2 Stickstoff-Markierung und stochastische Bibliotheken aus 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin-Isotopologen

6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin-Isotopologe konnten analog zu Riboflavin-Isotopologen enzymatisch aus Glukose (Kapitel 2.5.6) oder durch Kondensation der markierten Vorstufe 5-Amino-6-Ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion mit 2,3-Butandion synthetisch (Kapitel 2.6.8) gewonnen werden. Aus fermentativen Verfahren standen stochastische Bibliotheken markierter Lumazinmoleküle zur Verfügung (Illarionov *et al.*, 2004). Die Umsetzung von 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin zu Riboflavin geschah durch Inkubation einer wässrigen Lumazinslösung in 100 mM Tris-HCl (pH 7.8) mit Riboflavin-Synthase aus *E. coli* bei 37 °C. Da bei dieser Reaktion aus zwei Lumazinmolekülen ein Riboflavinmolekül und ein Molekül des Intermediats 5-Amino-6-Ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion entsteht betrug die theoretische Ausbeute nur 50 %. Sollte nicht auf die Hälfte der Ausbeute verzichtet werden, so enthielt der Ansatz zusätzlich ein Äquivalent 2,3-Butandion oder alternativ ein Äquivalent enzymatisch erzeugtes 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat (Kapitel 2.5.2) und 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin-Synthase aus *B. subtilis*.

#### 2.5.4.3 Ribitylseitenketten Markierung aus GTP-Isotopologen

Dem unter 2.4.3 beschriebenen GTP-Ansatz mit [U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]Glukose als markiertem Ausgangsstoff wurden nach Beendigung der XGPRT-Reaktion als weitere Enzyme GTP-Cyclohydrolyase II aus *E. coli* (10 mg) und Desaminase/Reduktase aus *E. coli* (6 mg) sowie eine

äquivalente Menge NADH (300 mg) zugesetzt. Guanylatkinase (1.4 mg) und Pyruvatkinase (20 units) wurden ebenfalls ergänzt. Der Ansatz wurde im Dunklen unter einer Argon-Atmosphäre bei 37 °C inkubiert, bis im <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum keine weitere Zunahme des Reduktaseprodukts (charakteristisches Signal von C-1' bei 43 ppm) zu erkennen war. Der pH-Wert wurde auf 4.8 eingestellt, 50 units saure Phosphatase wurden hinzugegeben und der Ansatz wurde weiter unter Schutzgas bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 2,3-Butandion (75 µl) und weiterer Phosphatase (100 units) wurde die Reaktion mittels Dünnschichtchromatographie an Cellulose (3 % wässriges NH<sub>4</sub>Cl) verfolgt, bis Lumazinphosphat vollständig in Lumazin umgewandelt wurde. 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin wurde, wie unter 2.4.4.2 beschrieben, mit Riboflavin-Synthase zu Riboflavin umgesetzt. Die Gesamtausbeute, des noch zu optimierenden Prozesses, betrug 10 % bezogen auf [U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]Glukose.

### 2.5.5 Flavinmononukleotid (FMN)

Ein Reaktionsansatz mit 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, Riboflavin (20 mg), ATP (1.5 mg), PEP (15 mg), Pyruvatkinase (10 units) und Flavokinase aus *S. pombe* (2 mg) wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert. Der Umsatz zu FMN wurde mittels Dünnschichtchromatographie an Kieselgelplatten (Laufmittel: 3% wässriges NH<sub>4</sub>Cl) kontrolliert. Oft konnte die Lösung z.B. für die Rekonstitution von Flavoproteinen direkt verwendet werden. Falls eine Reinigung des FMN nötig war, wurden Proteine durch Zugabe von TCA (15%) gefällt und abzentrifugiert. Anschließend wurde die Lösung neutralisiert und auf eine Sep-Pak C18-Säule (Waters, Milford, USA) aufgetragen, mit Wasser gespült und mit Methanol eluiert. Die gelbe Fraktion des Eluats wurde eingeeengt und im Vakuum getrocknet.

### 2.5.6 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin

Die enzymatische Synthese von 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin verlief weitgehend analog zur enzymatischen Riboflavinsynthese aus <sup>13</sup>C-markierten Glukose-Isotopologen (Kapitel 2.5.4.1). Eine Lösung aus 100 mM Tris-HCl (pH 7.8), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, <sup>13</sup>C-markierter Glukose (50 mg), ATP (7 mg), PEP (70 mg), NAD<sup>+</sup> (10 mg), 2-Ketoglutarat (100 mg), 5-Amino-6-Ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (75 mg), Pyruvatkinase, Hexokinase (je 50 units), Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase, Glutamat-Dehydrogenase (je 10 units), 6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase aus *B. subtilis* (5 mg), 3,4-Dihydroxy-



2-butanon-4-phosphat-Synthase aus *E. coli* (12 mg) und 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin-Synthase aus *B. subtilis* (45 mg) wurde über Nacht im Dunklen unter Schutzgas bei 37 °C inkubiert. Die Reaktionsmischung wurde zentrifugiert und auf eine Florisil-Säule (2.5 x 5 cm) aufgetragen. Die Säule wurde mit Wasser gespült und 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin wurde mit Wasser/Aceton (1:1 v/v) eluiert. Die grün fluoreszierenden Fraktionen wurden vereinigt, eingengt und im Vakuum getrocknet. Die Ausbeute lag zwischen 50 und 65 % Umsatz. Die Synthese wurde mit [U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]-, [2-<sup>13</sup>C<sub>1</sub>]-, [3-<sup>13</sup>C<sub>1</sub>]-, [4-<sup>13</sup>C<sub>1</sub>]- und [6-<sup>13</sup>C<sub>1</sub>]Glukose durchgeführt. Eine weitere Reinigung konnte durch Umkristallisieren des Produkts aus Wasser/Ethanol (1:1 v/v) erreicht werden.

## 2.6 Organisch Chemische Synthesen

### 2.6.1 D-Riboseoxim (Plaut und Harvey, 1971)

Hydroxylaminhydrochlorid (59 g) wurde in 300 ml absolutem Ethanol suspendiert und mit 2 Tropfen einer alkoholischen Phenolphthaleinlösung (1%) versetzt. Unter Rühren wurde eine aus Natrium und absolutem Ethanol frisch hergestellte Natrium-Ethanolatlösung zugetropft, bis sich die rosa Phenolphthaleinfärbung der Suspension innerhalb einer Minute gerade noch entfärbte. Das ausgefallene Natriumchlorid wurde abfiltriert und das Filtrat auf 70 °C erhitzt. D-Ribose (54.9 g) wurde in kleinen Portionen zugegeben und die Reaktionsmischung über Nacht bei Raumtemperatur stengelassen. Auskristallisiertes weißes Riboseoxim wurde abfiltriert. Aus der Mutterlauge konnte durch Einengen weiteres Riboseoxim kristallisiert werden. Nach Trocknung im Exsikkator betrug die Ausbeute an Riboseoxim 80 - 90 %. Zur Herstellung von [1-<sup>13</sup>C<sub>1</sub>]-markiertem Riboseoxim wurde der Ansatz linear auf 2 g [1-<sup>13</sup>C<sub>1</sub>]-D-Ribose, zur Synthese von [<sup>15</sup>N<sub>1</sub>]Riboseoxim auf 1 g [<sup>15</sup>N<sub>1</sub>]Hydroxylammoniumchlorid herunterskaliert.

### 2.6.2 D-Ribitylamin (Plaut und Harvey, 1971)

Eine Suspension von 25 g Riboseoxim und 500 mg PtO<sub>2</sub>-Katalysator in 400 ml Eisessig wurde in einer Hydrierapparatur unter H<sub>2</sub>-Athmosphäre gerührt, bis sich der weiße Feststoff komplett gelöst hatte und kein Wasserstoff mehr verbraucht wurde. Der Katalysator wurde

abfiltriert und das Filtrat unter Vakuum zu einem sirupartigen Öl eingengt. Der Rückstand wurde in 100 ml Wasser gelöst und auf eine Säule aus Dowex 50W-X8 (2 x 40 cm, 20-50 mesh, H<sup>+</sup>-Form) aufgetragen. Die Säule wurde mit 500 ml Wasser gewaschen und mit 500 ml 3M NH<sub>4</sub>OH entwickelt. Der pH-Wert des Durchlaufs wurde verfolgt und der alkalische Teil des Eluats zu einem braunen Sirup eingengt. Reste von Ammoniak wurden durch wiederholtes Aufnehmen in Wasser und erneutes Einengen entfernt. Die Ausbeute an D-Ribitylamin (65 - 75 %) wurde durch Titration gegen HCl-Maßlösung bestimmt. Für die Synthese von [1-<sup>13</sup>C<sub>1</sub>]- und [1-<sup>15</sup>N<sub>1</sub>]D-Ribitylamin wurde der Ansatz entsprechend der eingesetzten Menge Riboseoxim herunterskaliert.

### 2.6.3 4-Chloruracil (Cresswell und Wood, 1960)

2,4,6-Trichlorpyrimidin (48 g) wurde mit 420 ml Natronlauge (2.5 M) versetzt und für 16 h unter Rückfluß erhitzt. Die Reaktionsmischung wurde abgekühlt und mit 50 ml Salzsäure (12 M) angesäuert. Der weiße Niederschlag wurde abfiltriert, mit Wasser gewaschen und getrocknet. Die Ausbeute an 4-Chloruracil betrug ca. 92 %.

### 2.6.4 4-Chlor-5-nitrouracil (Cresswell und Wood, 1960)

4-Chloruracil (5 g) wurden bei Raumtemperatur nach und nach in konzentrierter Schwefelsäure (15 ml) gelöst, wobei darauf geachtet wurde, dass sich die Mischung nicht über 45 °C erhitzte. Unter Kühlung mit einer Eis/Kochsalz Kältemischung wurde langsam konzentrierte Salpetersäure (5.3 ml) zugetropft und noch weitere 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde unter Rühren langsam in ein gekühltes Gefäß mit 20 g Eis gegossen. Der weiße Niederschlag wurde abfiltriert, mit Eiswasser gewaschen und im Exsikkator über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> getrocknet. Die sehr reaktive Verbindung wurde möglichst rasch weiterverwendet.

### 2.6.5 5-Nitroso-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion

(Plaut und Harvey, 1971)

D-Ribitylamin (4 g) und 4-Chloruracil (2 g) wurden in 80 ml Wasser gelöst und 24 h unter Rückfluß gekocht. Unter Eiskühlung wurde NaNO<sub>2</sub> (6 g) zugegeben und die Lösung mit

Essigsäure (10 %) auf pH 4.6 eingestellt. Die tiefrote Lösung wurde noch 30 min im Eisbad und 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Der Ansatz wurde eingengt, in 80 ml Ammoniaklösung (0.15 M) aufgenommen und auf eine Säule aus Dowex 1-X8 (4 x 25 cm, 100-200 mesh, Formiat-Form) aufgetragen. Die Säule wurde mit je 500 ml Wasser und Ameisensäure (50 mM) gewaschen und mit 3 l Ameisensäure (120 mM) eluiert. Rot gefärbte Fraktionen wurden eingengt und der Rückstand aus Wasser umkristallisiert. Die Ausbeute lag typischerweise um 30 %. Für die Synthese von [1'-<sup>13</sup>C<sub>1</sub>] bzw. [5-<sup>15</sup>N<sub>1</sub>] 5-Nitroso-6-Ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion wurde der Ansatz auf 1.4 g [1-<sup>13</sup>C<sub>1</sub>]Ribitylamin bzw. 1 g [1<sup>5</sup>N<sub>1</sub>]NaNO<sub>2</sub> herunterskaliert.

### 2.6.6 5-Nitro-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion

(Cresswell und Wood, 1960; Nielsen und Bacher, 1988)

4-Chlor-5-Nitrouracil (3.9 g) in 200 ml Ethanol wurden zu einer Lösung von Ribitylamin (6 g) in 200 ml H<sub>2</sub>O gegeben. Die Mischung wurde mit K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1 M) auf pH 8 eingestellt und 24 h bei Raumtemperatur stehen gelassen. Der pH der Lösung wurde mit konzentriertem Ammoniak auf 10.7 eingestellt und der entstehende Niederschlag abfiltriert. Die Lösung wurde eingengt und auf eine Anionenaustauscher-Säule aufgetragen (Dowex 1-X8, 4 x 20 cm 100-200 mesh, Formiat-Form). Die Säule wurde mit Wasser und 0.01 M Ameisensäure (je 500 ml) gewaschen und mit Ameisensäure (0.1 M, 1.5 l) entwickelt. Die Fraktionen wurden photometrisch analysiert ( $\lambda_{\max} = 227, 323 \text{ nm}$ ) und produktthaltige Fraktionen wurden vereinigt und auf ca. 150 ml eingengt. Der in der Kälte gebildete weiße Niederschlag wurde abfiltriert und über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> getrocknet. Die Ausbeute betrug maximal 18 %. Ein entsprechend herunterskaliertes Ansatz wurde auch zur Synthese von [6-<sup>15</sup>N<sub>1</sub>]5-Nitro-6-Ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion aus 0.8 g [1-<sup>15</sup>N<sub>1</sub>]Ribitylamin verwendet.

### 2.6.7 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion

(Sedlmaier *et al.*, 1987)

Eine Suspension von 1.5 g 5-Nitro-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion oder 5-Nitroso-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion und 180 mg Palladium-Aktivkohle-Katalysator in 50 ml Wasser wurde in einer Hydrierapparatur bei Raumtemperatur unter einer H<sub>2</sub>-Athmosphäre gerührt, bis kein Wasserstoffverbrauch mehr festzustellen war. Der Katalysator wurde rasch abfiltriert und die luftempfindliche Lösung entweder unter Stickstoff

oder Argonathmosphäre sofort umgesetzt oder nach Zugabe von 100 mM DTT bei -20 °C eingefroren.

### 2.6.8 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin (Cresswell und Wood, 1960)

Die nichtenzymatische Umsetzung von 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion zu 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin erfolgte durch Kondensation mit einer äquivalenten Menge 2,3-Butandion in wässriger Lösung während einstündiger Inkubation bei 37 °C. Das Lumazin konnte bei Bedarf durch Säulenchromatographie an Florisil und/oder durch Umkristallisation aus Ethanol/Wasser (1:1 v/v) gereinigt werden.

### 2.6.9 Barbitursäure (Dickey und Gray, 1938)

Natrium (0.72 g) wurde in 15 ml absolutem Ethanol gelöst. Zu 1.5 ml dieser frisch hergestellten Natriumethanolatlösung wurden nacheinander 0.5 g Diethylmalonat und 188 mg trockner Harnstoff gegeben, welcher zuvor in 1.5 ml heißem Ethanol gelöst wurde. Die Mischung wurde 7 h unter Rückfluß auf 110 °C erhitzt. Nach Zugabe von 3.1 ml heißem Wasser und Ansäuern mit konzentrierter Salzsäure kristallisierte über Nacht im Kühlschrank ein weißer Niederschlag aus. Als isotopmarkierte Edukte wurden in verschiedenen Kombinationen [1,3-<sup>15</sup>N<sub>2</sub>]- und [2-<sup>13</sup>C<sub>1</sub>]Harnstoff sowie [1,3-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]- und [2-<sup>13</sup>C<sub>1</sub>]-Diethylmalonat eingesetzt. Die Ausbeuten lagen mit ca. 30 % deutlich unter denen in der Originalliteratur angegebenen 72 - 78 %.

### 2.6.10 1-(D-Ribitylamino)-2-phenylazo-4,5-dimethylbenzol

(Karrer und Meerwein, 1936)

3,4-Dimethylanilin (4.8 g) und D-Ribose (6 g) wurden 3 h in absolutem Methanol unter Rückfluss erhitzt. Diese Mischung wurde mit Ranney-Nickel unter einer Wasserstoffathmosphäre hydriert. Nach Abfiltrieren des Katalysators und Einengen der Methanollösung kristallisierte 3,4-Dimethylphenyl-D-ribitylamin mit einer Ausbeute von 80 % aus. Von dieser Substanz wurden 2.5 g unter schwachem Erwärmen in 250 ml Wasser gelöst, einige Tropfen Essigsäure hinzugegeben und bei Raumtemperatur mit einer Lösung von Phenyldiazoniumsulfat versetzt, so dass ein etwa 10 % iger Überschuss an

Diazoniumsalz bestand. Die Lösung färbte sich tief rot. Nach 15 min wurde 2 M Natronlauge zugetropft, bis sich eben ein Niederschlag zu bilden begann. Nach 20 h wurde der dunkelrote kristalline Azofarbstoff abfiltriert und mit 50 % Ethanol gewaschen. Das Rohprodukt wurde aus heißem Ethanol umkristallisiert. Die Ausbeute betrug 91 %.

Die hier beschriebene Synthese wurde im Rahmen dieser Arbeit lediglich zu Testzwecken mit unmarkierten Edukten durchgeführt, eignet sich aber im Prinzip als Alternative für die Einführung markierter Ribose in das Zielmolekül Riboflavin. Für die Synthese von Riboflavin aus dem unmarkierten Azofarbstoff und markierten Barbitursäure-Isotopologen standen größere Mengen des Azofarbstoffs als Spende von Hoffmann-La Roche (Basel) zur Verfügung.

### 2.6.11 Riboflavin (Tishler *et al.*, 1947)

Barbitursäure (520 mg) wurden mit 1-(D-ribitylamino)-2-phenylazo-4,5-dimethylbenzol (1.4 g) in 6.5 ml Dioxan und 1.3 ml Eisessig 24 h unter Rückfluß gekocht. Die Mischung wurde filtriert und der Rückstand aus kochendem Wasser umkristallisiert. Die Ausbeuten an Ribiflavin lagen um 65 %. Der Ansatz wurde jeweils mit dem unmarkiertem Azofarbstoff und insgesamt 5 verschiedenen Isotopologen von Barbitursäure durchgeführt (siehe Tabelle 3.3).

### 2.6.12 Xanthin (Shaw, 1950)

Eine Mischung aus 4-Amino-5-imidazolcarboxamidhydrochlorid (300 mg) und Harnstoff (300 mg) wurde 2 h im Ölbad auf 175 °C erhitzt. Die erkaltete Schmelze wurde mit Wasser aufgeschlämmt und abfiltriert. Eine Lösung des Rohprodukts in Kalilauge (1 M) wurde mit Aktivkohle entfärbt. Durch Umfällen des Xanthins aus alkalischer Lösung mit Essigsäure konnte es in ausreichender Reinheit isoliert werden. Die beschriebene Methode wurde für die Synthese von [2-<sup>13</sup>C<sub>1</sub>]Xanthin aus [2-<sup>13</sup>C<sub>1</sub>]Harnstoff verwendet. Die Ausbeute betrug 75 %.

### 2.6.13 Xanthin (Sariri und Khalili, 2002)

Die hier beschriebene vierstufige Xanthinsynthese wurde als Vorversuch mit unmarkierten Edukten durchgeführt, ermöglicht aber durch Verwendung markierten Harnstoffs,

Formamids, Natriumnitrits und Ethylcyanoacetats prinzipiell die Herstellung einer Vielfalt variabler Xanthin-Isotopologe.

#### 6-Amino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion

Ethylcyanoacetat (4.2 g) wurde zu einer, aus Natrium (1.8 g) und Ethanol (40 ml) frisch hergestellten Natriumethanolatlösung zugetropft, wobei sich ein weißer Niederschlag bildete. Vor der Zugabe von Harnstoff (2.4 g) wurde noch 20 min bei Raumtemperatur gerührt und die Reaktionsmischung anschließend drei Stunden unter Rückfluss erhitzt. Der weiße Niederschlag wurde abfiltriert, mit Ethanol gewaschen und in 20 ml Wasser gelöst. Diese Lösung wurde mit Eisessig auf einen pH-Wert von 7 eingestellt. Nach 2 h bei Raumtemperatur wurde das auskristallisierte Produkt abfiltriert und getrocknet. Die Ausbeute betrug 88 %.

#### 6-Amino-5-nitroso-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion

Eine Lösung von Natriumnitrit (2.8 g) in 7.4 ml Wasser wurde zu einer Mischung von 6-Amino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (4.5 g) in 2.2 ml Wasser gegeben. Unter heftigem Rühren wurde langsam Eisessig (3.2 g) zugetropft und die Mischung noch 6 h bei Raumtemperatur gerührt. Der rote Niederschlag wurde abfiltriert, mit Ethanol und Wasser gewaschen und getrocknet. Die Ausbeute an 6-Amino-5-nitroso-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion betrug 75 %.

#### 5,6-Diamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindionsulfat

Zu einer rot gefärbten Suspension aus 6-Amino-5-nitroso-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (4.1 g) in 25 ml heißem (90 °C) Wasser wurde innerhalb von 15 min Natriumdithionit (3.3 g) hinzugegeben. Dabei entfärbte sich das Reaktionsgemisch und es wurde noch 20 min bei 90 °C gerührt. Der weiß-gelbliche Niederschlag von 5,6-Diamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion-Dihydrogensulfat wurde abfiltriert und getrocknet. Nach Zugabe von 25 ml Wasser und 3 ml konzentrierter Schwefelsäure (4.5 g) wurde die Mischung eine Stunde unter Rückfluss erhitzt und anschließend abgekühlt. Der Niederschlag wurde abfiltriert, mit Aceton gewaschen und getrocknet. Ausbeute: 70 %.

#### Xanthin

5,6-Diamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindionsulfat (1 g) wurde mit 5 ml Formamid 90 min auf 180 °C erhitzt. Die Mischung wurde abgekühlt, das ausgefallene Xanthin abfiltriert und

gründlich mit Wasser und kaltem Ethanol gewaschen. Das Produkt wurde im Exsikkator über  $P_2O_5$  getrocknet. Die Ausbeute lag bei 90 %.

## 2.7 Enzymassays

### 2.7.1 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat-Synthase

Der Assay enthielt 100 mM Tris-HCl (pH 7.7), 10 mM  $MgCl_2$ , 10 mM  $[U-^{13}C_5]$ Ribulose-5-phosphat (Kapitel 2.5.1) und 10 %  $D_2O$  in 500  $\mu$ l Gesamtvolumen. Durch Messung eines 1D  $^{13}C$ -NMR-Spektrums bei konstanter Temperatur (im Allgemeinen 37 °C) wurde der Startwert festgelegt. Die Reaktion wurde durch Zugabe einer möglichst konzentrierten Proteinlösung gestartet. In Intervallen von 10 min entsprechend 200 scans wurden  $^{13}C$ -Spektren aufgenommen. Das Signal des während der Reaktion abgespaltenen  $^{13}C$ -markierten Formiat bei 171 ppm wurde in den einzelnen Spektren integriert und dem zeitlichen Mittelwert zwischen Anfang und Ende der jeweiligen Messung zugeordnet. Über eine Kalibriergerade aus  $^{13}C$ -Intensitäten von Formiatensignalen bekannter Konzentrationen konnte die zum jeweiligen Zeitpunkt umgesetzte Substratmenge berechnet werden. Aus der Steigung des Graphen  $c[\text{Formiat}]/t$  im linearen Anfangsbereich wurde die Reaktionsgeschwindigkeit abgeleitet. Bei Mutanten der 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat-Synthase, die bei denen so keine Formiatbildung festzustellen war, wurde die Probe im NMR-Röhrchen weiter bei 37 °C inkubiert und im Abstand einiger Stunden nachgemessen. Gegebenenfalls wurde die Probe über Nacht inkubiert und die Restaktivität über eine 2-Punkt Kinetik abgeschätzt. Auf diese Weise ließen sich Restaktivitäten nachweisen, die über dem Grenzwert von 2.5 nmol  $h^{-1} mg^{-1}$  lagen.

### 2.7.2 GTP-Cyclohydrolase II

500  $\mu$ l NMR-Ansätze enthielten 100 mM Tris-HCl (pH 8.5), 10 mM  $MgCl_2$ , 10 mM DTT, 5 mM  $[1'-^{13}C_1]$ GTP, 5 mM PEP, 1 mM ATP, Pyruvatkinase und Guanylatkinase (je 2 units). Die Probe wurde mit Argon überschichtet, im Spektrometer bei 37 °C vorinkubiert und das  $^{13}C$ -NMR-Spektrum der Ausgangsmischung aufgenommen. Nach Zugabe der Enzymlösung wurde alle 10 min die Aufnahme eines neuen Spektrums gestartet. Die Integrale der

Singulettssignale bei 86.0 (GTP), 85.1 ( $\beta$ -Produktanomer) und 81.7 ppm ( $\alpha$ -Produktanomer) wurden bestimmt und anhand ihrer relativen Intensitäten der Umsatz bzw. die Konzentrationen der Reaktionsteilnehmer zum jeweiligen Zeitpunkt berechnet. Zur Ermittlung von Ratenkonstanten der enzymatisch katalysierten Reaktion und der anschließenden spontanen Anomerisierung des Produkts wurden für ein kinetisches Modell Differenzialgleichungen erster Ordnung aufgestellt (Kapitel 3.5.2), deren Parameter durch die im Microsoft Excel Solver Add-In implementierten Algorithmen derart optimiert wurden, dass die quadrierten Abweichungen von den Messdaten ein Minimum aufwiesen.

### 2.7.3 GTP-Cyclohydrolase III

Eine Lösung aus 100 mM Tris-HCl (pH 8.5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 1 mg [U-<sup>13</sup>C<sub>10</sub>,U-<sup>15</sup>N<sub>5</sub>]GTP, 10 mM PEP, 1 mM ATP, Pyruvatkinase und Gunaylatkinase (je 2 units) in 10 % D<sub>2</sub>O wurde 30 min bei 37 °C unter Argon vorinkubiert um die GMP und GDP Anteile im kommerziell erhältlichen totalmarkierten GTP komplett ins 5'-Triphosphat umzuwandeln. Vor der Zugabe von 2.4 mg GTP-Cyclohydrolase III aus *Methanococcus jannaschii* wurde ein <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum der Substratlösung gemessen, danach wurden in den ersten 90 min Spektren im Abstand von ca. 10 min gestartet sowie zwei weitere nach 8.5 und nach 16 h. Die relativen Signalintensitäten der Atome C-1', C-5' und C-8 von GTP und den vier Produktisomeren wurden quantitativ ausgewertet. Für die Teilreaktionen wurden Differenzialgleichungen erster Ordnung formuliert (Kapitel 3.5.3) und deren Parameter mit Hilfe des Microsoft Excel Solver nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate optimiert, so dass sich eine bestmögliche Übereinstimmung mit den NMR-Messdaten ergab.

### 2.7.4 Pyrimidin-Desaminase

Durch 30 minütige Inkubation einer Lösung aus 100 mM Tris-HCl (pH 8.5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 5 mM [2,1',2',3',4',5'-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]GTP, 5 mM PEP, 1 mM ATP, 10 % D<sub>2</sub>O, Pyruvatkinase, Gunaylatkinase (je 2 units) und GTP-Cyclohydrolase II aus *E. coli* (1 mg) bei 37 °C unter einer Argonathmosphäre wurde eine Substratmischung für Desaminasen des Bakterien-/Pflanzen-Typs erzeugt. Deren <sup>13</sup>C-Spektrum wurde als Referenz für den Zeitpunkt t = 0 min gemessen. Nach Zugabe der Enzymlösung, wurden in Intervallen von 10 min <sup>13</sup>C-NMR-Spektren der Reaktionsmischung gemessen. Durch Integration der Singulett-Peaks



für das markierte C-2 Atom bei 151.6 und 151.2 ppm ( $\alpha/\beta$ -Anomer des Substrats) sowie bei 155.7 und 156.1 ( $\alpha/\beta$ -Anomer des Produkts) konnten die Konzentrationen der vier Reaktionsteilnehmer zeitabhängig dargestellt werden. Die Berechnung von Ratenkonstanten erster Ordnung erfolgte wiederum durch Optimierung der quadrierten Abweichungen der Modellrechnung von den Messwerten.

### 2.7.5 Reduktase

Zur Generierung der Substratmischung für Reduktasen des Hefe/Archaea-Typs wurde eine Lösung von 100 mM Tris-HCl (pH 8.5), 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM DTT, 5 %  $\text{D}_2\text{O}$ , 5 mM  $[1'\text{-}^{13}\text{C}_1]\text{GTP}$ , NADH (10 mM), ATP (1 mM), PEP (5 mM), Pyruvatkinase, Guanylatkinase (je 2 units) und GTP-Cyclohydrolase II aus *E. coli* (0.7 mg) unter Schutzgas ( $\text{Ar}/\text{N}_2$ ) bei 37 °C inkubiert. Das  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum der Ausgangslösung wurde gemessen und nach Zugabe der Reduktase wurde alle 10 min ein neues NMR-Spektrum aufgenommen. Zur Auswertung wurden die zeitabhängigen Integrale der C-1' Signale bei 81.7 und 85.1 ppm ( $\alpha/\beta$ -Anomer des Substrats) sowie bei 43 ppm (Produkt) bestimmt. In Microsoft Excel wurde eine Modellrechnung mit Reaktionen erster Ordnung für den Konzentrationsverlauf der drei Reaktionsteilnehmer durchgeführt. Die Ratenkonstanten wurden mit Hilfe des Solver Add-Ins durch Optimieren der Fehlerquadrate bestimmt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Klonierung, Expression und Reinigung von Enzymen

Als Voraussetzung für die spätere enzymatische Synthese isotopologer Verbindungen mussten zunächst ausreichende Mengen an Enzymen bereitgestellt werden. Das Ziel war, letztendlich alle benötigten Enzyme als Fusionsproteine mit "Affinitäts-tag" in *E. coli* zu exprimieren, um zum Einen eine schnelle und effektive Reinigung zu ermöglichen und zum Anderen um nicht auf eventuell verunreinigte kommerziell erhältliche Enzyme angewiesen zu sein.

Einige Expressionsklone für Enzyme des Pentosephosphatweges und der Nukleotidbiosynthese, wie die 6-Phosphoglukonat-Dehydrogenasen aus *E. coli* und *B. subtilis*, die PRPP-Synthase und die Xanthin/Guanin-Phosphoribosyltransferase aus *E. coli*, wurden jeweils als "His-tag-Fusionsproteine" aus einer eigenen früheren Arbeit übernommen. Zwei weitere Expressionsklone für die 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin-Synthase aus *B. subtilis*, ebenfalls als "His-tag-Konstrukt", sowie für die GTP-Cyclohydrolase II aus *E. coli* wurden freundlicherweise von Dr. Ilka Haase, Dr. Johannes Kaiser und Dr. Markus Fischer zur Verfügung gestellt. Dr. Boris Illarionov sei an dieser Stelle für die Bereitstellung größerer Mengen gereinigter Riboflavinsynthase aus *E. coli* gedankt.

Tabelle 3.1 gibt einen Überblick über diese und die weiteren im Laufe dieser Arbeit entstandenen Expressionsklone und einige Eigenschaften der entsprechenden Enzyme. Aus der Glykolyse und dem Pentosephosphatweg wurden die Glukokinase und die Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase aus *B. subtilis* kloniert, aus dem Nukleotidstoffwechsel die GMP-Synthase und die Guanylatkinase aus *E. coli* und schließlich aus der Riboflavinbiosynthese von *E. coli* die bifunktionelle Desaminase/Reduktase und die 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat-Synthase. Zur Klonierung der Hilfsenzyme Pyruvatkinase aus *E. coli* und Glutamat-Dehydrogenase aus *B. subtilis* wurden ebenfalls Anstrengungen unternommen, allerdings konnte für diese Enzyme kein guter Expressionsstamm gewonnen werden.

| Enzym                                       | EC-Nr.   | Organismus         | PCR Primer (Referenz)             |              | Stamm                    | Monomer | ε <sub>280</sub> |
|---|----------|--------------------|-----------------------------------|--------------|--------------------------|---------|------------------|
|   |          |                    | vorwärts                          | rückwärts    |                          |         |                  |
| Glukokinase                                 | 2.7.1.2  | <i>B. subtilis</i> | glck_bs_Bam                       | glck_bs_Hind | XL1-pQE30-glck           | 34 944  | 41 260           |
| Pyruvatkinase                               | 2.7.1.40 | <i>E. coli</i>     | pykA_Bam                          | pykA_Hind    | XL1-pQE30-pykA           | 52 755  | 9 440            |
| Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase            | 1.1.1.49 | <i>B. subtilis</i> | yqjJ_Bam                          | yqjJ_Kpn     | XL1-pQE30-yqjJ           | 57 026  | 79 730           |
| Glutamat-Dehydrogenase                      | 1.4.1.3  | <i>B. subtilis</i> | ypcA_Bam                          | ypcA_Pst     | XL1-pQE30-ypcA           | 48 610  | 46 850           |
| 6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase             | 1.1.1.44 | <i>B. subtilis</i> | (Römisch, 2000)                   |              | XL1-pQE30-Bs-pgdh        | 53 381  | 61 170           |
|   |          | <i>E. coli</i>     | (Römisch, 2000)                   |              | XL1-pQE30-Ec-pgdh        | 52 879  | 55 000           |
|   |          | <i>E. coli</i>     | (Römisch, 2000)                   |              | M15[pRep4]-pQE30-Ec-pgdh | 52 879  | 55 000           |
| PRPP-Synthase                               | 2.7.6.1  | <i>E. coli</i>     | (Römisch, 2000)                   |              | BL21[pRep4]-pQE30-prpp   | 35 596  | 5 600            |
|   |          |                    | ecoprs1-Eco                       | ecoprs2-Bam  | BL21-pMal-prsA           | 80 462  | 72 880           |
| Xanthin/Guanin-Phosphoribosyltransferase    | 2.4.2.22 | <i>E. coli</i>     | (Römisch, 2000)                   |              | XL1-pQE30-gpt            | 18 369  | 28 000           |
| GMP-Synthase                                | 6.3.4.1  | <i>E. coli</i>     | guaA-Bam                          | guaA-Pst     | BL21[pRep4]-pQE30-guaA   | 60 077  | 64 280           |
| Guanylatkinase                              | 2.7.4.8  | <i>E. coli</i>     | ecogmk1-Eco                       | ecogmk2-Bam  | BL21-pMal-gmk            | 69 856  | 83 210           |
| GTP-Cyclohydrolase II                       | 3.5.4.25 | <i>E. coli</i>     | (Bacher <i>et al.</i> , 1997a)    |              | XL1-pNCO-ribA            | 21 836  |                  |
| 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat-Synthase | 5.4.x.x  | <i>E. coli</i>     | ec-mut-1                          | ec-mut-2     | XL1-pQE30-ribB           | 24 752  | 3 040            |
| Desaminase / Reduktase                      | 3.5.4.26 | <i>E. coli</i>     | (Bacher <i>et al.</i> , 1997a)    |              | M15[pRep4]-pQE30-ribB    | 24 752  | 3 040            |
|   |          |                    | ec-ribD-1                         | ec-ribD-2    | BL21[pRep4]-pQE30-ribD   | 41 737  | 39 410           |
| Lumazin-Synthase                            | 2.5.1.9  | <i>B. subtilis</i> | (Fischer <i>et al.</i> , 2001)    |              | XL1-pNCO-His6-ribH       | 17 109  | 9 770            |
| Riboflavin-Synthase                         | 2.5.1.9  | <i>E. coli</i>     | (Illarionov <i>et al.</i> , 2001) |              | M15[pRep4]-pNCO-rosy     | 23 444  |                  |

Tabelle 3.1: Rekombinante Enzyme für die Synthese isotoploger Verbindungen.

Die bakteriellen Zielgene wurden mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) unter Verwendung der jeweils angegebenen Oligonukleotid-Primer aus der chromosomalen DNA von *E. coli* bzw. *B. subtilis* amplifiziert und anschließend einem Restriktionsverdau mit zwei unterschiedlichen Restriktionsenzymen unterzogen. Der vorgesehene Plasmid-Vektor wurde mit den jeweils selben Restriktionsenzymen geschnitten und so für die nachfolgende Ligation vorbereitet. Für die Expression mit N-terminalem "His-tag" wurde der Vektor pQE30, für die Expression eines N-terminalen Fusionsproteins mit dem Maltosebindeprotein aus *E. coli* der Vektor pMal-c2X verwendet.

Abbildung 3.1 zeigt den schematischen Aufbau beider Plasmide: Nach einer Promotor/Operatorsequenz folgt die Sequenz für den "Affinitäts-tag" aus 6 aufeinanderfolgenden Histidinresten bzw. dem Maltosebindeprotein von *E. coli*. Die *multiple cloning site* enthält eine Reihe von Restriktionsschnittstellen, hier wurden die jeweiligen zu klonierenden Gene eingefügt. Neben Terminatorsequenzen, einem Resistenzgen gegen Ampicillin und dem Replikationsursprung sind auf dem pMal-c2X noch zusätzlich das Repressorprotein für den Lac-Operator und das LacZ $\alpha$ -Peptid für eine blau/weiß-Selektion codiert.

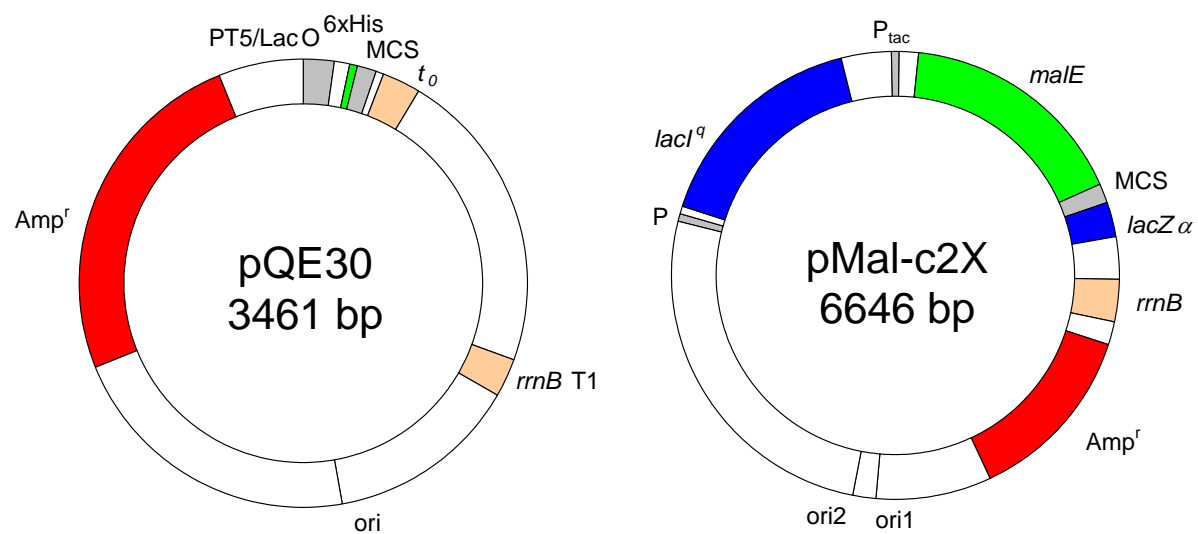


Abb. 3.1: Die Expressionsvektoren pQE30 und pMal-c2X. P<sub>tac</sub>, PT5, P: Promotorsequenzen; Lac O: Lac-Operator; 6xHis: Sequenz für 6 aufeinanderfolgende Histidine; *malE*: Maltosebindeprotein; MCS: *multiple cloning site*; t<sub>0</sub>, *rrnB*, T1: Terminatorsequenzen, ori: Replikationsursprung; Amp<sup>r</sup>: Ampicillin-Resistentgen; *lacI*<sup>q</sup>: Repressorprotein; *lacZ* $\alpha$ : Peptid für blau/weiß-Selektion.

Die Ligationsansätze wurden mittels Elektroporation in kompetente *E. coli* Zellen der Stämme XL1-Blue oder BL21[pRep4] transformiert, welche auf Selektivnährböden (LB, Ampicillin) ausgestrichen wurden. Gegebenenfalls erfolgte für einen, durch Plasmid-isolierung und analytischen Restriktionsverdau, positiv gescreenten Klon noch eine Umklonierung von XL1-Blue in die Expressionstämme M15[pRep4] oder BL21[pRep4].

Die Anzucht der Expressionstämme erfolgte, wie unter 2.3.2 beschrieben, bei 37°C im Schüttelkolben oder Fermenter. Nach anschließendem Ultraschallaufschluß und Reinigung der entsprechenden Rohextrakte mittels Affinitätschromatographie an Nickel-Chelat bzw. Amylose-Säulen, wurden die Proteine durch Ultrafiltration oder  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Präzipitation aufkonzentriert und falls nicht zur sofortigen Verwendung vorgesehen bei -80°C gelagert. Abbildung 3.2 zeigt die verschiedenen Enzyme auf einem analytischen SDS-Polyacrylamid-gel. Für die Anwendung als Biokatalysatoren war das Ergebnis der Reinigung in jedem Falle ausreichend.

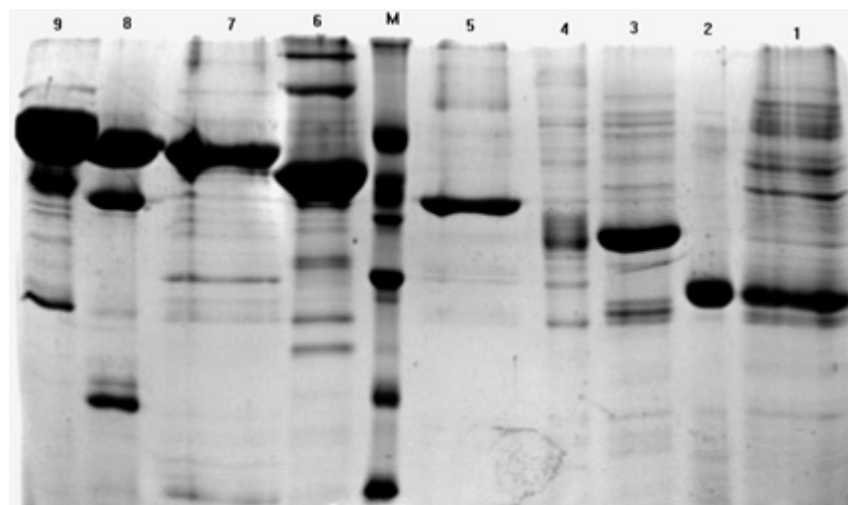


Abb. 3.2: SDS-PAGE der klonierten Synthese-Enzyme: 9, Guanylatkinase; 8, GMP-Synthase; 7, Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase; 6, 6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase; M, Molekulargewichtsmarker; 5, Desaminase/Reduktase; 4, Glukokinase; 3, PRPP-Synthase; 2, 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat-Synthase; 1, Xanthin/Guanin-Phosphoribosyltransferase

## 3.2 Synthese isotopologer Verbindungen

### 3.2.1 Guanosin-5'-triphosphat

Die Grundzüge der in dieser Arbeit weiterentwickelten, enzymatischen Synthese von GTP-Molekülen, die im Riboserest mit  $^{13}\text{C}$ -Atomen markiert sind, wurden bereits in früheren Arbeiten beschrieben (Bracher *et al.*, 1998; Tolbert und Williamson, 1997; Bouhss *et al.*, 1995; Römisch, 2000). Ausgehend von, in variablen  $^{13}\text{C}$ -Markierungen erhältlichen, Glukose-Isotopologen wird in drei enzymatischen Schritten Ribulose-5-phosphat erzeugt (Abb. 3.3 linke Seite). Die dafür benötigten Cofaktoren ATP und  $\text{NAD(P)}^+$  können mit Hilfe von Phosphoenolpyruvat (PEP) als Phosphatüberträger bzw. von 2-Ketoglutarat als Oxidationsmittel und den Hilfsenzymen Pyruvatkinase und Glutamat-Dehydrogenase regeneriert werden. Die Enzyme Hexokinase/Glukokinase, Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) und 6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase (6PGDH) sind kommerziell erhältlich, wurden zum Teil aber auch aus rekombinanten *E. coli* Stämmen gewonnen (Kapitel 3.1). Von der 6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase wurde je eine  $\text{NAD}^+$ - und eine  $\text{NADP}^+$ -abhängige Form aus *B. subtilis* bzw. *E. coli* kloniert. Die Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase aus *Leuconostoc mesenteroides* und die Glutamat-Dehydrogenase aus Rinderleber sind dagegen mit beiden Nicotinamid-Cofaktoren aktiv.

Nach der Isomerisierung von Ribulose-5-phosphat zu Ribose-5-phosphat durch die Phosphoriboisomerase (PRI) folgt die durch PRPP-Synthase katalysierte Übertragung der Pyrophosphatgruppe eines ATP-Moleküls auf die OH-Gruppe in Position 1 der Pentose. Das neben 5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat (PRPP) gebildete AMP wird von der Myokinase unter ATP-Verbrauch zunächst in ADP umgewandelt und so dem Recyclingsystem der Pyruvatkinase zugänglich gemacht. Der nächste Schritt wird von einem Enzym des *nucleotide salvage pathway*, der Xanthin/Guanin-Phosphoribosyltransferase (XGPRT), katalysiert. In dieser Reaktion wird das N-9 Atom der Purinbasen Xanthin oder Guanin unter Pyrophosphatabspaltung mit der C-1 Position des Zuckers verknüpft, wobei die 5'-Mononukleotide XMP bzw. GMP entstehen. Die Verwendung von Xanthin an Stelle von Guanin bringt neben der besseren Löslichkeit des Xanthins den Vorteil, dass zwei einfache organisch-chemische Syntheserouten für isotopmarkierte Xanthine existieren (Shaw, 1950; Sariri und Khalili, 2002), die somit leicht in die enzymatische GTP-Synthese integriert werden können.

Die 2-Oxo-Gruppe von XMP kann von der XMP-Aminase / GMP-Synthase (GuaA) in einer ATP-abhängigen Reaktion in Position 2 aminiert werden. Als Stickstoffquelle dienen hierfür Ammoniumionen. Das so erzeugte GMP wird zunächst von der Guanylatkinase wiederum unter ATP-Verbrauch in GDP umgewandelt, welches anschließend als Substrat der Pyruvatkinase zu GTP weiterreagiert.

Die komplette Reaktionssequenz ist im linken Teil von Abbildung 3.3 wiedergegeben. Sie benötigt insgesamt 11 Enzyme und kann ohne Isolierung von Zwischenprodukten als Eintopfreaktion durchgeführt werden. Es empfiehlt sich jedoch, die bei pH 8 schwerlösliche Nucleobase als alkalische Lösung nur nach und nach, im Laufe der Umsetzung zum gut löslichen Nucleotid, zuzugeben. Das Endprodukt GTP kann über Ionenaustausch-Chromatographie an DEAE Cellulose als Lithium-Salz gewonnen werden.

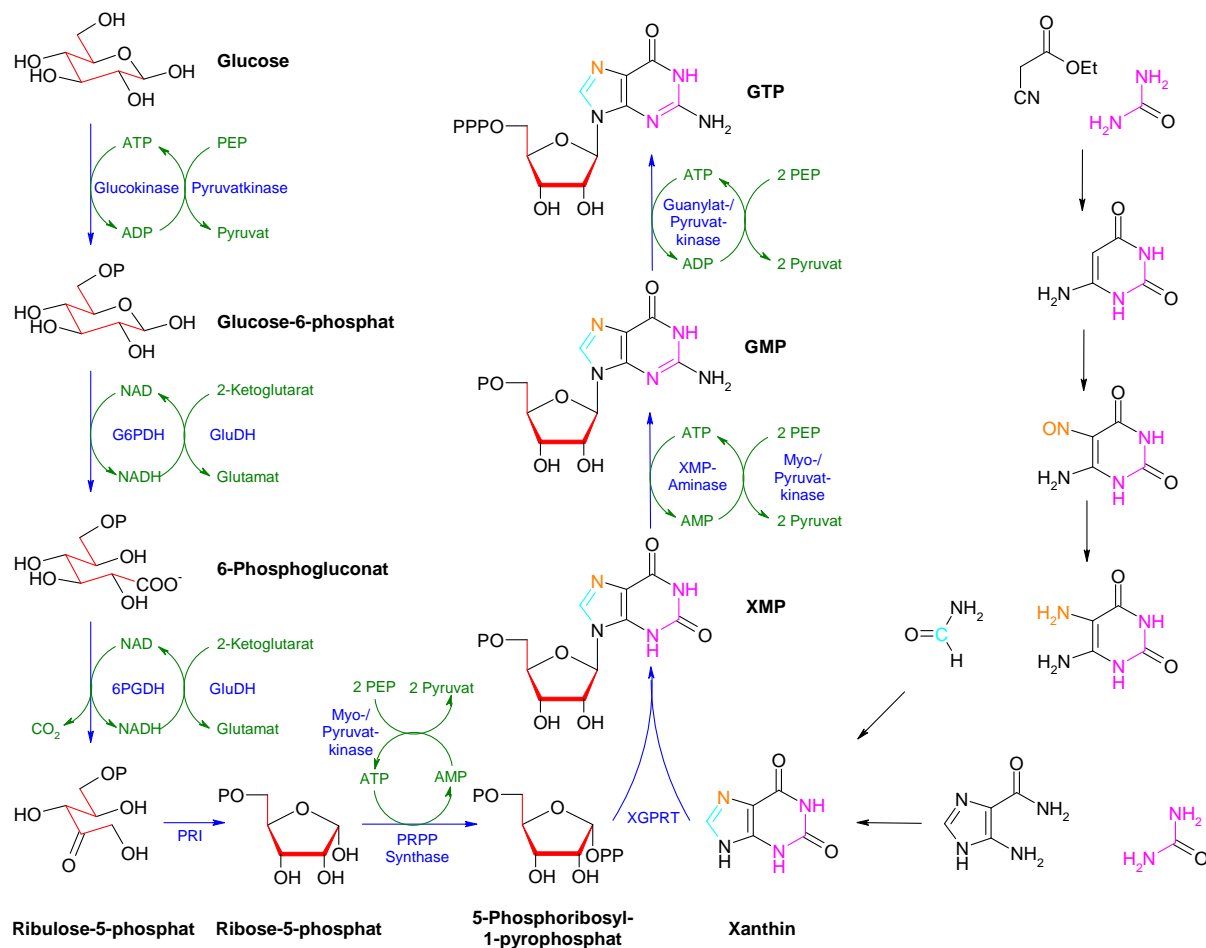


Abb. 3.3: Synthese isotopologischer GTP-Moleküle

Von den potentiell markierten Kohlenstoffatomen der Glukose (in Abb. 3.3 rot markiert) wird das C-1 Atom im Laufe der Reaktion als  $\text{CO}_2$  abgespalten, so dass sich lediglich die Positionen 2-6 der ursprünglichen Glukose im Ribosylrest des GTP wiederfinden.

Die in Abbildung 3.3 rechts oben dargestellte chemische Syntheseroute für Xanthin aus Ethylcyanoacetat, Harnstoff, Natriumnitrit und Formamid (Sariri und Khalili, 2002) ermöglicht eine einfache Markierung der Stickstoffatome N-1, N-3 (violett) und N-7 (orange) mit  $^{15}\text{N}$ , sowie der Kohlenstoffatome C-2 (violett) und C-8 (blau) mit  $^{13}\text{C}$ . Sollen nur die Atome 1-3 (violett) des Purinrings markiert werden, so bietet sich die einstufige Synthese von Xanthin aus 4-Amino-5-imidazolcarboxamid und Harnstoff an, die in Abbildung 3.3 rechts unten skizziert ist (Shaw, 1950).

Auf diese Weise wurden folgende markierte GTP-Isotopologe synthetisiert, wobei die Synthese der letzten beiden Isotopologe derzeit noch nicht abgeschlossen ist.

| Glukose                      | Xanthin                        | GTP  |
|------------------------------|--------------------------------|--|
| $[2\text{-}^{13}\text{C}_1]$ | unmarkiert                     | $[1'\text{-}^{13}\text{C}_1]$  |
| $[4\text{-}^{13}\text{C}_1]$ | unmarkiert                     | $[3'\text{-}^{13}\text{C}_1]$  |
| $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ | unmarkiert                     | $[1',2',3',4',5'\text{-}^{13}\text{C}_5]$                            |
| $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ | $[2\text{-}^{13}\text{C}_1]$   | $[2,1',2',3',4',5'\text{-}^{13}\text{C}_6]$                          |
| $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ | $[1,3\text{-}^{15}\text{N}_2]$ | $[1',2',3',4',5'\text{-}^{13}\text{C}_5,1,3\text{-}^{15}\text{N}_2]$ |
| $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ | $[2,8\text{-}^{13}\text{C}_2]$ | $[2,8,1',2',3',4',5'\text{-}^{13}\text{C}_7]$                        |

Tabelle 3.1: GTP Isotopologmuster

Das  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum des aus  $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ Glukose und  $[2\text{-}^{13}\text{C}_1]$ Xanthin gewonnenen  $[2,1',2',3',4',5'\text{-}^{13}\text{C}_6]$ GTP ist in Abbildung 3.4 wiedergegeben. Die Signale des Ribosylrests sind aufgrund von  $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$ - und  $^{13}\text{C}^{31}\text{P}$ -Kopplungen zu Multipletts aufgespalten. Die chemischen Verschiebungen und Kopplungskonstanten aus der NMR-spektroskopischen Charakterisierung der GTP-Isotopologe sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst.



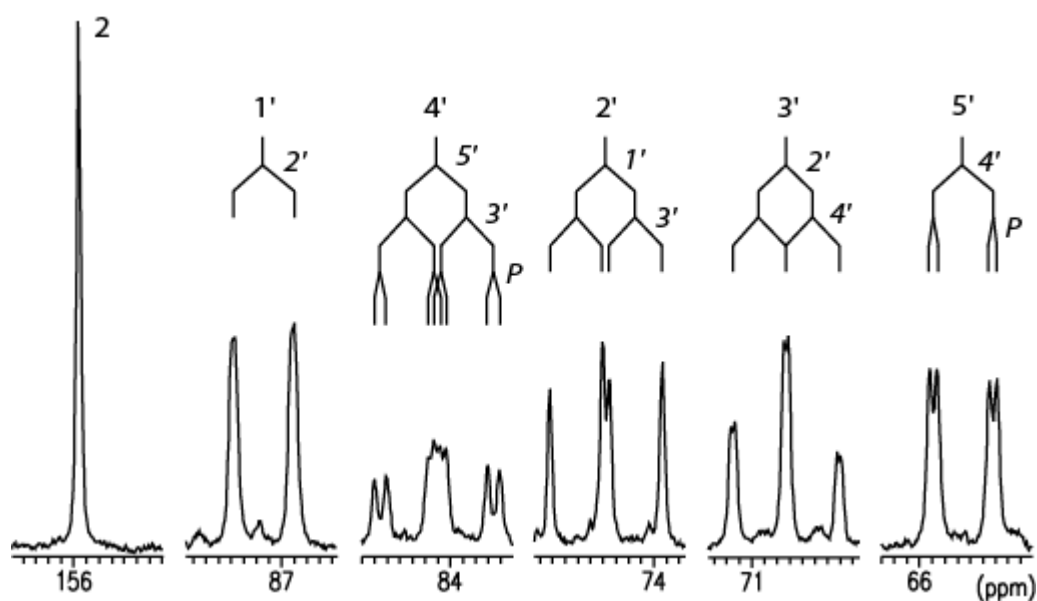


Abb. 3.4:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von  $[2,1',2',3',4',5'-^{13}\text{C}_5]\text{GTP}$

| Position | chemische Verschiebung<br>$\delta$ [ppm] | Kopplungskonstanten<br>J [Hz]   |
|----------|--|---------------------------------|
| 2        | 156.0                                    |                                 |
| 1'       | 87.2                                     | 42.8 (2')                       |
| 2'       | 74.4                                     | 42.9 (1')<br>37.6 (3')          |
| 3'       | 70.7                                     | 38.0 (2',4')<br>3.1 (1')        |
| 4'       | 84.1                                     | 42.7 (5')<br>38.6 (3')          |
| 5'       | 65.7                                     | 8.6 (P)<br>42.9 (4')<br>5.5 (P) |

Tabelle 3.2:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten isotopologer GTP-Moleküle

## 3.2.2 Riboflavin und FMN

### 3.2.2.1 Organische Synthese

Organisch chemische Synthesen von Riboflavin aus Alloxan oder Barbitursäurederivaten und einer o-Aminoazo-Verbindung, hergestellt aus 3,4-Dimethylanilin, Ribose und einem Aryldiazoniumsalz, wurden bereits in der ersten Hälfte des letzten Jahrhunderts entwickelt (Kuhn

*et al.*, 1934; Karrer und Meerwein, 1936; Tishler *et al.*, 1947) und dienten lange Zeit auch als großtechnische Verfahren zur Vitamin B<sub>2</sub> Produktion, bevor sie weitgehend durch biotechnologische Fermentationsverfahren abgelöst wurden. Auch ihre Anwendung für die Synthese isotopmarkierten Riboflavins wurde bereits mehrfach beschrieben (Grande *et al.*, 1977; Van Schagen und Müller, 1981; Vervoort *et al.*, 1986).

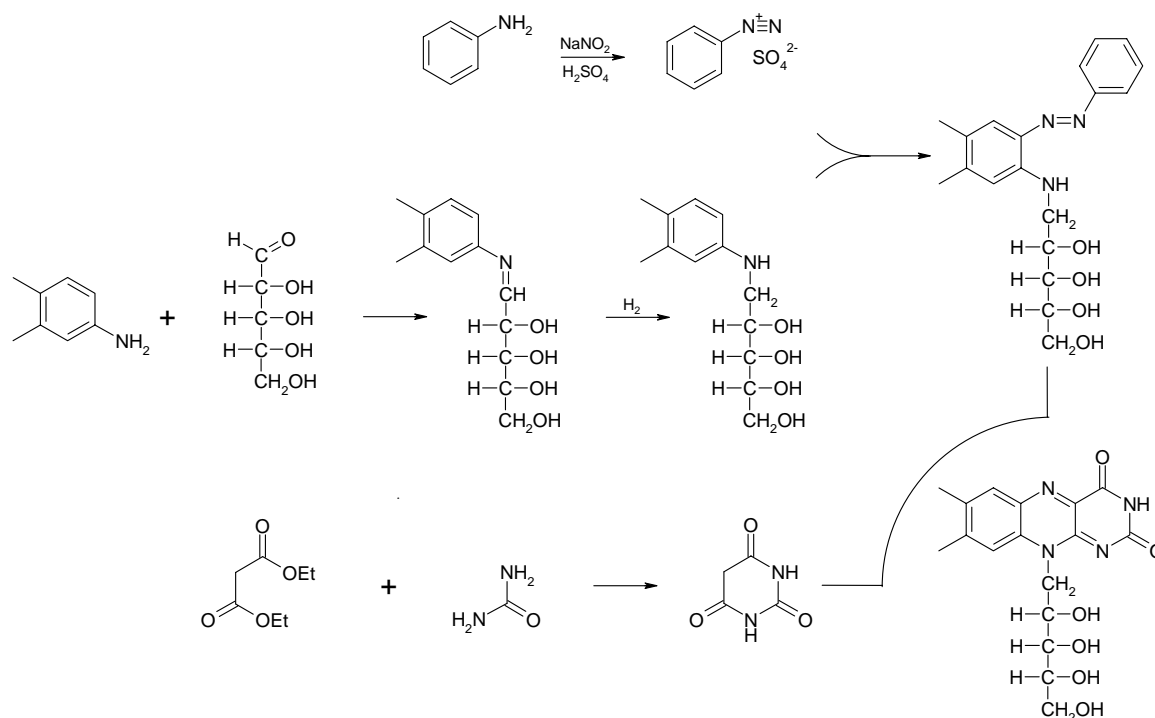


Abb. 3.5: Klassische Riboflavinsynthese

Zunächst wird aus 3,4-Dimethylanilin und Ribose eine Schiffsche Base gebildet, welche hydrogenolytisch zum Ribitylamino-Derivat reduziert wird. Nach Diazotierung von Anilin und anschließender Azokupplung erhält man das orange 1-(D-Ribitylamino)-2-phenylazo-4,5-dimethylbenzol. Dieser Azofarbstoff reagiert mit Barbitursäure beim Erhitzen in Dioxan zu Riboflavin. Die Barbitursäure erhält man ihrerseits durch eine Kondensationsreaktion von Diethylmalonat mit Harnstoff (Dickey und Gray, 1938).

Die Synthese isotopologer Verbindungen ist auf diesem Wege nur bedingt möglich. Durch Verwendung einer markierten Ribose bei der Herstellung des Azofarbstoffes wäre eine Markierung des Ribitylrestes denkbar. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die chemische Riboflavinsynthese jedoch ausschließlich zur Markierung von Atomen des Pyrimidinringes

genutzt, da als Azofarbstoff lediglich die unmarkierte, von der Firma Roche zur Verfügung gestellte Verbindung eingesetzt wurde. Relativ kostengünstig waren die Markierungen der Positionen 2 bzw. 1 und 3 zu realisieren, indem  $^{13}\text{C}$ - bzw.  $^{15}\text{N}$ -markierter Harnstoff als Edukt für die Barbitursäuresynthese eingesetzt wurde. Über ebenfalls kommerziell erhältliche Diethylmalonat-Isotopologe konnten aber auch die anderen Atome des Pyrimidinrings markiert werden. Tabelle 3.3 gibt eine Übersicht über die Markierungsmuster der auf diese Weise hergestellten Verbindungen:

| Harnstoff               | Diethylmalonat            | Barbitursäure             | Riboflavin                  |
|-------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| [U- $^{13}\text{C}_1$ ] | unmarkiert                | [2- $^{13}\text{C}_1$ ]   | [2- $^{13}\text{C}_1$ ]     |
| [U- $^{15}\text{N}_2$ ] | unmarkiert                | [1,3- $^{15}\text{N}_2$ ] | [1,3- $^{15}\text{N}_2$ ]   |
| unmarkiert              | [2- $^{13}\text{C}_1$ ]   | [5- $^{13}\text{C}_1$ ]   | [4a- $^{13}\text{C}_1$ ]    |
| unmarkiert              | [1,3- $^{13}\text{C}_2$ ] | [4,6- $^{13}\text{C}_2$ ] | [4,10a- $^{13}\text{C}_2$ ] |
| [U- $^{13}\text{C}_1$ ] | [2- $^{13}\text{C}_1$ ]   | [2,5- $^{13}\text{C}_2$ ] | [2,4a- $^{13}\text{C}_2$ ]  |

Tabelle 3.3: Markierungsmuster bei der chemischen Riboflavinsynthese

Die Ausbeuten der Barbitursäuresynthese schwankten zwischen 30 und 50 % und lagen damit deutlich unter den Literaturangaben, während die anschließende Reaktion mit dem Azofarbstoff durchgehend gute Ausbeuten um ca. 70 % ergab. Die Gesamtmenge hergestellter Riboflavine lag bei dieser Methode je nach Isotopolog zwischen 0.3 und 1 g.

### 3.2.2.2 Biotechnologische Verfahren

Heute wird Riboflavin für die Nahrungs- und Futtermittel-Industrie überwiegend über Fermentationsverfahren erzeugt. Dabei werden sowohl Eukaryonten, wie der Ascomycet *Ashbya gossipii*, als auch prokaryotische Mikroorganismen, wie das gram-positive Bakterium *B. subtilis* eingesetzt. Der hier verwendete *B. subtilis* Stamm RB50 enthält im Genom zwei Riboflavin Operons ([pRF69] und [pRF93]), die mit einem starken Phagenpromotor und einer Antibiotikaresistenz versehen sind. Das heißt seine chromosomale DNA beinhaltet eine sich wiederholende Sequenz, auf der neben den Genen der Riboflavinbiosynthese, auch ein Gen für Chloramphenicol-Resistenz codiert ist. (Hümbelin *et al.* 1999). Der Stamm RB50::[pRF69]<sub>n</sub>::[pRF93]<sub>m</sub> produziert ca. 100 mal mehr Riboflavin als entsprechende Wildtyp-Stämme (Perkins *et al.* 1998).

Abbildung 3.6 zeigt für verschiedene Testanzuchten in Schüttelkolben und im Fermenter den Verlauf der optischen Dichte des Mediums bei 450 nm für die Riboflavinkonzentration (durchgezogene Linien) und bei 600 nm für die Zelldichte (gestrichelte Linien).

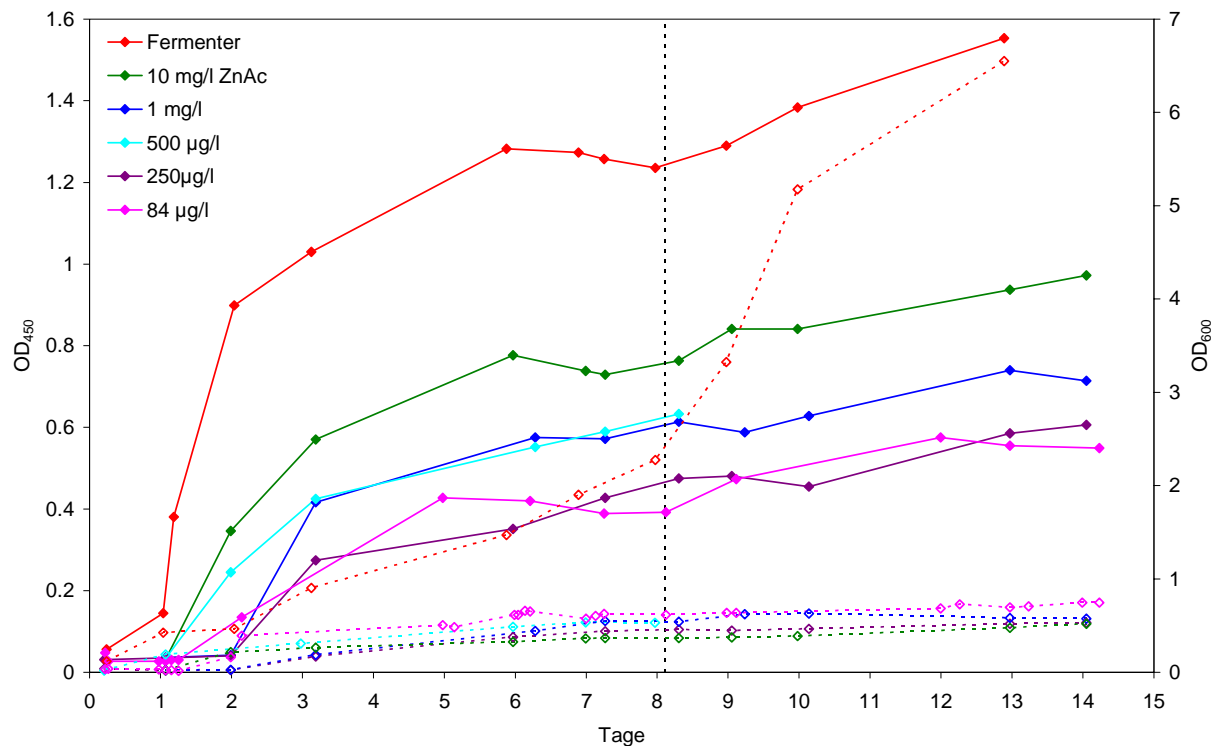


Abb. 3.6: Fermentation von *B. subtilis* RB50::*[pRF69]<sub>n</sub>::[pRF93]<sub>m</sub> zur Riboflavingewinnung*

Es wurden jeweils 3 g/l Glukose in TSS-Mineralmedium vorgelegt. Bei den Anzuchten in Schüttelkolben wurde die Konzentration von Zinkacetat im Medium, von dem etablierten Wert von 84 µg/l ausgehend, über drei Größenordnungen variiert. Es stellte sich heraus, dass die Riboflavinproduktion mit zunehmender  $Zn^{2+}$ -Konzentration ebenfalls zunimmt und das Wachstum der Zellen dabei allenfalls geringfügig beeinträchtigt wird. Für die Fermenteranzucht wurde dann der höchste Wert von 10 mg/l Zinkacetat übernommen. Bei der Fermenterkultur fällt auf, dass die Zellen schneller und bis zu einer deutlich höheren Zelldichte anwachsen und auch deutlich mehr Riboflavin produziert wird. Nach ca. 8 Tagen wurde dem Medium erneut Glukose und Ammoniumchlorid zugegeben (senkrecht gestrichelte Linie), wodurch zwar ein erneutes Ansteigen der Zelldichte, jedoch nur eine geringfügige zusätzliche Riboflavinproduktion induziert werden konnte.

Fermentative Verfahren sind für die Synthese totalmarkierter Riboflavine verwendbar. So wurde  $[U-^{13}C_{17}]$ - und  $[U-^{15}N_4]$ -markiertes Riboflavin durch Kultivierung des beschriebenen

*B. subtilis* Stammes auf Mineral-Medium mit [U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]Glukose bzw. <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl als Kohlenstoff- bzw. Stickstoff-Quelle hergestellt. Riboflavin wurde anschließend aus dem Medium gereinigt, da angenommen wurde, dass die Konzentration von endogenem Riboflavin in den Zellen vergleichsweise gering ist. Neben einer Kohlenstoff- bzw. Stickstoff-Markierung ist mit dieser Methode auch eine kombinierte [U-<sup>13</sup>C<sub>17</sub>, U-<sup>15</sup>N<sub>4</sub>]-Totalmarkierung möglich.

Die Reinigung des Riboflavins erfolgte durch Säulenchromatographie mit Florisil. Dieses Material bindet unter wässrigen Bedingungen Riboflavin mit hoher Affinität. Die Ausbeute an reinem Riboflavin betrug 1 - 2 % bezogen auf die eingesetzte Glukose. Die Ausbeute an Riboflavin ist damit relativ gering. Der Prozess ist allerdings auf eine Fermenter-Kultur im industriellen Maßstab, ausgelegt und ein einfaches "down-scaling" auf eine kleine Fermenter- oder Kolben-Anzucht vermutlich nicht ohne Ausbeuteverluste zu verwirklichen. Wie die Optimierung nur eines Medienbestandteils (Zn<sup>2+</sup>-Ionen) jedoch gezeigt hat, könnte die Ausbeute an Riboflavin durch eine aufwendige systematische Medien- und Anzuchts-Optimierung gegenüber den erzielten Werten noch gesteigert werden.

### 3.2.2.3 Enzymatische Synthesen

Die bisher vorgestellten Verfahren zur Synthese isotopologer Flavine haben neben einer begrenzten Ausbeute den Nachteil, dass die Isotopmarkierungen entweder alle Kohlenstoff- bzw. Stickstoffatome des Moleküls betreffen, oder nur einzelne Atome des Pyrimidinrings, mit nicht unerheblichem synthetischen Aufwand, markiert werden können. Die Markierung einzelner Atome anderer Molekülteile, wie des Ribitylrestes oder des Xylolringes ist so nicht möglich. Ein enzymatischer Ansatz unter Verwendung der Enzyme der Riboflavinbiosynthese und variabel markierter Glucosemoleküle als Substrate erschien da erfolgversprechender.

Der Xylolring im Riboflavin wird biochemisch aus zwei Molekülen 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat aufgebaut, die dabei in antiparalleler Anordnung verknüpft werden. Dazu wird zunächst ein Molekül 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat mit einem Molekül 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion kondensiert, wobei 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin entsteht. Zwei Lumazinmoleküle reagieren anschließend unter Bildung von Riboflavin und dem Vorläufermolekül 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion. In dieser Reaktion fungiert ein Lumazinmolekül als Donor einer 4-Kohlenstoffeinheit und das andere als Akzeptor. Das dabei entstehende Pyrimidin-Produkt kann von der Lumazin-

synthase regeneriert werden. 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat wird biosynthetisch aus Ribulose-5-phosphat gebildet, welches leicht anhand publizierter enzymatischer Verfahren aus Glukose erhältlich ist (Wong *et al.*, 1980; Volk und Bacher, 1991; Richter *et al.*, 1997). Da eine Vielzahl  $^{13}\text{C}$ -markierter Glukose-Isotopologe kommerziell erhältlich ist, ist es möglich aus geeigneten Glukose-Substraten eine Vielfalt von im Xylolring  $^{13}\text{C}$ -markierten Riboflavin-Isotopologen zu erzeugen.

Das andere hierfür benötigte Edukt, 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion, welches biosynthetisch aus GTP hergestellt wird, kann über etablierte Verfahren organisch synthetisch hergestellt werden (Plaut und Harvey, 1971; Cresswell und Wood, 1960). Die Synthese dieses Intermediates aus 2,4,6-Trichlorpyrimidin, Ribose und einfachen anorganischen Molekülen, wie Hydroxylamin und Natriumnitrit ermöglicht auch die Markierung des Ribitylrests und der Stickstoffatome des mittleren Rings von Riboflavin.

Das Reaktionsschema für die enzymatische Transformation von Glukose in Riboflavin unter Verwendung des synthetisch hergestellten Pyrimidin-Intermediats ist in Abb. 3.7 dargestellt. Während die Synthese von 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion in einzelnen Reaktionsschritten mit Isolierung sämtlicher Zwischenstufen durchgeführt werden musste, fand die anschließende Sequenz enzymatischer Reaktionen (**A** - **H**) als Eintopfreaktion statt.

Glukose wird wiederum in drei enzymatischen Schritten, über die Reaktionen der Glukokinase (**A**), Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase (**C**) und 6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase (**E**), in Ribulose-5-phosphat umgewandelt, wobei 1 Äquivalent ATP und zwei Äquivalente  $\text{NAD}^+$  oder  $\text{NADP}^+$  verbraucht werden. ATP und  $\text{NAD(P)}^+$  können auf die bereits unter 3.2.1 beschriebene Weise *in situ* mit Pyruvatkinase (**B**) und PEP bzw. mittels Glutamat-Dehydrogenase (**D**) und 2-Ketoglutarat regeneriert werden.

Die beiden enzymatischen Schritte zur Umwandlung von 6-Phosphoglukonat zu 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat (**E** und **F**) beinhalten die Abspaltung der Kohlenstoffatome C-1 (gelb) als  $\text{CO}_2$  und C-5 (hellblau) als Formiat und sind thermodynamisch irreversibel. Bei der anschließenden, durch die Lumazin-Synthase (**G**) katalysierten Reaktion entsteht neben Lumazin auch Wasser und anorganisches Phosphat. Diese Reaktion ist ebenfalls thermodynamisch irreversibel. Auch die Bildung des aromatischen Rings durch die, von der Riboflavinsynthase (**H**) katalysierten, Dismutationsreaktion ist wiederum eine thermodynamisch irreversible Reaktion. Die gesamte enzymatische Reaktionssequenz von der Glukose bis zum Riboflavin ist demnach durch eine deutlich negative freie Gibbs-Enthalpie

gekennzeichnet. Sie beinhaltet sechs Reaktionsschritte und zwei Cofaktor-Regenerationssysteme und benötigt insgesamt 8 Enzyme. Die in stöchiometrischer Menge gebildeten Produkte sind Riboflavin, Pyruvat, Glutamat, Formiat, Kohlenstoffdioxid und anorganisches Phosphat. ATP und NAD(P)<sup>+</sup> werden nur in katalytischen Mengen benötigt.

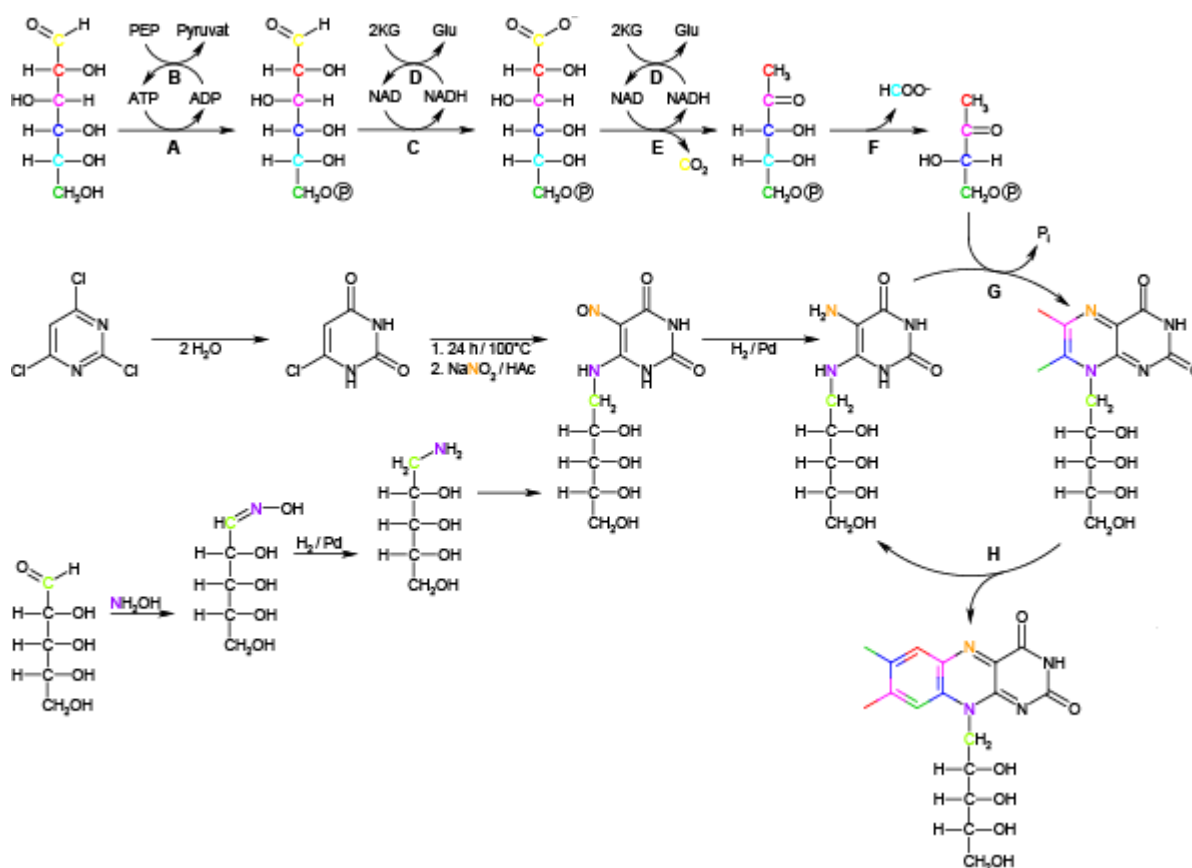


Abb. 3.7: Enzymatische Synthese Xylosyl-markierter Flavine unter Verwendung der klassischen Synthese von 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion.

Die Reaktion konnte als Eintopfreaktion durchgeführt werden, wobei Riboflavin am Ende spontan aus der Reaktionsmischung auskristallisierte und durch Zentrifugation und anschließendes Umkristallisieren in reiner Form erhalten wurde. Zusätzliches Riboflavin aus den Mutterlagen wurde durch Chromatographie an Magnesiumsilicat gewonnen.

Der Verbleib der Kohlenstoffatome von der Glukose bis zum Riboflavin ist in Abb. 3.7 farblich gekennzeichnet. Die Atome 2-4 und 6 werden in den Xylosylring von Riboflavin eingebaut, während das C-1 der Glukose als Carbonat und C-5 als Formiat verlorengehen. Als Konsequenz der Dismutationsreaktion zweier Lumazinmoleküle resultiert aus einer

einfach markierten Glukose als Substrat immer ein doppelt markiertes Riboflavin-Isotopomer.

Durch diesen Ansatz konnte mit relativ geringem experimentellem Aufwand eine Vielfalt an [ $^{13}\text{C}_2$ ]- und [ $^{13}\text{C}_8$ ]-markierten Riboflavin-Isotopomeren gewonnen werden. Die Möglichkeit alle gewünschten Isotopologe in parallelen Reaktionsansätzen zu erzeugen, da die Ansätze mit Ausnahme der eingesetzten  $^{13}\text{C}$ -markierten Glukose identisch waren, erwies sich als äußerst vorteilhaft. Folgende Flavine wurden auf diese Weise mit Gesamtausbeuten von 30 bis 50 % bezüglich der eingesetzten Glukose in Mengen zwischen 20 und 800 mg hergestellt:

| Glukose                 | Pyrimidin-Intermediat    | Riboflavin  |
|-------------------------|--------------------------|---|
| [2- $^{13}\text{C}_1$ ] | unmarkiert               | [6,8 $\alpha$ - $^{13}\text{C}_2$ ]   |
| [3- $^{13}\text{C}_1$ ] | unmarkiert               | [5 $\alpha$ ,8- $^{13}\text{C}_2$ ]   |
| [4- $^{13}\text{C}_1$ ] | unmarkiert               | [7,9 $\alpha$ - $^{13}\text{C}_2$ ]   |
| [6- $^{13}\text{C}_1$ ] | unmarkiert               | [7 $\alpha$ ,9- $^{13}\text{C}_2$ ]   |
| [U- $^{13}\text{C}_6$ ] | unmarkiert               | [5 $\alpha$ ,6,7,7 $\alpha$ ,8,8 $\alpha$ ,9,9 $\alpha$ - $^{13}\text{C}_8$ ] |
| [6- $^{13}\text{C}_1$ ] | [1'- $^{13}\text{C}_1$ ] | [7 $\alpha$ ,9,1'- $^{13}\text{C}_3$ ]  |

Tabelle 3.4: Markierungsmuster der enzymatischen Riboflavinsynthese

Der nächste Schritt war die Erweiterung der enzymatischen Synthese auf beide Edukte der Riboflavinbiosynthese, wodurch auch eine Markierung des Ribitylrestes und des Pyrimidinringes aus kostengünstigen markierten Edukten, wie Glukose und Harnstoff ermöglicht werden sollte. Die enzymatische Synthese isotopologer GTP-Moleküle aus Glukose und Xanthin mit Enzymen des Pentosephosphatweges und der Nukleotid-Biosynthese wurde in Kapitel 3.2.1 bereits ausführlich beschrieben und verläuft in den ersten Schritten parallel zur oben vorgestellten Riboflavinsynthese.

Von GTP ausgehend folgen bis zur Synthese des Riboflavin-Vorläufers 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion noch vier weitere enzymatische Schritte. Die dazu benötigten Proteine sind die GTP-Cyclohydrolase II, welche das C-8 von GTP als Formiat sowie anorganisches Pyrophosphat von der 5'-Position abspaltet, eine bifunktionelle Desaminase/Reduktase, welche den Pyrimidinring in Position 2 desaminiert und in einer zweiten NAD(P)H abhängigen Reaktion den Ribosylrest zur Ribitylseitenkette reduziert, sowie eine unspezifische Phosphatase zur Dephosphorylierung der 5'-Position, da 5-Amino-6-ribityl-



amino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion-5'-phosphat bekanntermaßen kein Substrat der Lumazin-Synthase ist (Harzer *et al.*, 1978; Neuberger und Bacher, 1986).

Auch diese Reaktionssequenz konnte als Eintopfreaktion durchgeführt werden und besitzt aufgrund der Abspaltung kleiner Moleküle, wie Formiat- und Ammonium-Ionen sowie anorganischer Phosphate, eine hohe negative freie Reaktionsenthalpie. Wegen der begrenzten Stabilität der Pyrimidin-Intermediate war dabei auf dunkle und anaerobe Reaktionsbedingungen zu achten. Falls derart gewonnenes 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion nicht mit 2,3-Butandion zu 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin umgesetzt wurde, sondern als Substrat für den oben beschriebenen Riboflavin-Syntheseansatz verwendet werden sollte, mussten zuvor die Enzyme, insbesondere die unspezifische Phosphatase, durch Ultrafiltration entfernt werden, um eine Dephosphorylierung der dort erzeugten Intermediate, von Glukose-6-phosphat bis 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat zu vermeiden. Die Optimierung dieses Prozesses ist derzeit allerdings noch nicht abgeschlossen.

Abbildung 3.9 zeigt das Reaktionsschema der nahezu komplett enzymatischen Synthese von Riboflavin aus Glukose und Xanthin. Dabei verläuft die Transformation von Glukose in Ribulose-5-phosphat in zwei Ansätzen zunächst identisch. Danach folgt im Zweig **A** nach einer Isomerisierungsreaktion die ATP abhängige Bildung von PRPP welches mit Xanthin zu XMP verknüpft wird. Eine der beiden erwähnten organischen Syntheserouten, mit denen sich isotopmarkierte Xanthine herstellen lassen, ist in Abb. 3.9 ebenfalls skizziert. XMP wird in drei weiteren ATP abhängigen Reaktionen zu GTP umgewandelt, welches durch die oben genannten Reaktionen in das Substrat der 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin-Synthase überführt wird. Deren zweites Substrat, 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat, wird in Zweig **B** unmittelbar aus Ribulose-5-phosphat erzeugt. In der abschließenden Reaktion der Riboflavin-Synthase entsteht aus zwei Molekülen 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin ein Riboflavinmolekül und ein Molekül 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion, welches von der Lumazin-Synthase wiederverwendet werden kann. Das bedeutet, dass für die Synthese eines Moleküls Riboflavin der Zweig **A** des Reaktionsschemas in Abbildung 3.9 nur einmal, der Zweig **B** jedoch zweimal durchlaufen werden muß.

Insgesamt werden bei diesem Ansatz neben 18 Enzymen 3 Äquivalente Glukose, 1 Äquivalent Xanthin, 9 Äquivalente ATP und 5 Äquivalente Nicotinamid-Cofaktoren benötigt. Da ATP und NAD(P)<sup>+</sup> wiederum nur in katalytischen Mengen eingesetzt werden und mit PEP bzw. 2-Ketoglutarat regeneriert werden, entstehen neben Riboflavin lediglich Kohlenstoff-



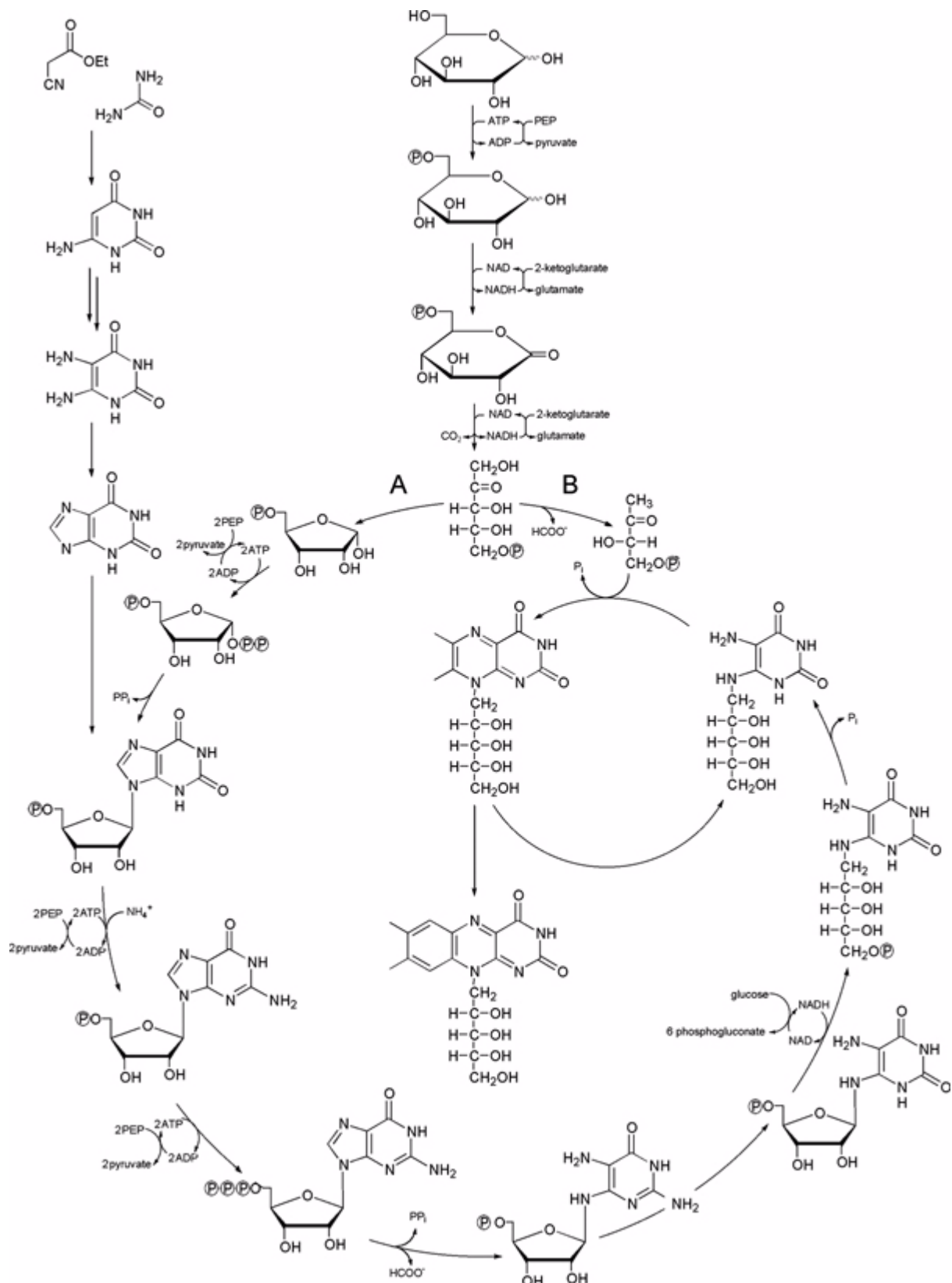


Abb. 3.9: Enzymatische Riboflavinsynthese unter Verwendung organisch synthetisch hergestellter Xanthins

Eine weitere Möglichkeit zu uniform  $^{13}\text{C}$ - und/oder  $^{15}\text{N}$ -markierten oder zu gemischten Bibliotheken von mehreren Isotopologen mit verschiedenen Blöcken von Einfach- und Zweifach-Markierungen zu gelangen, eröffnet sich durch die Kombination fermentativer und enzymatischer Verfahren. Dr. Boris Illarionov entwickelte einen *E. coli* Produktionsstamm für 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin, der ein Plasmid für die Gene *ribABGH* der Riboflavinbiosynthese besitzt (Illarionov *et al.*, 2004). Durch Fermentation dieses Stammes mit  $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ Glukose oder  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  kann total markiertes 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin aus dem Medium gewonnen werden. Beim Einsatz der einfach markierten Zucker  $[1\text{-}^{13}\text{C}_1]$ -,  $[2\text{-}^{13}\text{C}_1]$ - und  $[3\text{-}^{13}\text{C}_1]$ Glukose erhält man dagegen Mischungen verschiedener Isotopologe mit charakteristischen  $^{13}\text{C}$ -Anreicherungen an einzelnen Positionen. Diese biotechnologisch erzeugten Lumazin-Bibliotheken können mit Hilfe von Riboflavin-Synthase und Flavokinase in die entsprechenden Riboflavin- bzw. FMN-Bibliotheken umgewandelt werden. Abbildung 3.10 zeigt die typischen Markierungsmuster von Riboflavin bzw. dessen Vorstufe 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin.

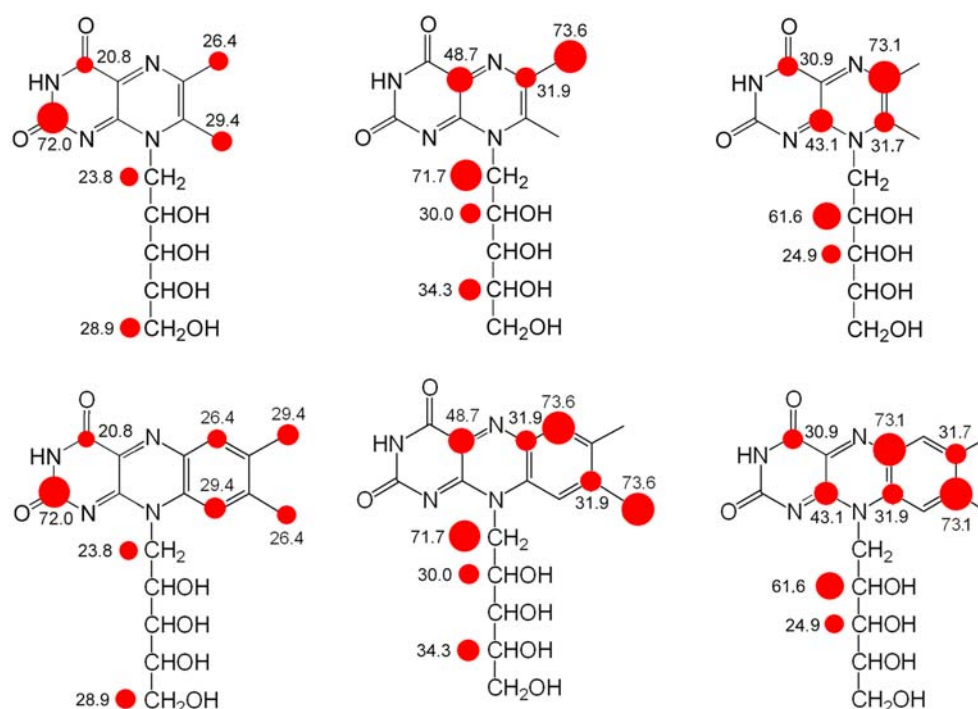


Abb. 3.10: Bibliotheken stochastisch  $^{13}\text{C}$ -markierter Lumazine und Riboflavine.

Falls nicht auf die Hälfte der markierten Lumazinmoleküle verzichtet werden soll, kann das bei der Riboflavin-Synthese Reaktion entstehende Intermediat 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion wiederum mit 2,3-Butandion oder mit Hilfe von Lumazin-

Synthese und enzymatisch erzeugtem 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat umgesetzt werden. In beiden Fällen wird das Markierungsmuster im Xylolring des Flavins gegenüber der ursprünglichen Lumazin-Markierung verändert. Sowohl eine Erniedrigung, als auch eine Erhöhung des Markierungsgrades einzelner Positionen ist durch Verwendung geeigneter Glukose-Isotopologe bei der Generierung von 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat möglich.

### 3.2.2.4 NMR-Spektroskopie

Zur Überprüfung der Regiospezifität und Reinheit wurden sämtliche Riboflavin-Isotopologe NMR-spektroskopisch charakterisiert. Sämtliche NMR-Signale konnten den markierten Positionen zugeordnet werden. Daneben wurden auch etliche homonukleare Kopplungskonstanten des Isoalloxazinringes bestimmt. Die Daten dieser Messungen sind in Tabelle 3.5 angegeben:

| Position | $\delta$<br>[ppm] | Kopplungskonstanten [Hz] |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |     |    |
|----------|-------------------|--------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|----|
|          |                   | 2                        | 4  | 4a | 5a | 6  | 7  | 7a | 8  | 8a | 9  | 9a | 10a |    |
| 2        | 159.3             | -                        |    | 4  |    |    |    |    |    |    |    |    |     |    |
| 4        | 162.8             |                          | -  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |     | 10 |
| 4a       | 135.1             | 4                        |    | -  |    |    |    |    |    |    |    |    |     |    |
| 5a       | 134.5             |                          |    |    | -  | 67 |    |    | 7  |    | 5  | 58 |     |    |
| 6        | 130.2             |                          |    |    | 67 | -  | 51 |    |    | 3  |    | 5  |     |    |
| 7        | 139.2             |                          |    |    |    | 51 | -  | 44 | 59 | 2  |    | 5  |     |    |
| 7a       | 18.5              |                          |    |    |    |    | 44 | -  | 2  |    | 2  |    |     |    |
| 8        | 150.2             |                          |    |    | 7  |    | 59 | 2  | -  | 43 | 51 |    |     |    |
| 8a       | 20.7              |                          |    |    |    | 3  | 2  |    | 43 | -  |    | 6  |     |    |
| 9        | 116.7             |                          |    |    | 5  |    |    | 2  | 51 |    | -  | 65 |     |    |
| 9a       | 131.7             |                          |    |    | 58 | 5  | 5  |    |    | 6  | 65 | -  |     |    |
| 10a      | 150.7             |                          | 10 |    |    |    |    |    |    |    |    |    |     | -  |

Tabelle 3.5:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten des Isoalloxazin-Ringsystems isotopologer Riboflavine

Zum Beispiel ermöglichten die enzymatisch aus Ribulose-5-phosphat gewonnenen Riboflavin-Isotopologe die Bestimmung von 17  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$ -Kopplungskonstanten des Xylolrings. Mit diesen Daten konnten, wie in Abbildung 3.11 gezeigt, die komplexen Multipllettstrukturen des aus  $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ Glukose gewonnenen  $[\text{5a,6,7,7a,8,8a,9,9a-}^{13}\text{C}_8]$ Riboflavins in guter Übereinstimmung mit dem experimentellen  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum simuliert werden. Einige der Linien sind allerdings aufgrund nicht aufgelöster Weitbereichskopplungen signifikant verbreitert.

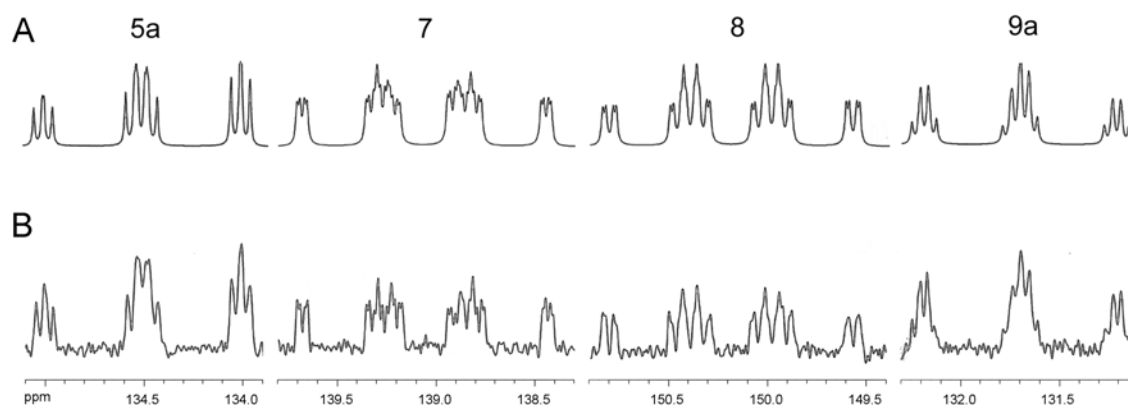


Abb. 3.11: Simulierte (A) und experimentelle (B)  $^{13}\text{C}$ -NMR-Signale von  $[5a,6,7,7a,8,8a,9,9a-^{13}\text{C}_8]$ Riboflavin.

Die von der 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin-Synthase und der Riboflavin-Synthase katalysierten Reaktionen sind regiospezifisch. Die  $^1\text{H}$  und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Analysen zeigten bei den enzymatisch gewonnenen  $[^{13}\text{C}_2]$ Isotopomeren des Xylolrings jedoch nur eine  $^{13}\text{C}$  Anreicherung in den gewünschten Positionen um ca. 95 %. Die Bildung unerwünschter Regioisomere lässt sich durch den spontanen Zerfall von 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat erklären, wobei 2,3-Butandion entsteht, welches ebenfalls mit 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion unter Bildung von 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin reagieren kann. Aufgrund der Symmetrie von 2,3-Butandion entstehen dabei zwei verschiedene Lumazine, welche anschließend jeweils als Donor und Akzeptor bei der Bildung von Riboflavin fungieren können. Zum Beispiel entsteht aus  $[3-^{13}\text{C}_1]$ Glukose in vier enzymatischen Schritten  $[2-^{13}\text{C}_1]$ 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat welches langsam zu  $[2-^{13}\text{C}_1]$ 2,3-Butandion zerfällt. Reagiert dieses mit dem Pyrimidin-Derivat so entsteht eine 1:1 Mischung aus  $[6-^{13}\text{C}_1]$  und  $[7-^{13}\text{C}_1]$ Lumazin, die zu einer Mischung aus dem gewünschten  $[5a,8-^{13}\text{C}_2]$ Riboflavin sowie den zusätzlichen  $[5a,7-^{13}\text{C}_2]$ -,  $[7,9a-^{13}\text{C}_2]$ - und  $[8,9a-^{13}\text{C}_2]$ -Isotopomeren weiterreagiert.

Abbildung 3.12 zeigt neben einigen charakteristischen Multiplettstrukturen des  $[^{13}\text{C}_8]$ Riboflavins (oben) auch die entsprechenden Signale der  $[^{13}\text{C}_2]$ Isotopomere aus den einfach markierten Glukosen (unten). Und in der Tat sind im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum des Riboflavins, welches aus  $[3-^{13}\text{C}_1]$ Glukose hergestellt wurde, im Zentrum der Dubletts bei 150.2 (C-8) und 134.5 ppm (C-5a) kleine Signale der  $[5a,7-^{13}\text{C}_2]$ - und  $[8,9a-^{13}\text{C}_2]$ - Isotopomere zu erkennen.

Eine leichte Kontamination der Produkte mit diesen Verunreinigungen ist allerdings in biophysikalischen Studien mit rekonstituierten Flavoproteinen tolerierbar, zumal auch die unmarkierten Kohlenstoffatome, entsprechend der natürlichen Häufigkeit, zu 1,1%  $^{13}\text{C}$ -Atome darstellen.

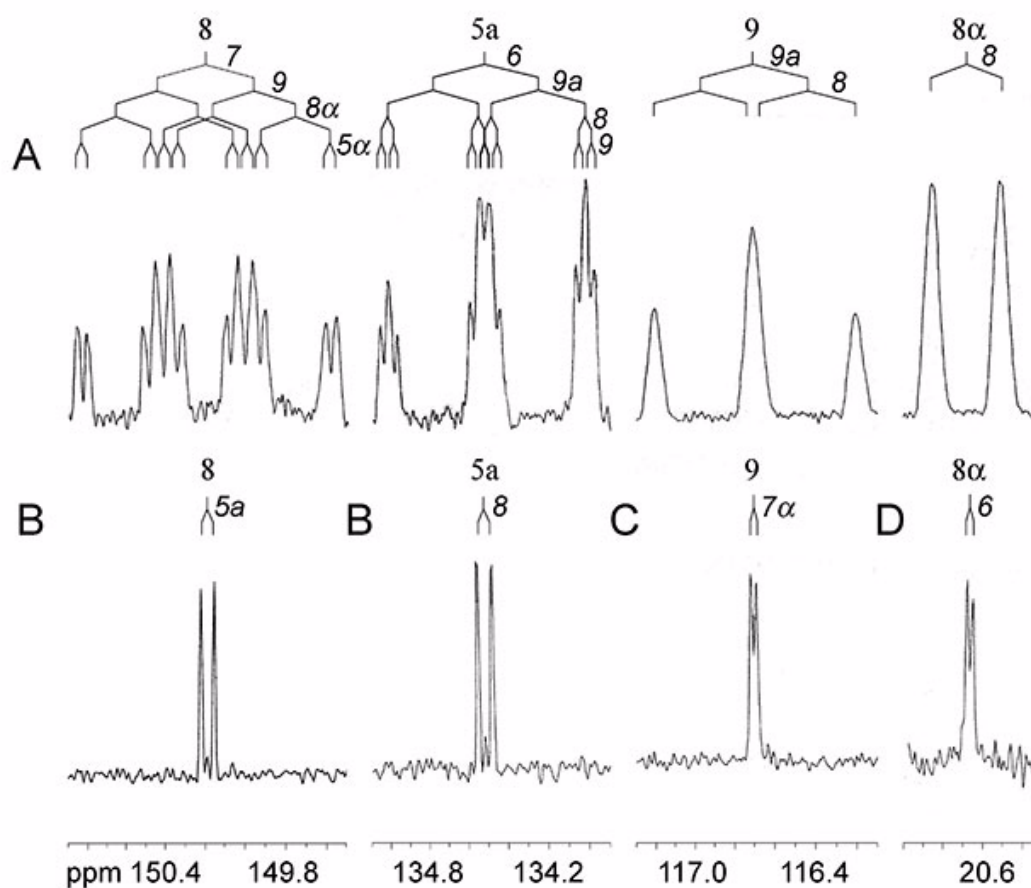
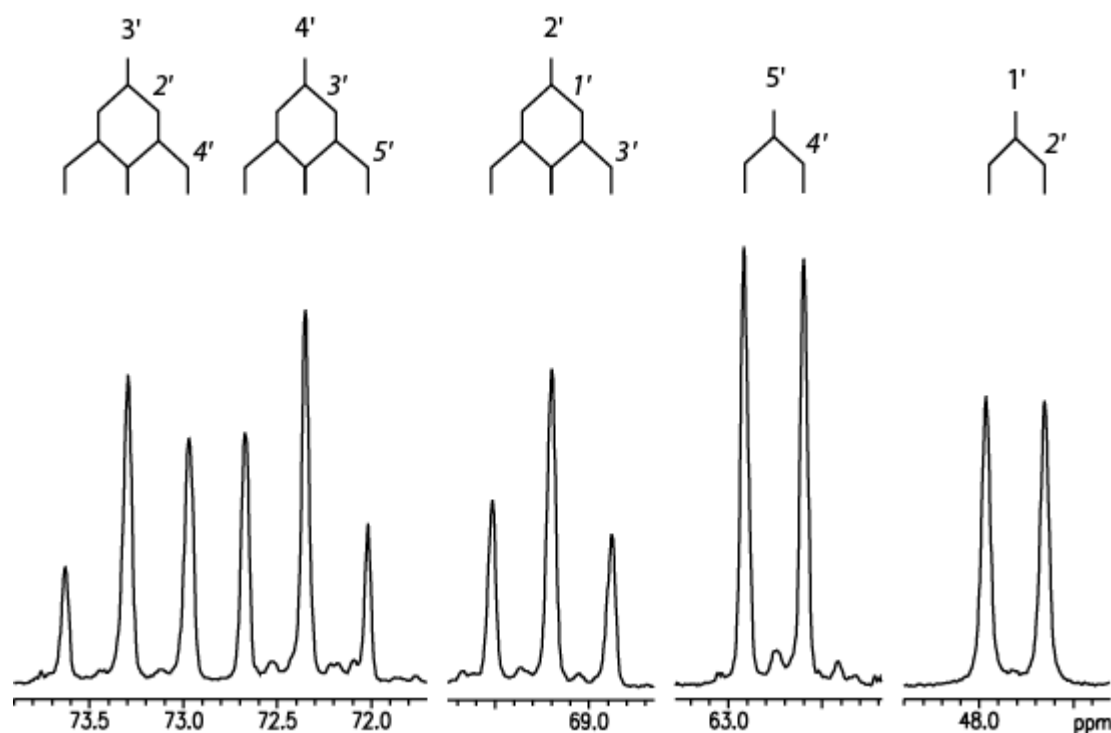


Abb. 3.12:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Signale von A:  $[5\alpha,6,7,7\alpha,8,8\alpha,9,9\alpha\text{-}^{13}\text{C}_8]$ -, B:  $[5\alpha,8\text{-}^{13}\text{C}_2]$ -, C:  $[7\alpha,8\text{-}^{13}\text{C}_2]$ -, D:  $[6,8\alpha\text{-}^{13}\text{C}_2]$ Riboflavin.

Das  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum des enzymatisch aus  $[1',2',3',4',5'\text{-}^{13}\text{C}_5]$ GTP gewonnenen, in der Ribitylseitenkette markierten  $[1',2',3',4',5'\text{-}^{13}\text{C}_5]$ Riboflavins ist in Abbildung 3.13 dargestellt. Die Signale der Kohlenstoffatome C-2' bis C-4' sind aufgrund von Kopplungen zu zwei benachbarten  $^{13}\text{C}$ -Atomen jeweils zu Pseudotripletts aufgespalten. Die C-1'- und C-5'-Positionen haben jeweils nur einen markierten Nachbarn und treten im NMR-Spektrum daher als Dubletts auf. Tabelle 3.6 gibt eine Übersicht über die NMR-spektroskopischen Daten der Ribitylseitenkette im Riboflavin.

Abb. 3.13:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Signale von  $[1',2',3',4',5'-^{13}\text{C}_5]\text{Riboflavin}$ 

| Position | chemische Verschiebung<br>$\delta$ [ppm] | Kopplungskonstanten<br>J [Hz] |
|----------|--|-------------------------------|
| 1'       | 47.8                                     | 39.1 (2')                     |
| 2'       | 69.2                                     | 39.9 (1',3')                  |
| 3'       | 73.3                                     | 41.5 (2',4')                  |
| 4'       | 72.3                                     | 41.1 (3',5')                  |
| 5'       | 62.8                                     | 39.8 (4')                     |

Tabelle 3.6:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten der Ribitylseitenkette von Riboflavin

### 3.2.3 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin

Die Synthese isotopologer Lumazine ergab sich zwanglos aus dem, in Kapitel 3.2.2.3 für die enzymatische Synthese von Riboflavin vorgestellten Verfahren, indem das letzte Enzym in der Reaktionssequenz, die Riboflavin-Synthase, weggelassen wurde. Lediglich die Stöchiometrie der beiden Vorstufen 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion und 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat (1:2 bei der Riboflavinsynthese, 1:1 bei der Lumazinsynthese) musste angepasst werden. Da das gut wasserlösliche Lumazin im Gegensatz zu Riboflavin am Ende der Reaktion nicht aus der Reaktionsmischung auskristallisiert, wurde



6,7-Dimethyl- 8-ribityllumazin durch Chromatographie an Magnesiumsilicat und anschließendes Umkristallisieren aus einer Ethanol/Wasser-Mischung in reiner Form erhalten.

Durch enzymatische Parallelsynthesen mit verschiedenen Glukose-Varianten und dem chemisch hergestellten Pyrimidin-Intermediat 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion konnten folgende isotopologe Lumazine gewonnen werden:

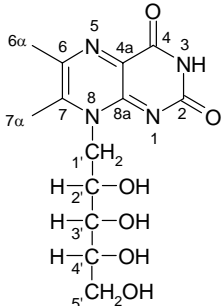
| Glukose                            | Pyrimidin-Intermediat              | 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin              |   |
|------------------------------------|------------------------------------|--|---|
| [2- <sup>13</sup> C <sub>1</sub> ] | unmarkiert                         | [6α- <sup>13</sup> C <sub>1</sub> ]        |  |
| [3- <sup>13</sup> C <sub>1</sub> ] | unmarkiert                         | [6- <sup>13</sup> C <sub>1</sub> ]         |   |
| [4- <sup>13</sup> C <sub>1</sub> ] | unmarkiert                         | [7- <sup>13</sup> C <sub>1</sub> ]         |   |
| [6- <sup>13</sup> C <sub>1</sub> ] | unmarkiert                         | [7α- <sup>13</sup> C <sub>1</sub> ]        |   |
| [U- <sup>13</sup> C <sub>6</sub> ] | unmarkiert                         | [6,6α,7,7α- <sup>13</sup> C <sub>4</sub> ] |   |
| unmarkiert                         | [5- <sup>15</sup> N <sub>1</sub> ] | [5- <sup>15</sup> N <sub>1</sub> ]         |   |

Tabelle 3.7: Markierungsmuster isotopologer 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazine

Daneben wurde eine deuterierte Lumazinspezies durch wiederholtes Umkristallisieren unmarkierten Lumazins in <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O erhalten. Neben den Sauerstoff- und Stickstoff-gebundenen Protonen des Ribitylrestes und des Pyrimidinringes tauschen dabei auch die drei Protonen der 7α-Methylgruppe aus, so dass es sich bei vollständigem Austausch aller aciden Protonen um ein [3,7α,2'O,3'O,4'O,5'O-<sup>2</sup>H<sub>8</sub>]6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin handelt. Weitere markierte Lumazine aus GTP-Isotopologen und chemischen Synthesen sind in Arbeit, stochastische Bibliotheken von Lumazin-Isotopologen sowie <sup>13</sup>C,<sup>15</sup>N-Totalmarkierungen standen aus der Biotransformation markierter Glucose in *E. coli* zur Verfügung (Illarionov *et al.*, 2004).

Die <sup>13</sup>C-NMR-Daten der bisher synthetisierten Lumazin-Isotopologe sind in Tabelle 3.8 wiedergegeben:

| Position | chemische Verschiebung<br>δ [ppm] | Kopplungskonstanten J [Hz] |      |      |      |
|----------|-----------------------------------|----------------------------|------|------|------|
|          |                                   | 6                          | 6α   | 7    | 7α   |
| 6        | 152.3                             |                            | 46.7 | 59.5 | 7.5  |
| 6α       | 18.1                              | 46.7                       |      | 3.3  | 1.2  |
| 7        | 145.0                             | 59.5                       | 3.3  |      | 54.1 |
| 7α       | 21.4                              | 7.5                        | 1.2  | 54.1 |      |

Tabelle 3.8: <sup>13</sup>C-NMR-Daten isotopologer Lumazine.

### 3.3 Kernmagnetische Resonanz-Spektroskopie an LOV2-Domänen pflanzlicher Phototropine

#### 3.3.1 Allgemeines

Pflanzen verfügen über vielfältige Systeme zur Lichtwahrnehmung (Jenkins *et al.*, 2001; Briggs und Olney, 2001; Christie und Briggs, 2001; Casal, 2000). Sie sind für den pflanzlichen Lebenszyklus von größter Bedeutung und ermöglichen u.a. die optimale Ausnutzung der Lichtenergie über die Licht-induzierte Steuerung von Wachstumsvorgängen (Phototropismus) (Liscum und Stowe-Evans, 2000) und die Anpassung an geophysikalische Prozesse, z.B. Tagesperiodik und Jahresperiodik.

Das vor wenigen Jahren in der Arbeitsgruppe von W. Briggs klonierte *nph1* (*phot1*) Gen aus *Arabidopsis thaliana* spezifiziert einen Blaulichtrezeptor, der am Phototropismus der Pflanze im Sinne einer optimalen Lichtausnutzung für die Photosynthese beteiligt ist (Briggs *et al.*, 2001; Huala *et al.*, 1997). Das von *phot1* codierte, membranassoziierte Rezeptorprotein (Phototropin) enthält zwei strukturell ähnliche FMN bindende Domänen (LOV1 und LOV2, Light Oxygen Voltage) sowie eine Serin/Threonin Proteinkinase Domäne. Abbildung 3.14 zeigt diesen schematischen Aufbau für das Phototropin aus *Avena sativa* (Hafer).

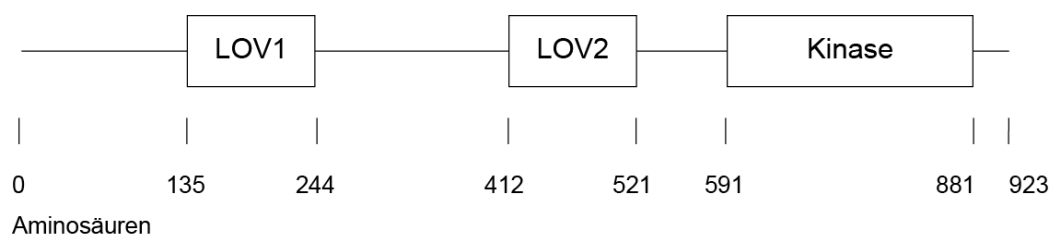


Abb. 3.14: Phototropin aus *A. sativa*.

LOV-Domänen aus den Phototropinen von *A. thaliana* und *A. sativa* wurden in den Arbeitsgruppen von W. Briggs und W. Rüdiger rekombinant exprimiert (Salomon *et al.*, 2000; Christie *et al.*, 1999). Die Belichtung der rekombinanten LOV-Domäne führt zu einem reversiblen Bleichprozess, bei dem sich das Absorptionsspektrum von 447 nm nach 390 nm verschiebt. Wird der konservierte Cysteinrest 450 in der LOV2-Domäne von *A. sativa* durch

Alanin ersetzt, so bleibt der Bleichprozess aus (Salomon *et al.*, 2000). Durch NMR-Spektroskopische Untersuchungen an belichteten und unbelichteten LOV2-Domänen aus Hafer, die mit  $^{13}\text{C}$ - und/oder  $^{15}\text{N}$ -markierten FMN-Isotopologen rekonstituiert wurden, konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem Photoprodukt um ein kovalentes Addukt von Cystein 450 an das C-4a Atom von FMN handelt (Salomon *et al.*, 2001). Die Dunkelreaktion besteht in der spontanen Fragmentierung dieses Addukts.

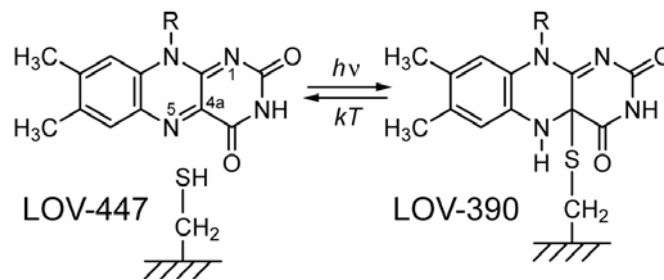


Abb. 3.15: Reversible Photoadduktbildung von Cystein 450 an C-4a von FMN.

### 3.3.2 Konformationelle Modulation des FMN-Liganden im Photozyklus der LOV2-Domäne von *Adiantum capillus veneris*

Für die effektive Expression und Rekonstitution der LOV2-Domäne des Farns *Adiantum capillus veneris* mit variabel markierten FMN-Liganden wurde mittels PCR-Techniken ein codonoptimiertes synthetisches Gen hergestellt. Das DNA Fragment wurde in einen Plasmidvektor ligiert, der die Expression eines Fusionsproteins aus dem Hisactophilin von *Dictyostelium discoideum*, einer Thrombin-Schnittstelle und der LOV2-Domäne in einen rekombinanten *E. coli* Stamm ermöglicht. Das Fusionsprotein konnte an eine Metall-Chelat Affinitätsmatrix gebunden und proteingebundenes FMN durch Spülen der Säule mit einer Harnstofflösung (8 M) eluiert werden. Die Rekonstitution des partiell entfalteten Apoproteins mit markierten FMN-Isotopologen erfolgte auf der Säule durch Spülen mit einer Harnstoff freien Lösung des Flavins-Liganden. Nach Elution des Proteins mit Imidazol, Thrombin-verdau und Gelpermeations-Chromatographie konnten NMR-Spektren der rekonstituierten LOV2-Domänen gemessen werden. Die Bestrahlung der Proben mit Blaulicht erfolgte durch eine Quecksilberdampfampe mit vorgeschalteten Filtern oder durch eine Blaulicht LED.

Abbildung 3.16 zeigt die  $^{13}\text{C}$ -NMR-Signale des Isoalloxazinringsystems verschiedener FMN-Isotopologe, gebunden an die LOV2-Domäne von *A. c. veneris*, im Dunklen und nach Blaulicht-Bestrahlung.

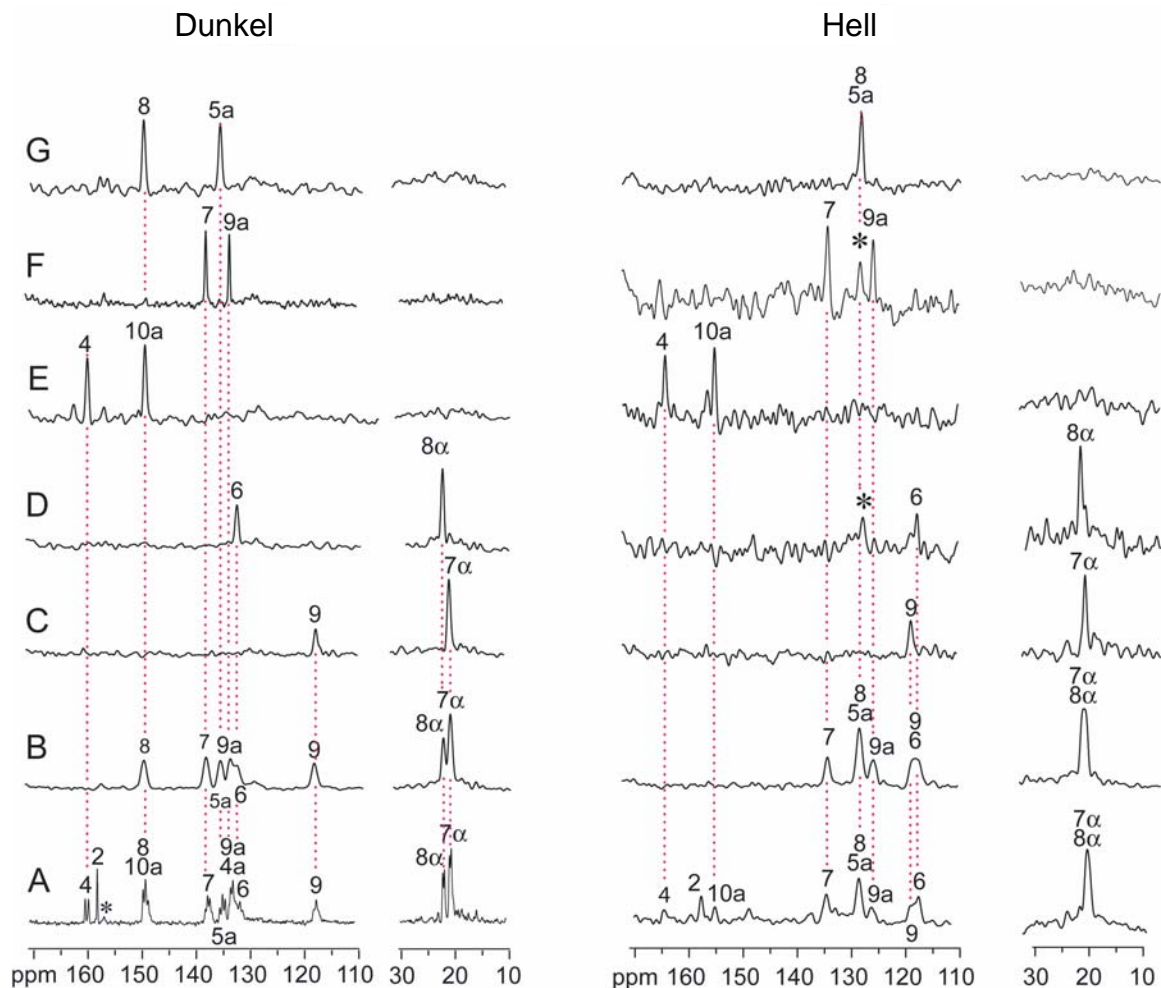


Abb. 3.16:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Signale der LOV2-Domäne aus Farn mit verschiedenen FMN-Isotopologen im Dunklen und nach Blaulichtbestrahlung. A, mit  $[\text{U}^{13}\text{C}_{17}]\text{FMN}$ , B, mit  $[\text{Xylol-}^{13}\text{C}_8]\text{FMN}$ , C, mit  $[\text{7}\alpha, \text{9-}^{13}\text{C}_2]\text{FMN}$ , D, mit  $[\text{6}, \text{8}\alpha\text{-}^{13}\text{C}_2]\text{FMN}$ , E, mit  $[\text{4}, \text{-}^{13}\text{C}_2]\text{FMN}$ , F, mit  $[\text{7}, \text{9a-}^{13}\text{C}_2]\text{FMN}$ , G, mit  $[\text{5a}, \text{8-}^{13}\text{C}_2]\text{FMN}$ .

Prinzipiell ist es möglich, durch Spektrenvergleich der  $^{13}\text{C}_2$ -,  $^{13}\text{C}_8$ - und  $^{13}\text{C}_{17}$ -Isotopologe eine komplette Zuordnung der  $^{13}\text{C}$ -NMR-Signale des Isoalloxazin-Motivs sowohl für den Dunkel- als auch den Hell-Zustand zu erhalten. Dies wurde bereits mit einer geringeren Anzahl chemisch synthetisierter und fermentativ gewonnener FMN-Isotopologe an der LOV2-Domäne von *A. sativa* demonstriert (Salomon *et al.*, 2001).

Die gemessenen Verschiebungen (Tabelle 3.10) sind bis auf wenige Ausnahmen denen beim Hafer Protein ähnlich. Die größte Verschiebung nach Blaulichtbeleuchtung ergibt sich wiederum für das C-4a Atom des FMN-Chromophors um etwa 68 ppm. Dieses wechselt vom aromatischen Zustand im freien bzw. proteingebundenen FMN zum  $sp^3$  hybridisierten Kohlenstoff im kovalenten Photoaddukt (Cys450→C-4a). Die Signale der übrigen Kohlenstoffatome verschieben sich nach Belichtung unterschiedlich stark im Bereich von 20 bis 0.1 ppm.

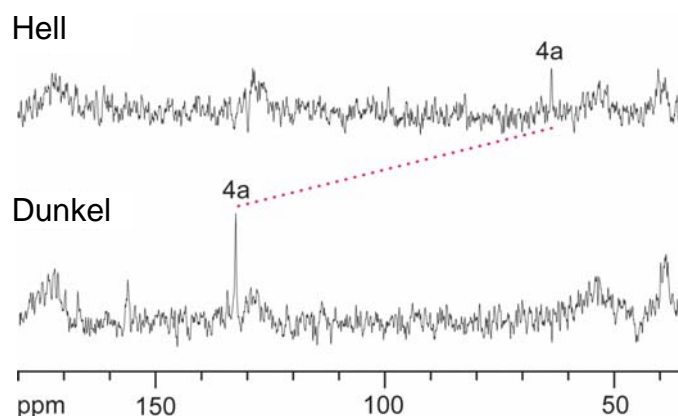


Abb. 3.17: Hell- und Dunkel- $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren der LOV2-Domäne aus Farn, rekonstituiert mit  $[4a\text{-}^{13}\text{C}_1]\text{FMN}$ .

Eine noch schnellere und umfassendere Zuordnung aller  $^{13}\text{C}$ -Signale des FMN-Liganden ist durch die Verwendung stochastischer FMN Isotopolog Bibliotheken möglich. Diese sind durch Fermentation des 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin produzierenden Stammes *E. coli* M15 [pRep4, pRFN4] (Illarionov *et al.*, 2004) mit einfach markierten Glukose-Isotopomeren und anschließender enzymatischer Umwandlung der markierten Lumazine in FMN zugänglich (Kapitel 3.2.2.3).

Die LOV2-Domäne aus *A. c. veneris* wurde mit FMN-Isotopolog-Bibliotheken rekonstituiert, welche durch das gemischt fermentativ-enzymatische Verfahren aus  $[2\text{-}^{13}\text{C}_1]$  und aus  $[3\text{-}^{13}\text{C}_1]$  gewonnen wurden. Die resultierenden Hell und Dunkel  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren sind zusammen mit denen einer Probe mit  $[\text{U-}^{13}\text{C}_{17}]\text{FMN}$  in Abbildung 3.18 wiedergegeben. In den Proben mit den Isotopolog-Mischungen erscheinen die Kohlenstoff Signale als Singulets mit über einen weiten Bereich variierenden Intensitäten, welche die Häufigkeit der verschiedenen Isotopologe bzw. die Markierungsgrade der einzelnen Kohlenstoffatome in der eingesetzten Bibliothek widerspiegeln.

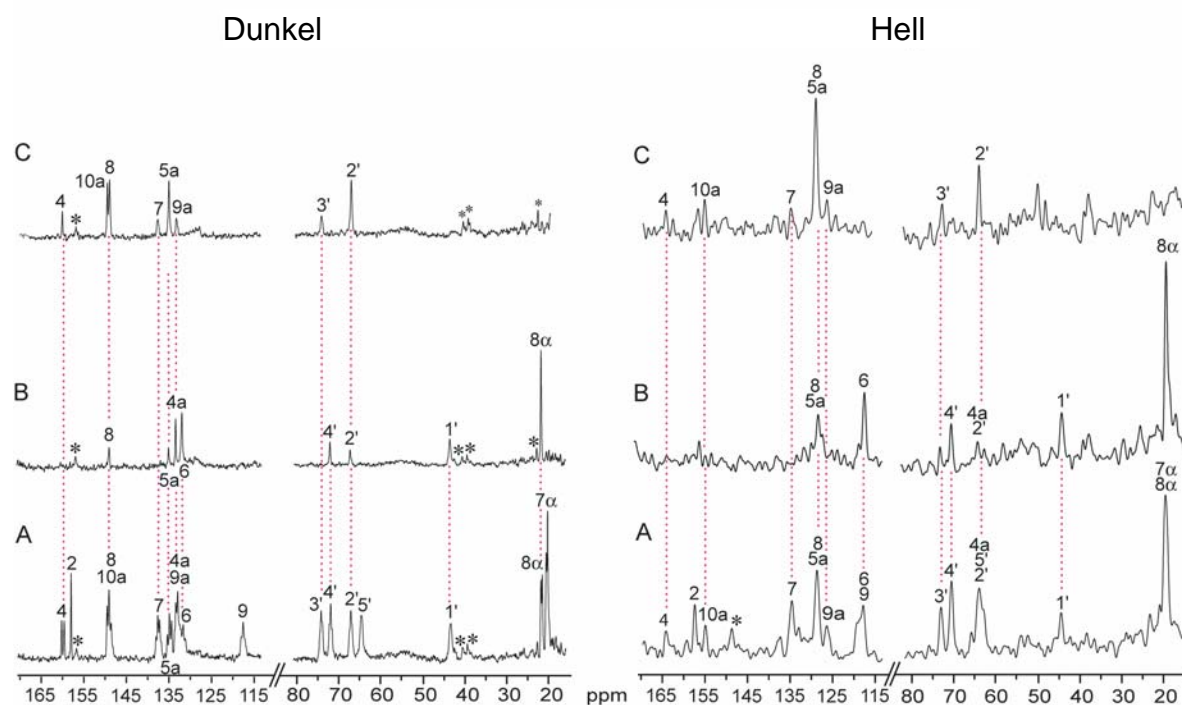


Abb. 3.18:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Signale der LOV2-Domäne aus Farn, rekonstituiert mit verschiedenen FMN Isotopolog-Bibliotheken im Dunklen und unter Blaulicht-Illumination. A, mit  $[\text{U-}^{13}\text{C}_{17}]\text{FMN}$ , B, mit FMN aus  $[2\text{-}^{13}\text{C}_1]\text{Glukose}$ , C, mit FMN aus  $[3\text{-}^{13}\text{C}_1]\text{Glukose}$ .

| Position | FMN aus $[2\text{-}^{13}\text{C}_1]$ Glukose |                            |                 | FMN aus $[3\text{-}^{13}\text{C}_1]$ Glukose |                            |                 |
|----------|--|----------------------------|-----------------|--|----------------------------|-----------------|
|          | Freies FMN                                   | LOV2 gebundenes FMN Dunkel | Hell            | Freies FMN                                   | LOV2 gebundenes FMN Dunkel | Hell            |
| 4        |  |                            |                 | 32   | 32 <sup>b</sup>            | + <sup>c</sup>  |
| 4a       | 49   | – <sup>a</sup>             | + <sup>c</sup>  |  |                            |                 |
| 5a       | 16   | 26                         | + <sup>c</sup>  | 87   | 70                         | ++ <sup>d</sup> |
| 6        | 87   | – <sup>a</sup>             | ++ <sup>d</sup> |  |                            |                 |
| 7        |  |                            |                 | 16   | 26                         | + <sup>c</sup>  |
| 8        | 16   | – <sup>a</sup>             | – <sup>a</sup>  | 87   | – <sup>a</sup>             | ++ <sup>d</sup> |
| 8a       | 87   | ++ <sup>d</sup>            | ++ <sup>d</sup> |  |                            |                 |
| 9a       |  |                            |                 | 16   | – <sup>a</sup>             | + <sup>c</sup>  |
| 10a      |  |                            |                 | 43   | – <sup>a</sup>             | + <sup>c</sup>  |
| 1'       | 72   | 90                         |                 |  |                            |                 |
| 2'       | 30   | 27                         | + <sup>c</sup>  | 62   | 81                         | ++ <sup>d</sup> |
| 3'       |  |                            |                 | 25   | 28                         | + <sup>c</sup>  |
| 4'       | 34   | 34 <sup>b</sup>            |                 |  |                            |                 |

Tabelle 3.9:  $^{13}\text{C}$  Anreicherung einzelner Positionen von stochastischen FMN Isotopolog Bibliotheken aus  $[2\text{-}^{13}\text{C}_1]$  bzw.  $[3\text{-}^{13}\text{C}_1]$  Glukose im freien Zustand bzw. an LOV2 gebunden. <sup>a</sup> aufgrund Signalüberlappungen nicht bestimmt, <sup>b</sup> Referenzsignal, <sup>c</sup> geringe Anreicherung, <sup>d</sup> hohe Anreicherung.

Durch einen Vergleich der relativen Signalintensitäten (bezogen auf die Signale der Totalmarkierung mit  $[U-^{13}\text{C}_{17}]$ FMN, Tabelle 3.9) im freien und im proteingebundenen Zustand, war eine komplette und zweifelsfreie Zuordnung aller  $^{13}\text{C}$ -Signale des FMN-Liganden, inklusive der bisher schwer zugänglichen Ribitylseitenkette, mit nur 3 Proben möglich.

Die chemischen Verschiebungen des freien, sowie des proteingebundenen Liganden im Hell- und Dunkel-Zustand sind Tabelle 3.10 zu entnehmen und in Abbildung 3.19 anschaulich dargestellt. Auffallend ist die unterschiedliche Reihenfolge der chemischen Verschiebungen bei den Ribitylsignalen des FMN im freien und im proteingebundenen Zustand. Die Bindung des Liganden an das Apoprotein verursacht also relativ große Änderungen im Bereich der Ribitylseitenkette. Bei Belichtung verschieben sich die Signale der Seitenkette um 1.4 bis 0.1 ppm. Während die Modulation des C-1'-Signals noch auf elektronische Effekte im heterocyclischen Ringsystem zurückzuführen sein könnte, ist bei den übrigen Atomen der Seitenkette eher von einer durch den konformationellen Wechsel des Proteins hervorgerufenen Änderung der Umgebung auszugehen.

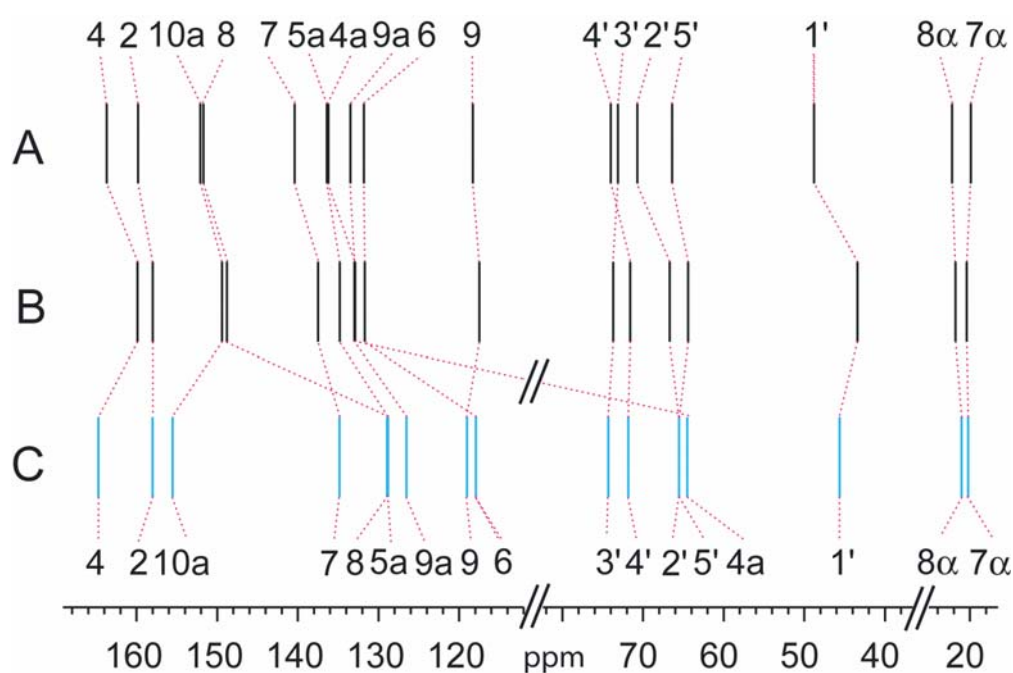


Abb. 3.19: Chemische Verschiebungen von FMN (A) in Lösung, (B) gebunden an die LOV2-Domäne im Dunklen, (C) gebunden an die LOV2-Domäne unter Blaulichtbestrahlung.

| Position | <sup>13</sup> C chemische Verschiebung |                            |          | <sup>13</sup> C <sup>13</sup> C-Kopplungskonstanten |                            |                |
|----------|--|----------------------------|----------|---|----------------------------|----------------|
|          | Freies FMN                             | LOV2 gebundenes FMN dunkel | FMN hell | Freies FMN  | LOV2 gebundenes FMN dunkel | FMN hell       |
| 2        | 159.8                                  | 158.0                      | 157.8    |   |                            | – <sup>b</sup> |
| 4        | 163.7                                  | 159.9                      | 164.5    | 76 (4a)   | 74 (d)                     | – <sup>b</sup> |
| 4a       | 136.2                                  | 132.8                      | 64.3     | 50, 76 (10a, 4)                                     | – <sup>a</sup>             | – <sup>b</sup> |
| 5a       | 136.4                                  | 134.8                      | 128.7    | 60, 66 (6, 9a)                                      | 60 (t)                     | – <sup>b</sup> |
| 6        | 131.8                                  | 131.7                      | 117.7    | 60, 66 (7,5a)                                       | – <sup>a</sup>             | – <sup>b</sup> |
| 7        | 140.4                                  | 137.5                      | 134.6    | 44, 66, 47 (7a, 6, 8)                               | 47 (q)                     | – <sup>b</sup> |
| 7a       | 19.9                                   | 20.5                       | 20.4     | 44 (7)  | 43 (d)                     | 44 (d)         |
| 8        | 151.7                                  | 148.8                      | 128.7    | 64, 42, 49 (8a, 9, 7)                               | – <sup>a</sup>             | – <sup>b</sup> |
| 8a       | 22.2                                   | 21.8                       | 20.8     | 42 (8)  | 42 (d)                     | 47 (d)         |
| 9        | 118.3                                  | 117.5                      | 118.2    | 62, 64 (8, 9a)                                      | 60 (t)                     | – <sup>b</sup> |
| 9a       | 133.5                                  | 133.0                      | 126.3    | 62, 53 (5a, 9)                                      | – <sup>a</sup>             | – <sup>b</sup> |
| 10a      | 152.1                                  | 149.4                      | 155.3    | 52 (4a)   | – <sup>a</sup>             | – <sup>b</sup> |
| 1'       | 48.8                                   | 43.4                       | 45.4     | 39 (2')   | 45 (d)                     | – <sup>b</sup> |
| 2'       | 70.7                                   | 66.7                       | 65.3     | 40 (1', 3')   | 39 (t)                     | – <sup>b</sup> |
| 3'       | 73.1                                   | 73.7                       | 74.1     | 42 (2', 4')   | 41 (t)                     | – <sup>b</sup> |
| 4'       | 74.0                                   | 71.5                       | 71.6     | 42 (3', 5')   | 39 (t)                     | – <sup>b</sup> |
| 5'       | 66.4                                   | 64.4                       | 65.3     | 41 (4')   | 32 (d)                     | – <sup>b</sup> |
| P        | 5.1                                    | 4.8                        | 4.1      |   |                            |                |

Tabelle 3.10: <sup>13</sup>C-NMR-Daten von freien und LOV2-gebundenem FMN.

### 3.3.3 Photochemisch induzierte dynamische Kernspinpolarisation in der C450A Mutante der LOV2-Domäne von *A. sativa*

Die rekombinante C450A Mutante der LOV2-Domäne aus *A. sativa* besitzt die für einen FMN Liganden im volloxidierten Redoxzustand typischen Absorptionsmaxima bei 363 und 447 nm. Nach der Belichtung dieses Proteins mit Blaulicht zeigen sich Absorptionsmaxima bei 570 und 605 nm, die charakteristisch für einen FMN-Radikalzustand sind. Über eine Photoreduktion dieser Mutante in An- oder Abwesenheit externer Elektronendonatoren wurde bereits früher berichtet (Kay *et al.*, 2003). Im Dunklen wandelt sich der Radikalzustand auf einer Zeitskala von Minuten wieder komplett in den volloxidierten Zustand um.

Analog zum weiter oben beschriebenen Verfahren wurde das mutierte LOV2 Protein mit verschiedenen FMN-Isotopologen rekonstituiert und <sup>13</sup>C-NMR-Spektren im Dunklen sowie unter Beleuchtung aufgenommen. In den Dunkelspektren erscheinen die Signale im Falle der [U-<sup>13</sup>C<sub>17</sub>]FMN Markierung (Abb. 3.20) als Multipletts, bei den [<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]- und [<sup>13</sup>C<sub>1</sub>]-Isotopologen (Abb. 3.21) als verbreiterte Singulets. Durch Vergleich der Mehrfach- und Einzelmarkier-



ungen konnten alle Signale zweifelsfrei zugeordnet werden. Die chemischen Verschiebungen des FMN im mutierten Protein weisen nur geringe Unterschiede zu denen in der Wildtyp LOV2-Domäne von *A. sativa* auf. Dies deutet darauf hin, dass der Ersatz von Cystein 450 durch Alanin die Umgebung des Flavin Chromophors kaum ändert.

Die Bestrahlung der Proben mit Blaulicht, welche zur partiellen Ausbildung des Radikalzustands im FMN führt, ändert hier nichts an den  $^{13}\text{C}$  chemischen Verschiebungen des Liganden. Die Ausbildung des oben beschriebenen Cys450-C-4a Photoaddukts ist hier aufgrund der Mutation nicht möglich, wodurch auch die damit einhergehende Konformationsänderung des Proteins unterbunden wird. Überraschenderweise weisen einige Signale in den Abbildungen 3.20 und 3.21 jedoch eine negative Amplitude auf, während andere Signale zwar in Absorption bleiben aber ihre Intensitäten in unterschiedlichem Ausmaß verstärkt oder abgeschwächt werden.

Im Spektrum der beleuchteten Probe sind die einzelnen NMR-Linien so stark verbreitert, dass sie nicht mehr nachweisbar sind. Dies ist auf die starke Hyperfeinkopplung der Kernspins mit dem Spin des ungepaarten Elektrons, welches weitestgehend im Isoalloxazinring lokalisiert ist, zurückzuführen. Die Signale der Ribitylseitenkette werden demgegenüber kaum beeinflusst.

Abbildung 3.20 C zeigt das Differenzspektrum der Hell- und Dunkelmessung skaliert auf gleiche Intensitäten der Ribitylsignale. In dieser Darstellung ist eine verstärkte absorptive Kernspinpolarisation im Bereich der sich überlappenden Signale der Kohlenstoffatome C-4a, C-5a und C-9a zu erkennen. Eine stark negative Spinpolarisation ist dagegen für C-2 und C-8 zu beobachten. Auch beim C-6-Signal tritt eine Spinumkehr auf, es erscheint schwach in Emission. Zusätzlich tritt bei 109 ppm ein intensives negatives Signal auf. Dieses Signal erscheint nur im Hellspektrum und ist keinem Kohlenstoffatom des FMN-Liganden zuzuordnen. Vielmehr ist davon auszugehen, dass es auf einen extrem stark negativ polarisierten Spin eines  $^{13}\text{C}$ -Atoms im C450A-Apoprotein zurückzuführen ist. Dieses Atom muß während der Photoreaktion so stark polarisiert werden, dass es im NMR-Spektrum sichtbar wird, obwohl die Aminosäuren des mutierten Proteins  $^{13}\text{C}$ -Atome nur in ihrer natürlichen Häufigkeit von 1.1 % aufweisen.

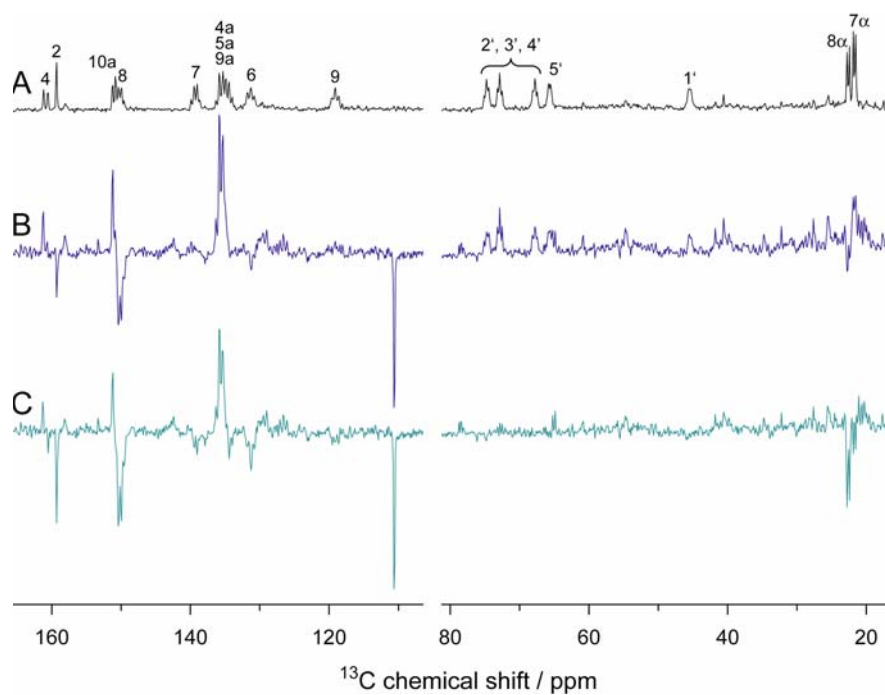


Abb. 3.20:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren der mit  $[\text{U-}^{13}\text{C}_{17}]$ FMN rekonstituierten C450A LOV2-Domäne. (A) Dunkelspektrum. (B) Spektrum unter Blaulichtbestrahlung. (C) Differenzspektrum (Hell minus Dunkel).

Eine differenziertere Auswertung der unterschiedlichen Ausmaße bei der Kernspinpolarisation einzelner Flavin Signale ist mit Hilfe der Hellspektren der mutierten LOV2-Domänen möglich, welche mit  $^{13}\text{C}_1$ - oder  $^{13}\text{C}_2$ -markierten FMN-Liganden rekonstituiert wurden (Abb. 3.21 rechte Seite). Hier erscheinen die einzelnen Signale als Singulets und es treten keine Signalüberlappungen auf.

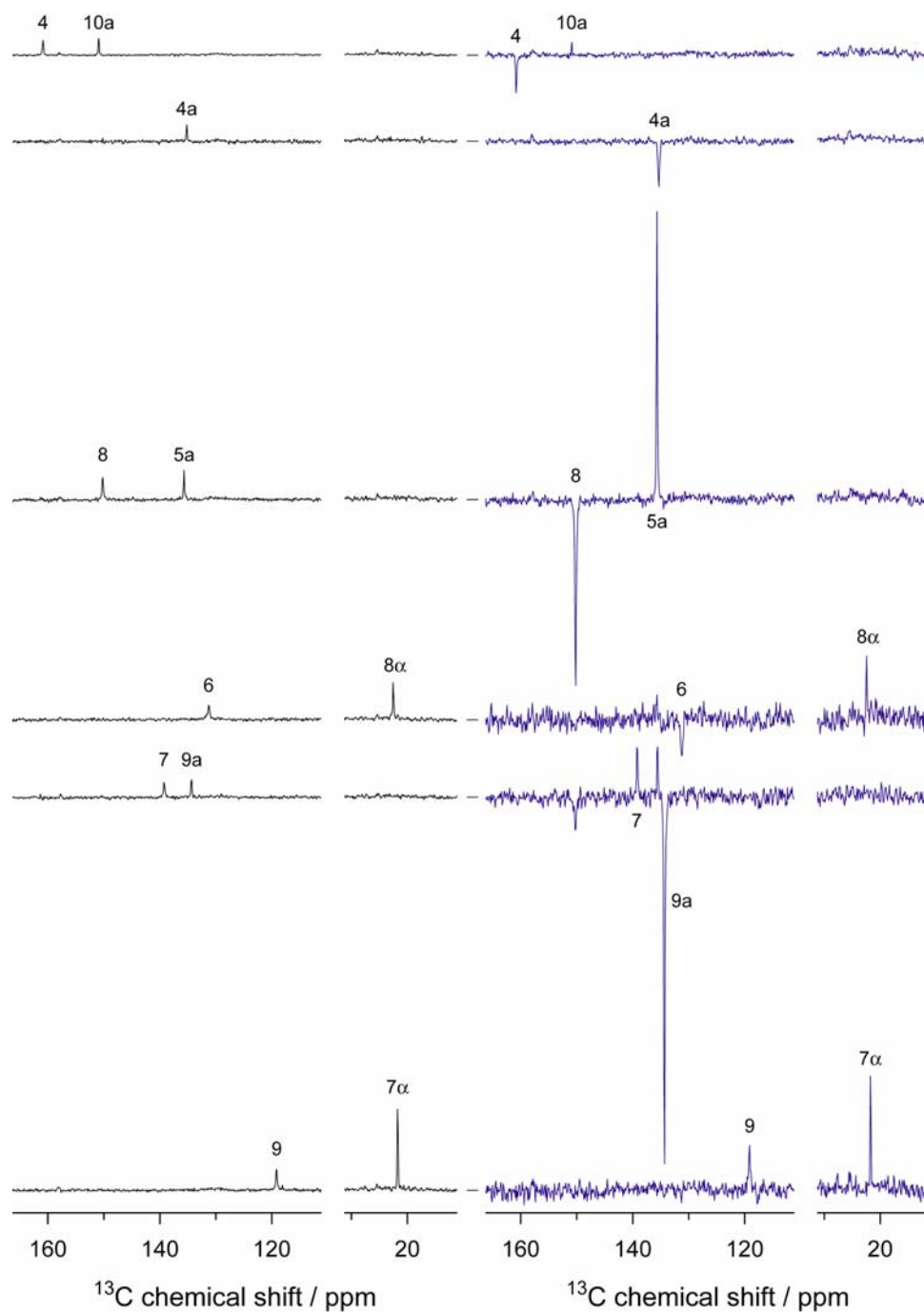


Abb 3.21:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren von C450A LOV2 Domänen, rekonstituiert mit  $[4,10\text{-}^{13}\text{C}_2]$ -FMN,  $[4\text{-}^{13}\text{C}_1]$ FMN,  $[5\text{a},8\text{-}^{13}\text{C}_2]$ FMN,  $[6,8\alpha\text{-}^{13}\text{C}_2]$ FMN,  $[7,9\text{a}\text{-}^{13}\text{C}_2]$ FMN und  $[7\alpha,9\text{-}^{13}\text{C}_2]$ -FMN. Linke Seite: Dunkelspektren. Rechte Seite: HELLSPKTRN

Die größten Änderungen ergeben sich für die Atome des Xylolringes im FMN-Liganden. Die Signale der Atome C-6, C-8 und C-9a wechseln bei Bestrahlung ihr Vorzeichen von Absorption zu Emission, während C-5a, C-9 und C-7 sogar verstärkte Absorption zeigen. Die

Signale der Methylgruppen C-7 $\alpha$  und C-8 $\alpha$  weisen nur geringe Änderungen auf. Von den Kohlenstoffatomen des Pyrimidinringes wechseln C-4 und C-4a ihr Vorzeichen, C-10a bleibt leicht abgeschwächt in Absorption.

Nach der Radikalpaar-Theorie über photochemisch induzierte Kernspinpolarisation (Kaptein, 1975; Closs, 1974) hängt die Gesamtpolarisation der NMR-Linien von den Elektron-Kern Hyperfeinkopplungen ab, welche wiederum von der ungepaarten Elektronenspindichte der jeweiligen Hälften eines intermediären Radikalpaares abgeleitet werden können. Dr. Stefan Weber (FU Berlin) führte hierzu quantenmechanische Berechnungen an einem 7,8,10-Tri-methylisoalloxazin-Radikal als Modell für FMN durch. Das Weglassen der Ribitylseitenkette (C-2' bis C-5') erscheint hier gerechtfertigt, da die Elektronenspindichte des Radikalpaares weitestgehend im konjugierten Isoalloxazin-Ringsystem lokalisiert ist. Dabei wurde je nach Protonierungszustand von N-5 eine anionische und eine neutrale Flavinradikalform berücksichtigt. Abbildung 3.22 zeigt für beide Formen die Amplituden der Elektronenspindichte für das jeweilige HOMO der Flavinradikale in einer Iso-Oberflächen-Darstellung, bei der die blaue Farbe für positive und die rote Farbe für eine negative Elektronenspindichte stehen.

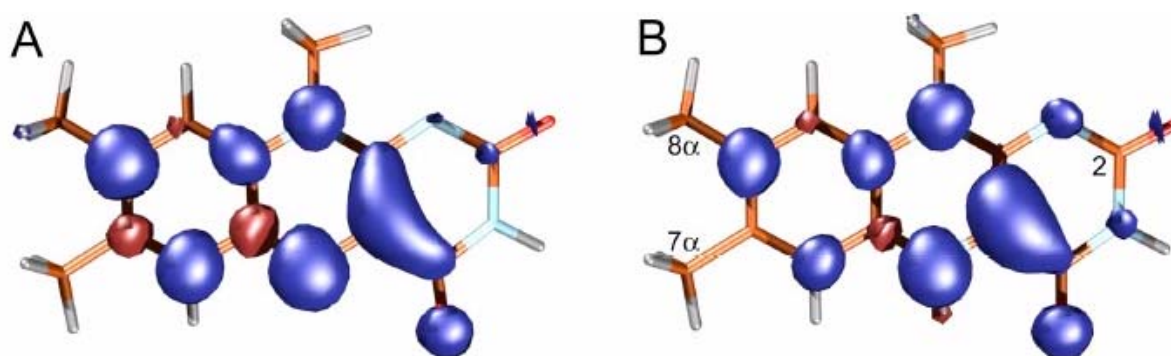


Abb. 3.22: Dichtefunktional-Rechnung für die ungepaarte Elektronenspindichte in einem Flavin-Anion  $\text{Fl}^{\bullet-}$  (A) und einem neutralen Flavin-Radikal  $\text{FlH}^{\bullet}$  (B).

Beide Radikalformen weisen insgesamt eine sehr ähnliche Verteilung der Elektronenspindichte auf: für C-4, C-4a, C-6, C-8 und C-9a erhält man ein positives Vorzeichen, für C-5a, C-7 und C-9 dagegen ein negatives Vorzeichen. In Position C-10a ergibt sich in Übereinstimmung mit neueren quantenmechanischen Rechnungen (Weber *et al.*, 2001b; Garcia *et al.*, 2002) für das anionische Flavinradikal  $\text{Fl}^{\bullet-}$  eine positive, für das neutrale Radikal  $\text{FlH}^{\bullet}$  jedoch eine negative Spindichte. Die Amplituden der negativen Spindichte in den Positionen C-5a, C-7 und C-9 sind im anionischen Flavinradikal größer.

Beim Vergleich der Hell- und Dunkel- $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren der LOV2-C450A-Mutante erkennt man zwei Sorten von Amplitudenänderungen. Die Signale von C-2, C-4, C-4a, C-6, C-8, C-9a und C-10a wechseln ihr Vorzeichen von positiv nach negativ oder verbleiben abgeschwächt in Absorption. Eine Verstärkung der NMR-Signale ist dagegen für die Positionen C-5a, C-7 und C-9 zu beobachten. Nach Kapteins Regeln über die Polarisierung von NMR-Linien (Kaptein, 1975) müssen die Kerne dieser beiden Gruppen Hyperfeinkopplungen mit unterschiedlichem Vorzeichen aufweisen. Im gegebenen Fall passt das Muster der berechneten Elektronenspindichte besser zum anionischen als zum neutralen Flavinradikal, wenn man davon ausgeht, dass negative Hyperfeinkopplungen zu einer Verstärkung und positive Hyperfeinkopplungen zu einer Abschwächung bzw. Vorzeichenumkehr der NMR-Signale führen. Daraus kann man schließen, dass die kernspinabhängige Umwandlung von Singulett- und Triplettzustand mit höherer Wahrscheinlichkeit im anionischen Flavinradikal-Zustand erfolgt.

### 3.3.4 Elektron-Kern-Doppelresonanz-Spektroskopie an der C450A Mutante der LOV2-Domäne von *A. sativa*

Elektronenspinresonanz (EPR) und Elektron-Kern-Doppelresonanz (ENDOR) sind wichtige spektroskopische Methoden, die Einblicke in die Struktur und die Dynamik paramagnetischer Moleküle bieten (Übersicht bei Carrington und McLachlan, 1969; Kurreck *et al.*, 1988; Holtzhauer, 1996; Atherton, 1993).

Wird ein ungepaartes Elektron in ein äußeres Magnetfeld gebracht, wird die ursprüngliche Entartung der beiden Spinzustände des Elektrons aufgehoben (Zeemann-Effekt). Übergänge zwischen den beiden Zeemann-Energieniveaus werden durch elektromagnetische Strahlung mit der Resonanzfrequenz angeregt. Neben dem g-Faktor, der die Position der Mitte einer EPR-Linie im Magnetfeldmaßstab charakterisiert sind Hyperfein-Kopplungskonstanten wichtige Parameter eines EPR-Spektrums. Die Hyperfein-Kopplung beruht auf der Wechselwirkung zwischen Elektronenspin und Kernspin und bewirkt die Aufspaltung einer EPR-Linie in mehrere Linien. Die Wechselwirkung lässt sich in eine isotrope und eine anisotrope Komponente zerlegen. Der anisotrope Anteil ergibt sich aus der klassischen Dipol-Dipol-Wechselwirkung zwischen Elektronenspin und Kernspin und ist damit von der relativen Lage der magnetischen Momente des ungepaarten Elektrons und des Kerns abhängig. Der isotrope Anteil ist auf die Fermi-Kontakt-Wechselwirkung zurückzuführen

und ergibt sich aus einer relativistischen Behandlung des Problems. Aus der isotropen Hyperfein-Kopplungskonstante lassen sich somit Informationen über die Elektronendichte am Kernort gewinnen, aus der anisotropen Hyperfein-Kopplungskonstante Informationen über die Geometrie des Moleküls.

Bei der Beteiligung vieler magnetisch nicht-äquivalenter Kerne steigt die Zahl der EPR-Linien multiplikativ mit der Anzahl der Kerne an. Daraus resultiert ein inhomogenes verbreitertes, nicht aufgelöstes Spektrum. Eine Methode zur Auflösung vieler Hyperfein-Kopplungen bietet dann eine Doppelresonanz-Technik (ENDOR-Spektroskopie), bei der zusätzlich eine Radiofrequenz eingestrahlt wird (kombiniertes EPR/NMR-Experiment). Bei ENDOR steigt die Zahl der EPR-Linien additiv mit der Anzahl der magnetisch nichtäquivalenten Kerne an. Bei ENDOR-Spektren ist die EPR-Signalintensität über der NMR-Frequenzskala aufgetragen. Sowohl für die Messung als auch die Zuordnung von Kohlenstoff-ENDOR-Spektren an Flavin-Radikalen ist die Markierung einzelner Atome mit  $^{13}\text{C}$  eine wichtige Voraussetzung. Zu jedem  $^{13}\text{C}$ -Kern sind dabei zwei EPR-Resonanzsignale mit dem Abstand der Hyperfein-Kopplungskonstanten symmetrisch um die freie  $^{13}\text{C}$ -Resonanzfrequenz angeordnet.

In der Arbeitsgruppe von Dr. Stefan Weber (FU-Berlin) wurden in gefrorener Lösung gepulste W-Band  $^{13}\text{C}$ -ENDOR-Spektren von der blaulichtbestrahlten C450A-Mutante der LOV2-Domäne mit verschiedenen isotopologen FMN-Radikalen gemessen. Abbildung 3.23 zeigt, wie sich das komplexe ENDOR-Spektrum eines  $[\text{U-}^{13}\text{C}_{17}, \text{U-}^{15}\text{N}_4]$ -markierten FMN-Liganden aus den verschiedenen Resonanzlinien der einzeln und doppelt markierten Proben zusammensetzen lässt. Gezeigt sind jeweils die ENDOR-Spektren in x-, y- und z-Richtung zum Magnetfeld. Das Spektrum des fiktiven  $[1', ^{13}\text{C}_1]\text{FMN}$  ergibt sich als Differenz aus den Spektren der dreifach markierten  $[1', 7\alpha, 9\text{-}^{13}\text{C}_3]$ - und der doppeltmarkierten  $[7\alpha, 9\text{-}^{13}\text{C}_2]$ -Probe.

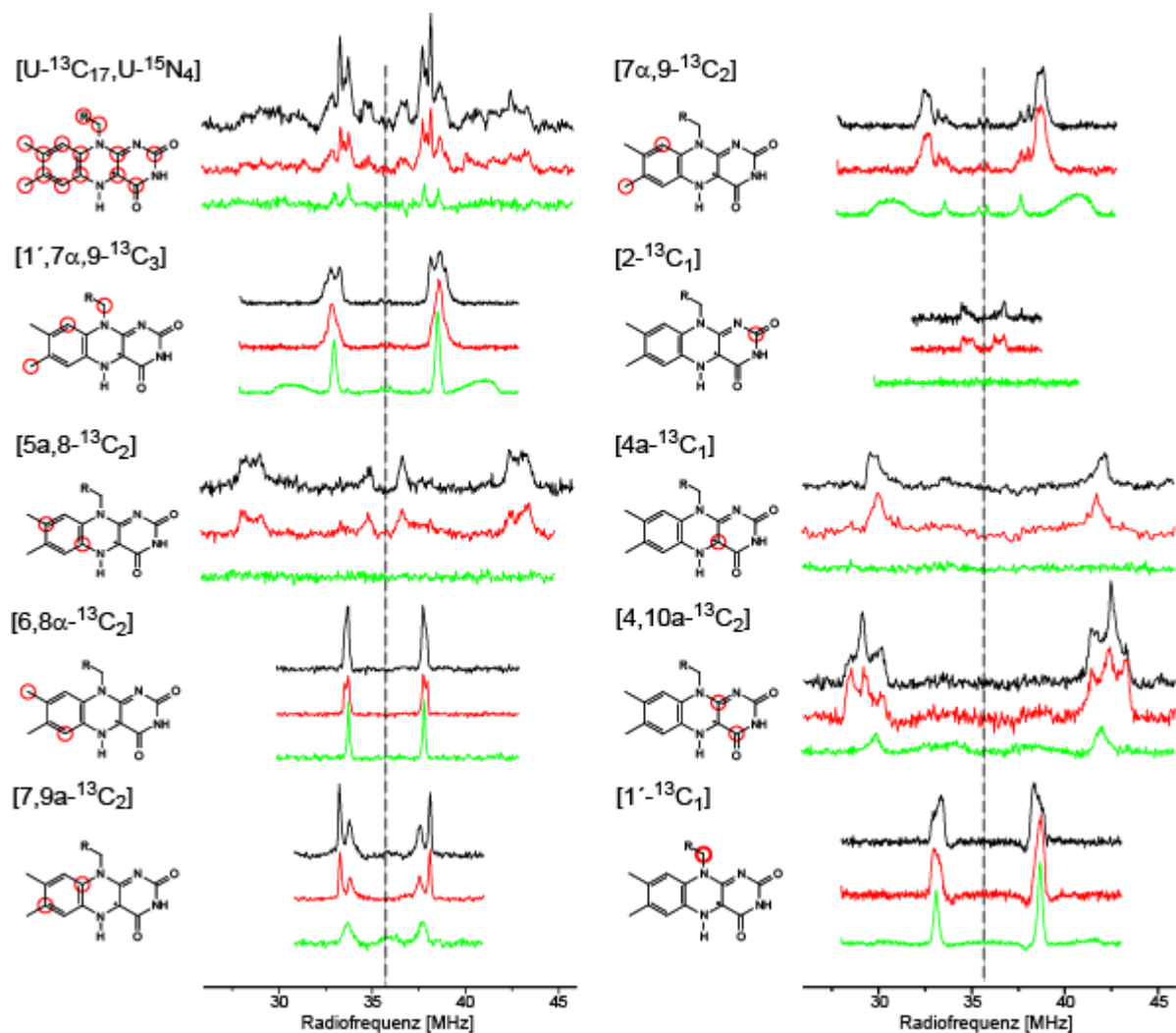


Abb. 3.23: W-Band  $^{13}\text{C}$ -ENDOR-Spektren unterschiedlich markierter FMN-Cofaktoren in rekonstituierten C450A-LOV2-Proteinen, aufgenommen in drei Richtungen zum Magnetfeld: schwarzes Spektrum, gX; rotes Spektrum, gY; grünes Spektrum gZ. Das Spektrum der  $[1'-^{13}\text{C}_1]$ -Markierung ergibt sich aus der Differenz der  $[1',7\alpha,9-^{13}\text{C}_3]$ - und  $[7\alpha,9-^{13}\text{C}_1]$ -Markierung.

Mit Hilfe quantenmechanisch simulierter Hyperfeinkopplungen wurde erstmals eine nahezu vollständige Zuordnung der  $^{13}\text{C}$ -ENDOR-Signale eines proteingebundenen Flavinradikals möglich. Die in Tabelle 3.11 angegebenen gemessenen und berechneten Hyperfeinkopplungskonstanten des ungepaarten Elektronenspin mit den einzelnen  $^{13}\text{C}$ -Atomen stimmen allerdings oft nur grob überein, so dass für eine zuverlässige Interpretation des kompletten  $^{13}\text{C}$ -ENDOR-Spektrums die Verwendung der selektiv markierten FMN-Isotopologie von entscheidender Bedeutung war.

| Hyperfein-Kopplungskonstanten | berechnet [MHz] |             | experimentell [MHz] |            |
|-------------------------------|-----------------|-------------|---------------------|------------|
| C-2                           | A1              | -5.3        | AX                  | -2.3       |
|                               | A2              | -6.9        | AY                  | -1.2       |
|                               | A3              | -9.1        | AZ                  | ---        |
| C-4/C-10a*                    | A1              | -17.7/-18.1 | AX                  | 13.0/14.1* |
|                               | A2              | -18.7/-20.3 | AY                  | 14.8/11.3* |
|                               | A3              | -21.2/-25.2 | AZ                  | 12.1/---*  |
| C-4a                          | A1              | -7.4        | AX                  | -12.8      |
|                               | A2              | -8.1        | AY                  | -11.8      |
|                               | A3              | 78.8        | AZ                  | ---        |
| C-5a                          | A1              | -10.5       | AX                  | -13.5      |
|                               | A2              | -12.8       | AY                  | -15.4      |
|                               | A3              | -17.8       | AZ                  | ---        |
| C-6                           | A1              | 13.5        | AX                  | ---        |
|                               | A2              | -0.9        | AY                  | ---        |
|                               | A3              | -0.3        | AZ                  | ---        |
| C-7                           | A1              | -4.1        | AX                  | -3.6       |
|                               | A2              | -4.3        | AY                  | -3.8       |
|                               | A3              | -6.6        | AZ                  | -4.1       |
| C-7 $\alpha$                  | A1              | 0.6         | AX                  | 0.4        |
|                               | A2              | 0.2         | AY                  | 0.4        |
|                               | A3              | 0.1         | AZ                  | 0.5        |
| C-8                           | A1              | 19.5        | A $_{\perp}$        | 1.8        |
|                               | A2              | 0.6         |                     |            |
|                               | A3              | 0           | A $_{\parallel}$    | ---        |
| C-8 $\alpha$                  | A1              | -2.8        | AX                  | -4.1       |
|                               | A2              | -3.1        | AY                  | -4.5       |
|                               | A3              | -3.4        | AZ                  | -4.1       |
| C-9                           | A1              | -3.6        | AX                  | -6.4       |
|                               | A2              | -4.5        | AY                  | -5.9       |
|                               | A3              | -10.5       | AZ                  | -11.7      |
| C-9a                          | A1              | 13          | A $_{\perp}$        | ---        |
|                               | A2              | -1.8        |                     |            |
|                               | A3              | -2.2        | A $_{\parallel}$    | 4.9        |
| C-1'                          | A1              | -2.7        | AX                  | 5          |
|                               | A2              | -3.9        | AY                  | 5.7        |
|                               | A3              | -5.1        | AZ                  | 5.6        |

Tabelle 3.11  $^{13}\text{C}$ -Hyperfein-Kopplungskonstanten des Flavinradikals im C450A-LOV2-Protein. \*Eine Zuordnung der experimentellen Kopplungskonstanten für C-4 und C-10a ist nicht möglich, da die Signale zusammenfallen.



### 3.4 Schwingungsspektroskopie an Flavin-Cofaktoren und Flavoproteinen

Infrarot- und Raman-Spektroskopie geben Aufschluß über die Schwingungsmoden eines Moleküls. Sie sind wichtige Methoden zur Untersuchung von Protein-Ligand Wechselwirkungen, da die Bindung eines Cofaktors an ein Protein dessen Vibrationsmoden deutlich verschieben kann. Allerdings ist die Zuordnung einzelner Banden meist mit erheblichen Schwierigkeiten verbunden. Die Zahl der theoretischen Schwingungsmoden ( $S$ ) eines nicht-linearen Moleküls ergibt sich aus der Anzahl seiner Atome ( $N$ ) nach der Formel  $S = 3 \cdot N - 6$ , da für jedes Atom 3 Translationsfreiheitsgrade, entsprechend einer Auslenkung in  $x$ ,  $y$  und  $z$ -Richtung existieren und für die Translation und Rotation des Gesamtmoleküls jeweils 3 Freiheitsgrade abgezogen werden müssen. Für Riboflavin ( $N = 47$ ) und 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin ( $N = 41$ ) ergeben sich somit 135 bzw. 117 voneinander unabhängige Schwingungsmoden. In experimentellen IR- und Raman-Spektren lassen sich jedoch, aufgrund von Linienverbreiterungen, Bandenüberlappungen und eingeschränkten Messbereichen deutlich weniger Banden beobachten (ca. 35 - 50). Abbildung 3.24 gibt die Transmissions-IR-Spektren von 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin und Riboflavin in KBr-Presslingen wieder.

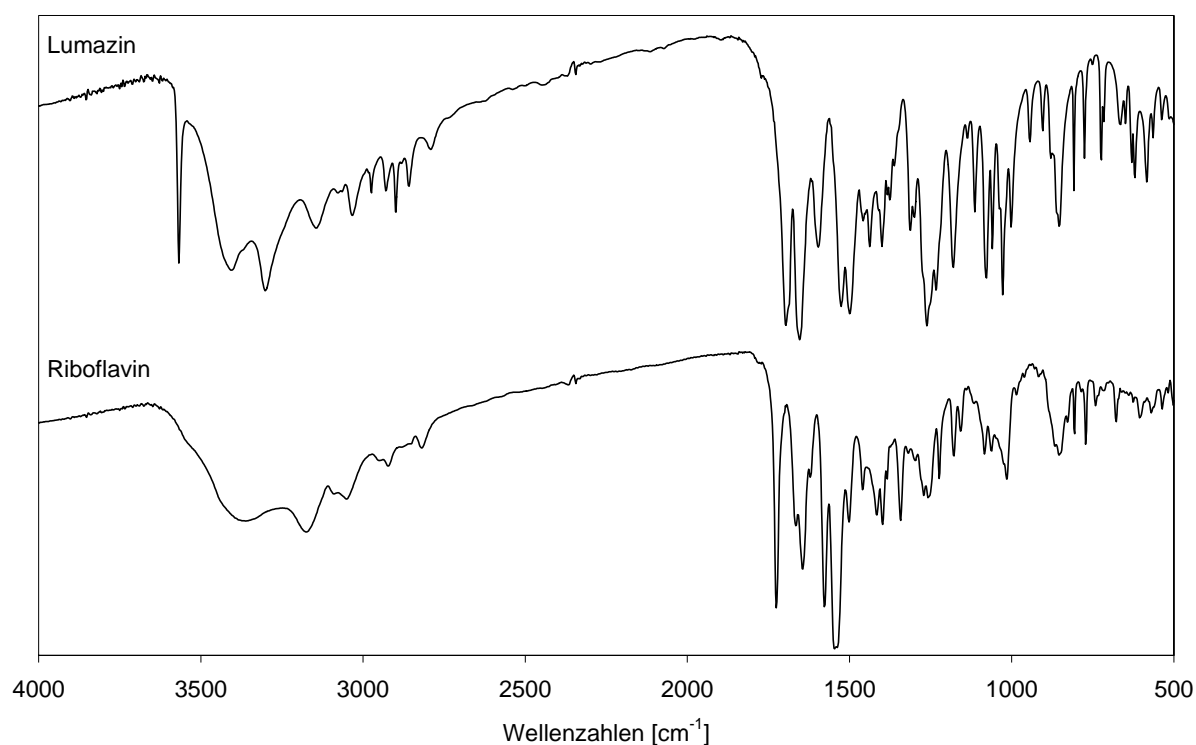


Abb. 3.24 Festkörper-IR-Spektren von 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin und Riboflavin

In beiden Spektren erkennt man deutlich zwei getrennte Bereiche, einen hochfrequenten Bereich mit breiten, sich überlappenden Banden ab  $2800\text{ cm}^{-1}$  und einen niederfrequenten Bereich von  $500 - 1800\text{ cm}^{-1}$  mit deutlich schärferen Banden. Im Gegensatz zu den bisher behandelten kernmagnetischen Resonanzmethoden kann in der Schwingungsspektroskopie eine Bande prinzipiell nicht einzelnen Atom zugeordnet werden. Vielmehr enthält jede Schwingungsmode verschiedene translatorische Anteile jedes Atoms. Da diese für bestimmte Molekülteile unterschiedlich stark ausfallen können, ist in Einzelfällen dennoch eine Zuordnung einer Bande zu einer quasi lokalisierten Schwingung einzelner Atome oder Atomgruppen möglich (z.B. Streckschwingung einer Carbonylgruppe).

Es existieren zahlreiche Versuche mit quantenmechanischen Methoden die Schwingungsmoden eines Moleküls sowie deren Frequenzen und Intensitäten theoretisch zu berechnen. Die folgenden Rechnungen an geometrieoptimierten Riboflavin- und Lumazin-Molekülen wurden einerseits mit HyperChem und zwei semiempirischen Methoden (MINDO3, PM3) sowie andererseits von Dr. Stefan Weber (FU-Berlin) mit einer Dichtefunktional-Methode (B3LYP/6-31G) unter Gaussian durchgeführt. Die Zweiteilung des Spektrums mit einer Lücke zwischen etwa  $1900$  und  $2800\text{ cm}^{-1}$  wird bei allen Methoden gut vorhergesagt.

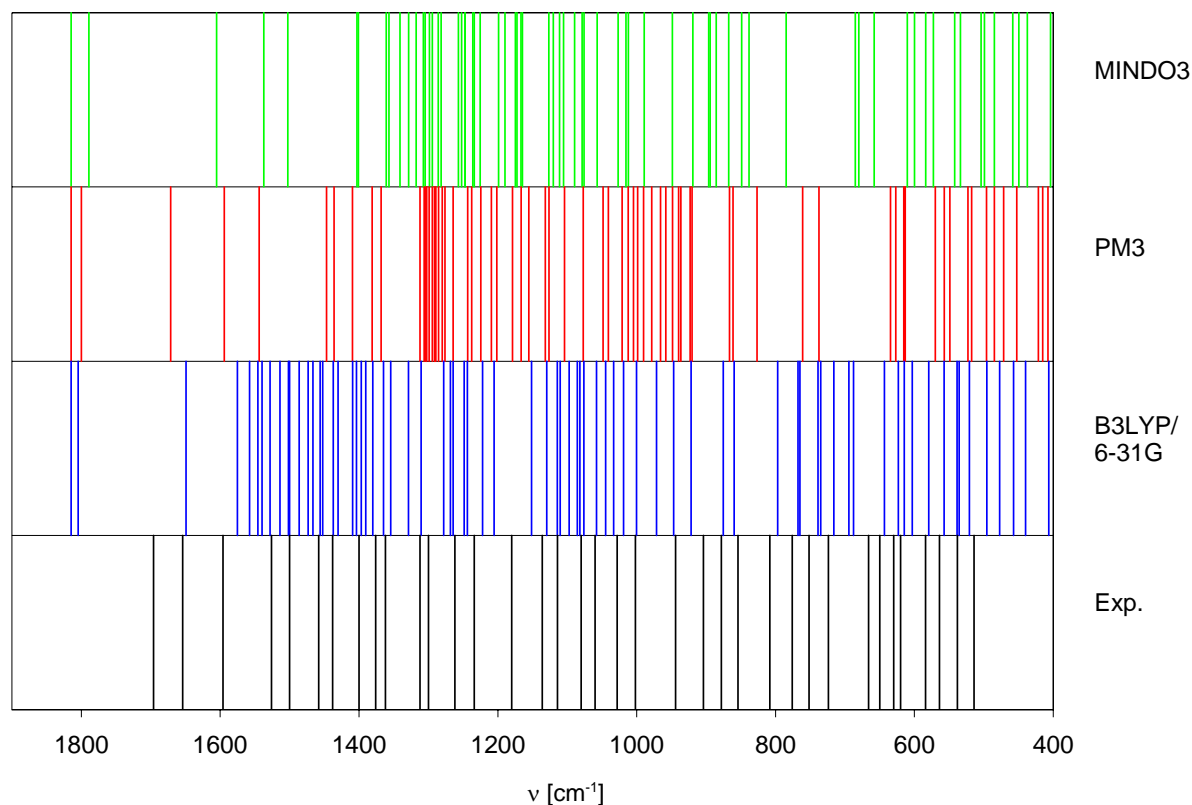


Abb. 3.25: Vergleich von quantenmechanisch berechneten IR-Banden (3 Methoden) mit dem experimentellen IR-Spektrum von 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin.

Abbildung 3.25 zeigt für den niederfrequenten Bereich der Wellenzahlen zwischen 400 und 1900  $\text{cm}^{-1}$  die berechneten und experimentellen IR-Banden des 6,7-Dimethyl-8-ribitylumazin-Moleküls in einer Strichcode-Darstellung. Die Ergebnisse der verschiedenen Methoden weisen sowohl untereinander als auch zu den experimentellen Spektren teils erhebliche Unterschiede auf. Insbesondere die berechneten Intensitätswerte sind wenig aussagekräftig und bleiben daher unberücksichtigt. Eine zuverlässige Zuordnung der experimentellen Banden zu den berechneten Schwingungsmoden ist auf dieser Basis nicht möglich.

Da die Schwingungen eines Moleküls von der Masse der beteiligten Atome abhängen, können sich beim Ersatz eines Atoms durch ein schwereres Isotop signifikante Verschiebungen zu niedrigeren Wellenzahlen ergeben. Bisher beschränkten sich Zuordnungsversuche meist auf einzelne oder einige wenige Isotopsubstitutionen um eine vage Vorstellung zu erhalten, an welchen Schwingungsbanden bestimmte Atome beteiligt sind. Eine konkrete Aussage über welche Schwingungsmode es sich bei einer gegebenen Bande handelt ist dadurch aber nur in Ausnahmefällen möglich und vor allem im niederfrequenten "Fingerprint-Bereich" mit einer hohen Unsicherheit behaftet. Geht man davon aus, dass die quantenmechanischen Berechnungen die relativen Verschiebungen einer Bande bei einer gegebenen Isotopensubstitution besser vorhersagen können als die Lage der Bande selbst, so sollte die Analyse der Verschiebungsmuster in den IR-Spektren vieler unterschiedlicher Isotopologe eine genauere Zuordnung einzelner Banden erlauben. Um so jedoch eine komplette Zuordnung aller Schwingungsbanden eines Moleküls zu erreichen, bräuchte man wohl eine unrealistisch hohe Anzahl verschiedener Isotopologe, so dass die Einbeziehung der berechneten Frequenzinformationen in einen zu entwickelnden Zuordnungsalgorithmus mit einem weit gefassten Toleranzbereich gerechtfertigt erscheint. Der selbe Algorithmus ließe sich dann auch auf Schwingungs-Spektren isotopologer Liganden in Flavoproteinen bzw. im Lumazinprotein anwenden.

Die Verfügbarkeit isotopologer Flavin-Liganden eröffnet somit neue Möglichkeiten zur Untersuchung etlicher Flavoproteine mittels IR- und Raman-Spektroskopie. Als Vorarbeit hierzu wurden die Festkörper-IR-Spektren der synthetisierten Riboflavin- und Lumazin-Isotopologe in KBr-Presslingen gemessen. Die Isotopeneffekte in diesen Spektren sind in Abbildung 3.26 und 3.27 durch Kennzeichnung der IR-Maxima mittels eines Strichcodes hervorgehoben.

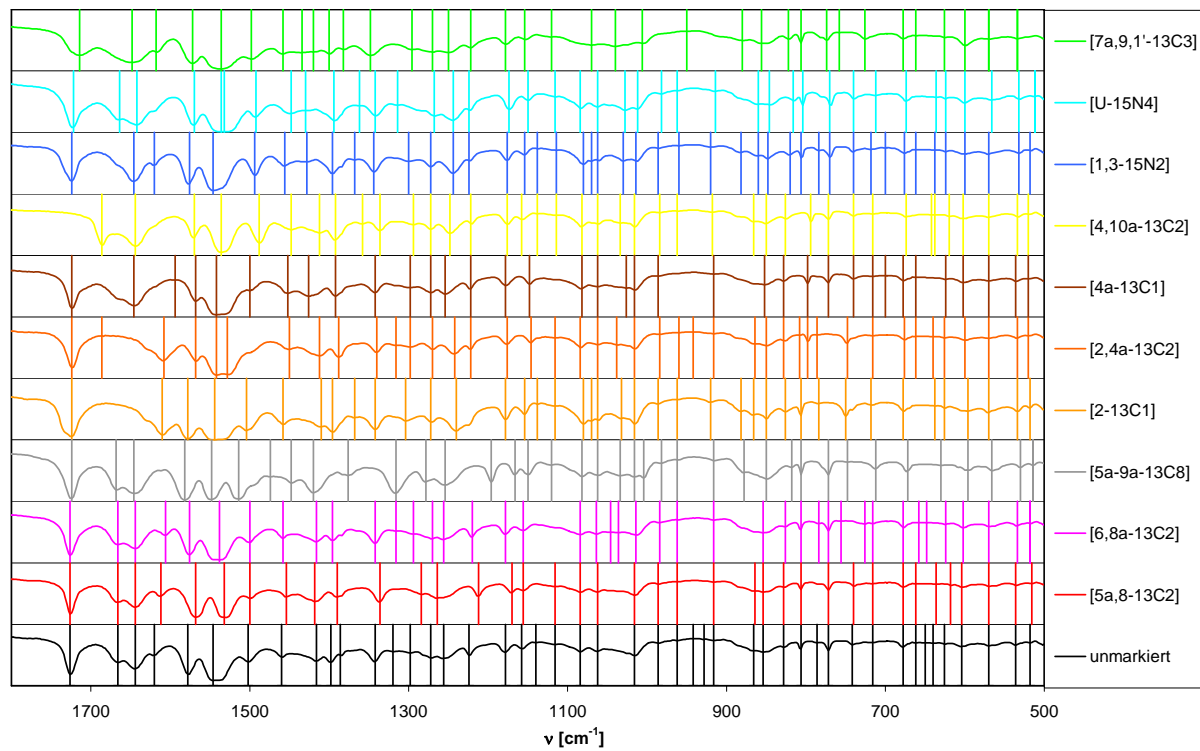


Abb. 3.26: IR-Spektren isotopologer Riboflavine.

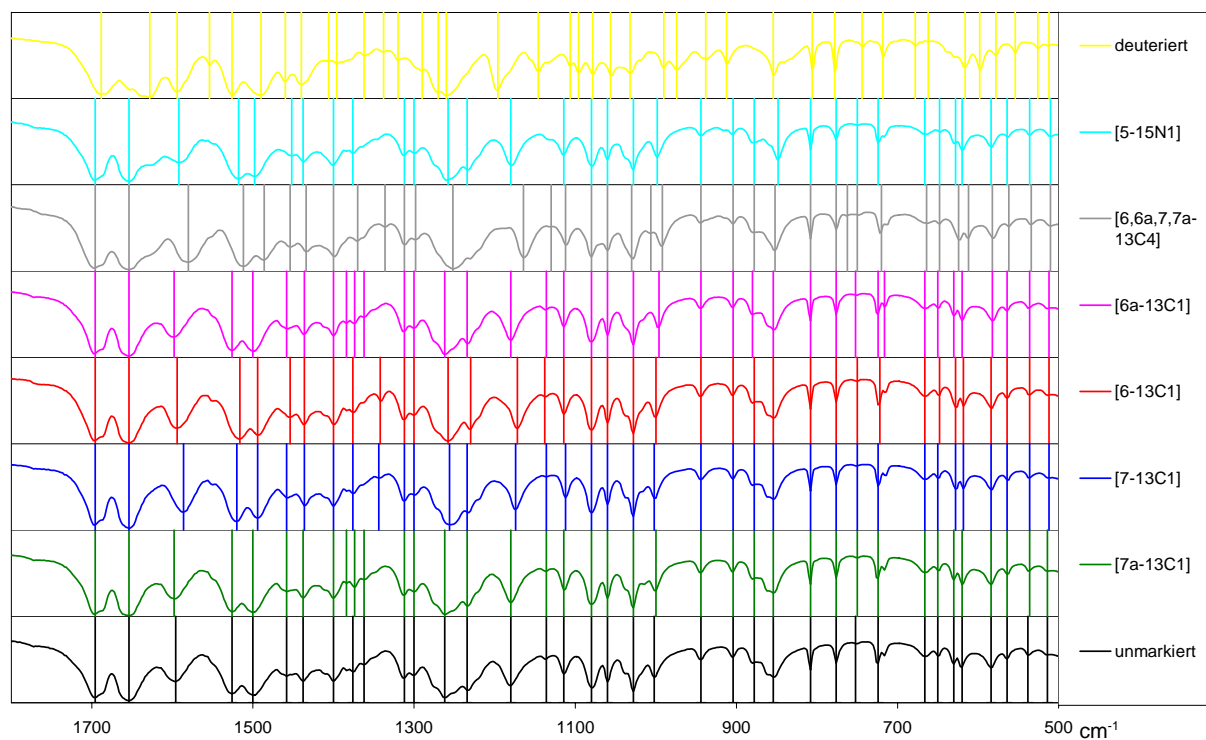


Abb. 3.27: IR-Spektren isotopologer Lumazine.

Mit Hilfe des Softwarepakets Gaussian, der DFT-Methode B3LYP und dem Basissatz 6-31G wurden die IR-Banden für zuvor *in vacuo* geometrieoptimierte Riboflavin- und Lumazinin-Moleküle simuliert. Anschließend wurden in diesen Molekülen sukzessive die gleichen Atome durch Schwerisotope ersetzt, wie in den realen Isotopologen und die Berechnung der IR-Banden wiederholt. Abbildung 3.28 gibt den niederfrequenten Bereich des berechneten Bandenmusters für die Riboflavin-Isotopologe wieder.

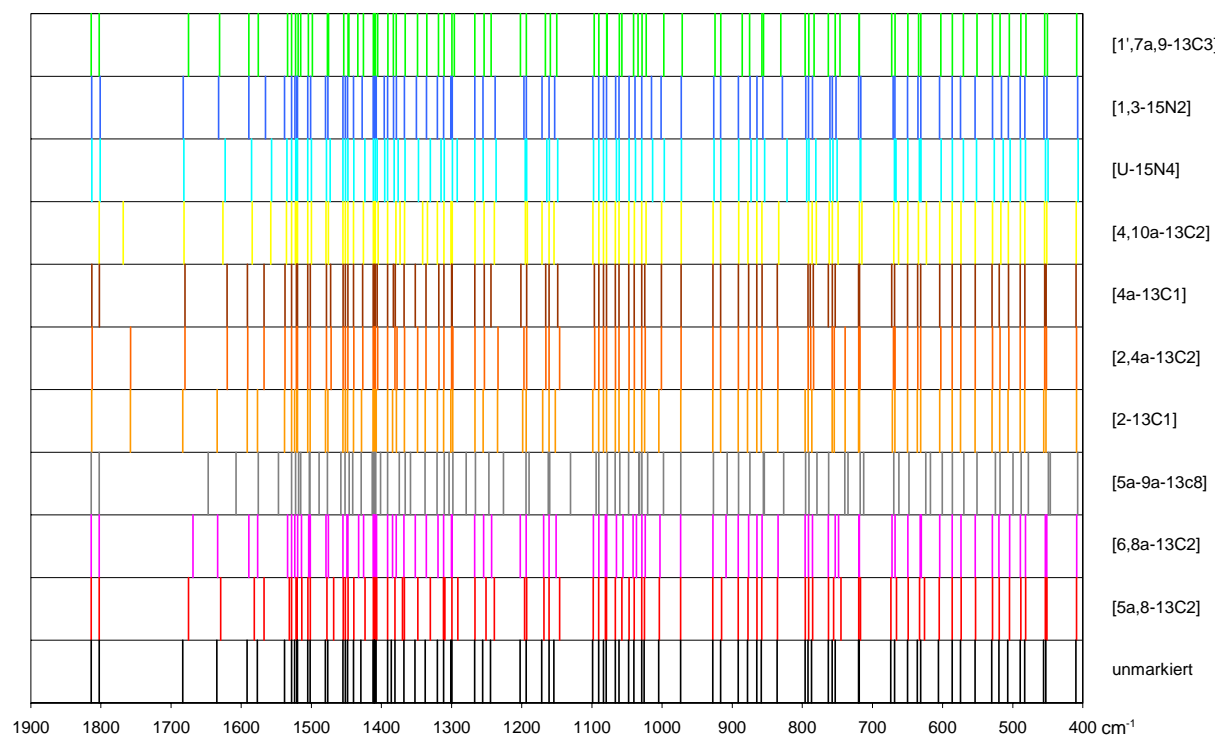


Abb. 3.28: Simulierte IR-Spektren isotopologer Riboflavine (DFT-Rechnung).

Man erkennt deutlich die Verschiebungen mehrerer IR-Banden bei unterschiedlichen Isotopsubstitutionen. Besonders auffällig sind die großen Verschiebungen im Bereich der weitgehend lokalisierten Carbonyl-Streckschwingungen um  $1800\text{ cm}^{-1}$ , falls die Carbonylkohlenstoffe C-4 oder C-2 markiert sind. Bei den übrigen Banden ergeben sich im Mittel die größten Unterschiede zum unmarkierten Riboflavin bei der  $[5a,6,7,7\alpha,8,8\alpha,9,9a-^{13}\text{C}_8]$ -Markierung, in der acht Schwerisotopsubstitutionen vorkommen, wodurch das Muster der Valenzschwingungen erheblich beeinflusst wird. Mit Hilfe eines selbstentwickelten C++ Programmes, welches anhand der von Gaussian ausgegebenen Translationsmatrices die Geometrie der Schwingungsmoden vergleicht, wurde überprüft, ob die Schwingungsmoden in den verschiedenen Isotopologen in der selben energetischen Reihenfolge vorkommen oder

ob "Über-Kreuz-Verschiebungen" auftreten. Dies ist zwar im Allgemeinen eher selten der Fall (1-4 über Kreuz zugeordnete Banden je Isotopolog), kommt aber bei der [ $^{13}\text{C}_8$ ]-Markierung im Bereich zwischen 1000 und 1700  $\text{cm}^{-1}$  gehäuft vor (Abbildung 3.29). Allerdings ändern sich hier die Geometrien der berechneten Schwingungsmoden mitunter so stark, dass eine zweifelsfreie Zuordnung nicht mehr in jedem Fall gewährleistet werden kann.

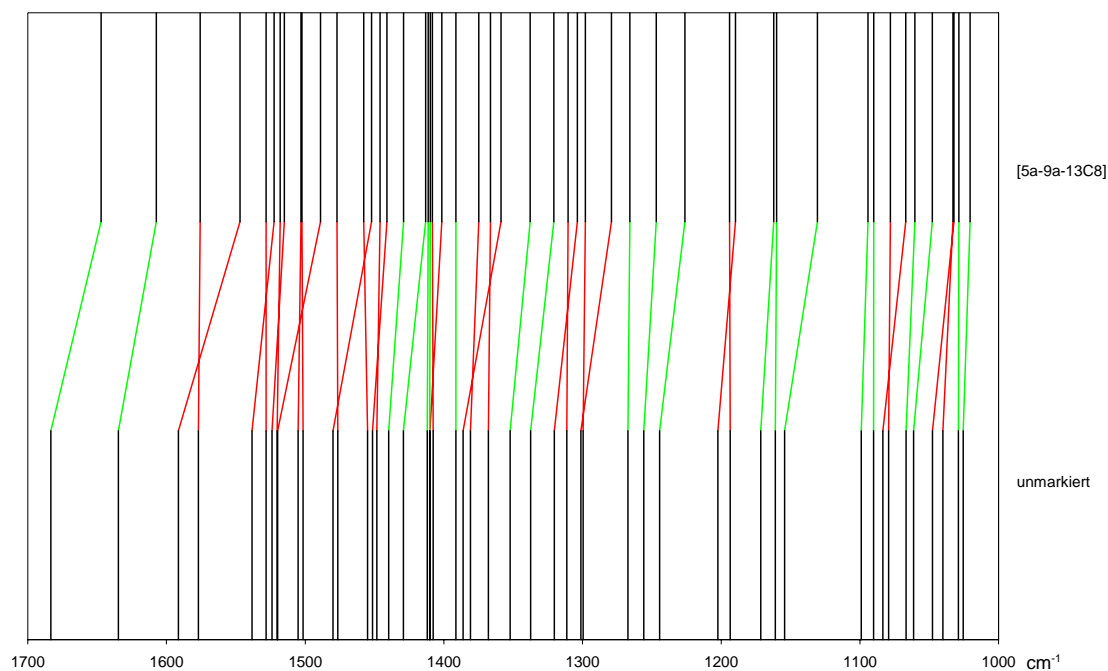


Abb. 3.29 Simulierte Verschiebungen der IR-Banden von [5a,6,7,7 $\alpha$ ,8,8 $\alpha$ ,9,9a- $^{13}\text{C}_8$ ]- und unmarkiertem Riboflavin. Überkreuzte Änderungen der Reihenfolge sind rot hervorgehoben.

Für jede gerechnete und gemessene IR-Bande eines Isotopologs wurde die Frequenzverschiebung bezüglich der entsprechenden Bande des unmarkierten Moleküls bestimmt. Abbildung 3.30 und 3.31 zeigen diese Verschiebungen für einige Riboflavin- bzw. Lumazin-Isotopologe. Die Abszisse dieser Diagramme bezeichnet die Wellenzahlen der IR-Banden des unmarkierten Moleküls, während auf der Ordinate die Wellenzahl-Differenzen der jeweiligen Isotopolog-Banden aufgetragen sind. Bei den experimentellen Spektren kommt jedoch zu den Problemen der Linienverbreiterung, der Bandenüberlappung und der messtechnisch bedingt begrenzten Wellenzahl-Auflösung noch hinzu, dass "Über-Kreuz-Verschiebungen" nicht auf einfache Weise erkennbar sind. Die experimentellen Wellenzahl-Verschiebungen sind daher mit einem deutlichen Unsicherheitsfaktor behaftet, der wohl auch zur eher qualitativen Übereinstimmung der simulierten und beobachteten Abweichungen beiträgt, sich aber durch mathematische Methoden wie Spektrendekonvolution vielleicht noch verringern ließe.

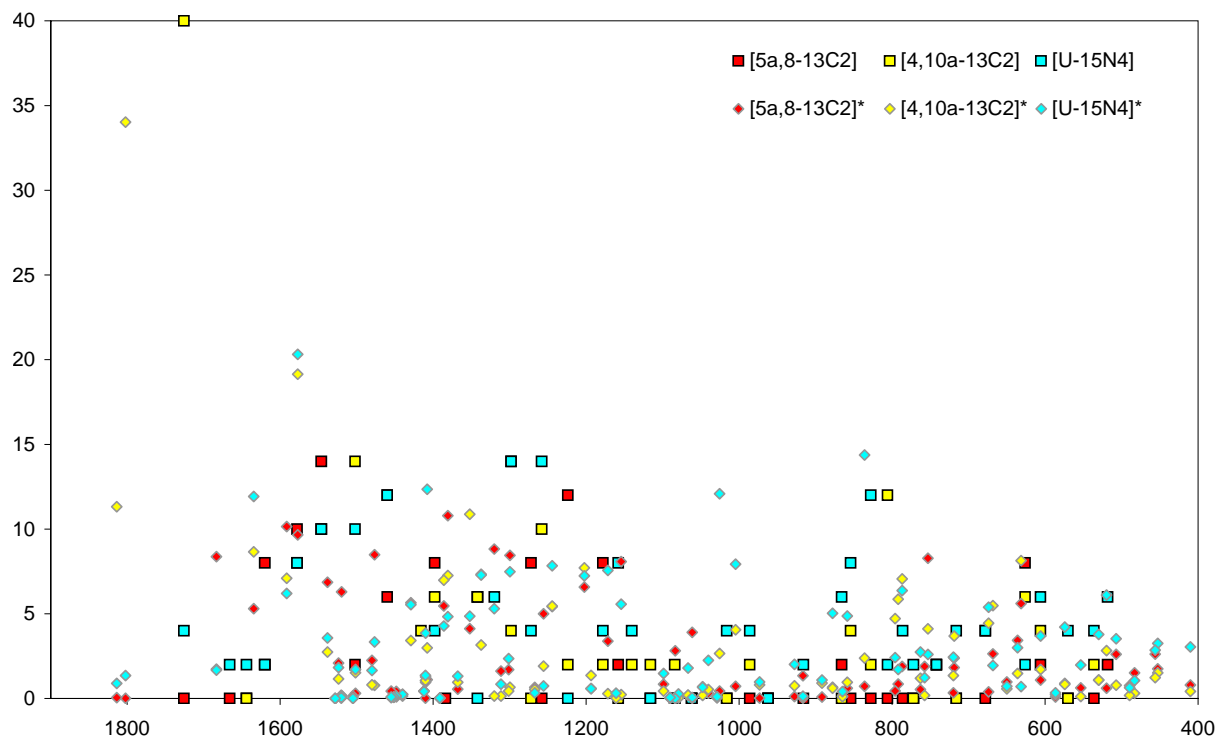


Abb. 3.30: Abweichungen der IR-Banden dreier isotopologer Riboflavine vom unmarkierten Riboflavin: □, Experiment; ♦, Simulation.

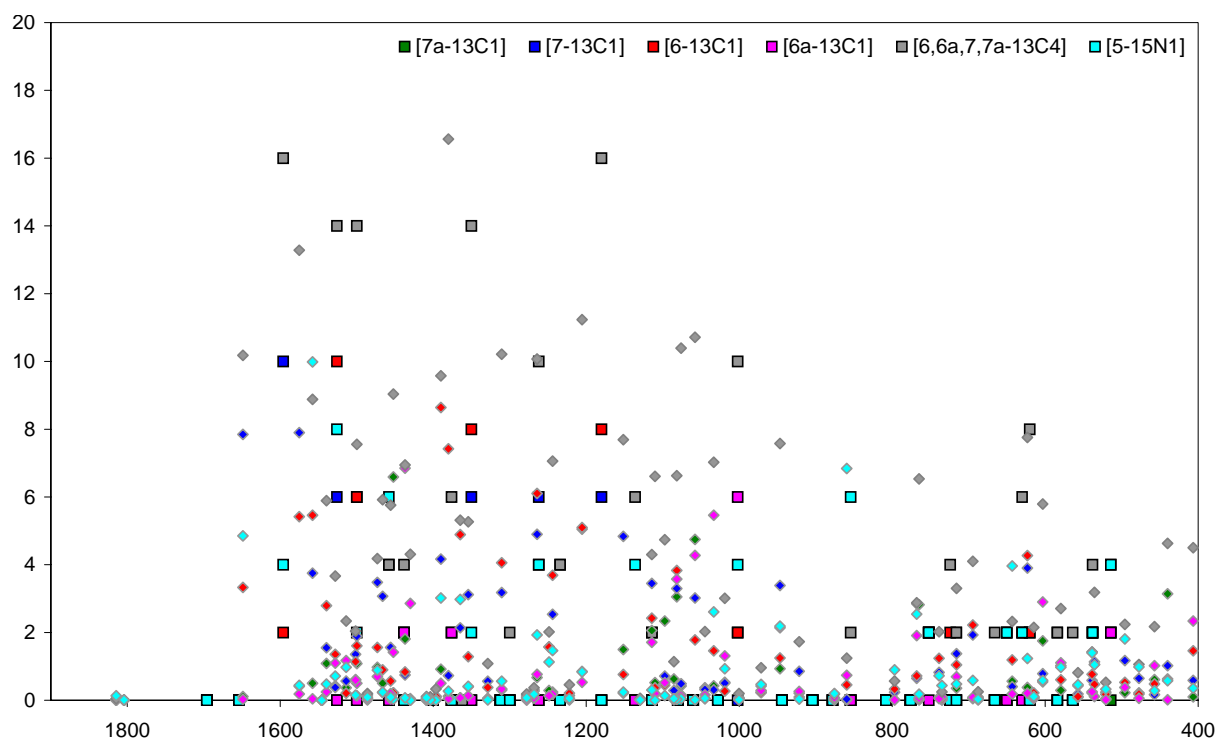


Abb. 3.31: Abweichungen der IR-Banden isotopologer Lumazine vom unmarkierten Lumazin: □, Experiment; ♦, Simulation.

Bildet man für jedes Riboflavin- und Lumazin-Isotopolog die mittlere Abweichung aller beobachtbaren bzw. simulierten IR-Banden von denen des unmarkierten Moleküls und vergleicht diese untereinander, so zeigt sich deutlich, dass sich verschiedene Markierungen unterschiedlich stark auf das IR-Spektrum auswirken und diese Einflüsse qualitativ richtig vorhergesagt werden (Abb. 3.32).

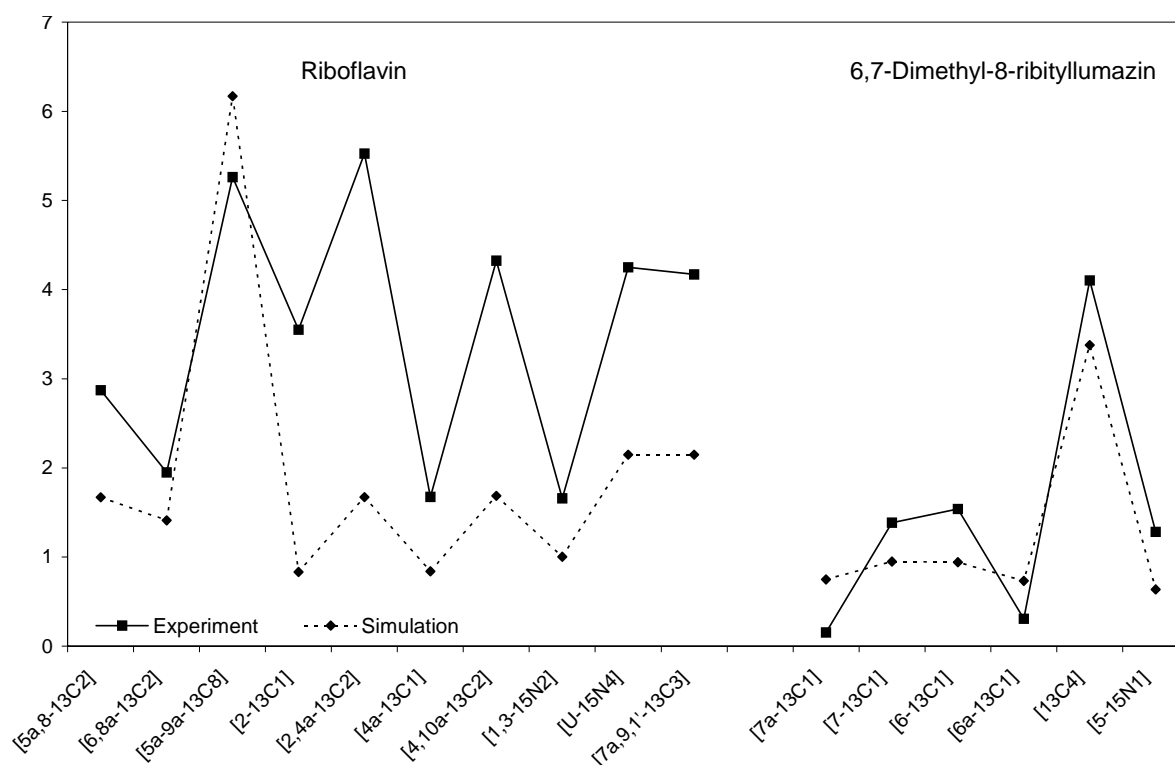


Abb. 3.32: Mittlere Abweichung der IR-Banden isotopologer Riboflavine und Lumazine vom unmarkierten Molekül: ■, Experiment; ◆, Simulation.

Aus der Analyse der quantenmechanischen Berechnungen und der gemessenen IR-Spektren erhielt man für alle Riboflavin- und Lumazin-Isotopologe zwei Vektoren, welche die erwarteten und beobachteten Verschiebungen der einzelnen Banden bezüglich des Spektrums des unmarkierten Moleküls beschreiben. Umgekehrt ergibt sich für jede Bande des theoretischen und des experimentellen Spektrums ein Vektor, der beschreibt wie diese Bande auf verschiedene Isotopsubstitutionen reagiert. Das nächste Ziel besteht nun darin einen Algorithmus zu entwickeln, der die experimentell beobachteten IR-Bandenpositionen mit der simulierten Verschiebungsmatrix abgleicht, um so zu einer plausiblen Bandenzuordnung zu kommen.



Mit den Daten der freien Liganden als Grundlage ließe sich das gleiche Verfahren dann auch auf proteingebundene Liganden anwenden. Dazu wurde in Kooperation mit Dr. Joachim Heberle (Forschungszentrum Jülich) und Prof. Peter Hildebrandt (TU-Berlin) begonnen Schwingungs-Spektren von LOV2-Domänen zu messen, die mit verschiedenen FMN-Isotopologen rekonstituiert wurden. Abbildung 3.33 zeigt die Ramanspektren einiger Flavin-Liganden in rekonstituierten Proben der LOV2-C450A-Mutante.

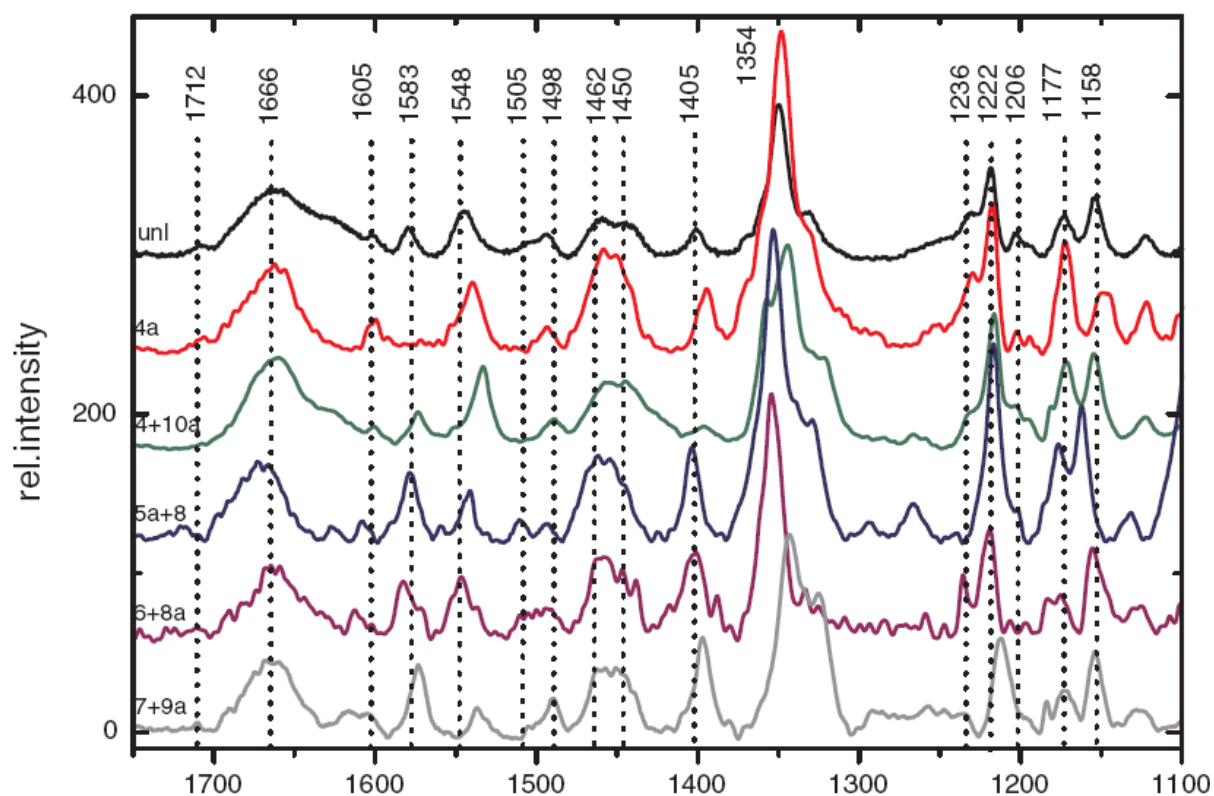


Abb. 3.33: Ramanspektren isotopologer FMN-Liganden in der C450A-LOV2-Mutante

Die zweite Raman-Spektrenserie (Abbildung 3.34), die mit rekonstituierten Wildtyp LOV2-Domänen und bei einer Anregungswellenlänge von 413 nm (Blaulichbestrahlung!) aufgenommen wurde, enthält auch Schwingungsbanden, die auf das kovalente Cys450→C-4a Photoaddukt zurückzuführen sind (Kapitel 3.3). In beiden Spektrenserien sind die Einflüsse der Isotopsubstitutionen deutlich an Bandenverschiebungen zu niedrigeren Wellenzahlen abzulesen. Ebenfalls in der Arbeitsgruppe von Dr. Joachim Heberle wurden Differenz-FTIR-Spektren der rekonstituierten LOV2-Domänen gemessen. Diese sind in Abbildung 3.35 wiedergegeben.



## 3.5 NMR-Spektroskopische Untersuchungen an Enzymen der Riboflavinbiosynthese

Bei den enzymatischen Riboflavin-Synthesen werden sämtliche Intermediate der Riboflavinbiosynthese durchlaufen. Somit ergibt sich durch Weglassen einzelner Enzyme die Möglichkeit, auch diese Zwischenstufen in stabilisotopmarkierter Form herzustellen. Die isotopologen Intermediate stellen wertvolle Hilfsmittel für kinetische und mechanistische Studien an den nachfolgenden Enzymen des Biosynthesewegs dar. Insbesondere konnten mehrere Enzyme der bisher nicht im Detail beschriebenen Riboflavinbiosynthese von Archaea und Pflanzen durch Verwendung  $^{13}\text{C}$ -markierter Zwischenstufen näher charakterisiert werden, darunter die 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat-Synthase, die GTP-Cyclohydrolase III, die Reduktase und die Riboflavin-Synthase des thermophilen Archaeobakteriums *M. jannaschii* sowie die Pyrimidin-Desaminase aus *A. thaliana*.

### 3.5.1 Untersuchungen zum Mechanismus der 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat-Synthase aus *M. jannaschii*

Über die Biosynthese von Riboflavin in Archaea war bis vor kurzem nur wenig bekannt. Eine *in vivo* Studie mit *Methanobacterium thermoautotrophicum*, bei der  $[\text{U-}^{13}\text{C}_2]$ Acetat und  $[\text{1-}^{13}\text{C}_1]$ Pyruvat als Tracer benutzt wurden, deutete darauf hin, dass der Xylolring des Vitamins auch dort aus zwei 4-Kohlenstoffeinheiten aufgebaut wird (Eisenreich *et al.*, 1991). Außerdem wurde gezeigt, dass 5-Amino-6-Ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion ein Intermediat der archaealen Riboflavinbiosynthese sowie auch der Biosynthese des 5-Deaza-Derivats Coenzym  $\text{F}_{420}$  darstellt (Reuke *et al.*, 1992). Kürzlich wurde ein Gen für die 7,8-Didemethyl-8-hydroxy-5-deazariboflavin-Synthase identifiziert, welche den letzten Schritt der Bildung dieses methanogenen Flavin-Analogs katalysiert (Graham *et al.*, 2003). Außerdem wurde eine Lumazinsynthase aus *M. jannaschii* gefunden, die den bisher bekannten Lumazinsynthasen aus Eubakterien und Eukaryonten ähnelt (Haase *et al.*, 2003).

Der offene Leserahmen MJ0055 von *M. jannaschii* codiert ein Protein mit erkennbarer Sequenzhomologie zur 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat-Synthase von *E. coli*. Das Protein wurde unter Verwendung eines für die Expression in *E. coli* optimierten synthetischen Gens kloniert und rekombinat exprimiert. Die Charakterisierung des gereinigten

Proteins durch Massenspektrometrie und analytische Ultrazentrifugation ergab eine homodimere Struktur mit einer Masse von 26 kDa je Untereinheit (Fischer *et al.*, 2002b). Diese konnte später durch Röntgenstrukturanalyse bestätigt werden (Steinbacher *et al.*, 2003).

Die durch das rekombinante Enzym katalysierte Reaktion wurde mittels  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie in Echtzeit verfolgt, indem  $[\text{U-}^{13}\text{C}_5]\text{Ribulose-5-phosphat}$  als Substrat eingesetzt wurde. Das bei der Fragmentierung des Substrats frei werdende Formiat zeigt sich im NMR-Spektrum als Singulett bei 170.9 ppm. Die anderen vier Signale in Zeile A von Abbildung 3.36 sind aufgrund von  $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$ - und  $^{13}\text{C}^{31}\text{P}$ -Kopplungen komplexe Multipletts. Die NMR-Daten des Produkts sind in Tabelle 3.11 zusammengefasst.

| Position | chemische Verschiebung | Kopplungskonstanten  |                      |
|----------|------------------------|----------------------|----------------------|
|          | $\delta$ [ppm]         | $J_{\text{CC}}$ [Hz] | $J_{\text{CP}}$ [Hz] |
| 1        | 25.7                   | 40.9 (2)             |                      |
|          |                        | 13.1 (3)             |                      |
| 2        | 211.7                  | 40.9 (1)             |                      |
|          |                        | 41.0 (3)             |                      |
|          |                        | 41.0 (2)             |                      |
| 3        | 76.5                   | 40.0 (4)             | 7.5                  |
|          |                        | 13.1 (1)             |                      |
| 4        | 66                     | 40.0 (3)             | 4.9                  |

Tabelle 3.11: NMR-Daten von 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat.

Das "Dublett von Dubletts" bei 25.7 ppm entspricht der C-1 Methylgruppe von 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat, welche mit einer Kopplungskonstante von 40.9 Hz zum C-2 Atom und mit 13.1 Hz über die Carbonylgruppe hinweg zum C-3 Atom koppelt. Die Carbonylgruppe des Enzymprodukts erscheint aufgrund von Kopplungen zu C-1 und C-3 als Pseudotriplett bei 211.7 ppm. Das Signal des C-3 Atoms bei 76.5 ppm ist ein komplexes Multiplett aufgrund Kopplungen zu C-2 und C-4 mit etwa 40 Hz sowie weiter reichenden Kopplungen zu C-1 (13.1 Hz) und Phosphor (7.5 Hz). C-4 erscheint als Dublett von Dubletts bei 66.0 ppm mit Kopplungen zu C-3 und Phosphor. Das  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum identifiziert das Enzymprodukt eindeutig als  $[\text{U-}^{13}\text{C}_4]\text{3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat}$ .

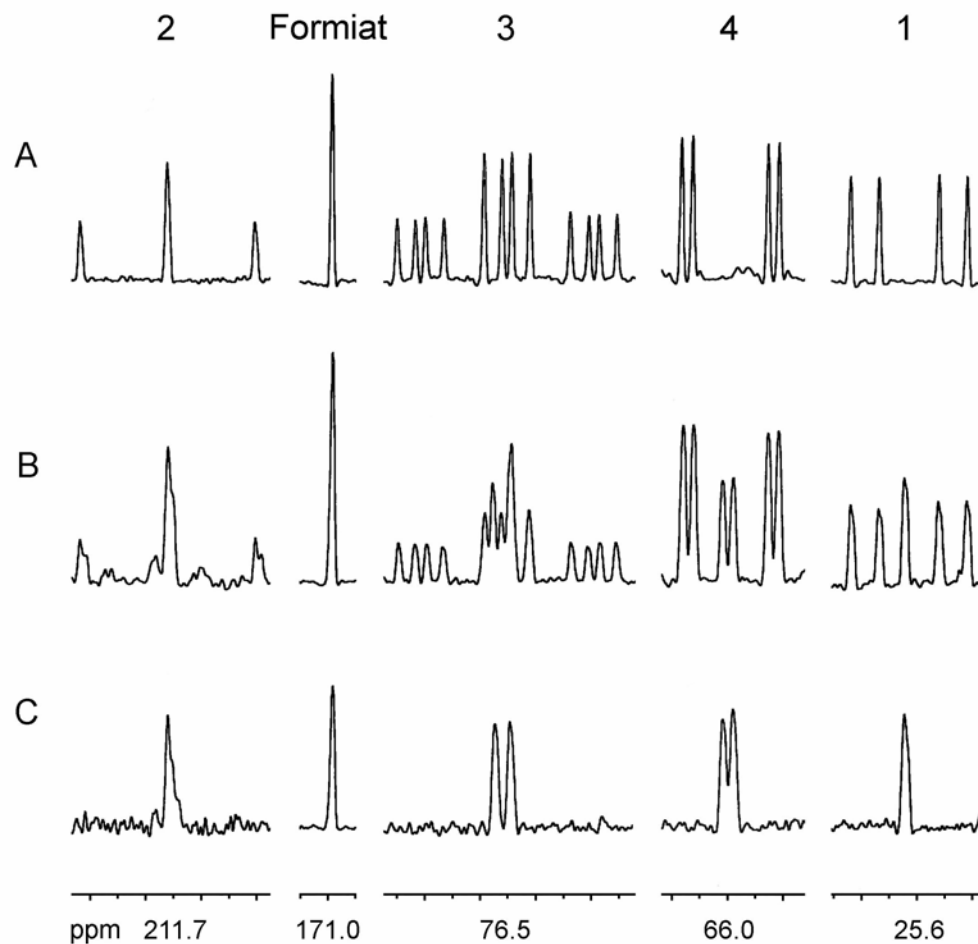


Abb. 3.36:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren von 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-Phosphat aus A:  $[\text{U-}^{13}\text{C}_5]$ -Ribulose-5-phosphat, B: einer 1:25 Mischung aus  $[\text{U-}^{13}\text{C}_5]$  und unmarkiertem Ribulose-5-phosphat und C: unmarkiertem Ribulose-5-phosphat.

Abbildung 3.36 (Zeile C) zeigt das  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von unmarkiertem 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat, welches aus unmarkiertem Ribulose-5-phosphat gewonnen wurde. Die Signale für die Kohlenstoffatome C-3 und C-4 weisen  $^{13}\text{C}^{31}\text{P}$ -Kopplungen auf. Die Verwendung von  $^{13}\text{C}$ -markiertem Substrat bewirkt eine über 90 % bessere Empfindlichkeit bei der Detektion des abgespaltenen Formiats, was für die Restaktivitätsbestimmung einiger weiter unten beschriebenen mutierten Proteine unabdingbar war. Bei der enzymatischen Umsetzung einer Substratmischung aus  $[\text{U-}^{13}\text{C}_5]$ Ribulose-5-phosphat und unmarkiertem Ribulose-5-phosphat im Verhältnis 1:25 mit der 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat-Synthase aus *M. jannaschii* erhielt man das in Abb. 3.36 (Zeile B) gezeigte Spektrum. Dieses stellt eine Überlagerung der beiden zuvor beschriebenen Spektren A und C dar, wie für das C-3 Signal in Abb. 3.37 mit simulierten NMR-Spektren nochmal ausführlich dargestellt ist.

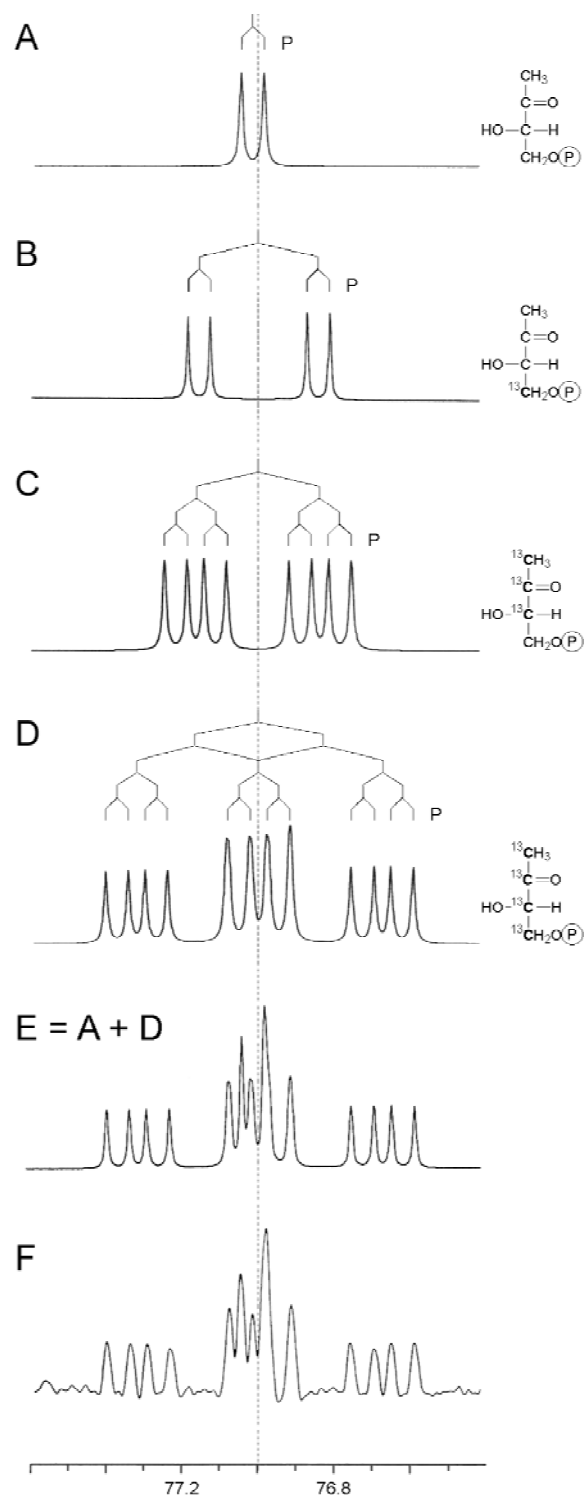


Abb. 3.37: Simulierte  $^{13}\text{C}$ -NMR-Signale für das C-3 Atom isotopologer 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Moleküle. A: unmarkiert B:  $[4\text{-}^{13}\text{C}_1]$ , C:  $[1,2,3\text{-}^{13}\text{C}_3]$ , D:  $[\text{U-}^{13}\text{C}_4]$ , E: Überlagerung der Spektren A und D. F: experimentelles  $^{13}\text{C}$ -NMR-Signal für das C-3 von 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat aus einer 1:25 Mischung von  $[\text{U-}^{13}\text{C}_5]$ Ribulose 5-Phosphat und unmarkiertem Ribulose-5-phosphat.

Die enzymkatalysierte Reaktion erfordert zwei Bindungsbrüche zwischen C-3 und C-4 sowie zwischen C-5 und C-4 und die Bildung einer neuen Bindung zwischen C-3 und C-5 des Substrats. Eine intermolekulare Rekombination je eines markierten und unmarkierten Substratmoleküles würde die Bildung teilmarkierter Produkte bedeuten. Genauer gesagt müsste in diesem Fall die Bildung von  $[1,2,3\text{-}^{13}\text{C}_3]$ - und  $[4\text{-}^{13}\text{C}_1]$ 3,4-Dihydroxy-2-butanon-

4-phosphat zu beobachten sein. Die simulierten  $^{13}\text{C}$ -NMR-Signale für das C-3 Atom dieser Isotopologe sind in Abbildung 3.37 dargestellt. Das aus der Substratmischung erhaltene Produktspektrum ist jedoch mit einer Überlagerung der Einzelspektren für unmarkiertes bzw. vollmarkiertes Substrat identisch. Daraus kann gefolgert werden, dass die Reaktion und die Bindungsknüpfung zwischen C-3 und C-5 des Substrats streng intramolekular abläuft.

Da bekanntermaßen beide Enantiomere, also sowohl die D-Form als auch die L-Form von 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat als Substrat für die 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin-Synthase von *B. subtilis* fungieren (Kis *et al.*, 1995), wurde mittels CD-Spektroskopie die absolute Konfiguration des Produkts des *M. jannaschii* Enzyms bestimmt (Fischer *et al.*, 2002b). Dabei zeigte sich, dass dieses ebenso wie die Produkte der eubakteriellen Enzyme die L-Konfiguration aufweist. Archaea und Eubakterien erzeugen demnach aus Ribulose-5-phosphat das gleiche Intermediat um den Xylolring des Riboflavinmoleküls aufzubauen.

Sequenzvergleiche zeigten, dass 17 polare Aminosäuren in den verschiedenen mutmaßlichen 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat-Synthasen von Mikroorganismen und Pflanzen absolut konserviert sind. Insbesondere zeigt eine kurze Folge geladener Aminosäuren von Position 21 bis 30 einen hohen Grad an Konservierung (Abb. 3.38). NMR-Studien am Enzym-Substrat Komplex haben gezeigt, dass auch die Reste der konservierten Aminosäuren Thr-112, Thr-115, Asp-118, Arg-119 und Thr-122 mit dem Substrat interagieren (Kelly *et al.*, 2001).

Der hypothetische Reaktionsmechanismus (Abb. 3.39) läßt für die Säure/Base-Katalyse eine entscheidende Rolle vermuten und polare Liganden sind sehr wahrscheinlich an der Interaktion des Proteins mit dem essentiellen zweiwertigen Metallion ( $\text{Mg}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ ) beteiligt. Die Kristallstruktur der 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat-Synthase aus *E. coli* im Komplex mit Glycerin, welches vermutlich als verkürztes Substratanalogon ans aktive Zentrum bindet, ist ebenfalls mit der Hypothese im Einklang, dass der "loop" aus konservierten sauren Aminosäureresten direkt an der Katalyse beteiligt ist (Liao *et al.*, 2002).

|   |                                |
|---|--------------------------------|
| <i>Aquifex aeolicus</i>                     | IRQGMVIVVDDPDRENEGDLVMAAEKVTP  |
| <i>Archaeoglobus fulgidus</i>               | FRKGSPLIYDFEDREGETDIAIPAIHV GK |
| <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>      | IRQKIIILVTDDRENEGDFICAAEFATP   |
| <i>Arabidopsis thaliana</i>                 | IRQKLVVVVDDENRENEGDLVMAAQLATP  |
| <i>Bacillus subtilis</i>                    | LKKGEVIVVDDRENEGDFVALAEHATP    |
| <i>Deinococcus radiodurans</i>              | LRAGRPVILVDDRENEGDLLMPAATATP   |
| <i>Escherichia coli</i>                     | LRGRGVMVLDRENEGDMIFPAETMTV     |
| <i>Haemophilus influenza</i>                | FKNGTGVLVLDRENEGDLIFPAETITP    |
| <i>Helicobacter pylori</i>                  | YKNGEMLIVMDDRENEGDLVLAGIFSTP   |
| <i>Lycopersicon esculentum</i>              | IRQKMVLVTDDRENEGDLVMAASKATP    |
| <i>Methanococcus jannaschii</i>             | LKKGEIILVYDSEREGETDMVVASQFITP  |
| <i>Mycobacterium leprae</i>                 | IAAGKAVVVIDRENEGDLIFAAEKATL    |
| <i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i> | LRRGEIVLVFDADNRERETDMIVAAEKIKP |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i>             | FKQNKFVIVMDDAGRENEGDLICAAENVST |
| <i>Schizosaccharomyces pombe</i>            | FRDGKFLIVLDRENEGDLIIAGCKVTT    |

Abb. 3.38: Sequenz Alignment (Positionen 11–40) von 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat-Synthasen aus verschiedenen Organismen. Ein Ersatz der markierten Aminosäuren ergibt mutierte Proteine mit einem drastischem Aktivitätsverlust gegenüber dem Wildtyp-Enzym (Fischer *et al.*, 2002b).

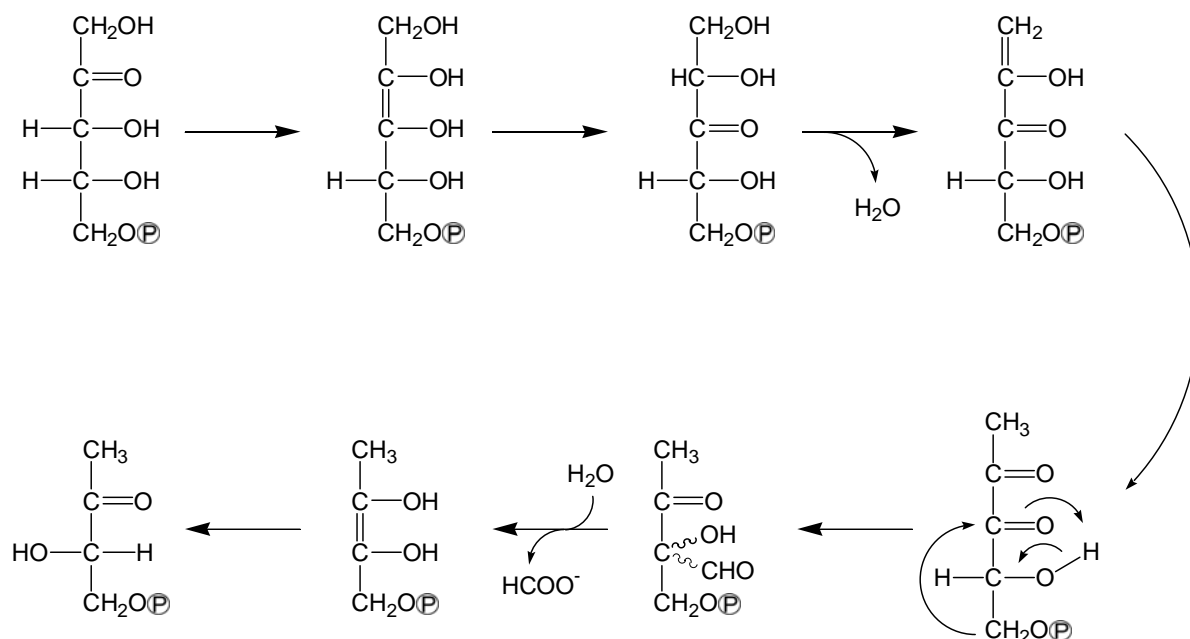


Abb. 3.39: Hypothetischer Reaktionsmechanismus der 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat-Synthase (Volk und Bacher, 1988).

Anhand von Experimenten mit  $^{18}\text{O}$  angereichertem Puffer konnte gezeigt werden, dass im Mittel 1,2 Sauerstoffatome aus dem wässrigen Lösungsmittel in das enzymatisch freigesetzte Formiat eingebaut werden, obwohl die Stöchiometrie der Reaktion nur ein inkorporiertes Sauerstoffatom aus dem Lösungsmittel vermuten lässt. Das überschüssige, im Formiat



gefundene  $^{18}\text{O}$  deutet auf einen reversiblen Austausch von Sauerstoff zwischen einem carbonylartigen Reaktionsintermediat und Wasser hin.

Das synthetische Gen für die 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat-Synthase aus *M. jannaschii* konnte mit Hilfe verschiedener experimenteller Techniken einfach mutiert werden. Insgesamt konnten 33 mutierte Gene effizient in *E. coli* exprimiert werden. Die kinetischen steady-state Parameter der gereinigten rekombinanten Enzyme wurden zunächst von Dr. Susanne Schiffmann mit Hilfe eines gekoppelten photometrischen Enzymassays bestimmt, der sich der 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin-Synthase als Reporterenzym bedient. Ein Ersatz von Glutamat 26, 28 oder 185, Aspartat 21 oder 30, Histidin 164 oder Arginin 25 lieferte Proteine deren relative Aktivität in den meisten Fällen unterhalb 0.7 % lag. Mutanten die durch den Ersatz von Arginin 119 oder 161, Threonin 165 oder Glutamat 166 erhalten wurden, behielten eine signifikante enzymatische Aktivität, aber ihre  $K_m$  Werte waren in etwa 10 fach erhöht (Tabelle 3.12).

Die Sensitivität des photometrischen Enzymassays, der die Bildung von 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin detektiert, wird durch die Stabilität von 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat und 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion begrenzt. Die relativ großen  $K_m$  Werte und die relativ geringe Umsatzrate des Hilfsenzym 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin-Synthase begrenzen die Genauigkeit des Verfahrens noch weiter, insbesondere bei den mutierten Enzymen mit geringer Restaktivität.

Dagegen hat Formiat, das zweite Produkt der 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat-Synthase, den Vorteil nahezu unbegrenzter Stabilität. Daher konnte mittels  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie die enzymkatalysierte Entstehung des Formiats direkt in Echtzeit gemessen werden (Abb. 3.40). Um die Empfindlichkeit der NMR-Detektion zu steigern, wurde  $[\text{U-}^{13}\text{C}_5]\text{Ribulose-5-phosphat}$  als Substrat verwendet.

Für das Wildtyp Enzym wurde mit diesem Assay eine spezifische Aktivität von  $174 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  bei 310 K gemessen im Vergleich zu  $148 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  im Photometerassay. Aus dem Arrheniusplot (Abb. 3.41) wurden Aktivierungsenergien von 61 kJ/mol (NMR-Assay) bzw. 55 kJ/mol (Photometerassay) berechnet. Die beiden Methoden ergaben auch für mutierte Proteine mit relativ hoher Restaktivität ähnliche Werte (Tabelle 3.12).

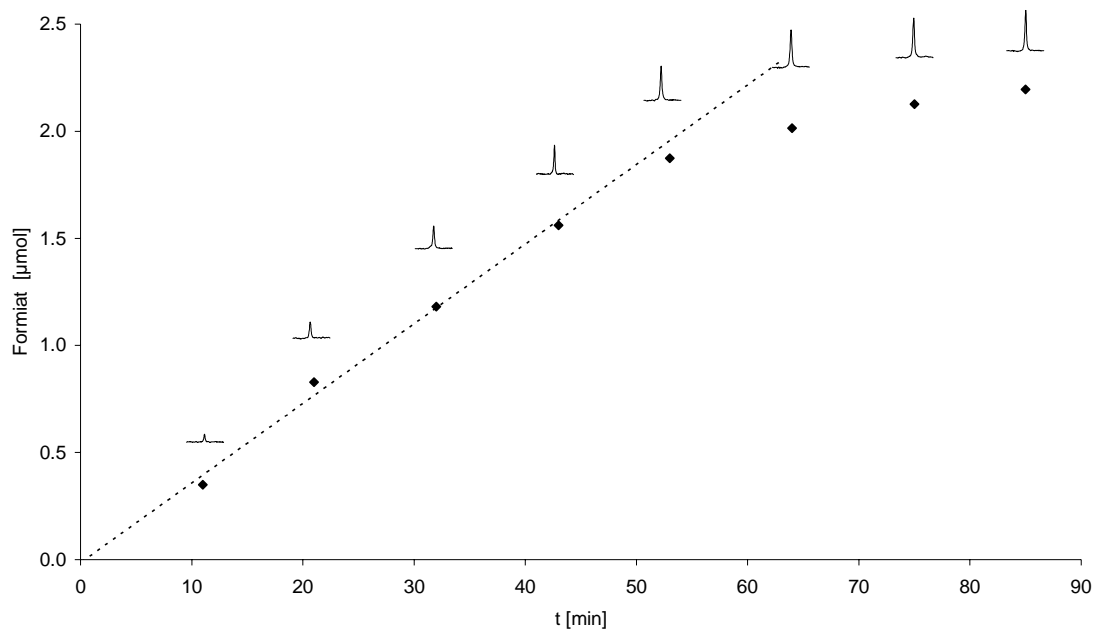


Abb. 3.40: Aktivitätsbestimmung der 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat-Synthase von *M. jannaschii*. Die Bildung von  $^{13}\text{C}$ -Formiat wurde mittels NMR-Spektroskopie in Zeitabständen von 10 min verfolgt. Die spezifische Aktivität des Enzyms ergibt sich aus der Anfangssteigung der Kurve und der eingesetzten Proteinmenge.

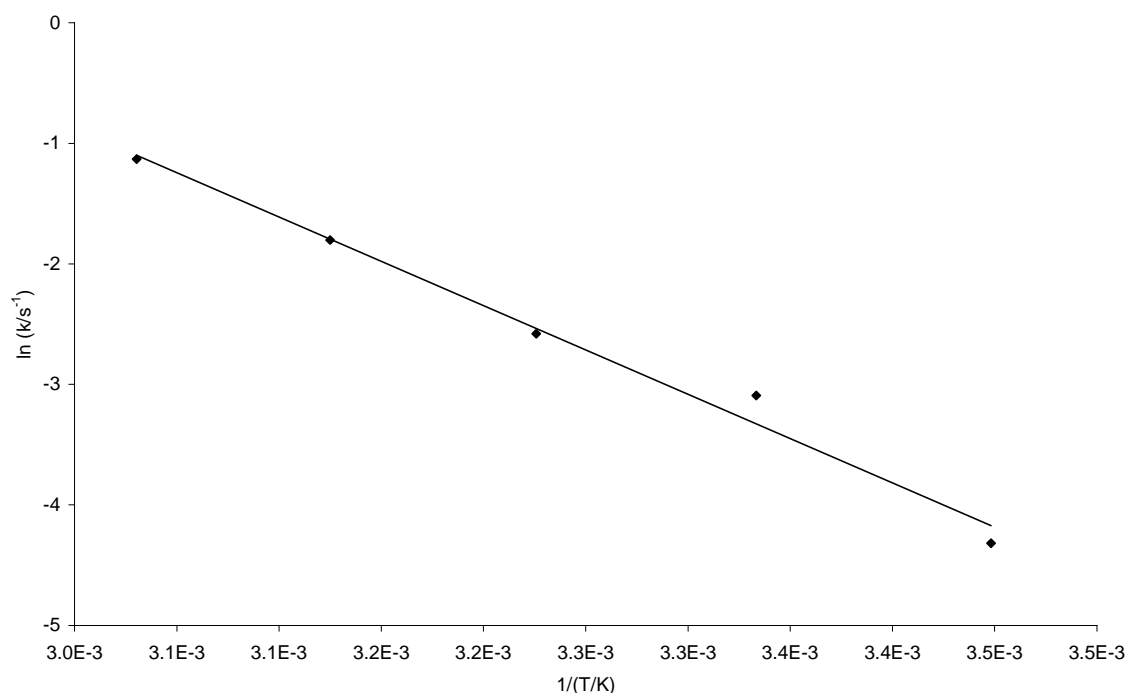


Abb. 3.41: Arrheniusplot für die 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat-Synthase von *M. jannaschii*. Mit dem NMR-Assay wurden Ratenkonstanten im Temperaturbereich von 290 - 330 K ermittelt. Aus der Steigung der Geraden  $\ln k$  gegen  $1/T$  ergibt sich nach der Gleichung  $E_A = - RT \ln k$ , eine Aktivierungsenergie von 61 kJ/mol.

| Protein  | $v_{\max}^a$<br>[nmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> ] | $v_{\max}^b$<br>[nmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> ] | $K_M^a$<br>[μM] | Accession<br>number |
|----------|--|--|-----------------|---------------------|
| wild typ | 148  | 174  | 140             | AF490554            |
| D21E     | <1   | <0.04  |                 | AF490552            |
| D21N     | <1   | <0.04  |                 | AF490551            |
| D21S     | 2  | 0.5  |                 | AF490553            |
| S22A     | 76   | 113  | 437             | AF490561            |
| D23S     | 33   |  | 453             | AF490550            |
| R25E     | 3  |  |                 | AF490567            |
| R25K     | 1.1  | 0.1  |                 | AF490563            |
| E26D     | <1   | <0.04  |                 | AF490557            |
| E26Q     | <1   | <0.04  |                 | AF490572            |
| E26S     | <1   |  |                 | AF490570            |
| E28D     | <1   | <0.04  |                 | AF516684            |
| E28Q     | 6.4  | 2.3  |                 | AF490569            |
| E28S     | <1   |  |                 | AF490571            |
| D30E     | <1   | <0.04  |                 | AF490549            |
| D30N     | <1   |  |                 | AF490548            |
| D30S     | 5  | 0.61   |                 | AF490547            |
| C55S     | 44   |  | 191             | AF490541            |
| C55G     | 19   |  | 927             | AF490542            |
| T112A    | 3  | 0.07   | 1 415           | AF490562            |
| T115A    | 38   |  | 264             | AF490560            |
| D118S    | 27   |  | 253             | AF490543            |
| R119S    | 17   |  | 1 200           | AF490564            |
| T122A    | 60   | 70   | 126             | AF490566            |
| H147S    | 18   |  | 41              | AF490573            |
| R161S    | 15   |  | 1 026           | AF490559            |
| H164N    | <1   | <0.04  |                 | AF490556            |
| H164S    | <1   |  |                 | AF490555            |
| T165S    | 54   |  | 74              | AF490568            |
| T165A    | 74   |  | 1 116           | AF490565            |
| E166S    | 39   |  | 1 054           | AF490546            |
| E185D    | <1   | <0.04  |                 | AF490545            |
| E185Q    | <1   |  |                 | AF490544            |
| E185S    | <1   |  |                 | AF490558            |

Tabelle 3.12: Mutanten der 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat-Synthase aus *M. jannaschii*. a: kinetische Daten des Photometerassays, b: kinetische Daten des NMR-Assays (Fischer *et al.*, 2002b).

Mutierte Proteine mit geringer oder nicht detektierbarer Restaktivität wurden mit Hilfe des NMR-Assays nochmals genauer analysiert. Durch Verwendung hoher Enzymkonzentrationen konnte ein Detektionslimit von 40 pmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> erreicht werden. Dies entspricht der Umsetzung eines Substratmoleküls pro katalytischem Zentrum innerhalb von 16 h. Selbst bei

dieser Empfindlichkeit konnte bei folgenden Mutanten-Proteinen keine Bildung von Formiat nachgewiesen werden: D21E, D21N, E26D, E26Q, E28D, D30E, H164N und E185D.

### 3.5.2 Studien zur Kinetik der GTP-Cyclohydrolase II aus *Candida albicans* und *Candida glabrata*

Der erste Schritt des von GTP ausgehenden Zweigs der Riboflavinbiosynthese ist die hydrolytische Öffnung des Imidazolrings und die Abspaltung von C-8 als Formiat sowie eines anorganischen Pyrophosphatrestes (siehe Abb. 1.2). Diese Reaktion wird von der GTP Cyclohydrolase II katalysiert und findet in Eubakterien (Foor und Brown, 1975 und 1980) und Pilzen (Shavlovsky *et al.*, 1976 und 1980) in gleicher Weise statt, während sich die Reihenfolgen der späteren Schritte, die Desaminierung an Position C-2 und die Reduktion des Ribosylrestes, in verschiedenen Organismen unterscheiden.

*C. albicans* und *C. glabrata* sind humanpathogene Hefen, die über Genital- und Darmbereich immungeschwächter Patienten ernsthafte und schwer behandelbare systemische Infektionen verursachen können. Durch die sich weltweit ausbreitenden HIV-Infektionen hat sich dieses Problem in den letzten Dekaden zusätzlich verschärft. Medikamente zur systemischen Behandlung von Pilzerkrankungen haben oft unerwünschte Nebenwirkungen aufgrund ihrer relativ hohen Toxizität. Generell besteht ein Mangel an wirksamen und gut verträglichen Antimykotika für systemische Anwendung.

Die Enzyme der Riboflavinsynthese stellen potentielle Angriffspunkte für die Entwicklung antimykotischer Wirkstoffe dar, da neben pathogenen Eubakterien (Shavlovsky *et al.*, 1982) mit hoher Wahrscheinlichkeit auch pathogene Hefen (Oltmanns *et al.*, 1969; Shavlovsky *et al.*, 1979) kein Transportsystem für exogenes Riboflavin besitzen und somit zwingend auf die eigene Biosynthese des Vitamins angewiesen sind.

Potentielle GTP-Cyclohydrolasen II von *C. albicans* und *C. glabrata* wurden, aufgrund von Sequenzhomologien offener Leserahmen zu dem Enzym aus *E. coli* unter Verwendung codonoptimierter synthetischer Gene für die Expression in *E. coli* kloniert und näher charakterisiert. Es handelt sich um homodimere Proteine mit Untereinheiten von ca. 37 kDa. Für maximale Aktivität werden divalente Kationen, vorzugsweise Cobalt oder Magnesium benötigt. Mittels AAS wurde ein Zinkatom pro Untereinheit gefunden.

Die Reaktion der GTP-Cyclohydrolase II aus *C. albicans* mit  $[U-^{13}C_{10}, U-^{15}N_5]GTP$  als Substrat wurde mittels  $^{13}C$ -NMR-Spektroskopie verfolgt und die zeitabhängigen Integrale des  $^{13}C$ -Formiatpeaks bei 171 ppm zur Aktivitätsbestimmung herangezogen (Abb 3.42), wie es bereits im vorherigen Kapitel für die Reaktion der 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat-Synthase ausführlich beschrieben wurde. Der auf diese Weise ermittelte Wert für die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion liegt bei  $450 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ .

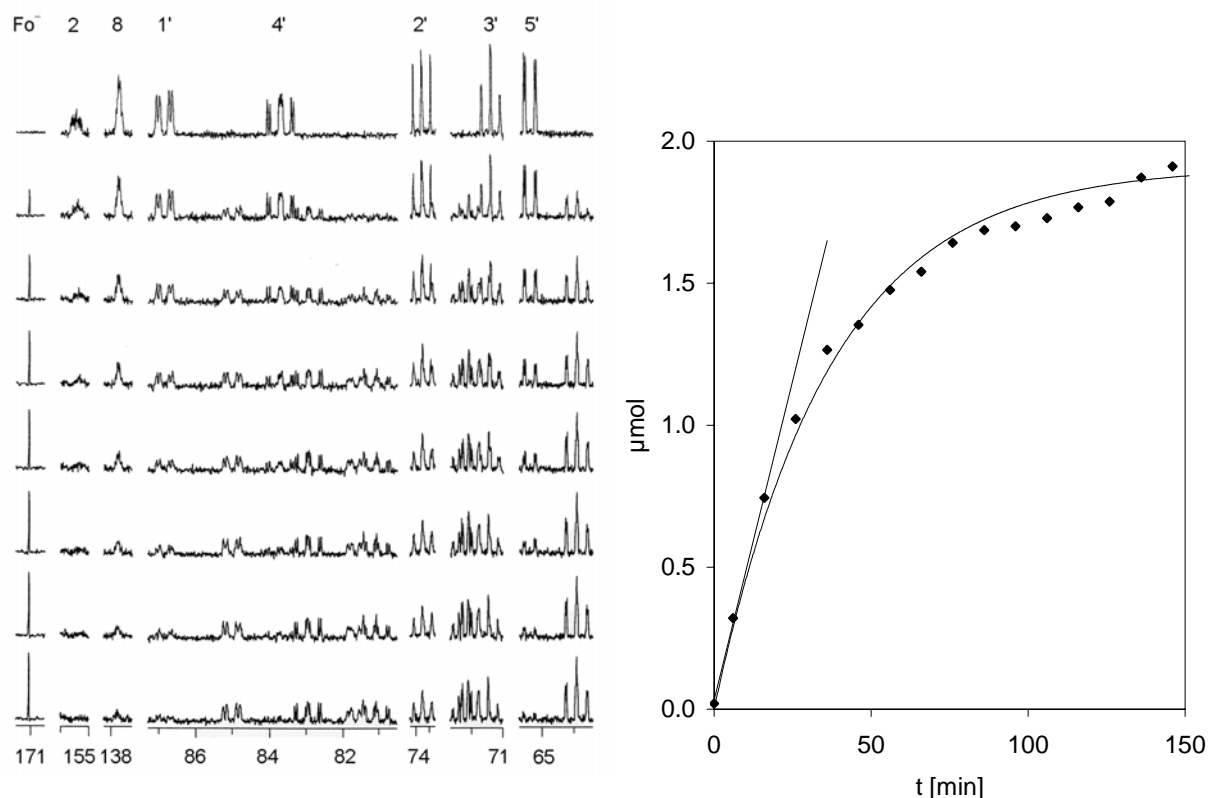


Abb. 3.42: Reaktionsdynamik der GTP-Cyclohydrolase von *C. albicans*. Linke Seite: Zeitaufgelöste Serie von  $^{13}C$ -NMR-Spektren mit  $[U-^{13}C_{10}, U-^{15}N_5]GTP$  als Substrat. Rechte Seite: Quantitative Auswertung der Entstehung des Formiat signals.

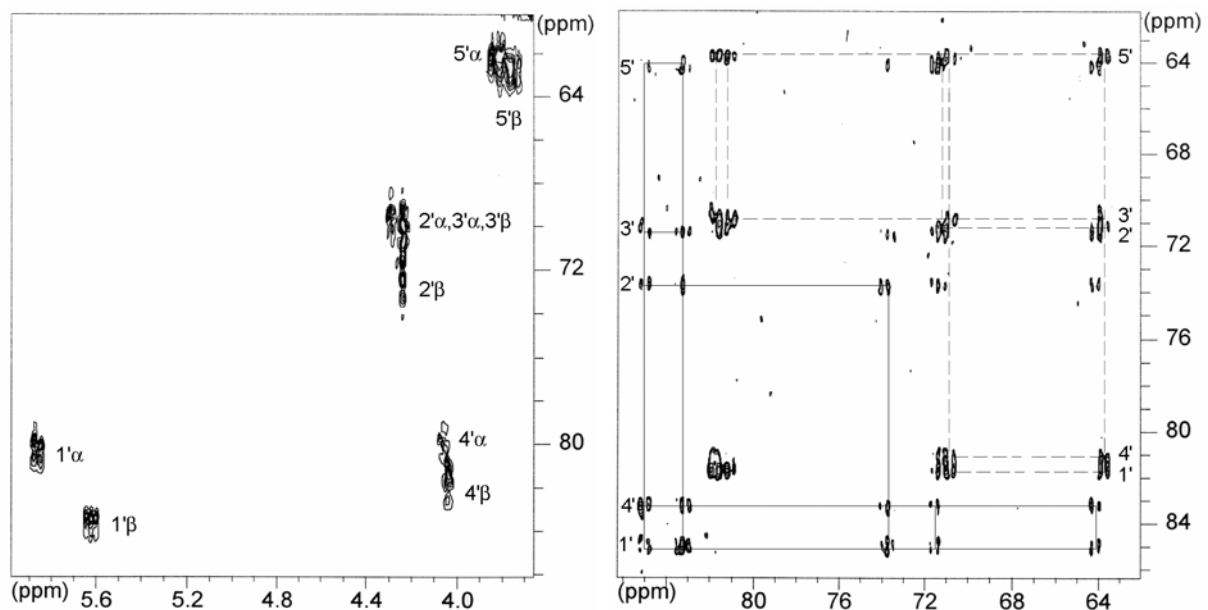


Abb. 3.43: 2D NMR-Spektren von 2,5-Diamino-6-ribosylamino-4(3H)-pyrimidinon-5'-phosphat. Linke Seite:  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -Korrelationspektrum (HMQC). Rechte Seite:  $^{13}\text{C}$  TOCSY, die Spinsysteme des  $\beta$ - bzw.  $\alpha$ -Anomers sind mit durchgezogenen bzw. gestrichelten Linien gekennzeichnet.

Neben Formiat entstehen zwei Produkte die mittels zweidimensionaler NMR-Techniken als  $\alpha$ - und  $\beta$ -Anomere von 2,5-Diamino-6-ribosylamino-4(3H)-pyrimidinon-5'-phosphat identifiziert werden konnten. Im HMQC Spektrum sind für den Zuckerbereich zehn  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -Korrelationen zu erkennen, was einem doppelten Signalsatz entspricht (Abb 3.43 linke Seite). Mit Hilfe des  $^{13}\text{C}$ -TOCSY-Spektrums konnten diese Signale zwei verschiedenen Spinsystemen und somit den jeweiligen Anomeren zugeordnet werden (Abb 3.43 rechte Seite). Die gewonnenen NMR-Daten der GTP-Cyclohydrolase II Produkte stimmen weitgehend mit früheren Untersuchungen von Ritz *et al.* (2001) überein.

Darüber hinaus wurden die Reaktionen beider *Candida* Enzyme mit  $[1\text{'-}^{13}\text{C}_1]\text{GTP}$  als Substrat beobachtet. Dabei erhält man, aufgrund fehlender Kopplungspartner, jeweils ein scharfes Singulett mit hoher Intensität für GTP und die beiden Produktanomeren. Da sich die Markierung im Produkt am anomeren Kohlenstoffatom befindet unterscheiden sich die beiden Signale in ihren chemischen Verschiebungen mit 85.1 bzw. 81.7 ppm deutlich voneinander. Ein Formiatensignal ist bei dieser Spektrenserie nicht zu erkennen, da die Position C-8 im Edukt nicht markiert war.

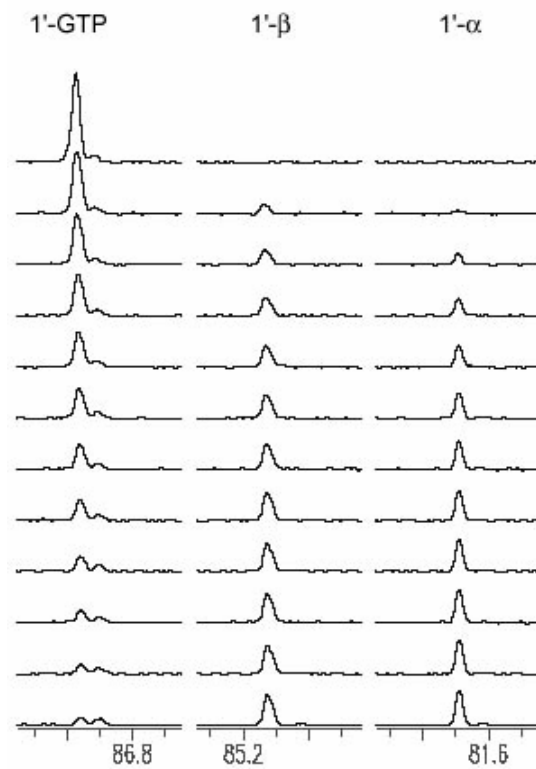


Abb 3.44: Zeitaufgelöste <sup>13</sup>C-NMR-Spektren der GTP-Cyclohydrolase II aus *C. albicans* mit [1'-<sup>13</sup>C<sub>1</sub>]GTP als Substrat.

Die Signalintensitäten der drei Reaktionsteilnehmer, GTP, β- und α-Anomer wurden für beide Enzyme quantitativ ausgewertet (Abb. 3.45). Neben der höheren Aktivität des *C. albicans* Enzyms erkennt man, dass die β-Anomere das primär gebildete Produkt darstellen, während die α-Anomere zeitlich verzögert entstehen.

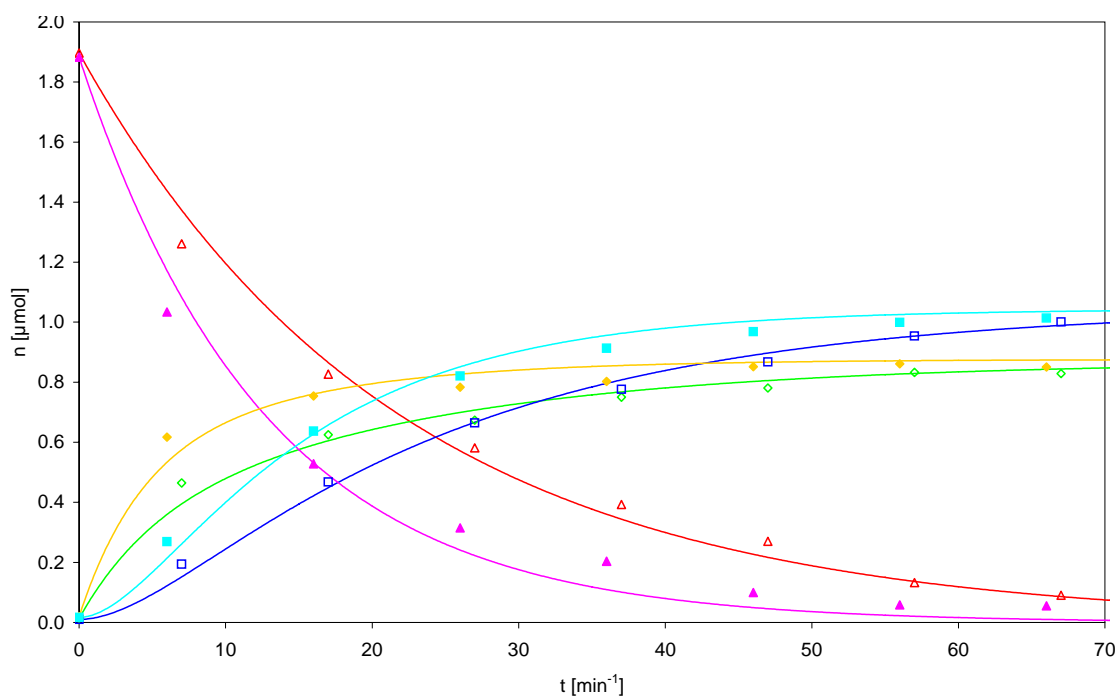


Abb. 3.45: Reaktionskinetik der GTP-Cyclohydrolase II aus *C. albicans*/*C. glabrata* (gefüllte/offene Symbole). Dargestellt ist jeweils der zeitliche Verlauf der Stoffmengen von GTP (violett/rot) sowie der  $\beta$ - (gelb/grün) und  $\alpha$ -Anomere (hellblau/blau) von 5,6-Diamino-6-ribosylamino-4(3*H*)-pyrimidinon-5'-phosphat.

Die gesamte durch NMR-Spektroskopie beobachtbare Reaktionsfolge kann somit durch folgendes Schema und die darin enthaltenen Ratenkonstanten dargestellt werden:

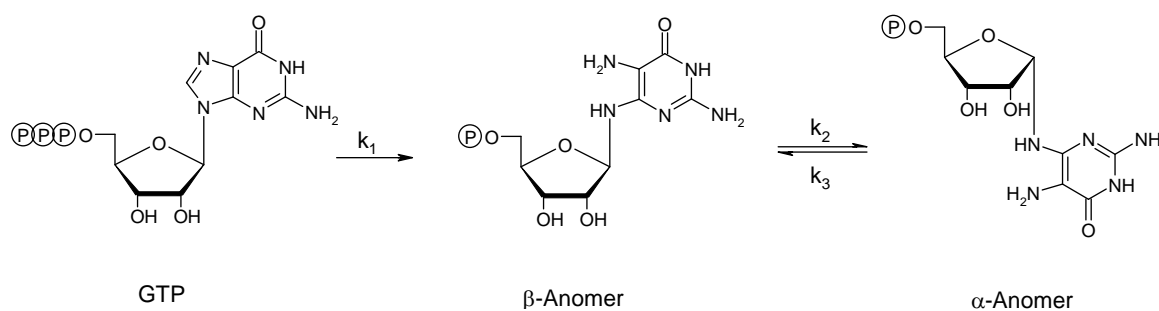


Abb. 3.46: Reaktionsschema der GTP-Cyclohydrolase II Reaktion.

Die zeitlichen Konzentrationsverläufe lassen sich mit den in Tabelle 3.13 angegebenen kinetischen Parametern in guter Übereinstimmung mit den experimentellen Daten durch folgende Differentialgleichungen erster Ordnung beschreiben.



| Differenzialgleichungen  | Parameter                  | <i>C. albicans</i> | <i>C. glabrata</i> |
|--|----------------------------|--------------------|--------------------|
| $\frac{dGTP}{dt} = -k_1 \cdot GTP$                                       | $k_1$ [min <sup>-1</sup> ] | 0.079              | 0.046              |
| $\frac{d\beta}{dt} = k_1 \cdot GTP - k_2 \cdot \beta + k_3 \cdot \alpha$ | $k_2$ [min <sup>-1</sup> ] | 0.134              | 0.113              |
| $\frac{d\alpha}{dt} = -k_3 \cdot \alpha + k_2 \cdot \beta$               | $k_3$ [min <sup>-1</sup> ] | 0.112              | 0.093              |

Tabelle 3.13: Differentialgleichungen und kinetische Parameter der GTP-Cyclohydrolase II Reaktion mit den Enzymen aus *C. albicans* und *C. glabrata*.

### 3.5.3 NMR-spektroskopische Charakterisierung der Reaktion einer archaealen GTP-Cyclohydrolase III

Es wurde bereits erwähnt, dass die Riboflavinbiosynthese in Archaeobakterien weit weniger erforscht ist, als in Eubakterien oder Hefen. Während man in den Genomen verschiedener komplett sequenzierter Archaea orthologe Sequenzen zu den Ribosyl-Reduktasen (Kapitel 3.5.5), 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin-Synthasen und 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat-Synthasen (Kapitel 3.5.1) anderer Organismen findet, wurden bisher kaum Orthologe für die GTP-Cyclohydrolase II, die Pyrimidin Desaminase und die Riboflavin-Synthase gefunden. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Archaea Riboflavin-Synthasen besitzen, welche Paraloge zu Lumazin-Synthasen darstellen (Kapitel 3.5.6).

Der offene Leserahmen MJ0145 von *M. jannaschii* codiert ein Enzym von dem man annimmt, dass es die hydrolytische Öffnung des Imidazolringes von GTP, die Abspaltung von PP<sub>i</sub>, nicht jedoch die Abspaltung von C-8 als Formiat katalysiert. Im Produkt dieses archaealen Enzyms wäre C-8 als Formamidgruppe erhalten (Graham *et al.*, 2002).

Nach Klonierung des Gens in einen *E. coli* Expressionsstamm konnte das thermostabile Protein mittels Hitzefällung anderer zellulärer Proteine und Ionenaustausch-Chromatographie in ausreichender Menge und Reinheit gewonnen werden. Hydrodynamische Untersuchungen ergaben ein Molekulargewicht von 120 kDa, was einer homotetrameren Struktur entspricht. Das pH Optimum des Mg<sup>2+</sup> abhängigen Enzyms liegt bei 8.5.

Mittels <sup>13</sup>C-NMR-Spektroskopie wurde die Reaktion mit [U-<sup>13</sup>C<sub>10</sub>,U-<sup>15</sup>N<sub>5</sub>]GTP als Substrat näher untersucht. Die Abbildungen 3.47 und 3.48 zeigen den Verlauf der Reaktion für den Bereich der Ribosylatome bzw. des Heteroaromaten. Aufgrund von <sup>13</sup>C<sup>13</sup>C- und <sup>13</sup>C<sup>15</sup>N-Kopplungen erscheinen sämtliche Signale als komplexe Multipletts. Im Zuckerbereich

zwischen 60 und 90 ppm erkennt man nach 16.5 h einen ähnlichen Signalsatz, wie für das weiter oben beschriebene Produkt der Cyclohydrolase II (vgl. Abb. 3.42). Daher kann wiederum auf das Vorliegen des Ribosylrestes in zwei anomeren Formen ( $\alpha/\beta$ ) geschlossen werden. Es fällt jedoch auf, dass die  $\alpha$ -Form in den ersten 80 min nicht auftritt, sondern erst deutlich später gebildet wird.

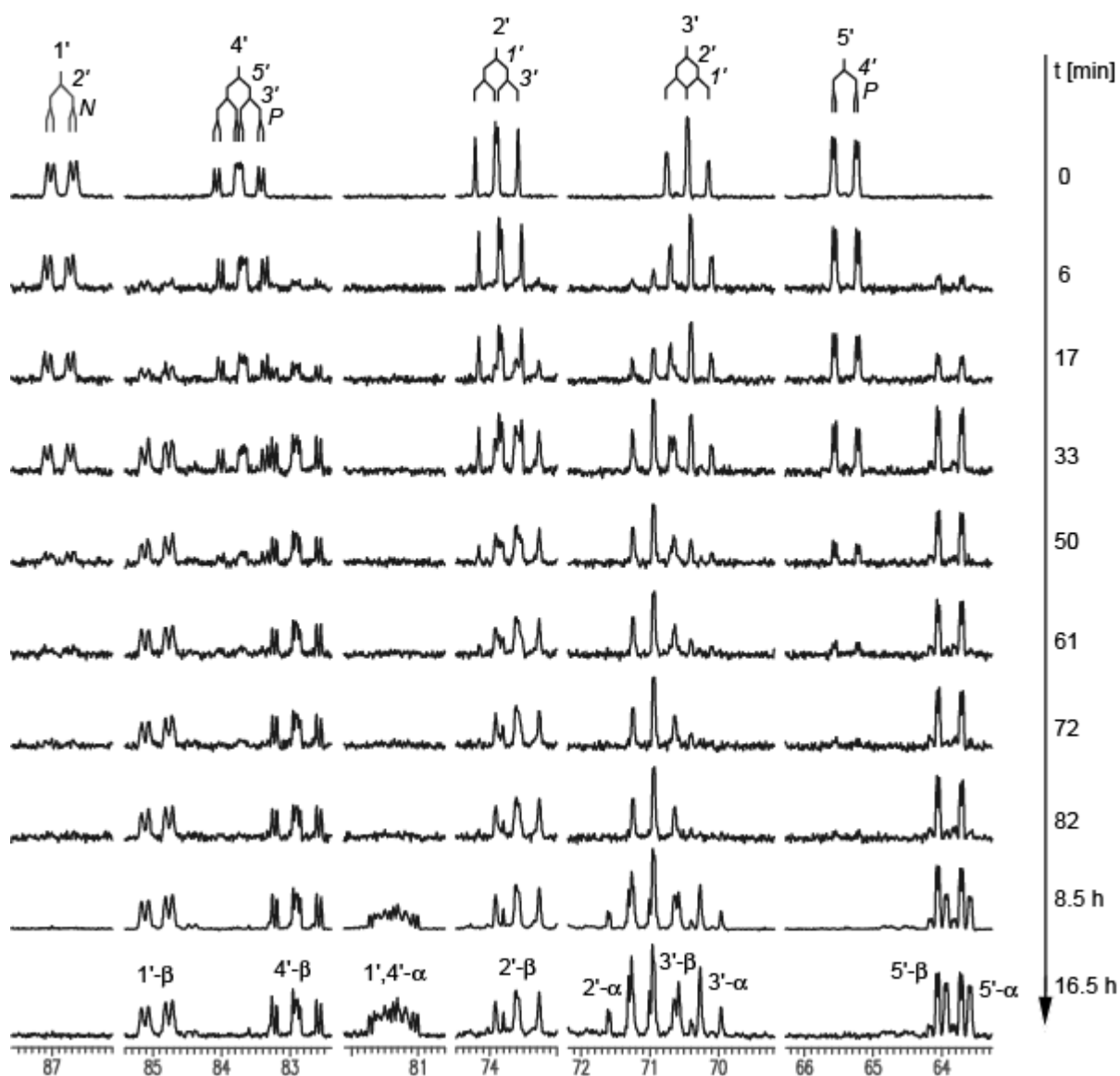


Abb. 3.47:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrenserie nach Zugabe der GTP-Cyclohydrolase III von *M. jannaschii* zu  $[\text{U-}^{13}\text{C}_{10}, \text{U-}^{15}\text{N}_5]\text{GTP}$  als Substrat (Zuckerbereich).

Die Aufspaltung der heterocyclischen Purin bzw. Pyrimidin  $^{13}\text{C}$ -Signale ist aufgrund vielfältiger  $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$ - und  $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -Kopplungen inklusive einiger Weitbereichskopplungen noch komplexer. Sie sind teils stark verbreitert und durch ein kleineres Signal/Rausch-Verhältnis

gekennzeichnet. Parallel zum Verschwinden des C-8 Signals von GTP treten nacheinander scharfe Dupletts bei 165.7, 170.5, 165.3 und 170.6 ppm auf, wobei die Signale bei 165 ppm deutlich intensiver sind, als die bei 170 ppm. In diesen Signalen weist das ursprüngliche C-8 Atom von GTP nur noch eine Kopplung von ca. 14 Hz zu einem  $^{15}\text{N}$ -Atom auf. Ein ähnlicher Signalsatz wurde von Bracher *et al.* (1999) im Produkt einer GTP-Cyclohydrolase I Mutante gefunden und den cis/trans-Isomeren von Formylaminogruppen in den jeweiligen  $\alpha/\beta$ -Anomeren eines 5-Formylamino-6-Ribosylamino-Pyrimidins zugeordnet.

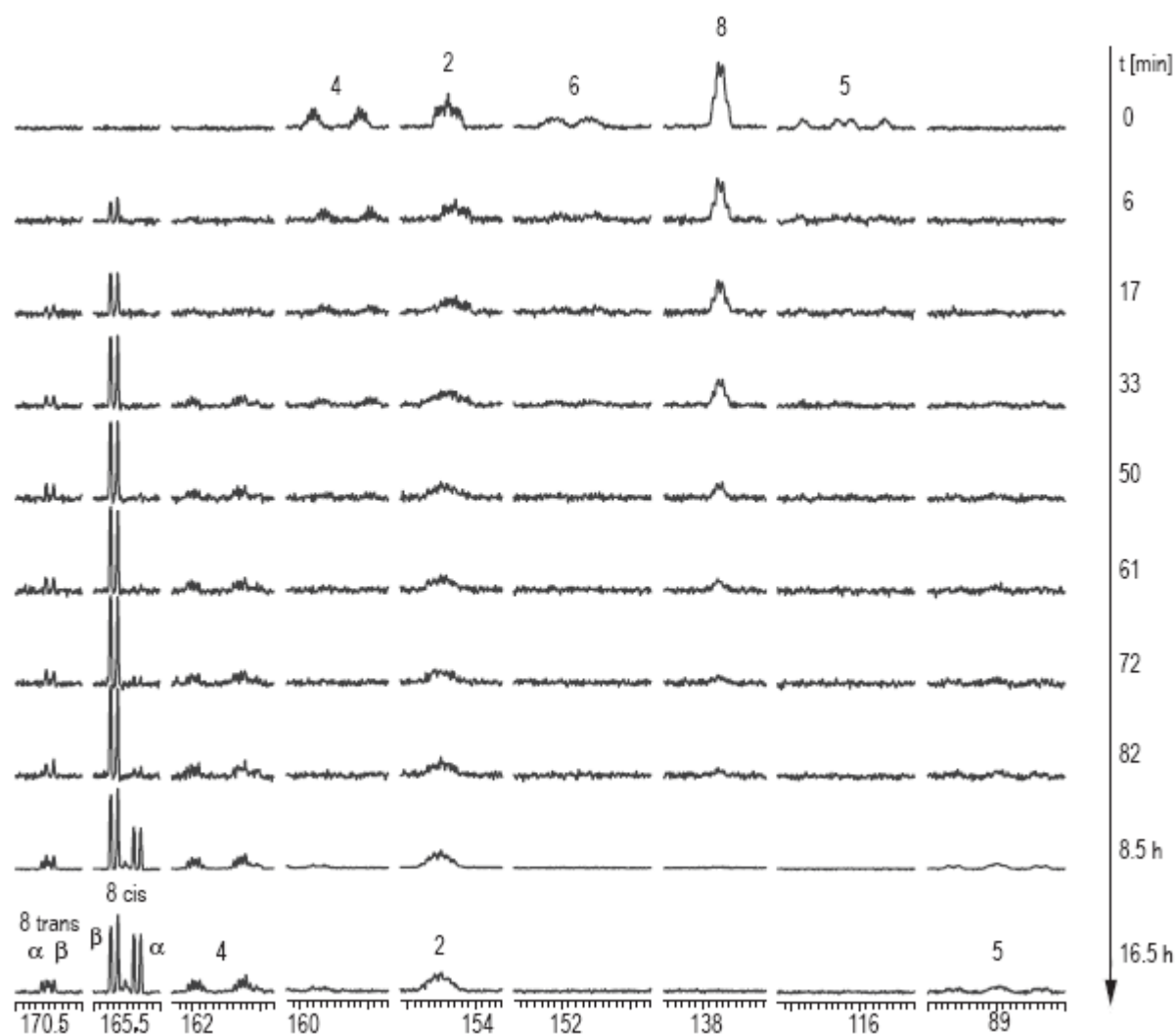


Abb 3.48:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrenserie nach Zugabe der GTP-Cyclohydrolase III von *M. jannaschii* zu  $[\text{U-}^{13}\text{C}_{10}, \text{U-}^{15}\text{N}_5]\text{GTP}$  als Substrat (Basenbereich).

Während das Produkt der GTP-Cyclohydrolase I Mutante ein 5'-Triphosphat ist (Bracher *et al.*, 1999), handelt es sich bei dem Produkt der neuartigen archealen GTP-Cyclohydrolase III

um das 5'-Monophosphat (Graham *et al.*, 2002). Aus Abbildung 3.48 ist ersichtlich, dass die  $\beta$ -cis Form von 2-Amino-5-formylamino-6-ribosylamino-4(3*H*)-pyrimidinon-5'-phosphat das primäre Produkt des Enzyms ist, aus dem durch spontane Isomerisierungen die  $\beta$ -trans und deutlich langsamer die  $\alpha$ -cis und  $\alpha$ -trans Formen entstehen. Die  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten dieser Produktmischung sind in folgender Tabelle zusammengefasst:

| Position | chem. Verschiebung $\delta$ [ppm] |         | Kopplungskonstanten J [Hz] |                                 |
|----------|-----------------------------------|---------|----------------------------|---------------------------------|
|          | $\alpha$                          | $\beta$ | $\alpha$                   | $\beta$                         |
| 1'       | 81.6                              | 84.9    | m                          | 43.8 (2')<br>12.6 (N)           |
| 2'       | 71.3                              | 73.6    | 41.9 (1')<br>37.9 (3')     | 43.5 (1')<br>38.6 (3')          |
| 3'       | 70.3                              | 70.9    | 38.9 (2',4')               | 41.4 (4')<br>38.8 (2')          |
| 4'       | 81.3                              | 82.9    | m                          | 43.1 (5')<br>38.0 (3')          |
| 5'       | 63.8                              | 63.9    | 43.4 (4')<br>4.1 (P)       | 8.3 (P)<br>43.0 (4')<br>4.5 (P) |
| 2        |                                   | 154.5   |                            | m                               |
| 4        |                                   | 161.6   |                            | 86, 14, 7 (5, N, 6)             |
| 5        |                                   | 89.0    |                            | 89, 76, 19 (4, 6, N)            |
| 6        |                                   | 160.5   |                            | m                               |
| 8 cis    | 165.3                             | 165.7   | 13.3 (N)                   | 13.7 (N)                        |
| 8 trans  | 170.6                             | 170.5   | 13.9 (N)                   | 14.4 (N)                        |

Tabelle 3.14:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten von 2-Amino-5-formylamino-6-ribosylamino-4(3*H*)-pyrimidinon-5'-phosphat. (m = komplexes Multipllett)

Die  $^{13}\text{C}$ -NMR-Signale der markierten Atome C-8, C-1' und C-5' aus den Abbildungen 3.47/48 wurden quantitativ ausgewertet und für die Berechnung von Ratenkonstanten erster Ordnung herangezogen. Da die Anomerisierung des Ribosylrestes deutlich langsamer ist als die cis/trans-Isomerisierung der Formylaminogruppe, wurde die Gleichgewichtseinstellung zwischen  $\beta$ -trans und  $\alpha$ -trans bei diesen Berechnungen vernachlässigt und stattdessen angenommen, dass die  $\alpha$ -trans Form ausschließlich aus der  $\alpha$ -cis Form gebildet wird.

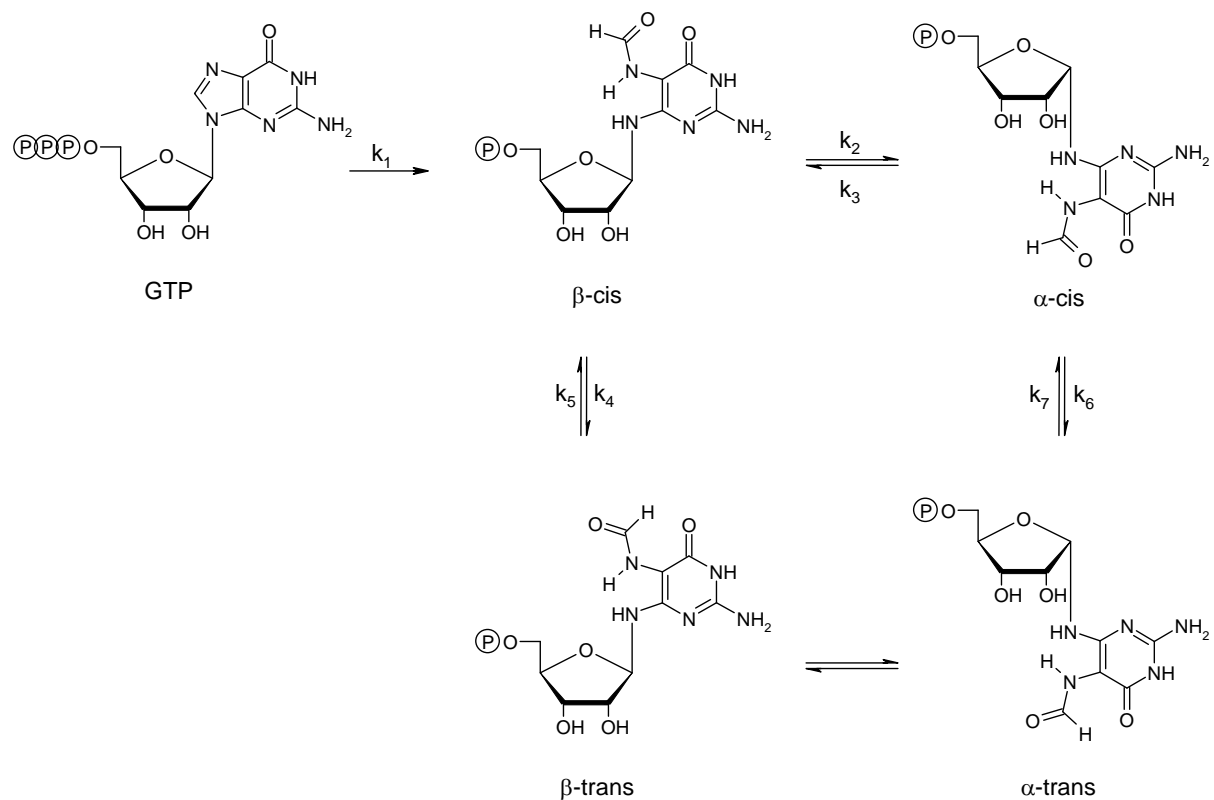


Abb 3.49: Reaktionsschema der GTP-Cyclohydrolase III Reaktion.

Abbildung 3.50 zeigt das Ergebnis der kinetischen Analyse der GTP-Cyclohydrolase III Reaktion während der ersten 80 Minuten (linke Seite) sowie unter Einbeziehung der zwei späteren Messpunkte nach 8.5 h und 16.5 h (rechte Seite). Die schnelle Bildung von  $\beta$ -cis und nachfolgend  $\beta$ -trans sowie die langsame Entstehung der  $\alpha$ -Formen ist deutlich zu erkennen. Die Differenzialgleichungen und die kinetischen Parameter, mit denen die beste Übereinstimmung zu den NMR-Daten gefunden wurde, sind in Tabelle 3.15 angegeben:

| Differenzialgleichungen   | Parameter | Wert [ $\text{min}^{-1}$ ] |
|---|-----------|----------------------------|
| $\frac{d\text{GTP}}{dt} = -k_1 \cdot \text{GTP}$  | $k_1$     | 0.028                      |
| $\frac{d\beta\text{-cis}}{dt} = k_1 \cdot \text{GTP} - (k_2 + k_4) \cdot \beta\text{-cis} + k_3 \cdot \alpha\text{-cis} + k_5 \cdot \beta\text{-trans}$ | $k_2$     | 0.001                      |
| $\frac{d\beta\text{-trans}}{dt} = k_4 \cdot \beta\text{-cis} - k_5 \cdot \beta\text{-trans}$  | $k_3$     | 0.002                      |
| $\frac{d\alpha\text{-cis}}{dt} = k_2 \cdot \beta\text{-cis} - (k_3 + k_6) \cdot \alpha\text{-cis} + k_7 \cdot \alpha\text{-trans}$                      | $k_4$     | 0.056                      |
| $\frac{d\alpha\text{-trans}}{dt} = k_6 \cdot \alpha\text{-cis} - k_7 \cdot \alpha\text{-trans}$   | $k_5$     | 0.351                      |
|   | $k_6$     | 0.062                      |
|   | $k_7$     | 0.330                      |

Tabelle 3.15: Differentialgleichungen und Ratenkonstanten der Cyclohydrolase III Reaktion.

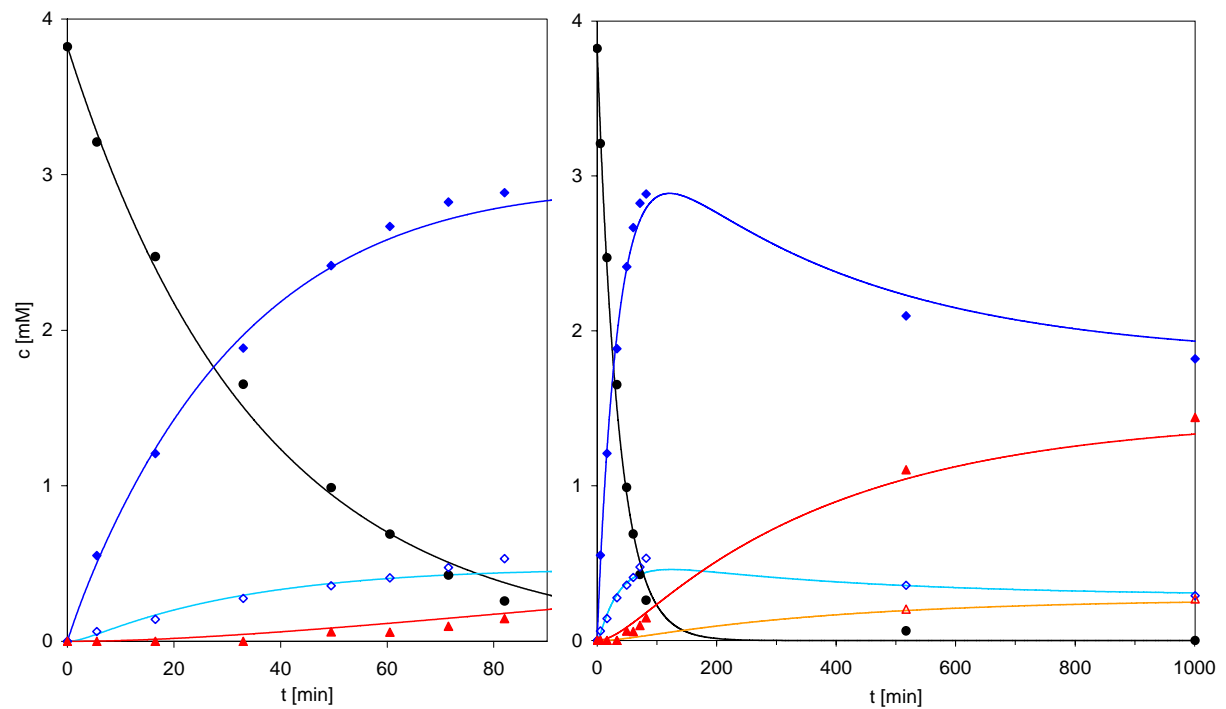


Abb. 3.50: Konzentrationsverläufe von GTP (schwarz) sowie verschiedenen Produktisomeren der GTP-Cyclohydrolase III in den ersten 80 Minuten (linke Seite) und über 16.5 h (rechte Seite):  $\beta$ -cis (blau),  $\beta$ -trans (hellblau),  $\alpha$ -cis (rot),  $\alpha$ -trans (orange).

### 3.5.4 Studien zur pflanzlichen Riboflavinbiosynthese an der Pyrimidin-Desaminase aus *A. thaliana*

Das Produkt des vorhergesagten offenen Leserahmens At4g20960 von *A. thaliana* weist eine deutliche Sequenzhomologie zu der Desaminasedomäne der bifunktionalen Desaminase/Reduktase (RibG) von *B. subtilis* auf. Da die Expression des aus cDNA von *A. thaliana* klonierten und um eine "Plastidtargeting-Sequenz" verkürzten Gens nur sehr schwach war, wurde für die effektive Überexpression des Proteins in *E. coli* ein codonoptimiertes synthetisches Gen entworfen und in den Vektor pNCO113 kloniert. Um der Aggregationsneigung des Proteins in *inclusion bodies* entgegenzuwirken und eine schnelle affinitätschromatographische Reinigung zu ermöglichen, wurde ein Fusionsprotein mit dem Maltosebindeprotein von *E. coli* am N-Terminus der Pflanzen-Desaminase konstruiert. Auf diese Weise konnten ausreichende Mengen an löslichem Protein mit einem, anhand SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese abgeschätzten Molekulargewicht von 83 kDa, gewonnen werden. Bei atomabsorptionsspektroskopischen Messungen wurde ein  $\text{Zn}^{2+}$ -Ion pro Untereinheit gefunden (Fischer *et al.*, 2004a).

Aus früheren NMR-Untersuchungen mit  $[1',2',3',4',5'-^{13}\text{C}_5]\text{GTP}$  (Ritz *et al.*, 2001) sowie  $[\text{U}-^{13}\text{C}_{10},\text{U}-^{15}\text{N}_4]$ - und  $[1'-^{13}\text{C}_1]\text{GTP}$  (Kapitel 3.5.2) war bekannt, dass das primäre Produkt der GTP-Cyclohydrolase II durch spontane Anomerisierung von der  $\beta$ -Form zu einer Mischung aus  $\alpha$  und  $\beta$  Anomeren übergeht. Durch Verwendung von  $[2,1',2',3',4',5'-^{13}\text{C}_6]\text{GTP}$  als Substrat für die GTP-Cyclohydrolase II erhielt man  $[2,1',2',3',4',5'-^{13}\text{C}_6]$ 2,5-Diamino-6-ribosylamino-4(3*H*)-pyrimidinon-5'-phosphat. In diesem Isotopolog trägt das Kohlenstoffatom C-2 im Pyrimidinring, welches den Angriffspunkt der Desaminasereaktion darstellt, eine  $^{13}\text{C}$ -Markierung. Entsprechend den beiden Anomeren des GTP-Cyclohydrolase II Produkts wurden für das C-2 Atom auch zwei  $^{13}\text{C}$ -Signale nahezu gleicher Intensität bei 151.2 und bei 151.6 ppm beobachtet. Aus zeitaufgelösten NMR-Messungen der GTP-Cyclohydrolase II Reaktion war zu erkennen, dass das Signal bei 151.2 ppm schneller entsteht, als das Signal bei 151.6 ppm, woraus abgeleitet werden konnte, dass das Signal bei 151.2 ppm die  $\beta$ -Form und das Signal bei 151.6 ppm die  $\alpha$ -Form repräsentiert.

Bei Zugabe der *A. thaliana* Pyrimidin-Desaminase zu dem Produkt der GTP-Cyclohydrolase II Reaktion verschwindet zuerst das Signal bei 151.2 ppm und später auch das bei 151.6 ppm und es entstehen nacheinander zwei neue Signale bei 156.1 ppm und 155.7 ppm, die etwas breiter erscheinen als die ursprünglichen Signale (Abb. 3.55). Daraus läßt sich schließen, dass wiederum zunächst die  $\beta$ -Form des Glykosids reagiert und das primäre Produkt anschließend spontan anomerisiert. Die übrigen Signale des Ribosylrestes ändern sich während der Reaktion nur geringfügig und erscheinen aufgrund von  $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$ -Kopplungen als komplexe Multipletts. Die  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren, welche man bei der Umsetzung von  $[2,1',2',3',4',5'-^{13}\text{C}_6]$ 2,5-Diamino-6-ribosylamino-4(3*H*)-pyrimidinon-5'-phosphat mit der Pyrimidin-Desaminase von *A. thaliana* bzw. mit der bifunktionellen Desaminase/Reduktase von *E. coli* erhält, sind augenscheinlich identisch (Abb 3.51).

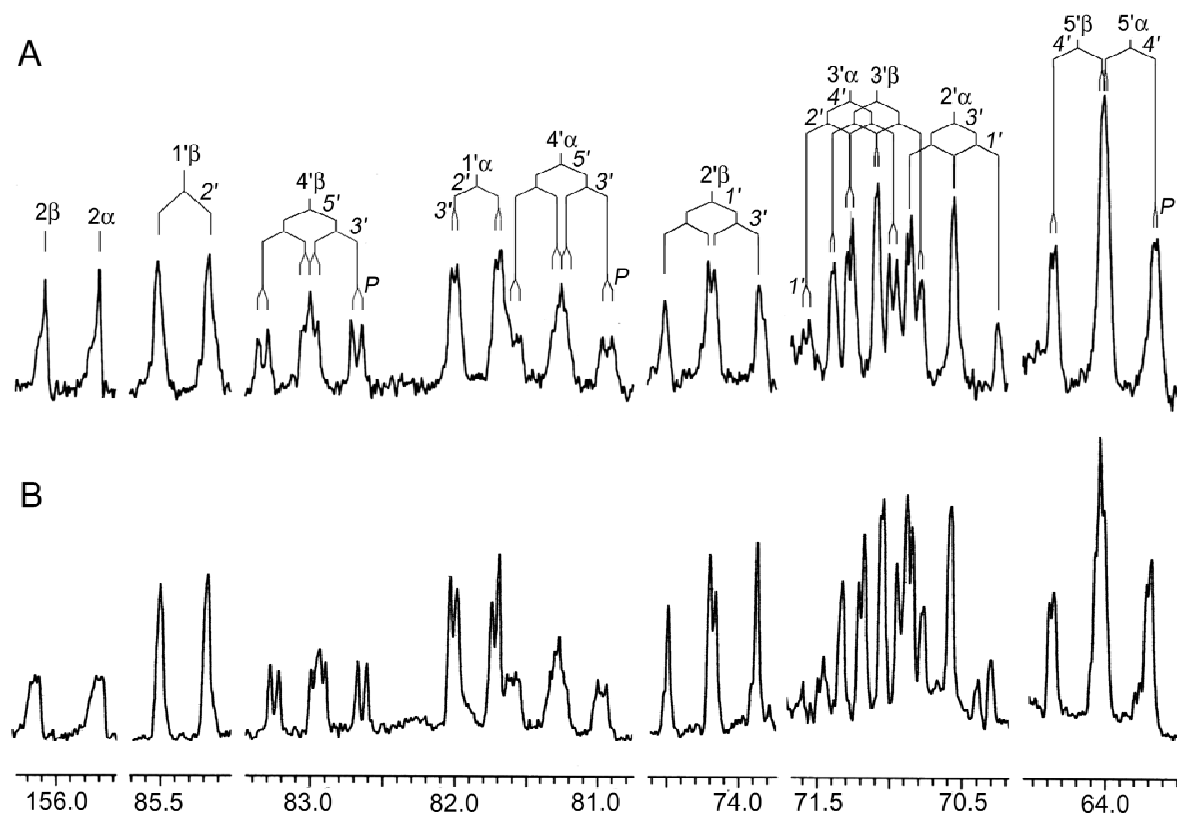


Abb. 3.51:  $[2,1',2',3',4',5'-^{13}\text{C}_6]$ -markierte Enzymprodukte der Desaminase aus *A. thaliana* (A) und der Desaminase/Reduktase aus *E. coli* (B) in einem Reaktionsansatz ohne NAD(P)H.

Der Schluß, dass demnach beide Enzyme die Bildung des gleichen Produkts (5-Amino-6-ribosylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion-5'-phosphat) katalysieren, konnte durch weitere umfangreiche NMR-Analysen bestätigt werden. Im zweidimensionalen INADEQUATE Experiment konnte die Konnetktivität der C-Atome 1' und 2' sowie 4' und 5' beider Anomere nachgewiesen werden. Das zweidimensionale  $^{13}\text{C}$ -TOCSY-Spektrum lieferte darüber hinaus weitere  $^{13}\text{C}$ -Korrelationen und ermöglichte somit die komplette Zuordnung beider Spinsysteme (Abb. 3.52).



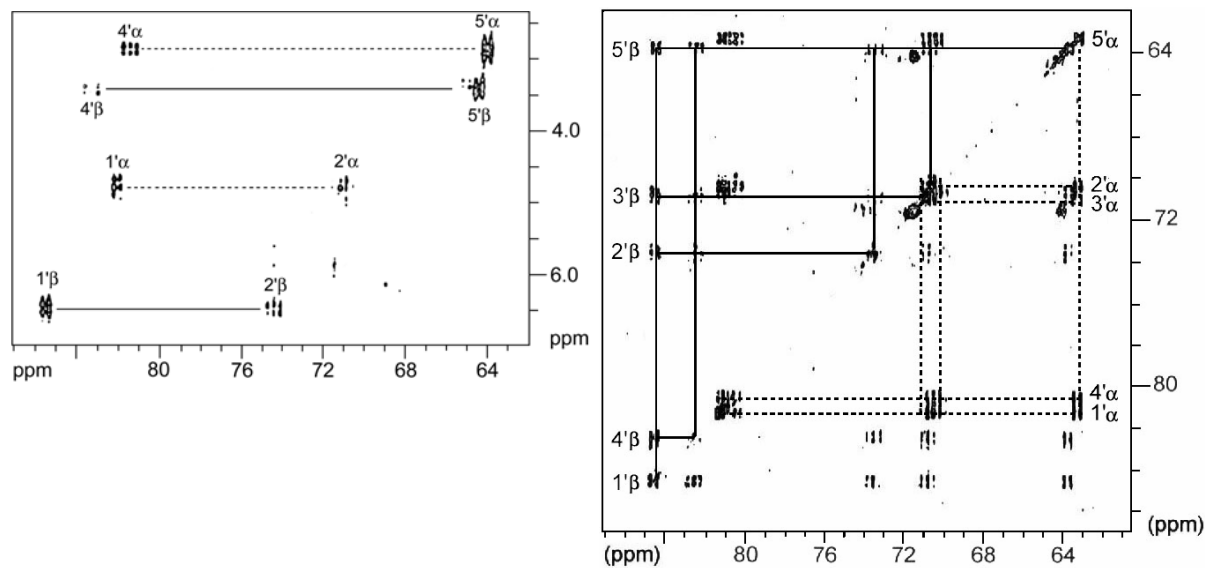


Abb. 3.52:  $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$ -Korrelationsspektren: INADEQUATE (links) und TOCSY (rechts). Die Signale des primären Desaminaseproduktes ( $\beta$ -Anomer) sind mit durchgezogenen Linien, die des  $\alpha$ -Anomers mit gestrichelten Linien verbunden.

Die  $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -Konnektivitäten im Zuckerbereich der beiden anomeren Produkte konnten mittels  $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -Korrelationspektroskopie zugeordnet werden. Das HMQC Spektrum (Abb. 3.53) lieferte Kreuzsignale für direkt benachbarte  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Atome, während mit dem hier nicht gezeigten HMQC-TOCSY Spektrum auch weiter entfernte  $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -Korrelationen innerhalb eines Spinsystems zugeordnet werden konnten.

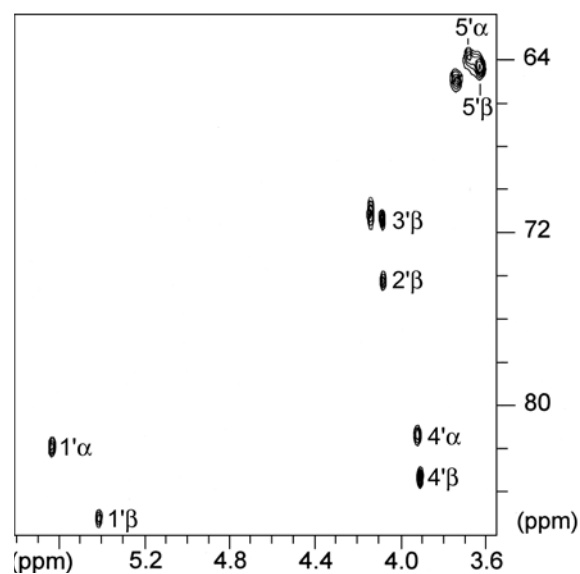


Abb. 3.53:  $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -Korrelationsspektrum (HMQC) der Desaminaseprodukte

Folgende Tabelle fasst die NMR-Daten beider anomeren Desaminaseprodukte zusammen:

| Position        | chemische Verschiebung |                 | Kopplungs-konstanten |                 | Signal-Korrelationen |                       |            |
|-----------------|------------------------|-----------------|----------------------|-----------------|----------------------|-----------------------|------------|
|                 | <sup>1</sup> H         | <sup>13</sup> C | J <sub>CC</sub>      | J <sub>CP</sub> | INADEQUATE           | <sup>13</sup> C TOCSY | HMQC-TOCSY |
| <b>α-Anomer</b> | <i>ppm</i>             |                 | <i>Hz</i>            |                 |                      |                       |            |
| 2               |                        | 155.7           |                      |                 |                      |                       |            |
| 1'              | 5.63                   | 81.8            | 38.5 (2')            |                 | 2'                   | 2',3',4',5'           | 2',3'      |
| 2'              | 4.14                   | 70.5            | 4.9 (3')             |                 | 1'                   | 1',3',4',5'           | 1',4'      |
| 3'              | 4.14                   | 71.3            | 37.3 (1',3')         |                 |                      | 1',2',4',5'           | 1',4'      |
| 4'              | 3.92                   | 81.2            | 38.3 (2')            | 8.2             | 5'                   | 1',2',3',5'           | 2',3',5'   |
| 5'              | 3.68                   | 63.8            | 37.4 (4')            | 3.0             | 4'                   | 1',2',3',4'           | 2',3',4'   |
|                 |                        |                 | 4.9 (1')             |                 |                      |                       |            |
| <b>β-Anomer</b> |                        |                 |                      |                 |                      |                       |            |
| 2               |                        | 156.1           |                      |                 |                      |                       |            |
| 1'              | 5.41                   | 85.3            | 44.7 (2')            |                 | 2'                   | 2',3',4',5'           | 2',3'      |
| 2'              | 4.08                   | 74.2            | 43.9 (1')            |                 | 1'                   | 1',3',4',5'           | 1'         |
| 3'              | 4.08                   | 71.1            | 38.4 (3')            |                 |                      | 1',2',4',5'           | 1',4'      |
| 4'              | 3.91                   | 83.0            | 38.2 (2',4')         | 8.5             | 5'                   | 1',2',3',5'           | 3',5'      |
| 5'              | 3.63                   | 64.2            | 2.2 (1')             | 3.9             | 4'                   | 1',2',3',4'           | 4'         |
|                 |                        |                 | 44.6 (5')            |                 |                      |                       |            |
|                 |                        |                 | 37.0 (3')            |                 |                      |                       |            |
|                 |                        |                 | 43.2 (4')            |                 |                      |                       |            |

Tabelle 3.16: NMR-Daten der anomeren Formen des Desaminaseproduktes 5-Amino-6-ribosylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion-5'-phosphat.

Die Reaktionsfolge von den Produkt-Anomeren der Cyclohydrolase II Reaktion (**1α/β**) zur Gleichgewichtsmischung der anomeren Desaminaseprodukte (**2α/β**) wird durch folgendes Reaktionsschema wiedergegeben:

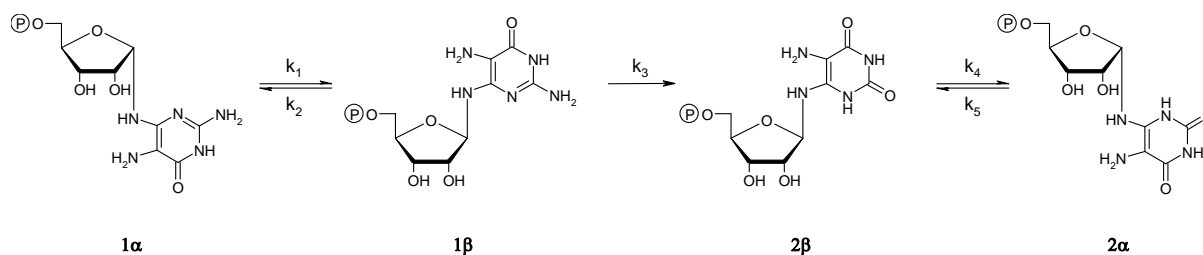


Abb. 3.54: Reaktionsschema der Desaminasereaktion

Dazu lassen sich wiederum Ratengleichungen erster Ordnung formulieren:

$$\frac{d1\alpha}{dt} = -k_1 \cdot 1\alpha + k_2 \cdot 1\beta$$

$$\frac{d1\beta}{dt} = k_1 \cdot 1\alpha - k_2 \cdot 1\beta - k_3 \cdot 1\beta$$

$$\frac{d2\beta}{dt} = k_3 \cdot 1\beta - k_4 \cdot 2\beta + k_5 \cdot 2\alpha$$

$$\frac{d2\alpha}{dt} = k_4 \cdot 2\beta - k_5 \cdot 2\alpha$$

Die Integrale der vier C-2 NMR-Signale wurden zeitabhängig quantitativ ausgewertet und daraus die jeweiligen Konzentrationen der Reaktionsteilnehmer berechnet. Durch Minimierung der Fehlerquadrate konnte ein Satz an Ratenkonstanten ermittelt werden, der den experimentellen Reaktionsverlauf gut wiedergibt (Abb. 3.55):

| Reaktion                                      | kinetischer Parameter | Wert  |
|---|-----------------------|---|
| $1\alpha \rightarrow 1\beta$                  | $k_1$                 | $0.11 \text{ min}^{-1}$                               |
| $1\beta \rightarrow 1\alpha$                  | $k_2$                 | $0.11 \text{ min}^{-1}$                               |
| $1\beta \rightarrow 2\beta$                   | $k_3$                 | $1.34 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$               |
| $2\beta \rightarrow 2\alpha$                  | $k_4$                 | $0.20 \text{ min}^{-1}$                               |
| $2\alpha \rightarrow 2\beta$                  | $k_5$                 | $0.18 \text{ min}^{-1}$                               |
| $1(\alpha/\beta) \rightarrow 2(\alpha/\beta)$ | $v_{\text{max}}$      | $0.9 \text{ } \mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ |

Tabelle 3.17: Kinetische Daten Desaminasereaktion.

Die Ratenkonstanten  $k_1$  und  $k_2$  bzw.  $k_4$  und  $k_5$  sind jeweils sehr ähnlich, was dem nahezu äquimolaren Verhältnis der beiden Anomere im Gleichgewicht entspricht. Die maximale Aktivität des Fusionsproteins aus Maltosebindeprotein und Pflanzendesaminase wurde aus den NMR-Daten zu  $0.9 \text{ } \mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  bestimmt und liegt damit etwas höher als bei den bifunktionellen Enzymen aus *E. coli* und *B. subtilis* mit  $0.4$  bzw.  $0.2 \text{ } \mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  (Bacher *et al.*, 1997a).

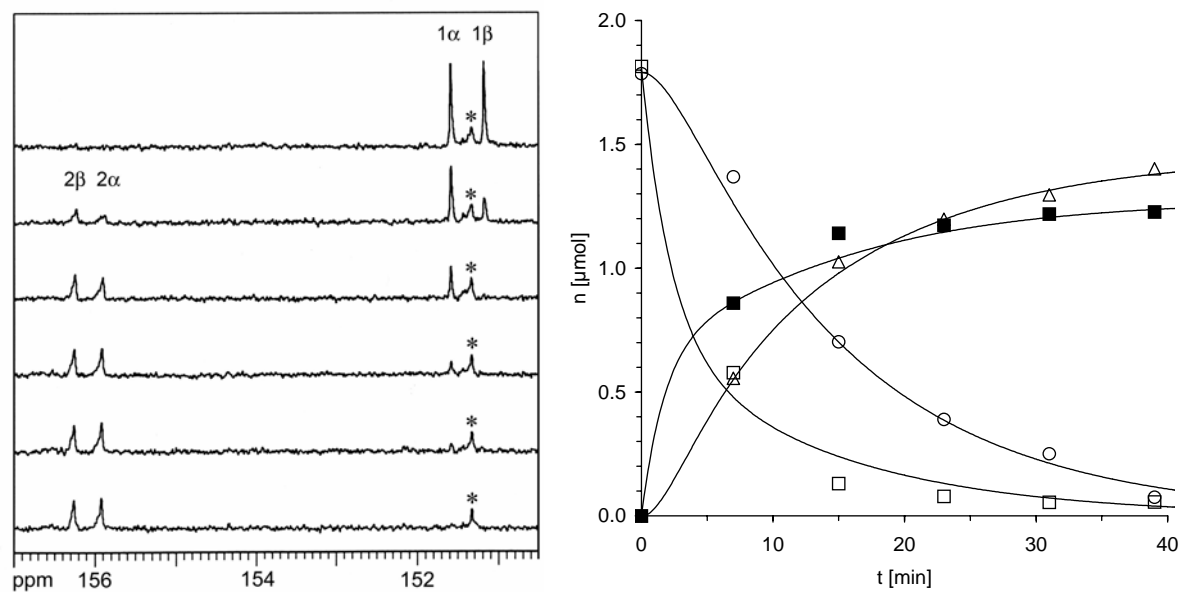


Abb. 3.55: Links: zeitaufgelöste  $^{13}\text{C}$ -NMR-Signale der C-2 Position im Verlauf der Desaminasereaktion (\*: Verunreinigung). Rechts: kinetische Analyse der NMR-Daten. Der Konzentrationsverlauf der Reaktionsteilnehmer ( $1\alpha$ :  $\circ$ ,  $1\beta$ :  $\square$ ,  $2\alpha$ :  $\triangle$ ,  $2\beta$ :  $\blacksquare$ ) wurde mit den im Text angegebenen Ratenkonstanten und Ratengleichungen erster Ordnung gefittet.

Eine Reduktaseaktivität des *A. thaliana* Proteins konnte dagegen im NMR-Versuch weder mit NADH noch mit NADPH als Cofaktor nachgewiesen werden. Ebenso wurde aus der Reaktion des Cyclohydrolase II Produkts mit der Reduktase aus *M. jannaschii* erhaltenes 2,5-Diamino-6-ribitylamino-4(3*H*)-pyrimidinon-5'-phosphat nicht desaminiert. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Komplementierungsversuchen, die Dr. Boris Illarionov an *ribD*<sup>-</sup> Mutanten durchführte. Diese Mutanten konnten nicht durch die Expression des *A. thaliana* Proteins komplementiert werden, während die Transformation mit einem Plasmid, auf dem die pflanzliche Desaminase mit einer eubakteriellen Reduktase koexpressiert wird, zu Zellen mit dem ursprünglichen Phentyp führte. Koexpression der Pflanzendesaminase mit einer Reduktase oder Desaminase des Hefe-Typs führten dagegen nicht zur Komplementierung (Fischer *et al.*, 2004a). Daraus sowie aus den oben beschriebenen NMR-Daten kann eindeutig geschlossen werden, dass die Schritte der Desaminierung und Reduktion des Cyclohydrolase II Produkts in *A. thaliana* in der selben Reihenfolge ablaufen wie in Eubakterien, während bei Pilzen die umgekehrte Reihenfolge auftritt.

Der N-terminale Teil der bifunktionellen RibD Proteine von Eukaryonten enthält die Desaminase Domäne, während der C-terminale die Reduktase Domäne bildet. Aufgrund von Sequenzvergleichen mit funktionalen Desaminasedomänen von *B. subtilis* wurden C-

terminal verkürzte Konstrukte des *A. thaliana* Desaminase Gens kloniert. Ein um 177 Aminosäuren verkürztes Proteinfragment zeigte eine Aktivität von etwa 5% der vollständigen Aminosäuresequenz, während sich für eine um 243 Einheiten verkürzte Aminosäuresequenz keine signifikante Restaktivität nachweisen ließ.

### 3.5.5 Mechanistische Untersuchungen an den Reduktasen aus *M. jannaschii*, *C. glabrata* und *Aquifex aeolicus*

Während in der Riboflavinbiosynthese von Eubakterien und Pflanzen die Desaminierung am Pyrimidinatom C-2 vor der Reduktion des Zuckerrestes stattfindet, folgt dieser Schritt in Pilzen direkt auf die GTP-Cyclohydrolase II Reaktion (siehe Abb. 1.2). Die Reihenfolge in Archaea war allerdings zu Beginn dieser Arbeit noch unbekannt. Vor kurzem wurde berichtet, dass der offene Leserahmen MJ0671 des thermophilen Archaeobakteriums *M. jannaschii* ein Enzym codiert, welches die Reduktion von 2,5-Diamino-6-ribosyl-amino-4(3*H*)-pyrimidinon-5'-phosphat zu 2,5-Diamino-6-ribitylamino-4(3*H*)-pyrimidinon-5'-phosphat katalysiert und somit eine Reduktase vom Hefetyp wäre (Graupner *et al.*, 2002).

Für die effektive Expression in *E. coli* wurde ein codonoptimiertes Gen für das 25 kDa große, als *MJ-Rib7* bezeichnete Protein synthetisiert und in einen *E. coli* Expressionsstamm kloniert. Daneben wurden noch zwei weitere Reduktasen des Hefetyps, Rib7 aus dem humanpathogenen Pilz *C. glabrata* und RibD2 aus dem thermophilen Eubakterium *A. aeolicus* kloniert.

Für NMR-Untersuchungen mit diesem Protein wurde [2,1',2',3',4',5'-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]2,5-Diamino-6-ribosylamino-4(3*H*)-pyrimidinon als <sup>13</sup>C-markiertes Substrat synthetisiert. Dies geschah, wie bereits früher beschrieben, durch enzymatische Umsetzung von [2,1',2',3',4',5'-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]-GTP mit der Cyclohydrolase II von *E. coli*.

Abbildung 3.56 zeigt die <sup>13</sup>C-NMR-Signale des Produkts der *M. jannaschii* Reduktase. Das kaum verschobene Signal des C-2 Atoms bei 151.6 ppm zeigt, dass es sich um ein 2-Amino-Pyrimidin handelt. Das Dublett des, vom Halbaminal zum Alkylamino-Rest reduzierten, C-1' Atoms erscheint hochfeldverschoben bei 43 ppm. Da die Ribitylkette nicht in zwei anomeren Formen vorkommen kann, ist für jedes Kohlenstoffatom nur ein, durch <sup>13</sup>C<sup>13</sup>C-Kopplung aufgespaltenes, charakteristisches Multiplett zu erkennen. Im <sup>13</sup>C-TOCSY tritt der Ribitylrest demnach als ein zusammenhängendes Spinsystem auf. Die aus

verschiedenen 1D und 2D NMR-Experimenten gewonnenen Daten von 2,5-Diamino-6-ribitylamino-4(3*H*)-pyrimidinon-5'-phosphat sind in Tabelle 3.18 zusammengefasst.

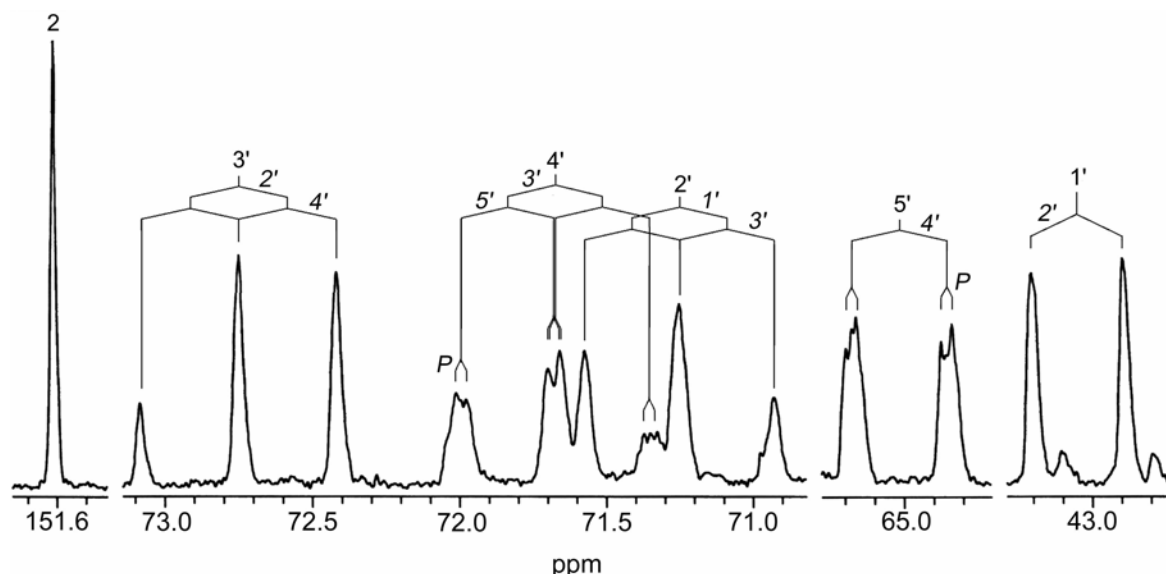


Abb. 3.56:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von  $[2,1',2',3',4',5'-^{13}\text{C}_6]$ 2,5-Diamino-6-ribitylamino-4(3*H*)-pyrimidinon-5'-phosphat.

| Position | chem. Verschiebung |                       | Kopplungskonstanten    |                      | INADEQUATE | $^{13}\text{C}$ -TOCSY |
|----------|--------------------|-----------------------|------------------------|----------------------|------------|------------------------|
|          | $^1\text{H}$ [ppm] | $^{13}\text{C}$ [ppm] | $J_{\text{CC}}$ [Hz]   | $J_{\text{CP}}$ [Hz] |            |                        |
| 0        |                    | 151.6                 |                        |                      |            |                        |
| 1'-proS  | 3.30               | 43.0                  | 39.1 (2')              |                      | 2'         | 2',3',4',5'            |
| 1'-proR  | 3.46               |                       |                        |                      |            |                        |
| 2'       | 3.77               | 71.2                  | 40.5<br>(1',3')        |                      | 1'         | 1',3',4',5'            |
| 3'       | 3.55               | 72.7                  | 41.6<br>(2',4')        |                      |            | 1',2',4',5'            |
| 4'       | 3.70               | 71.7                  | 41.6 (3')<br>40.2 (5') | 5.1                  | 5'         | 1',2',3',5'            |
| 5'       | 3.74               | 65.0                  | 40.6 (4')              | 4.5                  | 4'         | 1',2',3',4'            |

Tabelle 3.18: NMR-Daten von 2,5-Diamino-6-ribitylamino-4(3*H*)-pyrimidinon-5'-phosphat.

Die bei 30°C in kurzen Intervallen gemessene Serie von 1D  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren (Abb. 3.57) zeigt deutlich, dass zunächst nur das  $\beta$ -Anomer des Cyclohydrolase II Produkts reagiert und das  $\alpha$ -Anomer erst allmählich nach spontaner Isomerisierung aus dem vorgelagerten Gleichgewicht heraus verbraucht wird (Abb. 3.58). Dass sich die chemische Verschiebung der C-2 Position während der Reaktion kaum ändert ist ein klarer Beleg dafür, dass keine Desaminierung stattfindet und es sich bei *MJ*-Rib7 somit tatsächlich um eine Reduktase vom

Hefetyp handelt. Durch Integration der NMR-Signale und Anpassung der Daten an Differenzialgleichungen erster Ordnung (Tabelle 3.19) konnte der zeitliche Konzentrationsverlauf der Reaktionsteilnehmer graphisch dargestellt werden (Abb. 3.59 A).

Ähnliche NMR-Serien wurden mit den Proteinen Rib7 aus *C. glabrata* und RibD2 aus *A. aeolicus* bei verschiedenen Temperaturen und unterschiedlichen Mengen eingesetzten Enzyms gemessen. Da für diese Versuche [ $1'$ - $^{13}\text{C}_1$ ]GTP als Ausgangsstoff verwendet wurde, erhielt man in den hier nicht gezeigten Spektren für jede Spezies nur ein scharfes Singulett, wodurch die Auswertung deutlich vereinfacht wurde. Der Vergleich der Diagramme in Abb. 3.59 und der Daten in Tabelle 3.19 zeigt, dass das Enzym aus *M. jannaschii* mit Abstand die höchste Aktivität besitzt, da hier bei der niedrigsten Temperatur, mit der geringsten Menge Protein die höchste Reaktionsgeschwindigkeit ( $0.6 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ) erreicht wurde. Für die *C. glabrata* Reduktase wurde eine Reaktionsgeschwindigkeit von  $0.2 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  bestimmt, während für RibD2 aus *A. aeolicus* erst bei  $57 \text{ }^\circ\text{C}$  mit einer deutlich größeren Menge an Protein eine nennenswerte Aktivität festgestellt werden konnte ( $35 \text{ nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ).

Außerdem wird deutlich, dass sich das vorgelagerte Gleichgewicht der  $\alpha/\beta$ -Anomere mit höherer Temperatur (von links nach rechts in Abb. 3.59) deutlich schneller einstellt. Daher ist die Abnahme des  $\alpha$ -Anomers in dem Experiment bei 330K kaum mehr langsamer als die des  $\beta$ -Anomers (Abb 3.59 C).

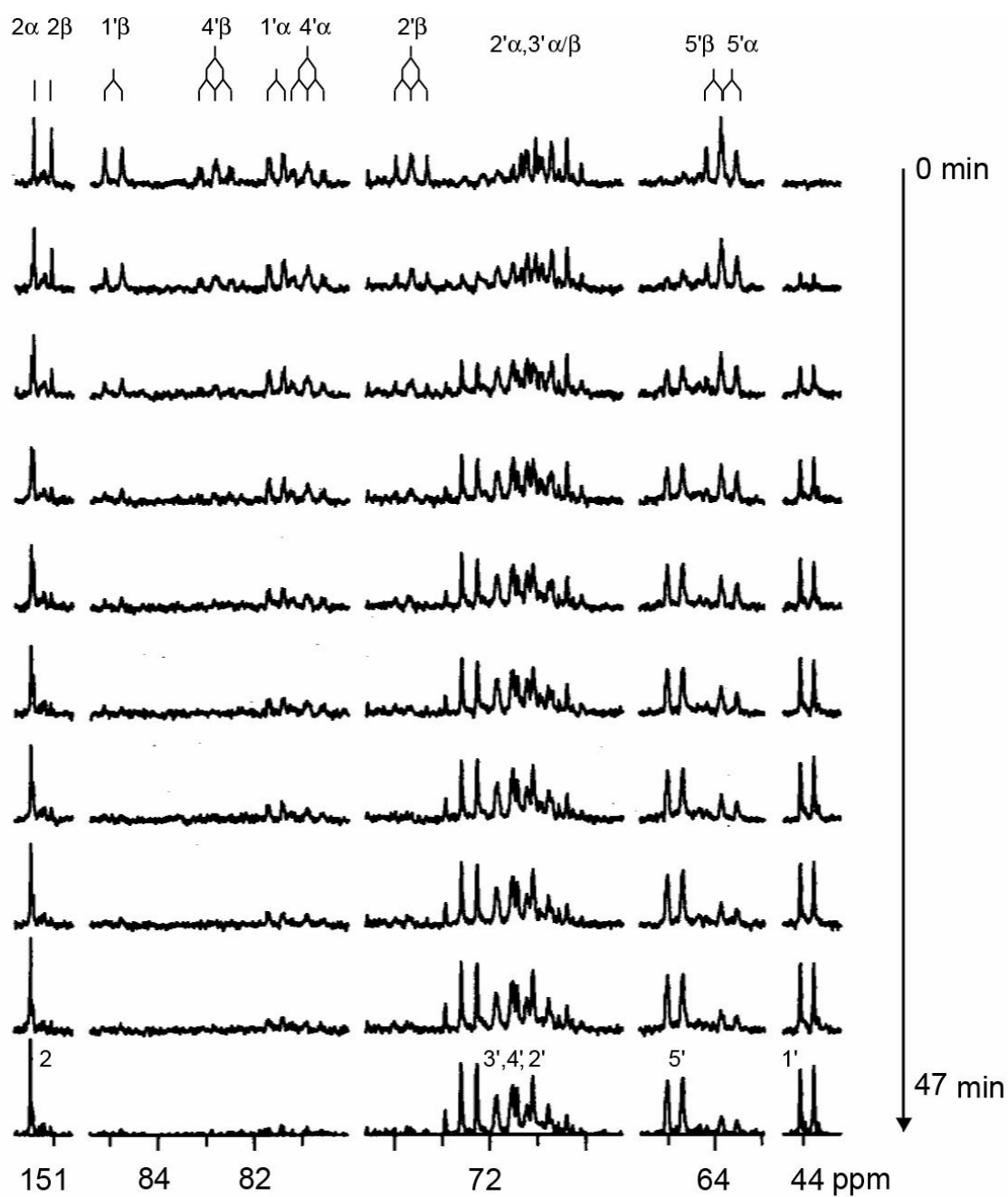


Abb 3.57:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrenserie nach Zugabe der Reduktase von *M. jannaschii* zu einer Gleichgewichtsmischung der anomeren Formen von  $[2,1',2',3',4',5'-^{13}\text{C}_6]$ 2,5-Diamino-6-ribosylamino-4(3*H*)-pyrimidinon-5'-phosphat als Substrat.



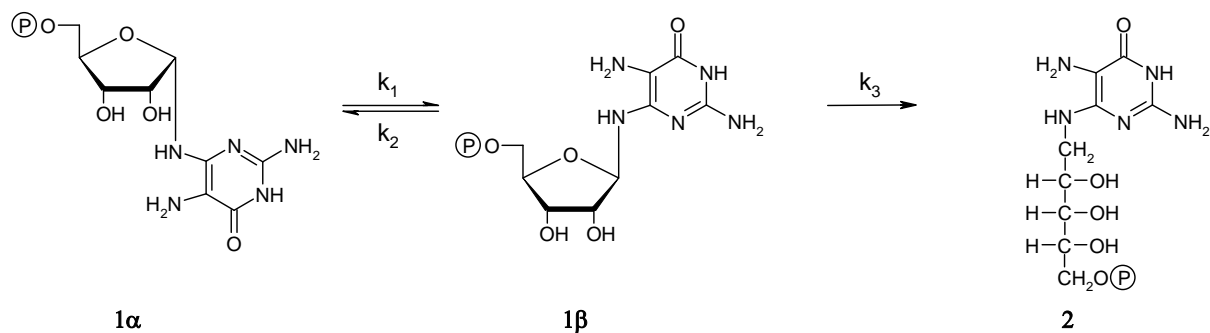
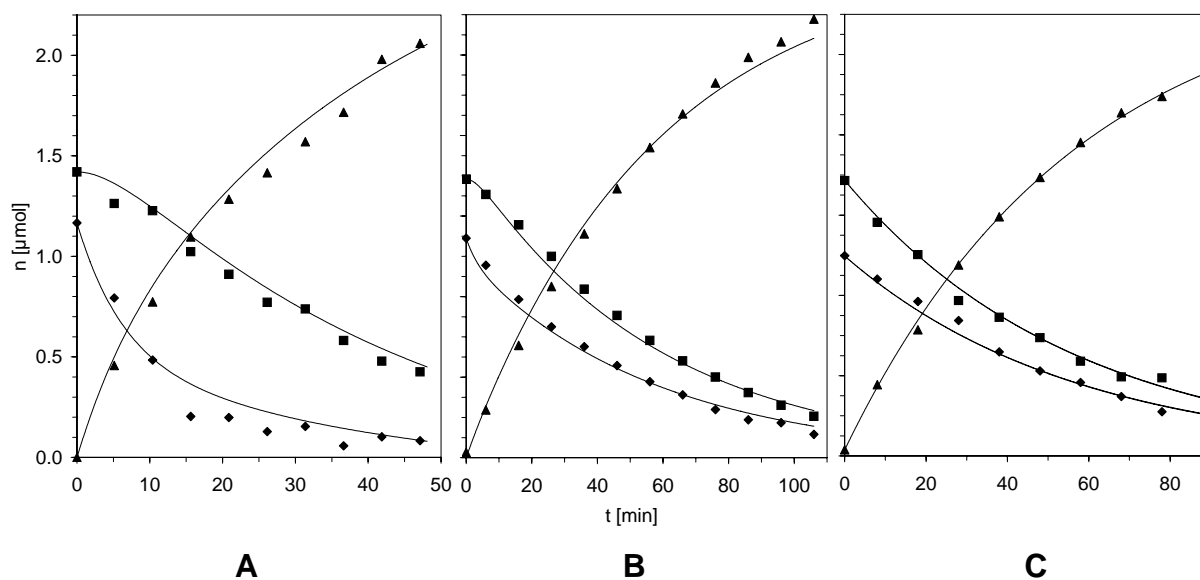


Abb. 3.58: Reaktionsschema der Reduktasereaktion

| Differentialgleichungen   | Parameter                  | <i>M. jannaschii</i> | <i>C. glabrata</i> | <i>A. aeolicus</i> |
|---|----------------------------|----------------------|--------------------|--------------------|
|   | T [K]                      | 303                  | 310                | 330                |
|   | E [mg]                     | 0.140                | 0.260              | 1.2                |
| $\frac{d1\alpha}{dt} = -k_1 \cdot 1\alpha$                          | $k_1$ [min <sup>-1</sup> ] | 0.041                | 0.115              | 8.41               |
| $\frac{d1\beta}{dt} = k_1 \cdot 1\alpha - (k_2 + k_3) \cdot 1\beta$ | $k_2$ [min <sup>-1</sup> ] | 0.050                | 0.146              | 11.57              |
| $\frac{d2}{dt} = k_3 \cdot 1\beta$                                  | $k_3$ [min <sup>-1</sup> ] | 0.094                | 0.043              | 0.042              |

Tabelle 3.19: Differentialgleichungen und kinetische Parameter der Reduktasereaktion mit den Enzymen aus *M. jannaschii*, *C. glabrata* und *A. aeolicus*.Abb. 3.59: Reaktionskinetik von drei Reduktasen des Hefe-Typs: A, *M. jannaschii*, B, *C. glabrata*, C, *A. aeolicus*. (♦, β-Anomer, ■, α-Anomer, ▲, Reduktaseprodukt)

Mechanistisch beinhaltet die Reduktion des Ribosylrestes die Ringöffnung der Furanose durch Abstraktion eines Protons am Stickstoffatom, gefolgt von der Reduktion der resultierenden Schiffsbasis (Abb. 3.60). Dabei wird formal ein Hydridion von NADPH auf die 1'-Position des Produkts übertragen.

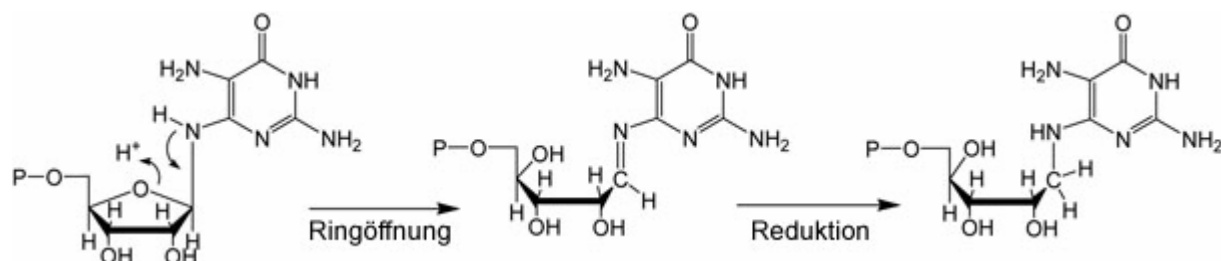


Abb. 3.60: Vorgeschlagener Reaktionsmechanismus für Reduktasen vom Hefetyp (Keller *et al.*, 1988)

Wie das HMQC zeigt sind die beiden 1'-H Atome im Produkt spektroskopisch unterscheidbar (Abb. 3.61). Für die Reduktase aus dem Hefepilz *Ashbya gossypii* wurde gezeigt, dass das Proton in 1'-proR Position aus dem Riboserest und das Proton in 1'-proS Position demnach aus NADPH stammt (Keller *et al.*, 1988).

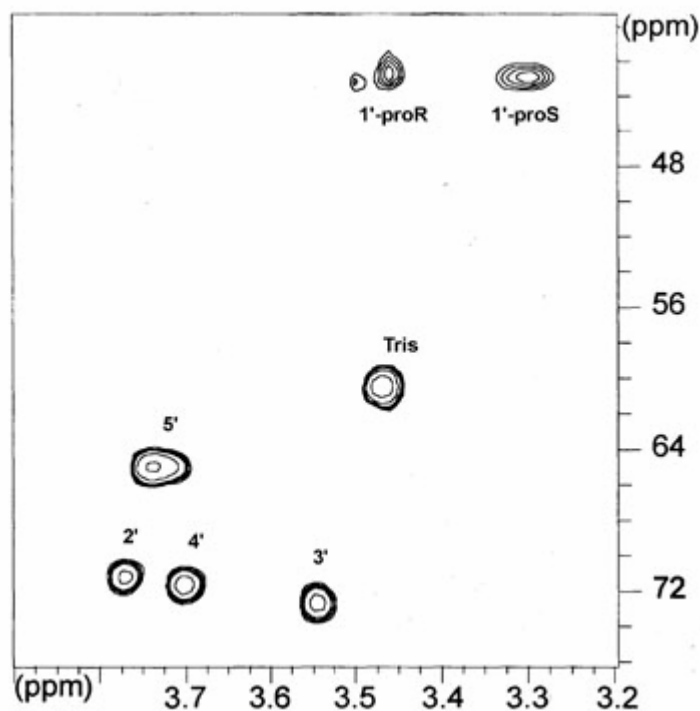


Abb. 3.61: HMQC Spektrum des  $^{13}\text{C}$ -markierten *M. jannaschii* Reduktaseprodukts, [2,1',2',3',4',5'- $^{13}\text{C}_6$ ]2,5-Diamino-6-ribitylamino-4(3*H*)-pyrimidinon-5'-phosphat

Am Nicotinamidcofaktor NADPH gibt es ebenfalls zwei unterschiedliche Positionen am C-4 Atom. Man unterscheidet allgemein zwischen A-Typ Reduktasen, die ein Hydridion von der proR Position an C-4 übertragen und B-Typ Reduktasen, die proS spezifisch sind. Mit Hilfe der Glukose-Dehydrogenase Reaktion konnte spezifisch in proS oder proR deuteriertes NADPH hergestellt werden.

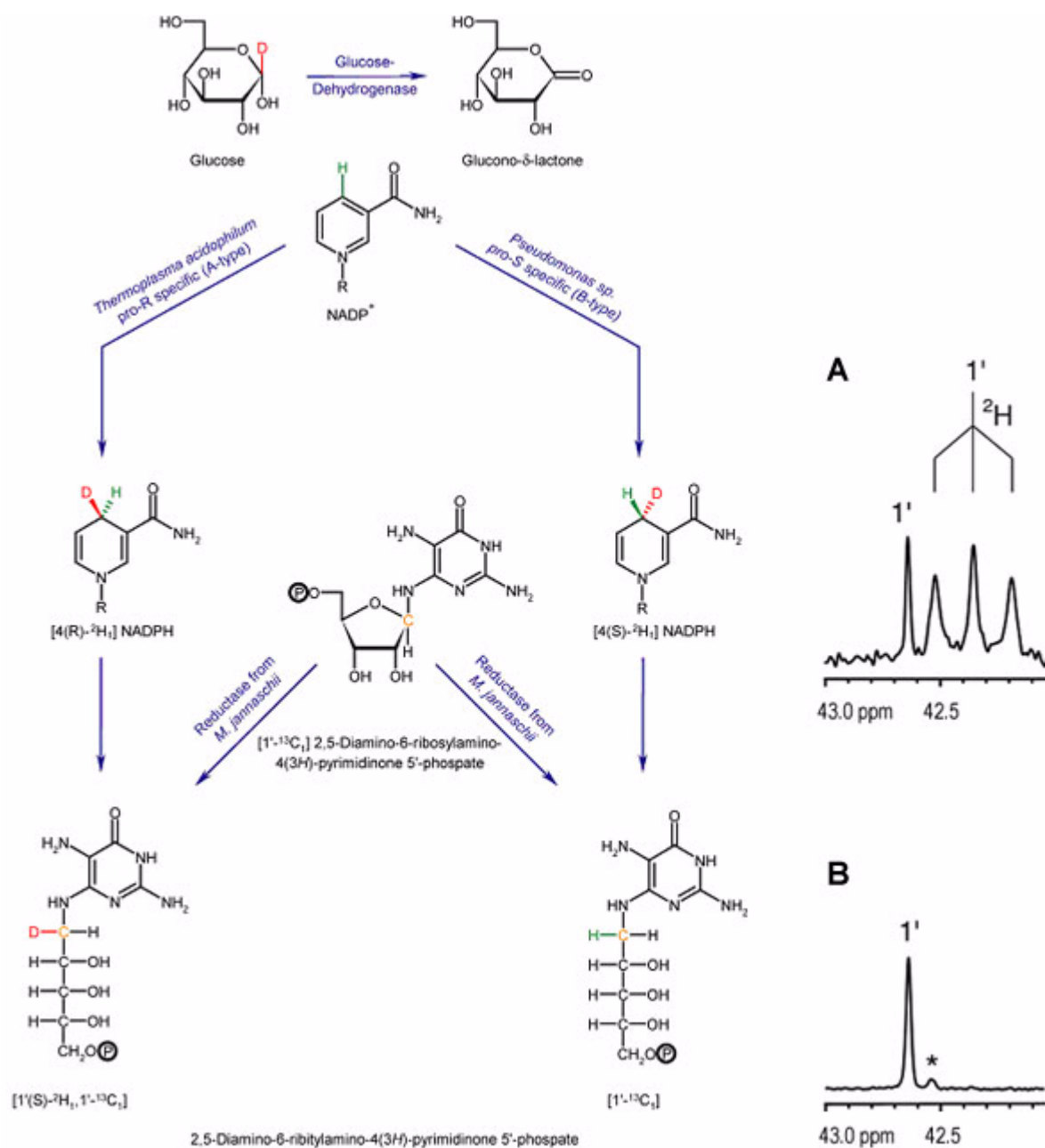


Abb. 3.62: Linke Seite: Experiment zur Bestimmung der Stereospezifität der Reduktase von *M. jannaschii* mit spezifisch deuteriertem NADPH und [1'-<sup>13</sup>C<sub>1</sub>]-markiertem Substrat. Rechte Seite: <sup>13</sup>C-NMR-Signale von [1'(S)-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>, 1'-<sup>13</sup>C<sub>1</sub>]2,5-Diamino-6-ribitylamino-4(3H)-pyrimidinon-5'-phosphat (A) und [1'-<sup>13</sup>C<sub>1</sub>]2,5-Diamino-6-ribitylamino-4(3H)-pyrimidinon-5'-phosphat (B).

Mit den Glukose-Dehydrogenasen aus *Thermoplasma acidophilum* und *Pseudomonas sp.* stand sowohl ein Enzym vom A-Typ als auch vom B-Typ zur Verfügung. Aus  $[1'-^{13}\text{C}_1]\text{GTP}$  wurde mit der GTP-Cyclohydrolase II aus *E. coli* Substrat für die Reduktasen aus *M. jannaschii* und *C. glabrata* hergestellt. Als Cofaktor wurde jeweils *in situ* enzymatisch generiertes  $[4(\text{R})\text{-}^2\text{H}_1]$  und  $[4(\text{S})\text{-}^2\text{H}_1]\text{NADPH}$  verwendet. In beiden Fällen konnte im Produkt nur dann Deuterium nachgewiesen werden, wenn NADPH verwendet wurde, welches in der 4(R) Position deuteriert war. Auf der linken Seite von Abbildung 3.62 sind die Versuche zur Bestimmung der Stereospezifität von Reduktasen bezüglich des Hydridions am Cofaktor in einem Reaktionsschema anschaulich dargestellt. Rechts sind die  $^{13}\text{C}$ -NMR-Signale des C-1' Atoms gezeigt. Während in dem unteren Spektrenausschnitt ( $[4(\text{S})\text{-}^2\text{H}_1]\text{NADPH}$  als Cofaktor) lediglich ein Singulett zu beobachten ist, erkennt man im oberen Spektrum ( $[4(\text{R})\text{-}^2\text{H}_1]\text{NADPH}$  als Cofaktor) auch ein gekoppeltes Signal, welches durch Kopplung zu einem Deuterium-Kern (Spinquantenzahl 1) in drei Linien aufgespalten ist. Damit konnten die Reduktasen aus *M. jannaschii* und *C. glabrata* eindeutig als A-Typ Reduktasen identifiziert werden.

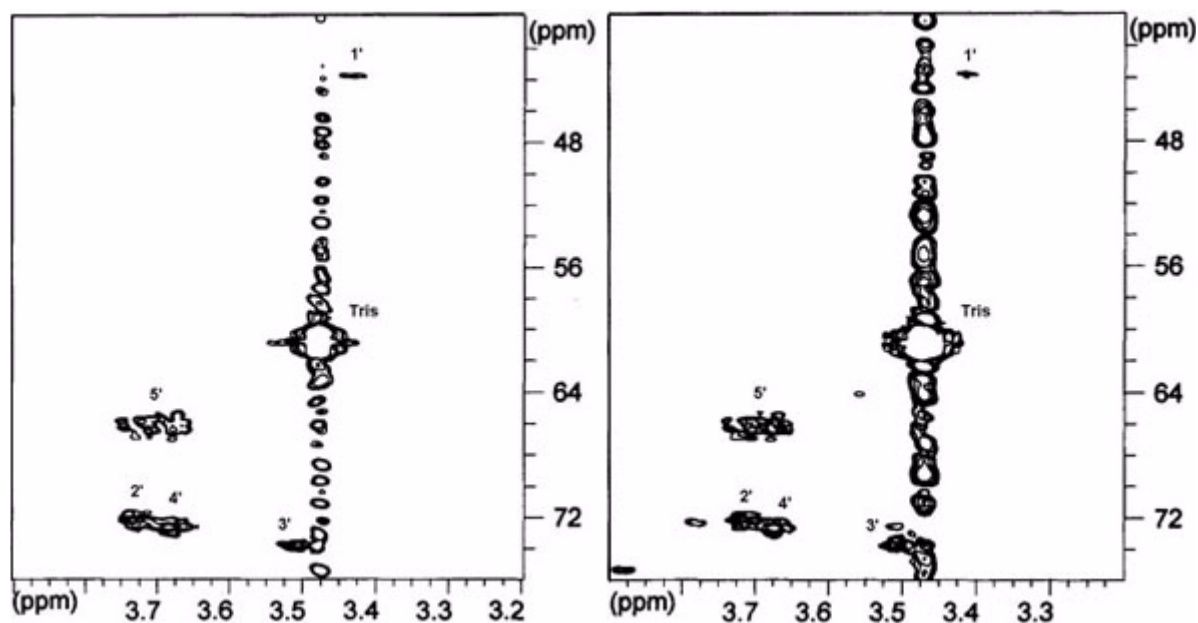


Abb. 3.63: HMQC Spektren von  $[1'(\text{S})\text{-}^2\text{H}_1,1',2',3',4',5'\text{-}^{13}\text{C}_5]$ 2,5-Diamino-6-ribitylamino-4(3H)-pyrimidinon-5'-phosphat aus den Reaktionen der Reduktasen von *M. jannaschii* (linke Seite) und *C. glabrata* (rechte Seite) mit  $[4(\text{R})\text{-}^2\text{H}_1]\text{NADPH}$  als Cofaktor.

Aus früheren Untersuchungen war bekannt, dass Hefereduktasen das Hydrid aus NADPH in die proS-Position des Produkts einbauen (Keller *et al.*, 1988). Abbildung 3.63 zeigt die beiden HMQC Spektren der Reduktaseprodukte von *M. jannaschii* und *C. glabrata*, welche durch Reaktion von  $[1',2',3',4',5'-^{13}\text{C}_5]$ -markiertem Substrat mit  $[4(\text{R})\text{-}^2\text{H}_1]\text{NADPH}$  erzeugt wurden. Beim Vergleich mit Abbildung 3.61 erkennt man, dass in beiden Fällen das Signal des 1'-proS Protons fehlt. Daraus kann geschlossen werden, dass auch die archaealen Reduktasen das 4-proR H-Atom von NADPH in die 1'-proS Stellung von 2,5-Diamino-6-ribitylamino-4(3H)-pyrimidinon-5'-phosphat einbauen.

### 3.5.6 Nachweis der Regiospezifität einer pentameren, archaealen Riboflavin-Synthase

Der letzte Schritt der Riboflavinbiosynthese ist die Reaktion von zwei Molekülen 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin zu je einem Molekül Riboflavin und 5-Amino-6-ribitylamino-(1H,3H)2,4-pyrimidindion. Die Riboflavin-Synthasen von Eubakterien, Pilzen und Pflanzen sind trimere Proteine, deren Monomere aus mehr als 200 Aminosäuren bestehen und aus zwei Domänen mit hoher Sequenzhomologie und ähnlichen Faltungsmustern aufgebaut sind (Gerhardt *et al.*, 2002; Liao *et al.*, 2001b; Schott *et al.*, 1990a). Sie binden die beiden Substratmoleküle in einer antiparallelen Anordnung und benötigen keine Metallionen als Cofaktoren.

Die bisher einzige bekannte archaeale Riboflavin-Synthase aus *Methanothermobacter thermoautotrophicus* besteht aus 156 Aminosäuren und weist keinerlei Sequenzhomologien zu den Riboflavin-Synthasen der Eubakterien und Eukaryonten auf (Eberhardt *et al.*, 1997). Der offene Leserahmen MJ1184 von *M. jannaschii* besitzt Sequenzhomologien sowohl zu dieser archealen Riboflavin-Synthase, als auch zu den pentameren Lumazin-Synthasen von Eubakterien, Eukaryonten und Archaea. Durch Klonierung eines codon-optimierten synthetischen Gens in das Plasmid pNCO113 gelang die Überexpression des zugehörigen Proteins. Aus einem rekombinanten *E. coli* Stamm, der dieses Gen unter der Kontrolle eines T5-Phagen Promotors und eines lac Operators exprimiert, wurde nach Hitzebehandlung des Rohextraktes und anschließender Gelfiltrationschromatographie homogenes Protein erhalten, dessen Molekulargewicht zu 17.364 Da je Untereinheit bestimmt wurde. Hydrodynamische Untersuchungen deuteten auf eine Molekulargewicht von 88.3 kDa und somit eine pentamere Struktur hin. Das rekombinante Protein katalysierte die Umsetzung von 6,7-Dimethyl-

8-ribityllumazin zu Riboflavin bei pH 7.0 und 40 °C mit einer spezifischen Aktivität von 24 nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>. Für die maximale katalytische Aktivität war die Anwesenheit zweiwertiger Metallkationen, vorzugsweise Mg<sup>2+</sup> oder Mn<sup>2+</sup>, zwingend erforderlich (Fischer *et al.*, 2004b).

Die von der Riboflavin-Synthase katalysierte Reaktion beinhaltet die Übertragung einer 4-Kohlenstoffeinheit zwischen zwei Molekülen 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin. Somit stammen alle 8 Kohlenstoffatome des Xylolrings im Riboflavin von den Atomen 6, 6 $\alpha$ , 7 und 7 $\alpha$  des Substrats. In diesem Prozess verliert jede Methylgruppe des Akzeptor-Moleküls zwei H-Atome und wird Teil des carbocyclischen Ringsystems. In Studien mit <sup>2</sup>H-markierten Lumazinmolekülen und Riboflavin-Synthase aus Bäckerhefe konnten Beach und Plaut (1970) schon frühzeitig zeigen, dass die 6 $\alpha$ -Methylgruppe des Donor-Moleküls als 8 $\alpha$ -Methylgruppe in das Produkt Riboflavin eingebaut wird. Daraus wurde geschlossen, dass die beiden Substratmoleküle im aktiven Zentrum des Enzyms in antiparalleler Orientierung angeordnet sein müssen. Dieser Befund wurde später in einer Arbeit mit der Riboflavin-Synthase von *B. subtilis* und <sup>13</sup>C-markiertem 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin als Substrat bestätigt (Sedlmaier *et al.*, 1987).

Nachdem die Riboflavin-Synthasen von Archaea keinerlei Sequenzhomologien mit denen der Eubakterien und Eukaryonten aufweisen, war es notwendig die Regiochemie des katalytischen Prozesses in *M. jannaschii* zu überprüfen. Zu diesem Zweck wurden verschiedene <sup>13</sup>C-markierte Lumazine mit der Riboflavin-Synthase aus *M. jannaschii* umgesetzt. Auf der Basis der bekannten Regiochemie in Eubakterien und Hefen konnten die Markierungsmuster der Riboflavine (2a-c), die beim Einsatz von 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin-Isotopologen (1a-c) entstehen, vorhergesagt werden (Abb 3.64). Zum Beispiel würde aus [7-<sup>13</sup>C<sub>1</sub>]- (1a), [6 $\alpha$ -<sup>13</sup>C<sub>1</sub>]- (1b) und [7 $\alpha$ -<sup>13</sup>C<sub>1</sub>]-6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin (1c) die Bildung der Riboflavin Isotopomere [7,9 $\alpha$ -<sup>13</sup>C<sub>2</sub>] (2a), [6,8 $\alpha$ -<sup>13</sup>C<sub>2</sub>] (2b) und [7 $\alpha$ ,9-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>] (2c) erwartet.

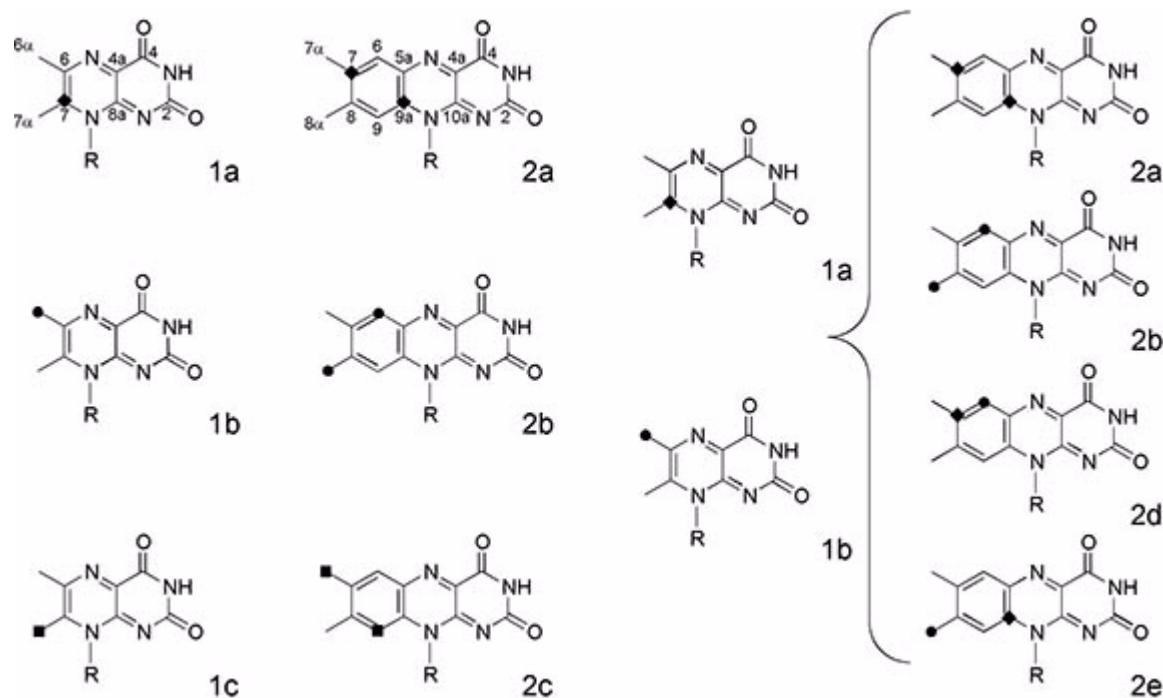


Abb. 3.64: Linke Seite: Isotopomere von 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin (1a–c) und daraus gewonnene Riboflavin Isotopomere (2a–c). Rechte Seite: Riboflavin Isotopomere (2a, b, d, e) aus einer äquimolaren Mischung der isotopomeren Lumazine 1a und 1b.

Abbildung 3.65 (Zeile A) zeigt die  $^{13}\text{C}$ -NMR-Signale des Riboflavins, welches aus der Reaktion von  $[7\text{-}^{13}\text{C}_1]$ 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin mit der Riboflavin-Synthase aus *M. jannaschii* erhalten wurde. Die Dublets bei 139.2 und 132.0 ppm konnten, mit den aus Kapitel 3.2.2.4 bekannten NMR-Daten isotopologer Riboflavine, dem C-7 bzw. dem C-9a Atom des Xylolrings zugeordnet werden (siehe Tabelle 3.5). Die Aufspaltung der Signale kann durch die Weitbereichskopplung zwischen den beiden markierten C-Atomen erklärt werden. Die nicht markierten C-Atome haben in diesem Spektrum aufgrund der geringen natürlichen Häufigkeit des  $^{13}\text{C}$ -Isotops Intensitäten unterhalb des Detektionslimits. Die Zeilen B und C in Abbildung 3.65 zeigen analog die  $^{13}\text{C}$ -NMR-Signale der Riboflavin-Isotopomeren aus den  $[6\alpha\text{-}^{13}\text{C}_1]$ - und  $[7\alpha\text{-}^{13}\text{C}_1]$ -markierten Lumazinen. Die Signale erscheinen, aufgrund der hier nicht aufgelösten Weitbereichskopplungen im Bereich von 2-3 Hz, als verbreiterte Singulets und konnten den Atomen C-6 und C-8 $\alpha$ , im Experiment mit  $[6\alpha\text{-}^{13}\text{C}_1]$ 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin bzw. den Atomen C-9 und C-7 $\alpha$  im Experiment mit  $[7\alpha\text{-}^{13}\text{C}_1]$ 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin zugeordnet werden. Diese Beobachtungen stimmen mit den Vorhersagen überein, die auf Basis der bekannten Regiochemie bei eubakteriellen und eukaryotischen Riboflavin-Synthesen getroffen wurden.

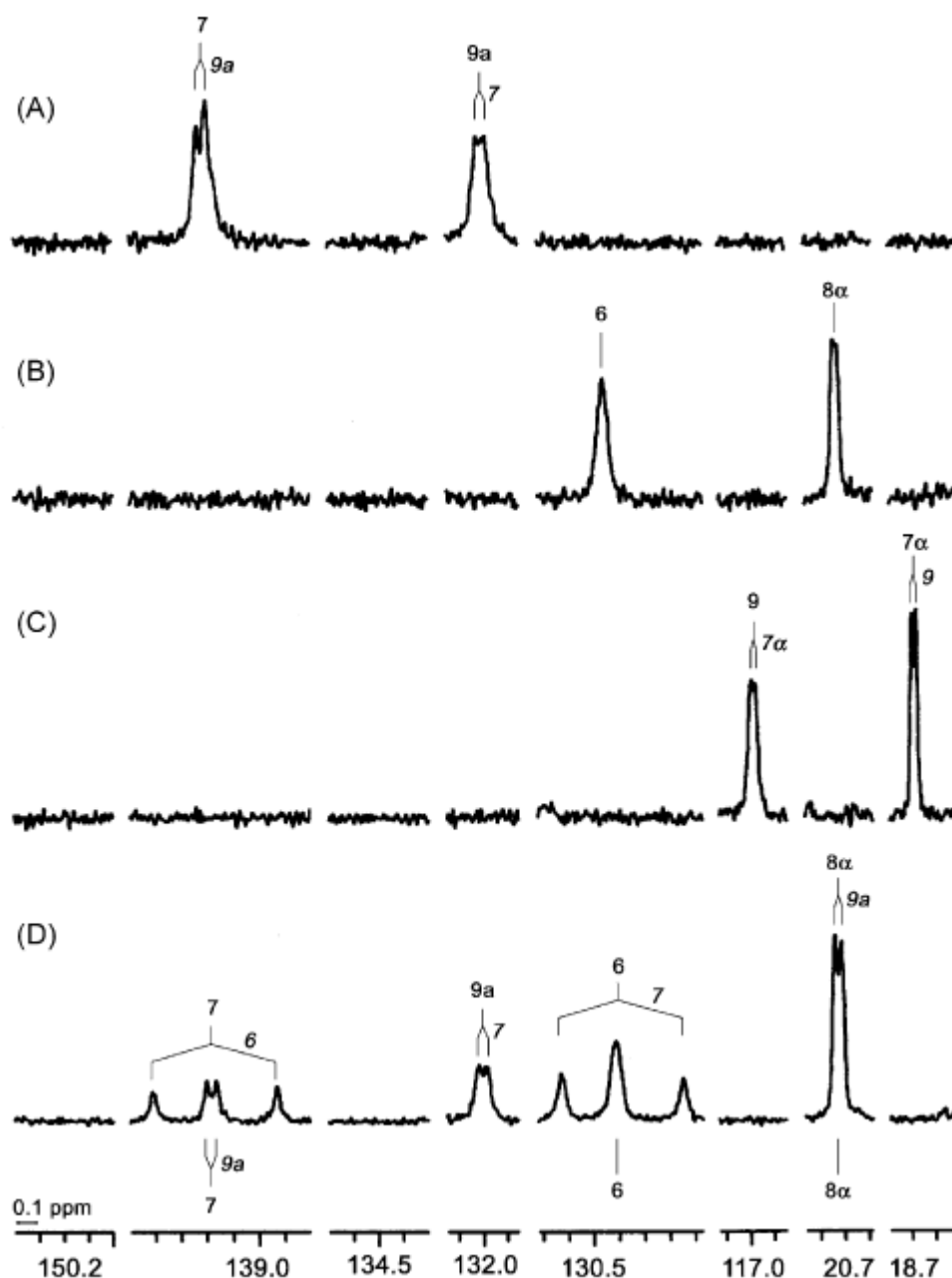


Abb 3.65:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Signale von Riboflavin Isotopomeren, die unter dem katalytischen Einfluss der Riboflavin-Synthase von *M. jannaschii* aus folgenden Lumazin Isotopomeren erhalten wurden: (A)  $[7\text{-}^{13}\text{C}_1]$ , (B)  $[6\alpha\text{-}^{13}\text{C}_1]$ , (C)  $[7\alpha\text{-}^{13}\text{C}_1]$ . Das Spektrum in Zeile D entstand bei der Reaktion einer äquimolaren Mischung von  $[7\text{-}^{13}\text{C}_1]$ - und  $[6\alpha\text{-}^{13}\text{C}_1]$ -6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin.

Eine Mischung aus den zwei isotopomeren Substrat-Proben,  $[7\text{-}^{13}\text{C}_1]$ - (1a) und  $[6\alpha\text{-}^{13}\text{C}_1]$ -6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin (1b), sollte insgesamt vier Riboflavin-Isotopomere (2a, 2b, 2d und 2e) ergeben, da jedes Lumazinmolekül in jeder möglichen Kombination sowohl als Donor, als auch als Akzeptor der 4-Kohlenstoffeinheit fungieren kann. Im Einklang mit dieser Erwartung erscheint das Signal des C-7 Atoms bei 139.2 ppm als Überlagerung zweier



Dublets (Abb. 3.65, Zeile D). Die äußeren Linien stammen von einer  $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$ -Kopplung über eine Bindung zwischen C-6 und C-7 im Produkt-Isotopomer 2d. Das Dublett im Zentrum dieser Signalgruppe repräsentiert das C-7 Atom mit einer Kopplung zu C-9a über drei Bindungen im Isotopomer 2a. Die Isotopomere 2b und 2e haben keine  $^{13}\text{C}$ -Markierung in Position 7 und tragen daher nichts zu dem Signal bei 139.2 ppm bei. In ähnlicher Weise besteht das C-6 Signal bei 130.5 ppm aus einem Dublet, aufgrund der Kopplung zwischen C-6 und C-7 in Isotopomer 2d und einem zentralen Singulet von Isotopomer 2b. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Regiochemie der Riboflavin-Synthase von *M. jannaschii* trotz eines völlig unterschiedlichen Enzymaufbaus identisch zu den korrespondierenden Reaktionen in Eubakterien und Hefen ist.

## 4 Diskussion

### 4.1 Synthese isotopologer Verbindungen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene zum Teil neu entwickelte Verfahren zur Synthese isotopologer Flavine verwendet. Abbildung 4.1 stellt diese in einer zusammenfassenden Übersicht dar. Die bekannten organisch synthetischen (grüner/blauer Block) und fermentativen (grauer Block) Verfahren, die beide auch für die großtechnische Produktion von Riboflavin eingesetzt wurden, weisen bei der Synthese isotopologer Flavine einige Schwächen auf. Dennoch wurde für Markierungen im Pyrimidinring und der Ribitylseitenkette des Riboflavinmoleküls zunächst auf relativ aufwendige chemische Synthesen zurückgegriffen. Biotechnologische (fermentative) Ansätze ermöglichen einerseits die Komplettmarkierung des Riboflavinmoleküls mit  $^{13}\text{C}$  und/oder  $^{15}\text{N}$ , andererseits erhält man bei Verwendung einfach markierter Glukose Isotopomere als Kohlenstoffquelle komplexe Mischungen verschiedener Flavin-Isotopologe. Diese stochastischen Bibliotheken stellten sich als wertvolle Hilfsmittel für die amplitudengestützte Zuordnung von NMR-Signalen in proteingebunden Liganden heraus.

Daneben wurden flexible biomimetische Ansätze für die enzymatische Synthese selektiv isotopmarkierter Flavine und deren Vorstufen entwickelt. Durch Verwendung sechs rekombinanter und kommerziell erhältlicher Enzyme gelang die Transformation variabel markierter Glukose-Isotopologe in die jeweils entsprechend markierte Riboflavin-Vorstufe 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat (roter Block). Die zweite Riboflavin-Vorstufe 5-Amino-6-ribosylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion konnte auf bekanntem Wege synthetisch aus Ribose und 2,4,6-Trichlorpyrimidin hergestellt werden (gelber Block) oder über die Zwischenstufe Guanosin-5'-triphosphat ebenfalls durch enzymatische Synthese aus Glukose und Xanthin. Für die Markierung von Xanthin in variablen Positionen standen organisch synthetische Methoden zur Verfügung. Mit Hilfe von Flavokinase und FAD-Synthase konnten die Riboflavin-Isotopologe in die Coenzymformen FMN bzw. FAD umgewandelt werden.

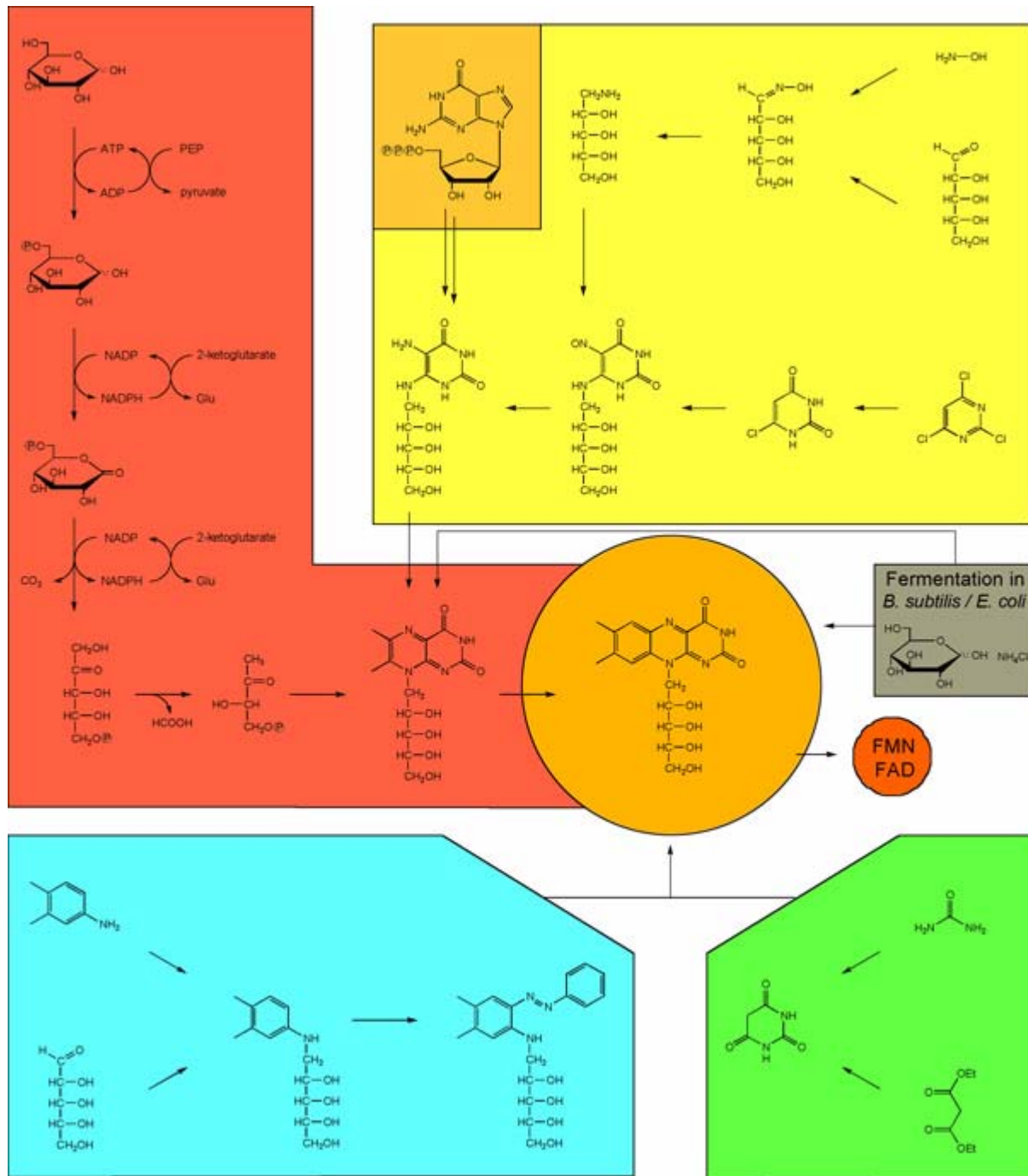


Abb. 4.1: Verschiedene Methoden der Riboflavinsynthese.

An der vollenzymatischen Synthese von FMN sind insgesamt 19 Enzyme beteiligt. Außer Glukose und Xanthin müssen lediglich PEP und 2-Ketoglutarat in äquivalenten Mengen eingesetzt werden, die Cofaktoren ATP und NAD(P)<sup>+</sup> werden nur in katalytischer Menge benötigt. Eine Isolierung von Zwischenprodukten, deren Isotopologe oft für sich genommen wertvoll sind, ist auf den Stufen von Ribulose-5-phosphat, 3,4-Dihydroxy-2-butanon-

4-phosphat, Guanosin-5'-triphosphat, 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin und Riboflavin leicht möglich, aber prinzipiell nicht notwendig.

Demgegenüber bedarf die chemische Synthese komplexer Naturstoffe normalerweise der Isolierung und Reinigung von Intermediaten nach jedem Reaktionsschritt. Dieser Prozess ist oft mühsam und die Gesamtausbeute hängt neben den unvermeidlichen Reinigungsverlusten vom Umsatz jedes einzelnen Reaktionsschrittes ab. Die Entsorgung unerwünschter Nebenprodukte kann einen erheblichen zusätzlichen Kostenfaktor darstellen.

Die Biosynthese von Naturstoffen in den Zellen von Organismen funktioniert dagegen ohne Bildung unerwünschter Nebenprodukte und eine große Zahl von Reaktionen, je nach genetischer Komplexität des Organismus einige hunderte bis tausende, laufen parallel und ohne gegenseitige Störungen ab. Diese Simultanprozesse werden in Reaktoren (Zellen, Organellen) durchgeführt, deren Volumen im Bereich von einigen Femto- bis Pico-Liter liegen. In diesem Zusammenhang können Zellen letztlich als biochemische "Nanoreaktoren" angesehen werden.

Zu den herausragenden Eigenschaften zellulärer Biosynthese gehören die Verwendung von in Bezug auf Substrat- Regio- und Stereoselektivität hochspezifischen, jedoch nicht zwingend absolut spezifischen Katalysatoren sowie die Kontrolle der Gibbschen freien Enthalpie Gradienten. Bemerkenswerterweise ist die Rate enzymkatalysierter Reaktionen nicht immer hoch. So liegen typische Umsatzraten im Bereich von Millisekunden bis Minuten. Daneben gibt es allerdings auch einige schnelle enzymatische Reaktionen, deren Rate diffusionskontrolliert ist. Einige an der Biokatalyse von Riboflavin beteiligte Enzyme haben als Beispiele für langsame Reaktionen Umsatzzahlen im Bereich von 2 Molekülen pro Minute und Untereinheit (Richter *et al.*, 1992; Bacher *et al.*, 1997a; 1997b; Illarionov *et al.*, 2001).

Einige Charakteristika des zellulären Metabolismus können auch auf enzymatische *in vitro* Naturstoffsynthesen übertragen werden. Die Verfügbarkeit von Enzymen, die eine Vielfalt chemischer Reaktionen katalysieren, nimmt ständig zu. Dies ist unter anderem auf die wachsende Zahl komplett sequenzierter Genome aus unterschiedlichen Organismen zurückzuführen. Durch Verwendung rekombinanter Gentechnologie, in Verbindung mit affinitätschromatographischer Reinigung, beispielsweise von rekombinanten His-tag Fusionsproteinen an Metallchelate-Säulen, können gewünschte Enzyme mit begrenztem und gut kalkulierbarem Aufwand gewonnen werden. Ein hinreichend großer Gradient an freier Gibbs Enthalpie als Triebkraft für den kompletten Umsatz einer Reaktion wird auf einfache

Weise erreicht, wenn spezifische enzymatische Schritte des jeweiligen Biosyntheseweges von sich aus thermodynamisch irreversibel sind. Stark negative  $\Delta G$  Werte treten vor allem bei Reaktionen auf, die durch den Entropiegewinn bei der Abspaltung kleiner Moleküle, wie Phosphat, Wasser oder Formiat, die Hydrolyse energiereicher Verbindungen wie Phosphorsäureester, oder die Bildung stabiler aromatischer Systeme gekennzeichnet sind. Dies ist im Bereich der Riboflavinbiosynthese z.B. für die Schritte der 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat-Synthase, der 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin-Synthase und der Riboflavin-Synthase der Fall. Darüber hinaus können negative  $\Delta G$  Werte erzwungen werden, indem man energetisch ungünstige Reaktionen an stark exergonische Hilfsreaktionen koppelt. Bei der enzymatischen Riboflavinsynthese geschieht dies durch die Verwendung der Hilfsenzyme Pyruvatkinase und Glutamat-Dehydrogenase für das Cofaktorrecycling mit den Hilfssubstraten PEP und 2-Ketoglutarat.

Eine wichtige Methode des zellulären Stoffwechsels die freie Enthalpie zu regulieren besteht darin Metabolite über Zellkompartimente hinweg zu transportieren. So können Metabolite z.B. in Pflanzenvakuolen gespeichert oder an das umgebende Medium (Fermentationsmedium bzw. interzelluläre Flüssigkeit) abgegeben werden. In biomimetischen *in vitro* Synthesen ist die Kontrolle von  $\Delta G$  durch die Entfernung des Produkts aus dem Reaktionsvolumen jedoch meist schwierig zu realisieren. Im Fall der Riboflavinsynthese ist die Lage besonders günstig, da Riboflavin aufgrund seiner geringen Löslichkeit in Wasser aus dem Reaktionsgemisch auskristallisiert. Allerdings wäre hier die Gesamtreaktionsenthalpie auch ohne dieser zusätzlichen Senke negativ genug um die Reaktion vollständig ablaufen zu lassen.

Dass die Ausbeuten der in dieser Arbeit beschriebenen enzymatischen Synthesen dennoch meist nicht über 50 % hinauskamen, mag neben Verlusten bei der Aufarbeitung daran liegen, dass während den teilweise sehr langen Inkubationszeiten die nach der GTP-Cyclohydrolase II Reaktion auftretenden bzw. synthetisch hergestellten sauerstoffempfindlichen Pyrimidin Intermediate oxidiert wurden, da nicht streng anaerob (z.B. in einer Glovebox) gearbeitet wurde. Zum Anderen können Spuren von Phosphataseaktivität in den kommerziellen und/oder rekombinanten Enzymen zu einer Dephosphorylierung von Intermediaten und so zu nachfolgenden Ausbeuteverlusten führen.

Die Reinheit der verwendeten Enzyme stellt generell einen wichtigen Faktor in Multienzym Eintopf Reaktionen dar. Ein Enzym, das eine unerwünschte Nebenreaktion katalysiert, kann

dabei prinzipiell durch jedes andere Enzym in die Reaktionsmischung mit eingeschleppt werden. Rekombinante Enzyme können oft als Fusionsproteine mit Metall chelatisierenden, Kohlenhydrat oder Protein bindenden Domänen konstruiert werden um eine einfache und effiziente Reinigung *via* Affinitätschromatographie zu ermöglichen. Die Reinheit der kommerziell erhältlichen Enzyme bleibt jedoch ein allgemeiner Unsicherheitsfaktor.

Enzymatische Verfahren sind besonders nützlich für die Herstellung isotopmarkierter Moleküle. Im Fall der Flavocoenzyme werden vielfältige Einzel- und Mehrfachmarkierungen für biophysikalische Untersuchungen an Flavoproteinen mittels NMR-, EPR-, IR- und Ramanspektroskopie benötigt. Daneben sind stabilisotopmarkierte Intermediate wertvoll für mechanistische Untersuchungen an den beteiligten Enzymen. Da die enzymatischen Verfahren einfach auf kleine Volumina herunter skaliert werden können, eignen sie sich prinzipiell auch sehr gut für die Synthese radioisotopmarkierter Verbindungen mit hoher spezifischer Aktivität aus einfach erhältlichen Edukten wie  $^{14}\text{C}$ -markierter Glukose. Dagegen kann die Skalierung chemischer Synthesen zur Herstellung radioaktiver Verbindungen mit hoher spezifischer Aktivität zu schwer lösbaren Problemen führen.

Die Anwendbarkeit enzymgestützter Langschuß-Eintopf-Synthesen mit Kaskaden rekombinanter Enzyme wächst ständig mit der Verfügbarkeit einer hohen Zahl bekannter Gene aus verschiedenen Organismen. Der Satz isotopmarkierter Edukte für enzymatische Synthesen ist relativ begrenzt, da alle Naturstoffe letztlich aus einer kleinen Zahl intermediärer Metabolite aufgebaut werden. Unter den genannten Aspekten sowie langfristig unter dem Aspekt der Verknappung/Verteuerung fossiler Rohstoffe erscheint es durchaus möglich, dass zunehmend komplexere enzymatische Synthesen auch Einzug in industrielle Prozesse zur Herstellung unmarkierter Produkte finden werden.

## 4.2 Spektroskopische Untersuchungen an Flavoproteinen

Stabilisotopmarkierte Flavine sind ideale Hilfsmittel und teilweise zwingende Voraussetzung für die Interpretation von spin- und massensensitiven biophysikalischen Messungen an Flavoproteinen. Dazu gehört neben verschiedenen Kern- und Elektronen-Magnetischen Resonanz Verfahren auch die Schwingungsspektroskopie. NMR-Spektren geben Informationen über die chemische Umgebung einzelner Atome und lassen Rückschlüsse auf die Konformation eines Moleküls im freien oder proteingebundenen Zustand zu. Mit EPR

und ENDOR-Spektroskopie lassen sich Radikalzustände des Flavinliganden und die Hyperfeinwechselwirkungen zwischen Kern- und Elektronenspin genauer untersuchen. Die Infrarot und Raman Schwingungsspektroskopie liefert wichtige Erkenntnisse über die Beweglichkeit einzelner Molekülteile und kann insbesondere bei zeitaufgelösten Verfahren auf Konformationsänderungen während einer Reaktion oder optischen Anregung hinweisen. Die genannten Verfahren sind prinzipiell sowohl auf den freien oder proteingebundenen Liganden als auch auf das Flavoprotein selbst anwendbar.

An der LOV2-Domäne des Farns *A. capillus veneris*, deren Kristallstruktur bereits bekannt ist, wurde erstmals die Anwendbarkeit stochastischer FMN-Bibliotheken bei der Signalintensitäten gestützten Zuordnung von NMR-Signalen des Flavinliganden demonstriert und mit selektiven Einzel- und Mehrfachmarkierungen überprüft. Anhand nur 3 Proteinproben mit markiertem FMN-Bibliotheken aus [U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>], [2-<sup>13</sup>C<sub>1</sub>] und [3-<sup>13</sup>C<sub>1</sub>]Glukose, konnten sämtliche Flavinsignale sowohl im Dunkelzustand der LOV-Domäne, als auch im C450→C-4a Photoaddukt zweifelsfrei zugeordnet werden. Dies stellt einen deutlich verringerten experimentellen Aufwand gegenüber der herkömmlichen Zuordnung über Einzelmarkierungen dar. Zudem konnten einige fehlerhafte Zuordnungen einer älteren Studie an der LOV2-Domäne von *A. sativa* korrigiert werden, die darauf beruhten, dass damals nicht alle nötigen Einzelmarkierungen insbesondere der Ribitylseitenkette zugänglich waren. Das herausragende Resultat dieser Versuche war der Befund, dass die Signale der Ribitylseitenkette im freien und im proteingebundenen Liganden nicht die selbe Reihenfolge bezüglich der chemischen Verschiebung aufweisen, sondern dass einige Ribityl-Kohlenstoffatome relativ große Veränderungen bei der Bindung an das Apoprotein erfahren. Im Einklang mit der älteren Zuordnung ergibt sich nach Blaulichtbestrahlung für das C-4a Atom eine Hochfeldverschiebung von etwa 68 ppm, was auf die Photoadduktbildung eines Cysteinrestes an die C-4a Position zurückzuführen ist. Die anderen Kohlenstoffatome des Isoalloxazinsystems erfahren nach Beleuchtung Änderungen der chemische Verschiebung von 20.1 bis 0.1 ppm, die der Ribitylseitenkette von 1.4 - 0.1 ppm. Lediglich für die Modulation der chemischen Verschiebung am C-1' Atom liese sich noch ein direkter elektronischer Einfluß der Veränderungen im konjugierten heterocyclischen System des Chromophors durch die Adduktbildung diskutieren, die übrigen abgegrenzten Kohlenstoffatome der Ribitylseitenkette dürften davon aber unbeeinflusst bleiben. Demnach dürften ihre veränderten chemischen Verschiebungen eine Modulation der Umgebung der Ribitylseitenkette widerspiegeln.

Bei der C450A Mutante der LOV2-Domäne aus *A. sativa* ist die Bildung des kovalenten C-4a Cystein Addukts nicht möglich. In den NMR-Spektren markierter Flavinliganden in dem Apoprotein dieser Mutante treten daher auch keine Änderungen der chemischen Verschiebungen nach Blaulichtbestrahlung auf. Dafür sind dort zum Teil stark negativ und positiv polarisierte NMR-Linien zu beobachten. Diese polarisierten NMR-Linien sind ein Kennzeichen des CIDNP-Effekts, der vor über 35 Jahren das erste mal bei photoinduzierten Radikalreaktionen beobachtet wurde (Bargon und Fischer, 1967; Ward und Lawler, 1967). Der Begriff CIDNP bezeichnet eine Nicht-Boltzmann Verteilung der Kernspins, welche sich durch verstärkte absorptive oder emissive NMR-Signale bemerkbar macht. Der Ursprung des CIDNP-Effekts beruht auf einem Radikalpaar Mechanismus für den postuliert wird, dass der Verlauf der photochemischen Reaktion vom Ausmaß des Austauschs von Singulett und Triplett Zuständen in den Radikalpaar-Intermediaten abhängt und dieser Austausch zumindest teilweise von der Hyperfeinwechselwirkung zwischen Elektronen- und Kernspin getrieben wird (Closs, 1969; Lawler, 1967 und 1972; Kaptein, 1975). Die Anwendung von CIDNP-Effekten wurde mit großem Erfolg auf Biopolymere ausgedehnt und wird heutzutage verwendet um die Oberfläche von Proteinen mit exogenen photosensitiven Molekülen zu untersuchen, die Radikalpaarreaktionen mit aromatischen Aminosäuren induzieren sollen (Hore *et al.*, 1997; Mok und Hore, 2004; Maeda *et al.*, 2000). Dennoch wurde photo-CIDNP an integralen Protein-Cofaktor Systemen bisher nur an photosynthetischen Reaktionszentren von Bakterien und Pflanzen beobachtet (Zysmilich und McDermott, 1994; 1996a; 1996b; Alia *et al.*, 2004; Matysik *et al.*, 2000). Diese Proteinkomplexe sind jedoch so groß, dass Festkörper NMR-Techniken wie magic-angle-spinning angewandt werden müssen um schmale NMR-Linien zu erhalten. Kernspinpolarisation in Flüssig-NMR-Experimenten beruht auf der bemerkenswerten Tatsache, dass der Spinzustand magnetischer Kerne die chemische Reaktivität beeinflussen könnte. Die Spin Sortierung bei einer Radikalpaar Reaktion muss dabei gar nicht mal besonders effektiv sein um stark verstärkte NMR-Signalintensitäten zu bewirken.

Abbildung 4.2 zeigt einen hypothetischen Radikalpaar Reaktionsmechanismus für den Photozyklus der C450A LOV2-Domäne, der mit den experimentellen Beobachtungen konsistent ist. Ein ähnlicher Mechanismus wurde für die photosensitive Reaktion von exogenem FMN mit Oberflächen-exponierten Aminosäuren in Proteinen vorgeschlagen (Mok und Hore, 2004). FMN im volloxidierten, diamagnetischen (und somit im NMR sichtbaren) Grundzustand wird durch Blaulichtabsorption in den angeregten Singulettzustand  $^1\text{FMN}$



versetzt. Mit hoher Quantenausbeute folgt durch *inter system crossing* (ISC) die Umwandlung in den Triplettzustand. Eine starke Population des  $^3\text{FMN}$ -Zustands wurde bereits durch zeitaufgelöste optische Spektroskopie und EPR nachgewiesen (Swartz *et al.*, 2001; Schleicher *et al.*, 2004).  $^3\text{FMN}$  ist ein starkes Oxidationsmittel und somit in der Lage ein Elektron von einer benachbarten redoxaktiven Aminosäure in der LOV2-Domäne zu abstrahieren. Das auf diese Weise gebildete spinkorrelierte geminale Triplett-Radikalpaar  $^3[\text{FMN}^{\bullet-} \cdots \text{A}^{\bullet+}]$  wandelt sich entweder in den Singulett-Zustand  $^1[\text{FMN}^{\bullet-} \cdots \text{A}^{\bullet+}]$  um, der anschließend einem spinerlaubtem Elektronenrücktransfer unterliegt und so die Reaktanten FMN und die Aminosäure A im Grundzustand zurückbildet, oder es verliert die Spinkorrelation durch weitere Elektronentransferschritte, die unkorrelierte Radikale ergeben.

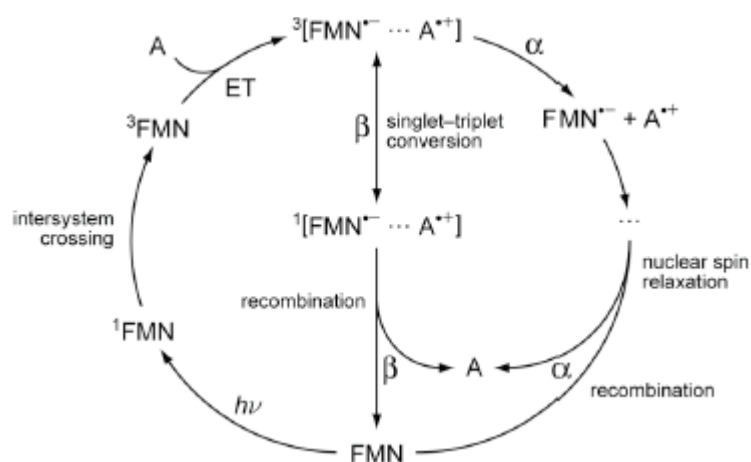


Abb. 4.2: Hypothetischer Radikalpaarmechanismus für die C450A LOV2 Mutante.

Wenn man annimmt, dass die Umwandlung von Singulett und Triplett Radikalpaar Zuständen über die Elektron-Kern Hyperfeinwechselwirkung vom Spinzustand der  $^{13}\text{C}$ -Kerne im FMN Chromophor abhängt und man weiter (willkürlich) annimmt, dass die Umwandlung schneller ist, wenn ein oder mehrere  $^{13}\text{C}$  Atome im  $\beta$ -Spinzustand ( $m_I = -1/2$ ) sind, dann besteht für Triplett-Radikalpaare, die  $^{13}\text{C}$  Atome in  $\beta$  Konfiguration enthalten, eine höhere Konversionswahrscheinlichkeit in den Singulettzustand und anschließende Rekombination. Auf der anderen Seite ergeben Triplett-Radikalpaare mit  $^{13}\text{C}$  Atomen in  $\alpha$ -Spin Konfiguration ( $m_I = +1/2$ ) dann eher nicht korrelierte Radikale. Diese könnten weiteren Reaktionen unterliegen und zum Beispiel ein N-5 protoniertes  $\text{FMNH}^{\bullet}$  Radikal und ein deprotoniertes Aminosäureradikal  $\text{A}^{\bullet}$  bilden, die unter Umständen auch wieder zu den Reaktanten FMN und A im

Grundzustand rekombinieren können. Diese Rekombination würde jedoch auf einer deutlich längeren Zeitskala stattfinden als der Weg über das Singulett Radikalpaar, so dass die polarisierten  $^{13}\text{C}$  Atome in den unkorrelierten Radikalen genug Zeit hätten vor der Rekombination wieder zur Boltzmann Spinverteilung zurück zu relaxieren. Durch die unterschiedlichen Geschwindigkeiten beider Wege bleiben im Grundzustand (FMN, A) Netto-Kernspinpolarisationen der  $^{13}\text{C}$  Atome erhalten. In diesem Reaktionsschema stammt das stark negativ polarisierte NMR-Signal bei 109 ppm von einem mit natürlicher Häufigkeit vorkommenden  $^{13}\text{C}$  Atom der redoxaktiven Aminosäure A, das über den Weg des  $^1[\text{FMN}^{\bullet-}\cdots\text{A}^{\bullet+}]$  Radikalpaars seine Spinpolarisation erhält. In CIDNP Untersuchungen der Lösungsmittelzugänglichkeit von Proteinoberflächen mit exogenem FMN sind typischerweise aromatische Aminosäuren wie Tyrosin, Tryptophan oder Histidin als Elektronentransfer- Partner beobachtet worden (Mok und Hore, 2004). Dass nur ein polarisiertes NMR-Signal der, mit hoher Wahrscheinlichkeit einem Tryptophanrest zuzuordnenden Aminosäure beobachtet werden kann, deutet auf eine stark lokalisierte ungepaarte Elektronenspindichte im Radikalzustand hin. Eine weitergehende quantitative Analyse des Polarisierungsphänomens unter standardisierten Beleuchtungsbedingungen, dürfte wertvolle Informationen über die elektronische Struktur paramagnetischer Intermediatzustände in LOV Domänen liefern, da sich die daraus ergebende Kernspinpolarisation auch in den diamagnetischen Reaktionsprodukten widerspiegelt. Ein solches Verfahren, dessen Grundlagen nun mit der ersten Beschreibung eines CIDNP-Effekts in Flüssig-NMR-Experimenten zugänglich gemacht wurden, dürfte sich auch auf die Erforschung von Elektronentransferprozessen in anderen Flavoproteinen bis zu mittlerer Größe anwenden lassen.

Nachdem sich die Anstrengungen zunächst auf die LOV2-Domänen pflanzlicher Phototropine konzentrierten, wurde vor kurzem auch mit EPR- und IR-Messungen an der DNA-Photolyase begonnen, einem Protein, das FAD als Cofaktor besitzt und in einer lichtabhängigen Reaktion DNA Schäden von durch UV-Licht gebildeten Thymin-Dimeren repariert. Weitere Studien an Flavin- oder Lumazin-bindenden Proteinen mit isotopologen Cofaktoren sind bei der Flavokinase aus *S. pombe*, der Idi2 einem Enzym des alternativen Terpenbiosynthesewegs und dem Lumazinprotein mariner Bakterien in Bearbeitung. Prinzipiell lassen sich mit der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Bibliothek spezifisch oder stochastisch markierter Riboflavinmoleküle interessante biophysikalische Fragestellungen an nahezu jedem Flavoprotein bearbeiten.

### 4.3 Enzyme der Riboflavinbiosynthese

Die isotopmarkierten Intermediate, die bei den enzymatischen Riboflavin-Synthesen auftreten, konnten in vielen Fällen als hilfreiche Substrate für mechanistische und kinetische Untersuchungen an Enzymen der Vitamin B<sub>2</sub> Biosynthese verwendet werden. Die bisher bekannten Enzymassays für die 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat-Synthase, die GTP-Cyclohydrolasen und die verschiedenen Desaminasen und Reduktasen verwenden zum Teil aufwendige und indirekte Methoden, bei denen das primäre Produkt erst nach Derivatisierung, nachgeschalteten enzymatischen Reaktionen und evtl. einer HPLC-Reinigung einer photometrischen Detektion zugänglich gemacht wird. Die Reaktionen der GTP-Cyclohydrolasen und der Reduktasen (NADH-Verbrauch) lassen sich zwar auch direkt photometrisch verfolgen, aber eine komplexe kinetische Analyse, die z.B. auch die Anomerisierung von Ribosylresten der Substrate oder Produkte mit einbezieht ist auf diesem Wege nicht möglich. Demgegenüber konnten durch enzymatische Synthesen für jedes der genannten Enzyme, zur jeweiligen Fragestellung massgeschneiderte isotopologe Substrate hergestellt werden, die eine direkte Beobachtung aller Reaktionsteilnehmer durch zeitaufgelöste NMR-Spektroskopie ermöglichten. Die Verwendung spezifisch <sup>13</sup>C-markierter Substrate ermöglichte neben der enormen Empfindlichkeitssteigerung des spektroskopischen Nachweises auch die Konzentration auf Veränderungen an spezifischen Positionen einer Verbindung, z.B. dem C-1' Atom bei der Anomerisierung eines Ribosylrestes oder dem C-2 Atom bei der Desaminierung eines Pyrimidin Intermediats.

Für die 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat-Synthase aus *M. jannaschii* (Kapitel 3.5.1) konnte mit Hilfe von <sup>13</sup>C-Markierungsexperimenten auf einfache und eindeutige Weise ein intramolekularer Reaktionsmechanismus nachgewiesen werden. In dessen Verlauf findet eine ungewöhnliche Umlagerungsreaktion statt, bei der am Ende das C-4 Atom aus einer Kette von 5 Kohlenstoffatomen als Formiat abgespalten wird. Experimente mit <sup>18</sup>O-markiertem Wasser deuten auf einen komplexen Mechanismus, mit reversiblen Austausch von Sauerstoff zwischen einem carbonylartigen Reaktionsintermediat und Wasser hin, da auch markierte Formiatmoleküle mit mehr als einem <sup>18</sup>O Atom gefunden wurden. Mutanten der archaealen 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat-Synthase, die konservierte Aminosäurereste betrafen zeigten zum Teil sehr geringe Restaktivitäten, die mit Hilfe des klassischen Lumazin-Synthase gekoppelten Essays kaum nachzuweisen waren, da die Lumazin-Synthase Reaktion bei niedriger Substratkonzentration sehr langsam wird und das zweite Substrat der

Hilfsreaktion von begrenzter Stabilität ist.  $^{13}\text{C}$ -markiertes Formiat ist dagegen als direktes und nahezu unbegrenzt stabiles Produkt NMR-Spektroskopisch auch in geringen Mengen und nach langer Inkubationszeit mit hinreichender Genauigkeit nachweisbar. Der neuartige NMR-Assay zeigte bei den Mutanten-Proteinen deutlich seine Überlegenheit, da auf diese Weise noch Restaktivitäten größer als 0.02 % des Wildtyp-Enzyms nachweisbar waren. Es konnte so gezeigt werden, dass vor allem die polaren Aminosäuren im Aspartat und Glutamat reichen Bereich der Positionen 21-30 von essentieller Bedeutung für die katalytische Aktivität der 3,4-Dihydroxy-2-butanon-Synthase sind, was auf einen Mechanismus mit etlichen katalytischen Protonentransfer-Schritten hinweist. Außerdem konnten mit Threonin 112, Histidin 164 und Glutamat 185 drei weitere polare Aminosäuren außerhalb dieses sauren Loops identifiziert werden, deren Austausch die Aktivität des archaealen Enzyms um drei Größenordnungen herabsetzt.

Der NMR-Enzymassay für die GTP-Cyclohydrolase II aus den humanpathogenen Hefestämmen *C. albicans* und *C. glabrata* (Kapitel 3.5.2) beruht bei Totalmarkierung des Substrats GTP ebenfalls auf dem direkten Nachweis von  $^{13}\text{C}$  Formiat als Reaktionsprodukt. Da sich die UV-Vis Absorptionsspektren von GTP und dem Produkt der Reaktion 2,5-Diamino-6-ribosylamino-4(3*H*)-pyrimidinon hinreichend unterscheiden ist die Enzymaktivität prinzipiell auch über einen Photometerassay bestimmbar (Ritz *et al.*, 2001). Der NMR-Assay liefert allerdings darüber hinaus weitere Informationen zum Reaktionsverlauf. So kann insbesondere mit  $[1\text{-}^{13}\text{C}_1]\text{GTP}$  als Substrat gezeigt werden, dass zunächst in schneller Reaktion nur ein Produkt entsteht und ein zweites Produkt erst verzögert mit sigmoidalem Konzentrationsverlauf auftritt. Es handelt sich dabei um die beiden anomeren Formen des Ribosylrestes von 2,5-Diamino-6-ribosylamino-4(3*H*)-pyrimidinon, wobei die  $\beta$ -Form das primäre Produkt der enzymkatalysierten Form darstellt, während die  $\alpha$ -Form durch spontane und reversible Isomerisierung entsteht. Durch quantitative Auswertung der NMR-Signale und mathematische Optimierung des verwendeten Modells von Reaktionen erster Ordnung konnten die Ratenkonstanten der Hin- und Rückreaktion der Produkt-anomerisierung sowie des enzymatischen GTP Verbrauchs bestimmt werden.

Auch für die neuartige archaeale GTP-Cyclohydrolase III aus *M. jannaschii* lieferten erste NMR-Experimente mit total  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -markiertem Substrat bereits wichtige Erkenntnisse über die vier isomeren Produkte und die Dynamik ihrer Entstehung (Kapitel 3.5.3). Es konnte gezeigt werden, dass im Gegensatz zu der klassischen Cyclohydrolase II Reaktion das C-8

Atom von GTP nicht als Formiat abgespalten wird, sondern nach Öffnung des Imidazolrings als Formylaminogruppe erhalten bleibt. Das Produkt der enzymatisch katalysierten Reaktion entsteht wiederum zunächst als  $\beta$ -Anomer des Ribosylrestes und weist bezüglich der Formylaminogruppe eine cis-Konformation auf. Während die Gleichgewichtseinstellung der cis/trans-Isomerisierung des Formylaminorestes relativ rasch erfolgt, ist die  $\alpha/\beta$ -Anomerisierung des Zuckerrestes gegenüber den vergleichbaren Pyrimidin Intermediaten nach den Reaktionen der Cyclohydrolase II oder Desaminase um etwa zwei Größenordnungen verlangsamt. Dies dürfte zum Einen auf die sterische Hinderung des Formylaminorestes bei der Deprotonierung des Ribosylamino-Stickstoffs zurückzuführen sein, die zur Bildung einer Schiffschen Base als Übergangszustand der Anomerisierungsreaktion nötig ist. Zum Anderen könnten elektronischen Effekte die Deprotonierung des Formylamino- gegenüber dem Ribosylamino- Stickstoff begünstigen und eine stärkere Delokalisierung der negativen Ladung in den Heterocyclus und die konjugierte Formylaminogruppe hinein bewirken, als dies im reinen Diaminopyrimidinon Produkt der Cyclohydrolase II Reaktion der Fall ist.

Die Riboflavinbiosynthese in Pflanzen war in einigen Details bereits eingehend untersucht und ist von potentieller Bedeutung für die Nahrungs- und Futtermittelindustrie. Die Gene einer bifunktionellen GTP-Cyclohydrolase/Dihydroxybutanonphosphat-Synthase aus Tomate (Herz *et al.*, 2000 und 2002) und der Lumazin-Synthase aus Spinat wurden kloniert, die Struktur der pflanzlichen Lumazinsynthase wurde durch Röntgenkristallographie bestimmt (Persson *et al.*, 1999). Eine Riboflavin-Synthase wurde aus Spinat partiell gereinigt (Mitsuda *et al.*, 1970) und später das Gen der Riboflavin-Synthase aus *A. thaliana* kloniert (Bacher und Eberhardt, 2001). Über die Reaktionsschritte zwischen der GTP-Cyclohydrolase II und der Lumazin-Synthase in der pflanzlichen Riboflavinbiosynthese, insbesondere die Reihenfolge der Desaminase und Reduktase Reaktion, war bisher jedoch nichts bekannt. Durch selektive  $^{13}\text{C}$  Markierungen konnte nach Klonierung einer hypothetischen Desaminase aus *A. thaliana* NMR-Spektroskopisch nachgewiesen werden, dass das Protein die Desaminierung von 2,5-Diamino-6-ribosylamino-4(3*H*)-pyrimidinon-5'-phosphat katalysiert und damit eine Desaminase vom eubakteriellen Typ darstellt, während die Desaminasen von Pilzen ein Substrat mit bereits reduziertem Zuckerrest benötigen. Spontane Anomerisierungsreaktionen treten bei den GTP-Cyclohydrolasen nur beim Produkt und bei den Reduktasen nur beim Substrat auf, bei der Desaminasereaktion liegen jedoch sowohl Substrat als auch Produkt in anomeren Gleichgewichtsmischungen vor. Über 1D und 2D NMR-Experimente konnte auch hier die Dynamik der Umwandlung von der Substrat- in die Produktmischung und deren

strukturelle Zuordnung genauer untersucht werden. Aufgrund der kinetischen Experimente lässt sich schließlich zusammenfassend feststellen, dass alle Intermediate der Riboflavinbiosynthese zwischen der GTP-Cyclohydrolase Reaktion und der Reduktion des Ribosylrestes primär als  $\beta$ -Anomer entstehen und verbraucht werden, wobei sich jedoch meist recht schnell ein nahezu äquimolares Gleichgewicht mit dem  $\alpha$ -Anomer einstellt.

Für die Reduktasen aus *M. jannaschii*, *C. glabrata* und das RibD2 Protein aus *A. aeolicus* wurde ein NMR-Assay entwickelt, der ebenfalls auf spezifischen  $^{13}\text{C}$  Markierungen beruht und neben der enzymatisch katalysierten Reaktion auch die Dynamik des vorgeschalteten Gleichgewichts der anomeren Substrate beschreibt (Kapitel 3.5.5). In allen drei Fällen handelt es sich um Reduktasen vom Hefetyp, die ohne vorherige Desaminierung das Produkt der GTP-Cyclohydrolase II umsetzen können. Das Enzym des thermophilen Eubakteriums *A. aeolicus* weist allerdings eine deutlich geringere Aktivität auf als das orthologe Hefe- und Archaea- Enzym. Tatsächlich besitzt *A. aeolicus* neben dem untersuchten Protein noch ein weiteres Enzym mit Sequenzhomologie zu den bifunktionellen Desaminase/Reduktase-Enzymen des eubakteriellen Typs. Das ribD2 Gen dürfte somit phylogenetisch, falls es nicht durch horizontalen Gentransfer aus einem Archaeon erworben wurde, ein an Bedeutung ärmer gewordenes Überbleibsel einer Reduktase-Urform darstellen, welche im Laufe der Evolution durch Mutationen ihre Aktivität weitgehend eingebüßt hat. Der Hefetyp der Riboflavinbiosynthese (erst Reduktion, dann Desaminierung), den auch Archaeobakterien beschreiten scheint also der stammesgeschichtlich ältere zu sein. Durch Markierungsexperimente mit Deuterium und 2D NMR-Techniken konnte die Stereochemie der Reduktase Reaktion aufgeklärt werden. Über enzymatische Hilfsreaktionen wurde dazu deuteriertes NADPH hergestellt, welches die  $^2\text{H}$  Markierung einmal in der 4(S) und einmal in der 4(R) Position trägt. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass es sich bei allen betrachteten Reduktasen um A-Typ Reduktasen handelt, die spezifisch das proR Hydridion an Position 4 des Nicotinamidcofaktors übertragen. Durch den Einbau von Deuterium in das  $[1',2',3',4',5'-^{13}\text{C}_5]$ -markierte Reduktaseprodukt verschwindet im HMQC eines der beiden Protonen an Position 1'. Dadurch konnte abgeleitet werden, dass die Reduktasen von *C. glabrata* und *M. jannaschii* die gleiche Stereospezifität aufweisen, d.h. ein H-Atom aus der 4(proR)-Position des Cofaktors auf die 1'(proS)-Position der Ribitylseitenkette übertragen. Obwohl im Falle der *M. jannaschii* Reduktase eine Kristallstruktur des Proteins gelöst wurde (Fischer *et al.*, 2005), konnten die stereochemischen Aspekte der Reaktion erst durch die oben beschriebenen Experimente geklärt werden. Dies ist ein weiteres überzeugendes

Beispiel für die Bedeutung stabilisotopmarkierter Intermediate bei der Aufklärung von Enzymmechanismen, selbst bei bekannter 3D Struktur des aktiven Zentrums.

Die Riboflavinsynthasen von Eubakterien und Hefen sind im Normalfall Homotrimeren, deren Untereinheiten aus zwei Domänen mit ähnlichem Faltungsmuster bestehen. Jede der 6 Domänen der homotrimeren Proteine kann ein Molekül 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin binden und die aktiven Zentren werden von je einer N-terminalen Substratbindungsstelle und der C-terminalen Bindungsstelle der benachbarten Untereinheit gebildet (Eberhardt *et al.*, 2001; Meining *et al.*, 2003; Truffault *et al.*, 2001; Gerhardt *et al.*, 2002). Bemerkenswerter Weise können Moleküle trimerer Riboflavinsynthasen in dem zentralen Hohlraum ikosaedrischer Lumazinsynthasen von Bacillaceae eingeschlossen sein (Bacher *et al.*, 1980 und 1986). Dagegen haben die Riboflavin-Synthasen der Archaea *M. jannaschii* und *M. thermoautotrophicus* keinerlei Sequenzhomologie mit den oben beschriebenen trimeren Riboflavin-Synthasen, wohl aber mit den pentameren 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin-Synthasen. Durch Sequenzvergleiche konnten in vielen Archaeobakterien paraloge Paare von pentameren Riboflavin und Lumazin-Synthasen gefunden werden. Durch phylogenetische Analysen konnte gezeigt werden, dass die archaealen Riboflavin-Synthasen vermutlich zu einem sehr frühen Zeitpunkt in der Evolution von den archaealen Lumazin-Synthasen abzweigen (Fischer *et al.*, 2004b). Interessanter Weise ist bei den heutigen Lumazin-Synthasen die Fähigkeit Riboflavin zu binden erhalten geblieben, so ist die Riboflavin-Synthase aus *S. pombe* aufgrund stark gebundenem Riboflavin ein gelb gefärbtes Protein (Fischer *et al.*, 2002a). Die aktiven Zentren müssen dort also groß genug sein um Riboflavin zu binden, bei den pentameren, Lumazin-Synthase ähnlichen Riboflavin-Synthasen ist es offensichtlich groß genug um zwei Moleküle 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin zu binden. Durch Verwendung <sup>13</sup>C-markierter Substrate und Substratmischungen konnte zweifelsfrei nachgewiesen werden, dass die beiden Lumazin Moleküle in diesen neuartigen Riboflavin-Synthasen archaealen Typs, ebenso wie bei den trimeren Enzymen der übrigen Organismen, zwingend antiparallel angeordnet sein müssen. Es kann gemutmaßt werden, dass in einer frühen Phase der Evolution z.B. in einer RNA-Welt zunächst 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin und später dann Riboflavin und FMN als Cofaktoren für Redoxprozesse gedient haben könnten. Die Redoxeigenschaften des Lumazins sind denen des Riboflavins recht ähnlich, so kann es zum Beispiel reversibel reduziert werden. Riboflavin kann nichtenzymatisch unter präbiotischen Bedingungen aus 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin gebildet werden, welches ebenfalls in Abwesenheit eines Katalysators aus einer Zucker- und

---

einer reduzierten Nukleosideinheit gebildet werden kann (Eschenmoser und Löwenthal, 1992; Beach und Plaut, 1969; Rowan und Wood, 1963 und 1968). Prinzipiell wäre es denkbar, dass Lumazin auch als Cofaktor in frühen Oxidoreduktasen gedient haben könnte, ähnlich wie FMN in den heutigen Flavoproteinen. Allerdings wurde noch kein Protein gefunden, das Lumazin hierfür verwendet. Es kann jedoch in marinen Bakterien in proteingebundener Form als optischer Transponder für die Biolumineszenz dienen. Die Lumazinproteine erhalten dazu in strahlungslosen Prozessen optische Anregungsenergie von der Luciferase dieser Bakterien und bewirken eine Modulation der Emissionswellenlänge sowie eine erhöhte Quantenausbeute (O’Kane *et al.*, 1985 und 1990; Petushkov *et al.*, 1996a und 1996b).



## 5 Zusammenfassung

Riboflavin und die davon abgeleiteten Flavocoenzyme FMN und FAD sind für alle zellulären Organismen essentiell, da sie an vielen Redoxprozessen und einigen Nicht-Redoxprozessen beteiligt sind. Für zahlreiche biophysikalische Untersuchungsmethoden an Flavoproteinen ist die Verfügbarkeit stabilisotopmarkierter Flavine von herausragender Bedeutung.

Bisher war die selektive Markierung von Riboflavin mit Stabilisotopen nur an wenigen Positionen und mit erheblichem synthetischen Aufwand möglich. Betrachtet man nur  $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ - und  $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ -Substitutionen, so umfasst der komplexe Isotopolograum des Riboflavins bereits  $2^{21} = 2\,097\,152$  verschiedene Isotopologe. Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Kombination synthetischer, enzymatischer und fermentativer Verfahren macht es erstmals möglich, nahezu beliebige, maßgeschneiderte Isotopologe aus dieser Grundmenge mit überschaubarem Aufwand herzustellen. Sowohl für die Ribitylseitenkette, den Xylolring und den Pyrimidinteil des Riboflavinmoleküls existieren nun zum Teil mehrere voneinander unabhängige Methoden  $^{13}\text{C}$ - und/oder  $^{15}\text{N}$ -Markierungen an spezifischen Positionen einzuführen.

Insbesondere die enzymatisch präparativen Verfahren zur Synthese der Riboflavinvorstufen Ribulose-5-phosphat und GTP aus verschiedenen kommerziell erhältlichen Glucose-Isotopologen lassen sich äußerst variabel kombinieren um mit weiteren Enzymen der Riboflavinbiosynthese selektive Markierungen in den Xylolring und die Ribitylseitenkette des Riboflavinmoleküls einzuführen. Im Extremfall war so der Aufbau des markierten Naturstoffs aus Glucose und einer Purinbase (Xanthin/Guanin) unter Beteiligung von 18 zum Teil rekombinant erzeugten Enzymen und zwei Cofaktor-Regenerationssystemen für ATP und NAD(P) möglich. Die bekannten Syntheserouten für Xanthin erweitern die Variabilität auf Markierungen im Pyrimidinteil des Isoalloxazinsystems.

Ein großer Vorteil der enzymatischen Verfahren ist die Möglichkeit vielstufige Synthesen mit hoher Ausbeute in Parallelansätzen und ohne Isolierung und Reinigung von Intermediaten durchführen zu können. Eine notwendige Voraussetzung hierfür ist eine hohe negative freie Enthalpie des Gesamtprozesses, die durch die Bildung thermodynamisch stabiler Endprodukte, das Auftreten irreversibler Reaktionen, die Abspaltung kleiner Moleküle und den damit verbundenen Entropiegewinn, das Entfernen des Produkts aus dem Reaktionsmedium sowie durch die Kopplung endergonischer Prozesse an exergonische

Hilfsreaktionen gewährleistet werden kann. Alle diese Faktoren waren im Falle der enzymatischen Riboflavinsynthese in optimaler Weise gegeben: Die Bildung eines aromatischen Rings im letzten Schritt, weitere irreversible Abspaltungs- und Kondensationsreaktionen, die Kopplung an exergonische Reaktionen zur Cofaktoregenerierung sowie die Tatsache, dass Riboflavin am Ende der Reaktion als unlösliches Produkt auskristallisiert, sorgen für eine hohe Triebkraft der Gesamtreaktion. Viele der benötigten Synthese-Enzyme konnten unter Verwendung molekularbiologischer Methoden als Fusionsproteine in *E. coli* rekombinant exprimiert und affinitätschromatographisch gereinigt werden.

Die Fermentation Riboflavin- bzw. 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin-produzierender Bakterienstämme mit  $^{13}\text{C}$ -markierter Glucose oder  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  ermöglichte neben der Herstellung total  $^{13}\text{C}$ - und/oder  $^{15}\text{N}$ -markierter Flavin-Isotopologe auch die Gewinnung stochastisch markierter Flavin-Isotopolog-Bibliotheken beim Einsatz einfachmarkierter Glucose-Isotopologe. In diesen Bibliotheken erhält jedes Kohlenstoffatom des Flavins aufgrund der bekannten Stoffwechselwege des Kohlenhydratmetabolismus und der Riboflavinbiosynthese einen charakteristischen Markierungsgrad, der gegebenenfalls durch nachgeschaltete enzymatische Reaktionen noch beeinflusst werden kann. Dies war entscheidend für die Entwicklung einer einfachen amplitudengestützten Zuordnung von NMR-Signalen in Flavoproteinen.

Die Verfügbarkeit ganzer Bibliotheken selektiv und stochastisch markierter Flavine eröffnet generell neue Möglichkeiten für kernspin- und massensensitive spektroskopische Untersuchungen an unterschiedlichen Flavoproteinen. Dazu gehören neben der ein- und mehrdimensionalen Kernspinresonanz-Spektroskopie auch Elektronen-paramagnetische-Resonanz-Methoden wie EPR, ENDOR und TRIPLE-Resonanz, die über die Hyperfeinwechselwirkung von Elektronen- und Kernspin Aussagen über die elektronische und geometrische Struktur von Flavin-Radikalen zulassen. Bei der Schwingungsspektroskopie (IR und Raman) war aufgrund der Komplexität der Schwingungsmoden selbst verhältnismäßig kleiner Moleküle an eine komplette empirische Banden-Zuordnung bisher kaum zu denken.

Am Beispiel der LOV2-Domäne des Phototropins von *A. sativa* bzw. *A. capillus veneris* wurde eine Methode zur schnellen Rekonstitution des Proteins mit isotopologen FMN-Cofaktoren entwickelt. Die Proteinproben konnten für vielfältige spektroskopische Untersuchungen des reversiblen Photozyklus dieser Proteine verwendet werden. Die

C450A-Mutante der LOV2-Domäne bildet nach Blaulichtbestrahlung ein stabiles Radikal aus, da die für das Wildtyp-Protein typische Bildung des kovalenten Addukts von Cystein450 an das C-4a Atom des Flavinmoleküls dort nicht möglich ist. Dies erlaubte die Untersuchung des proteingebundenen Flavin-Radikalzustands durch CIDNP-NMR- und ENDOR-Spektroskopie. Im ersten Fall handelte es sich um die erste Beobachtung einer photochemisch induzierten dynamischen Kernspinpolarisation an einem Protein-Cofaktor-Komplex in Lösung. Dabei treten sowohl verstärkt absorptive als auch emissive NMR-Linien mit Vorzeichenumkehr auf, was auf eine Nicht-Boltzmann-Verteilung der Kernspins zurückzuführen ist. Mit Hilfe einer  $^{13}\text{C}$ -Totalmarkierung sowie mehrerer Selektivmarkierungen des Cofaktors war eine eindeutige Zuordnung sämtlicher NMR-Signale möglich.

Die Zuordnung von ENDOR-Signalen sowie von Schwingungsbanden in IR- und Raman-spektren erfolgt üblicherweise durch den Vergleich der experimentellen Spektren mit quantenmechanischen Rechnungen, die typischerweise *in vacuo* geometrieoptimierte Moleküle zur Grundlage nehmen. Teilweise erfolgt noch eine "Absicherung" durch eine bis wenige Isotopensubstitutionen. Wie der systematische Vergleich experimenteller IR-Spektren mehrerer verschiedener Riboflavin- und 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin-Isotopologe mit den simulierten Spektren zeigt, ist diese Übereinstimmung oft unzureichend oder nur sehr grob gegeben. Ähnliches gilt für die ENDOR-Signale des FMN-Radikals in der C450A-LOV2-Domäne. Während im Fall der ENDOR-Spektren durch die Messung mehrerer selektivmarkierter Proben eine zweifelsfreie empirische Zuordnung gelang, ist dies für den wesentlich komplexeren Fall der Schwingungsspektroskopie nicht ohne weiteres möglich. Neben der Notwendigkeit einer weitergehenden rechnergestützten Methodenentwicklung zur automatisierten Analyse der Isotopolog-bedingten Verschiebungsmuster tritt hier das Problem der Unterbestimmung in den Vordergrund, da die 135 bzw. 117 Schwingungsmoden des Riboflavins bzw. 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazins nur im Ausnahmefall auf einzelne Atome lokalisiert sind und andererseits eine hinreichend große Anzahl unterschiedlicher Isotopologe nicht mit vertretbarem Aufwand herzustellen ist.

Im Verlauf der enzymatischen Synthese isotopologer Flavine treten naturgemäß sämtliche Intermediate der Riboflavinbiosynthese auf. Dadurch war es möglich, durch Weglassen der späteren Enzyme auch diese Zwischenprodukte in isotopmarkierter Form herzustellen. Als stabilisotopmarkierte Substrate waren sie wertvolle Hilfsmittel für kinetische oder mechanistische Untersuchungen an den Enzymen, die die nachfolgenden Schritte der

Riboflavinbiosynthese katalysieren. So konnte an der Reduktase des thermophilen Archaeobakteriums *M. jannaschii* bzw. an der Desaminase aus *A. thaliana* NMR-spektroskopisch gezeigt werden, dass die Desaminierung und Reduktion des GTP-Cyclohydrolase II Produkts in Archaea der selben Reihenfolge wie in Hefen folgt (erst Reduktion), während bei Pflanzen wie in Eubakterien die umgekehrten Reihenfolge auftritt.

Außerdem wurden mehrere Enzymassays entwickelt, bei denen die sonst oft nur indirekt und aufwendig messbare Enzymaktivität durch  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie an maßgeschneiderten Substrat-Isotopologen in Echtzeit verfolgt werden konnte. Beispiele hierfür sind die 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat-Synthase aus *M. jannaschii* und ihre Mutanten, die mechanistisch unterschiedlichen GTP-Cyclohydrolasen aus *M. jannaschii* und zwei *Candida* Stämmen, sowie Reduktasen und Desaminasen aus verschiedenen Organismen.

Daneben wurde gezeigt, dass alle Intermediate der Riboflavinbiosynthese nach der GTP-Cyclohydrolase II Reaktion und vor der Reduktion des Ribosylrestes zunächst in der  $\beta$ -Form der Furanose entstehen, wobei sich aber rasch ein nahezu äquimolares Gleichgewicht mit der jeweiligen  $\alpha$ -Form einstellt. Das kinetische Netzwerk der spontanen Anomerisierungs- und der vor- bzw. nachgelagerten enzymatischen Reaktionen konnte für die GTP-Cyclohydrolasen, Reduktasen und Desaminasen  $^{13}\text{C}$ -NMR-spektroskopisch beobachtet und theoretisch ausgewertet werden.

Schließlich wurden an der 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat-Synthase, der Reduktase und der Riboflavin-Synthase aus *M. jannaschii* mechanistische Untersuchungen zur Regio- und Stereoselektivität dieser Enzyme angestellt, bei denen neben selektiv  $^{13}\text{C}$ -markierten Substraten u.a. auch  $^{18}\text{O}$ -Markierungen und stereospezifisch deuterierte NADPH-Cofaktoren eingesetzt wurden.

## 6 Literatur

- Alia, Roy, E., Gast, P., van Gorkom, H. J., de Groot, H. J. M., Jeschke, G. und Matysik, J. (2004) Photochemically Induced Dynamic Nuclear Polarization in Photosystem I of Plants Observed by  $^{13}\text{C}$  Magic-Angle Spinning NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 12819-12826.
- Atherton, N. M. (1993) Principles of Electron Spin Resonance, Ellis Horwood LTD., Chichester.
- Bacher, A. und Lingens, F. (1970) Biosynthesis of riboflavin. Formation of 2,5-diamino-6-hydroxy-4-(1'-D-ribitylamino)pyrimidine in a riboflavin auxotroph. *J. Biol. Chem.* **245**, 4647-4652.
- Bacher, A. und Mailänder, B. (1973) Biosynthesis of Riboflavin. The Structure of the Purine Precursor. *J. Biol. Chem.* **248**, 6227-6231.
- Bacher, A., Mailander, B., Baur, R., Eggers, U., Harders, H. und Schnepfle H. (1975) Studies on the biosynthesis of riboflavin. *Chem. Biol. Pteridines*, Proc. Int. Symp. **5**, 285-90.
- Bacher, A., Baur, R., Eggers, U., Harders, H. D., Otto, M. K. und Schnepfle, H. (1980) Riboflavin synthases of *Bacillus subtilis*. Purification and properties. *J. Biol. Chem.* **255**, 632-637.
- Bacher, A., LeVan, Q., Bühler, M., Keller, P. J. und Floss, H. G. (1983) Biosynthesis of Riboflavin. Origin of the Xylene Ring. *Chem. Biol. Pteridines*, Proc. Int. Symp. **7**, 699-703.
- Bacher, A. (1986) Heavy riboflavin synthase from *Bacillus subtilis*. *Methods Enzymol.* **122**, 192-199.
- Bacher, A. (1991) Riboflavin kinase and FAD synthetase. *Chem. Biochem. Flavoenzymes* **1**, 349-370.
- Bacher, A., Eberhardt, S. und Richter, G. (1996) Biosynthesis of riboflavin. in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and molecular biology. Neidhardt, F. C. et al. (eds.), American Society for Microbiology, Washington DC, **2**, 657-664.

- Bacher, A., Richter, G., Ritz, H., Eberhardt, S., Fischer, M. und Krieger, C. (1997a) Biosynthesis of Riboflavin: GTP Cyclohydrolase II, Deaminase, and Reductase. *Methods Enzymol.* **280**, 382-389.
- Bacher, A., Eberhardt, S., Fischer, M., Mörtl, S., Kis, K., Kugelbrey, K., Scheuring, J. und Schott, K. (1997b) Biosynthesis of riboflavin: lumazine synthase and riboflavin synthase. *Methods Enzymol.* **280**, 389-399.
- Bacher, A., Eberhardt, S., Fischer, M., Kis, K. und Richter, G. (2000) Biosynthesis of vitamin B<sub>2</sub> (riboflavin). *Annu. Rev. Nutr.* **20**, 153-167.
- Bacher, A., Eberhardt, S., Eisenreich, W., Fischer, M., Herz, S., Illarionov, B., Kis, K. und Richter, G. (2001) Biosynthesis of riboflavin. *Vitam. Horm.* **61**, 1-49.
- Bacher, A. und Eberhardt, S. (2001) Cloning and characterization of riboflavin synthase from *Arabidopsis thaliana* and screening for riboflavin synthase-inhibiting herbicides. Deutsches Patent WO2000-EP11145, 17. Mai 2001.
- Bargon, J. und Fischer, H. (1967) Nuclear magnetic resonance emission lines during fast radical reactions. II. Chemically induced dynamic nuclear polarization. *Z. Naturforsch.* **22A**, 1556-1562.
- Beach, R. L. und Plaut, G. W. E. (1969) The formation of riboflavin from 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine in acid media. *Tetrahedron Letters*, **40**, 3489-3492.
- Beach, R. L. und Plaut, G. W. E. (1970) Stereospecificity of the enzyme synthesis of the o-xylene ring of riboflavin. *J. Am. Chem. Soc.* **92**, 2913-2916.
- Bouhss, A., Sakamoto, H., Palibroda, N., Chiriac, M., Sarfati, R., Smith, J. M., Craescu, C. T. und Barzu, O. (1995) Enzymatic Synthesis of Guanine Nucleotides Labeled with <sup>15</sup>N at the 2-Amino Group of the Purine Ring. *Anal. Biochem.* **225**, 18-23.
- Bracher, A., Eisenreich, W., Schramek, N., Ritz, H., Götze, E., Herrmann, A., Gütlich, M. und Bacher, A. (1998) Biosynthesis of Pteridines, NMR studies on the reaction mechanisms of GTP cyclohydrolase I, pyruvoyltetrahydropterin synthase, and sepiapterin reductase. *J. Biol. Chem.* **273**, 28132 - 28141.
- Bracher, A., Fischer, M., Eisenreich, W., Ritz, H., Schramek, N., Boyle, P., Gentili, P., Huber, R., Nar, H., Auerbach, G. und Bacher, A. (1999) Histidine 179 mutants of GTP

- cyclohydrolase I catalyze the formation of 2-amino-5-formylamino-6-ribofuranosyl-amino-4(3*H*)-pyrimidinone triphosphate. *J. Biol. Chem.* **274**, 16727-16735.
- 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.
- Bresler, S. E., Glazunov, E. A., Perumov, D. A. und Chernik, T. P. (1977) Riboflavin biosynthesis operon of *Bacillus subtilis*. XIII. Genetic and biochemical study of mutants with regard to intermediate stages of biosynthesis. *Genetika* **13**, 2006-2016.
- Briggs, W. R., Beck, C. F., Cashmore, A. R., Christie, J. M., Hughes, J., Jarillo, J. A., Kagawa, T., Kanegae, H., Liscum, E., Nagatani, A., Okada, K., Salomon, M., Rüdiger, W., Sakai, T., Takano, M., Wada, M. und Watson, J. C. (2001) The phototropin family of photoreceptors. *Plant Cell* **13**, 993-997.
- Briggs, W. E. und Huala, E. (1999) Blue-light photoreceptors in higher plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **15**, 33-62.
- Briggs, W. R. und Olney, M. A. (2001) Photoreceptors in plant photomorphogenesis to date. Five phytochromes, two cryptochromes, one phototropin, and one superchrome. *Plant Physiol.* **125**, 85-88.
- Brown, G. M. und Reynolds, J. J. (1963) Biogenesis of water-soluble vitamins. *Annu. Rev. Biochem.* **32**, 419-462.
- Brown, G. M., Yim, J., Suzuki, Y., Heine, M. C. und Foor, F. (1975) The Enzymatic Synthesis of Pterins in *Escherichia coli*. *Chem. Biol. Pteridines*, Proc. Int. Symp. **5**, 219-45.
- Brown, G. M. und Williamson, J. M. (1982) Biosynthesis of riboflavin, folic acid, thiamine, and pantothenic acid. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **53**, 345-381.
- Brown, G. M. und Williamson, J. M. (1987) Biosynthesis of folic acid, riboflavin, thiamine and pantothenic acid. in *Escherichia coli* and *Salmonella thyphimurium* (F.C. Neidhardt *et al.*, eds.), American Society for Microbiology, Washington, DC, **1**, 521-538.
- Bullock, W. O., Fernandez, J. M. und Short, J. M. (1987) XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* with beta galactosidase selection. *Bio. Techniques* **5**, 376-380.

- Burrows, R. B. und Brown, G. M. (1978) Presence in *Escherichia coli* of a deaminase and a reductase involved in biosynthesis of riboflavin. *J. Bacteriol.* **136**, 657-667.
- Carrington, A. und McLachlan, A. D. (1969) Introduction to Magnetic Resonance, Harper International Edition, New York.
- Casal, J. J. (2000), Phytochromes, cryptochromes, phototropin: photoreceptor interactions in plants. *Photochem. Photobiol.* **71**, 1-11.
- Cashmore, A. R., Jarillo, J. A., Wu, Y.-J. und Liu, D. (1999) Cryptochromes: blue light receptors for plants and animals. *Science*, **284**, 760-765.
- Christie, J. M. und Briggs, W. R. (2001) Blue light sensing in higher plants. *J. Biol. Chem.* **276**, 11457- 11460.
- Christie, J. M., Salomon, M., Nozue, K., Wada, M. und Briggs, W. R. (1999) LOV (light, oxygen, or voltage) domains of the blue-light photoreceptor phototropin (nph1): binding sites for the chromophore flavin mononucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 8779-8783.
- Closs, G. L. (1969) Mechanism explaining nuclear spin polarizations in radical combination reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **91**, 4552-4554.
- Closs, G. L. (1974) Chemically induced dynamic nuclear polarization, Academic Press: New York Vol. 7.
- Cresswell, R. M. und Wood, H. C. S. (1960) The Biosynthesis of Pteridines. Part I. The Synthesis of Riboflavin. *J. Chem. Soc.*, 4768-4779.
- Demain, A. L. (1972) Riboflavin oversynthesis. *Annu. Rev. Microbiol.* **26**, 369–388.
- Dickey, J. B. und Gray, A. R. (1938) Barbituric Acid. *Org. Syntheses* **18**, 8-9.
- Eberhardt, S., Korn, S., Lottspeich, F. und Bacher, A. (1997) Biosynthesis of riboflavin: an unusual riboflavin synthase of *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *J. Bacteriol.* **179**, 2938–2943.
- Eberhardt, S., Zingler, N., Kemter, K., Richter, G., Cushman, M. und Bacher, A. (2001) Domain structure of riboflavin synthase. *Eur. J. Biochem.* **268**, 4315–4323.
- Edmondson, D. E. (1985) Electron-spin-resonance studies on flavoenzymes. *Biochem. Soc. Trans.* **13**, 593-600.



- Eisenreich, W., Schwarzkopf, B. und Bacher, A. (1991) Biosynthesis of nucleotides, flavins, and deazaflavins in *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *J. Biol. Chem.* **266**, 9622–9631.
- Eschenmoser, A. und Löwenthal, E. (1992) Chemistry of potentially prebiological natural products. *Chem. Soc. Rev.* **21**, 1–16.
- Fischer, M., Bacher, A., Haase, I., Tristl, M. und Sackmann, E. (2001) Design of Biofunctional Assemblies on Solids through Recombinant Spherical Bacterial Protein Lumazine Synthase. *ChemPhysChem* **10**, 623-627.
- Fischer, M., Haase, I., Feicht, R., Richter, G., Gerhardt, S., Changeux, J. P., Huber, R. und Bacher A. (2002a) Biosynthesis of riboflavin: 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase of *Schizosaccharomyces pombe*. *Eur. J. Biochem.* **269**, 519–526.
- Fischer, M., Römisch, W., Schiffmann, S., Kelly, M., Oschkinat, H., Steinbacher, S., Huber, R., Eisenreich, W., Richter, G. und Bacher, A. (2002b), Biosynthesis of Riboflavin in Archaea: Studies on the Mechanism of 3,4-Dihydroxy-2-butanone-4-phosphate Synthase of *Methanococcus jannaschii*. *J. Biol. Chem.* **277**, 41410-41416.
- Fischer, M., Römisch, W., Saller, S., Illarionov, B., Richter, G., Rohdich, F., Eisenreich, W. und Bacher, A. (2004a) Evolution of Vitamin B2 Biosynthesis: Structural and Functional Similarity Between Pyrimidine Deaminases of Eubacterial and Plant Origin. *J. Biol. Chem.* **279**, 36299-36308.
- Fischer, M., Schott, A.-K., Römisch, W., Ramsperger, A., Augustin, M., Fidler, A., Bacher, A., Richter, G., Huber, R. und Eisenreich, W. (2004b) Evolution of Vitamin B2 Biosynthesis. A Novel Class of Riboflavin Synthase in Archaea. *J. Mol. Biol.* **343**, 267-278.
- Fischer, M., Chatwell, L., Römisch, W., Eisenreich, W., Huber, R., Krojer, T. und Bacher, A. (2005), Biosynthesis of riboflavin. Stereochemistry and X-ray structure of 2,5-diamino-6-ribitylamino-4(3*H*)-pyrimidinone 5'-phosphate synthase of *Methanococcus jannaschii*. *Flavins and Flavoproteins 2005*, Proc. Int. Symp. **15**, Shonan Village, Japan (im Druck).

- Fleischmann, G., Lederer, F., Müller, F., Bacher, A., und Rüterjans, H. (2000) Flavin-protein interactions in flavocytochrome b<sub>2</sub> as studied by NMR after reconstitution of the enzyme with <sup>13</sup>C- and <sup>15</sup>N-labelled flavin. *Eur. J. Biochem.* **267**, 5156-5167.
- Foor, F. und Brown, G. M. (1975) Purification and Properties of Guanosine Triphosphate Cyclohydrolase II from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **250**, 3545-3551.
- Foor, F. und Brown, G. W. (1980) GTP-cyclohydrolase II from *Escherichia coli*. *Meth. Enzymol.* **66**, 303-307.
- Foy, H. und Mbaya, V. (1977) Riboflavin. *Prog. Food Nutr. Sci.* **2**, 256-262.
- García, J. I., Medina, M., Sancho, J., Alonso, P. J., Gómez-Moreno, C., Mayoral, J. A. und Martínez, J. I. (2002) Theoretical Analysis of the Electron Spin Density Distribution of the Flavin Semiquinone Isoalloxazine Ring within Model Protein Environments. *J. Phys. Chem. A* **106**, 4729-4735.
- Gerhardt, S., Schott, A.-K., Kairies, N., Cushman, M., Illarionov, B., Eisenreich, W., Bacher, A., Huber, R., Steinbacher, S. und Fischer, M. (2002) Studies on the reaction mechanism of riboflavin synthase: X-ray crystal structure of a complex with 6-carboxyethyl-7-oxo-8-ribityllumazine. *Structure (Camb.)*, **10**, 1371–1381.
- Graham, D. E., Xu, H. und White, R. H. (2002) A member of a new class of GTP cyclohydrolases produces formylaminopyrimidine nucleotide monophosphates. *Biochemistry* **41**, 15074-15084.
- Graham, D. E., Xu, H. und White, R. H. (2003), Identification of the 7,8-didemethyl-8-hydroxy-5-deazariboflavin synthase required for coenzyme F(420) biosynthesis. *Arch. Microbiol.* **180**, 455–464.
- Grande, H. J., Gast, R., Van Schagen, C. G., Van Berkel, W. J. H. und Müller, F. (1977) <sup>13</sup>C-NMR Study on Isoalloxazine and Alloxazine Derivatives. *Helv. Chim. Acta* **60**, 367-379.
- Graupner, M., Xu, H. und White, R. H. (2002) The pyrimidine nucleotide reductase step in riboflavin and F420 biosynthesis in Archaea proceeds by the eukaryotic route to riboflavin. *J. Bacteriol.* **184**, 1952-1957.

- Haase, I., Mörtl, S., Kohler, P., Bacher, A. und Fischer, M. (2003) Biosynthesis of riboflavin in archaea. 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase of *Methanococcus jannaschii*. *Eur. J. Biochem.* **270**, 1025–1032.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580.
- Hanahan, D. (1985) Techniques for transformation of *Escherichia coli*: in DNA Cloning, Glover, D. M. (ed.), Irl. Press, Oxford, Washington DC, **1**, 109-135.
- Harzer, G., Rokos, H., Otto, M. K., Bacher, A. und Ghisla, S. (1978) Biosynthesis of riboflavin. 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazine 5'-phosphate is not a substrate for riboflavin synthase. *Biochim. Biophys. Acta* **540**, 48–54.
- Herz, S., Eberhardt, S. und Bacher, A. (2000) Biosynthesis of riboflavin in plants. The *riba* gene of *Arabidopsis thaliana* specifies a bifunctional GTP cyclohydrolase II / 3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase. *Phytochemistry* **53**, 723–731.
- Herz, S., Kis, K., Bacher, A. und Rohdich, F. (2002) A tomato enzyme catalyzing the phosphorylation of 3,4-dihydroxy-2-butanone. *Phytochemistry* **60**, 3–11.
- Hollander, I. und Brown, G. M. (1979) Biosynthesis of Riboflavin: Reductase and Deaminase of *Ashbya gossypii*. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **89**, 759-764.
- Holtzhauer, M. (1996) Methoden der Proteinanalytik, Springer-Verlag, Berlin.
- Hore, P. J., Winder, S. L., Roberts, C. H. und Dobson, C. M. (1997) *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 5049-5050.
- Huala, E., Oeller, P. W., Liscum, E., Han, I., Larsen, E. und Briggs, W. R. (1997) *Arabidopsis* NPH1: A protein kinase with a putative redox-sensing domain. *Science* **278**, 2120-2123.
- Hümbelin, M., Griesser, V., Keller, T., Schurter, W., Haiker, M., Hohmann, H.-P., Ritz, H., Richter, G., Bacher, A. und van Loon, A. P. G. M. (1999) GTP cyclohydrolase II and 3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase are rate-limiting enzymes in riboflavin synthesis of an industrial *Bacillus subtilis* strain used for riboflavin production *J. of Ind. Microbiol. Biotech.* **22**, 1-7.

- Illarionov, B., Kemter, K., Eberhardt, S., Richter, G., Cushman, M. und Bacher, A. (2001) Riboflavin Synthase of *Escherichia coli*, Effect of single amino acid substitutions on reaction rate and ligand binding properties. *J. Biol. Chem.* **276**, 11524-11530.
- Illarionov, B., Fischer, M., Lee, C. Y., Bacher, A. und Eisenreich, W. (2004) Rapid Preparation of Isotopolog Libraries by in Vivo Transformation of <sup>13</sup>C-Glukose. Studies on 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazine, a Biosynthetic Precursor of Vitamin B<sub>2</sub>. *J. Org. Chem.* **69**, 5588-5594.
- Jenkins, G. I., Long, J. C., Wade, H. K., Shenton, M. R. und Bibikova, T. N. (2001) Research review UV and blue light signalling: pathways regulating chalcone synthase gene expression in *Arabidopsis*. *New Phytol.* **151**, 121-131.
- Kaptein, R. (1975) Chemically induced dynamic nuclear polarization: theory and applications in mechanistic chemistry. *Adv. Free Rad. Chem.* **5**, 319-380.
- Karrer, P. und Meerwein, H. F. (1936) 36. Eine verbesserte Synthese des Lactoflavins und 6,7-Dimethyl-9-[1'-arabityl]-iso-alloxazins. *Helv. Chim. Acta* **19**, 264-269.
- Kay, C. W. M., Feicht, R., Schulz, K., Sadewater, P., Sancar, A., Bacher, A., Möbius, K., Richter, G. und Weber, S. (1999) EPR, ENDOR, and TRIPLE resonance spectroscopy on the neutral flavin radical in *Escherichia coli* DNA photolyase. *Biochemistry* **38**, 16740-16748.
- Kay, C. W. M., Schleicher, E., Kuppig, A., Hofner, H., Rüdiger, W., Schleicher, M., Fischer, M., Bacher, A., Weber, S. und Richter, G. (2003) Blue Light Perception in Plants Detection and Characterization of a light-induced neutral Flavin Radical in a C450A Mutant of Phototropin. *J. Biol. Chem.* **278**, 10973-10982.
- Keller, P. J., Le Van, Q., Kim, S. U., Bown, D. H., Chen, H. C., Kohnle, A., Bacher, A. und Floss, H. G. (1988) Biosynthesis of Riboflavin: Mechanism of Formation of the Ribitylamino Linkage. *Biochemistry* **27**, 1117-1120.
- Kelly, M. J. S., Ball, L. J., Krieger, C., Yu, Y., Fischer, M., Schiffmann, S., Schmieder, P., Kühne, R., Bermel, W., Bacher, A., Richter, G. und 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. U. S. A.* **98**, 13025-13030.

- Kis, K. und Bacher, A. (1995) Substrate channeling in the lumazine synthase/riboflavin synthase complex of *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **270**, 16788–16795.
- Kis, K., Volk, R. und Bacher A. (1995) Biosynthesis of riboflavin. Studies on the reaction mechanism of 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase. *Biochemistry* **34**, 2883–2892.
- Kraut, H. (1960) Über die Deckung des Nährstoffbedarfs in Westdeutschland. *Nutr. Dieta* **1**, 45–60.
- Kuhn, R., Reinemund, K. und Weygand, F. (1934) Synthesis of lumilactoflavin. *Ber.* **67B**, 1460-1462.
- Kurreck, H., Bock, M., Bretz, N., Elsner, M., Kraus, H., Lubitz, W., Müller, F., Geissler, J. und Kroneck, P. M. H. (1984) Fluid solution and solid-state electron nuclear double resonance studies of flavin model compounds and flavoenzymes. *J. Am. Chem. Soc.* **106**, 737-746.
- Kurreck, H., Kirste, B. und Lubitz, W. (1988) Electron Nuclear Double Resonance Spectroscopy of Radicals in Solution. VCH, Weinheim.
- Lämmlli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lawler, R. G. (1967) Chemically induced dynamic nuclear polarization. *J. Am. Chem. Soc.* **89**, 5519-5521.
- Lawler, R. G. (1972) Chemically induced dynamic nuclear polarization (CIDNP). II. Radical-pair model. *Acc. Chem. Res.* **5**, 25-33.
- Lee, J. (1985) in Chemi- and bioluminescence. Burr, J. G. (ed.), Marcel Dekker, New York, 401-437.
- Liao, D. I., Wawrzak, Z., Calabrese, J. C., Viitanen, P. V. und Jordan, D. B. (2001b). Crystal structure of riboflavin synthase. *Structure (Camb.)* **9**, 399–408.
- Liao, D. I., Zheng, Y.-J., Viitanen, P. V. und 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.
- Lingens F., Oltmanns O. und Bacher A. (1967) Über Zwischenprodukte der Riboflavin-Biosynthese bei *Saccharomyces cerevisiae*. *Z. Naturforsch* **22B**, 755-758.

- Liscum, E. und Stowe-Evans, E. L. (2000) Phototropism: a "simple" physiological response modulated by multiple interacting photosensory-response pathways. *Photochem. Photobiol.* **72**, 273-282.
- Lüttgen, H. (2000) NMR-spektroskopische Untersuchung von Ligand-Protein-Komplexen. Dissertation, Technische Universität München.
- Maeda, K., Lyon, C. E., Lopez, J. J., Cemazar, M., Dobson, C. M. und Hore, P. J. (2000) *J. Biomol. NMR* **16**, 235-244.
- Mailänder, B. und Bacher, A. (1976) Biosynthesis of Riboflavin. Structure of the Purine Precursor and Origin of the Ribityl Side Chain. *J. Biol. Chem.* **251**, 3623-3628.
- Martinez, J. I., Alonso, P. J., Gomez-Moreno, C. und Medina, M. (1997) One- and two-dimensional ESEEM spectroscopy of flavoproteins. *Biochemistry* **36**, 15526-15537.
- Massey, V. (2000) The chemical and biological versatility of riboflavin. *Biochem Soc. Trans.* **28**, 283-296.
- Matysik, J., Alia, Gast, P., van Gorkom, H. J., Hoff, A. J. und de Groot, H. J. M. (2000) Photochemically induced nuclear spin polarization in reaction centers of photosystem II observed by <sup>13</sup>C-solid-state NMR reveals a strongly asymmetric electronic structure of the P680<sup>(+)</sup> primary donor chlorophyll. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 9865-9870.
- McLaren, J. A. (1952) The Effects of Certain Purins and Pyrimidines upon the Production of Riboflavin by *Eremothecium ashbyii*. *J. Bacteriol.* **63**, 233-241.
- Meining, W., Eberhardt, S., Bacher, A. und Ladenstein, R. (2003) The structure of the N-terminal domain of riboflavin synthase in complex with riboflavin at 2.6 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **331**, 1053-1063.
- Mitsuda, H., Kawai, F., Suzuki, Y. und Yoshimoto, S. (1970) Biogenesis of riboflavin in green leaves. VII. Isolation and characterization of spinach riboflavin synthetase. *J. Vitaminol.* **16**, 285-292.
- Mok, K. H. und Hore, P. J. (2004) Photo-CIDNP NMR methods for studying protein folding. *Methods* **34**, 75-87.

- Morris, M. D. und Bienstock, R. J. (1986) Resonance Raman spectroscopy of flavins and flavoproteins. *Adv. Spectrosc.* **13**, 395-442.
- Müller, F. und Moonen, C. T. W. (1982) Physical techniques in flavin research. *Dev. Biochem.* **21**, 517-527.
- Müller, F., Ghisla, S. und Bacher, A. (1988) Vitamin B<sub>2</sub> und natürliche Flavine. in Vitamine II; Wasserlösliche Vitamine. Isler, O. *et al.* (eds.), Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 50-159.
- Müller, F. (1992) Nuclear magnetic resonance studies on flavoproteins. in Chemistry and biochemistry of flavoenzymes. Müller, F. (ed.), CRC Press, Boca Raton, FL, **3**, 557-595.
- Murgida, D. H., Schleicher, E., Bacher, A., Richter, G. und Hildebrandt, P. (2001) Resonance Raman spectroscopic study of the neutral flavin radical complex of DNA photolyase from *Escherichia coli*. *J. Raman Spectrosc.* **32**, 551-556.
- Neuberger G. und 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.
- Nielsen, P. und Bacher, A. (1981) Biosynthesis of riboflavin. Characterization of the product of the deaminase. *Biochim. Biophys. Acta* **662**, 312-317.
- Nielsen, P. und Bacher, A. (1988) Biosynthesis of riboflavin. A simple synthesis of the substrate and product of the pyrimidine deaminase and of structural analogs. *Z. Naturforsch.* **43B**, 1358-1364.
- Nishina, Y., Sato, K., Miura, R., Matsui, K. und Shiga, K. (1998) Resonance Raman study on reduced flavin in purple intermediate of flavoenzyme: use of [4-carbonyl-<sup>18</sup>O]-enriched flavin. *J. Biochem.* **124**, 200-208.
- O’Kane, D. J. und Lee, J. (1985) Physical characterization of lumazine proteins from *Photobacterium*. *Biochemistry*, **24**, 1484–1488.
- O’Kane, D. J., Lee, J., Kohnle, A. und Bacher, A. (1990) Binding of pteridine derivatives to lumazine apoprotein. *Chem. Biol. Pteridines*, 1989 Proc. Int. Symp. Pteridines Folic Acid Deriv. **9**, 457–461.

- O'Kane, D. J. und Prasher, D. C. (1992) Evolutionary origins of bacterial bioluminescence. *Mol. Microbiol.* **6**, 443-449.
- Oltmanns, O., Bacher, A., Lingens, F. und Zimmermann, F. K. (1969) Biochemical and genetic classification of riboflavine deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **105**, 306-313.
- Perkins, J. B., Sloma, A., Hermann, T., Theriault, K., Zachgo, E., Erdenberger, T., Hannett, N., Chatterjee, N. P., Williams, V. Jr. G. R., Hatch, R. und Pero, J. (1998) Genetic engineering of *Bacillus subtilis* for the commercial production of riboflavin. *J. of Ind. Microbiol. Biotech.* **22**, 8-18.
- Persson, K., Schneider, G., Douglas, B. J., Viitanen, P. V. und Sandalova, T. (1999) Crystal structure analysis of a pentameric fungal and an icosahedral plant lumazine synthase reveals the structural basis for differences in assembly. *Protein Sci.* **8**, 2355–2365.
- Petushkov, V. N., Ketelaars, M., Gibson, B. G. und Lee, J. (1996a) Interaction of *Photobacterium leiognathi* and *Vibrio fischeri* Y1 luciferases with fluorescent (antenna) proteins: bioluminescence effects of the aliphatic additive. *Biochemistry* **35**, 12086–12093.
- Petushkov, V. N., Gibson, B. G. und Lee, J. (1996b) Direct measurement of excitation transfer in the protein complex of bacterial luciferase hydroxyflavin and the associated yellow fluorescence proteins from *Vibrio fischeri* Y1. *Biochemistry* **35**, 8413–8418.
- Petushkov, V. N. und Lee, J. (1997) Purification and characterization of flavoproteins and cytochromes from the yellow bioluminescence marine bacterium *Vibrio fischeri* strain Y1. *Eur. J. Biochem.* **245**, 790–796.
- Plaut, G. W. E. (1960) Studies on the stoichiometry of the enzymatic conversion of 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine to riboflavin. *J. Biol. Chem.* **235**, 41-42.
- Plaut, G. W. E. (1961) Water-soluble vitamins. II. (Folic acid, riboflavin, thiamine, vitamin B12). *Annu. Rev. Biochem.* **30**, 409-446.
- Plaut, G. W. E. (1963) Studies on the nature of the enzymatic conversion of 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine to riboflavin. *J. Biol. Chem.* **238**, 2225-2243.
- Plaut, G. W. E. und Harvey, R. A. (1971) The Enzymatic Synthesis of Riboflavin. *Methods Enzymol.* **18b**, 515-538.



- Plaut, G. W., Smith, C. M. und Alworth, W. L. (1974) Biosynthesis of water-soluble vitamins. *Annu. Rev. Biochem.* **43**, 899-922.
- Read, S. M., und Northcote, D. H. (1981) Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie blue G dye-binding assay for protein. *Anal Biochem.* **116**, 53-64.
- Reuke, B., Korn, S., Eisenreich, W. und Bacher, A. (1992) Biosynthetic precursors to deazaflavins. *J. Bacteriol.* **174**, 4042-4049.
- Richter, G., Volk, R., Krieger, C., Lahm, H. W., Röthlisberger, U. und Bacher, A. (1992) Biosynthesis of riboflavin: cloning, sequencing, and expression of the gene coding for 3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174**, 4050-4056.
- Richter, G., Krieger, C., Volk, R., Kis, K., Ritz, H., Götze, E. und Bacher, A. (1997) Biosynthesis of Riboflavin: S-3,4-Dihydroxy-2-butanone 4-phosphate Synthase. *Meth. Enzymol.* **280**, 374-382.
- Richter, G., Kelly, M., Krieger, C., Yu, Y., Bermel, W., Karlsson, G., Bacher, A. und Oschkinat, H. (1999) NMR studies on the 46-kDa dimeric protein, 3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase, using  $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , and  $^{15}\text{N}$ -labeling. *Eur. J. Biochem.* **261**, 57-65.
- Ritz, H., Schramek, N., Bracher, A., Herz, S., Eisenreich, W., Richter, G. und Bacher, A. (2001) Biosynthesis of riboflavin: studies on the mechanism of GTP cyclohydrolase II. *J. Biol. Chem.* **276**, 22273-22277.
- Römisch, W. (2000) Synthese isotopmarkierter RNA, Diplomarbeit, Technische Universität München.
- Römisch, W., Eisenreich, W., Richter, G. und Bacher, A. (2002) Rapid One-Pot Synthesis of Riboflavin Isotopomers. *J. Org. Chem.* **67**, 8890-8894.
- Rowan, T. und Wood, H. C. S. (1963) The biosynthesis of riboflavin. *Proc. Chem. Soc.* 21-22.
- Rowan, T. und Wood, H. C. S. (1968) The biosynthesis of pteridines. Part V. The synthesis of riboflavin from pteridine precursors. *J. Chem. Soc.* 452-458.

- Salomon, M., Christie, J. M., Knieb, E., Lempert, U. und Briggs, W. R. (2000) Photochemical and Mutational Analysis of the FMN-Binding Domains of the Plant Blue Light Receptor, Phototropin. *Biochemistry* **39**, 9401-9410.
- Salomon, M., Eisenreich, W., Dürr, H., Schleicher, E., Knieb, E., Massey, V., Rüdiger, W., Müller, F., Bacher, A. und Richter, G. (2001) An optomechanical transducer in the blue light receptor phototropin from *Avena sativa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 12357-12361.
- Sancar, A. (1994) Structure and function of DNA photolyase. *Biochemistry* **33**, 2-9.
- Sariri, R. und Khalili, G. (2002) Synthesis of Purine Antiviral Agents, Hypoxanthine and 6-Mercaptopurine. *Russ. J. Org. Chem.* **38**, 1053-1055.
- Schleicher, E., Kowalczyk, R. M., Kay, C. W. M., Hegemann, P., Bacher, A., Fischer, M., Bittl, R., Richter, G. und Weber, S. (2004) On the Reaction Mechanism of Adduct Formation in LOV Domains of the Plant Blue-Light Receptor Phototropin. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 11067-11076.
- Sedlmaier, H., Müller, F., Keller, P. J. und Bacher, A. (1987) Enzymatic synthesis of riboflavin and FMN specifically labeled with <sup>13</sup>C in the xylene ring. *Z. Naturforsch.* **42C**, 425-429.
- Schott, K., Kellermann, J., Lottspeich, F. und Bacher, A. (1990a) Riboflavin synthases of *Bacillus subtilis*. Purification and amino acid sequence of the  $\alpha$ -subunit. *J. Biol. Chem.* **265**, 4204-4209.
- Schott, K., Ladenstein, R., König, A. und Bacher, A. (1990b) The lumazine synthase/riboflavin synthase complex of *Bacillus subtilis*. Crystallization of reconstituted icosahedral  $\beta$ -subunit capsids. *J. Biol. Chem.* **265**, 12686-12689.
- Shavlovsky, G. M., Logvinenko, E. M., Kashenko, V. E., Koltun, L. V. und Zakal'sky, A. E. (1976) Detection of an enzyme of the first stage of flavinogenesis of GTP cyclohydrolase in yeast *Pichia guilliermondii*. *Dokl. Akad. Nauk. SSSR*, **230**, 1485-1487.
- Shavlovsky, G. M., Sibirny, A. A., Kshanovskaya, B. V., Koltun, L. V. und Logvinenko, E. M. (1979) Genetic classification of riboflavinless mutants of *Pichia guilliermondii* yeast. *Soviet Genet.* **15**, 1561-1568.

- Shavlovsky, G. M., Logvinenko, E. M., Benndorf, R., Koltun, L. V., Kashchenko, V. E., Zakal'sky, A. E., Schlee, D. und Reinbothe, H. (1980) First Reaction of Riboflavin Biosynthesis – Catalysis by a Guanosine Triphosphate Cyclohydrolase from Yeast. *Arch. Microbiol.* **124**, 255-259.
- Shavlovsky, G. M., Teslyar, G. E. und Strugovshchikova, L. P. (1982) Regulation of flavogenesis in riboflavin-dependent *Escherichia coli* mutants. *Mikrobiologiya* **51**, 986-992.
- Shaw, E. (1950) A new Synthesis of the Purines Adenine, Hypoxanthin, Xanthine, and Isoguanine. *J. Biol. Chem.* **185**, 439-447.
- Swartz, T. E., Corchnoy, S. B., Christie, J. M., Lewis, J. W., Szundi, I., Briggs, W. R. und Bogomolni, R. A. (2001) The photocycle of a flavin-binding domain of the blue light photoreceptor phototropin. *J. Biol. Chem.* **276**, 36493-36500.
- Steinbacher, S., Schiffmann, S., Richter, G., Huber, R., Bacher, A. und 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: Implications for the Catalytic Mechanism. *J. Biol. Chem.* **278**, 42256-42265.
- Stüber, D., Matile, H. und Garotta, G. (1990) System for high-level production in *Escherichia coli* and rapid purification of recombinant proteins: application to epitope mapping, preparation of antibodies, and structure-function analysis. in Immunological methods IV, Lefkovits, I. und Pernis, P. (eds.), Academic Press, Orlando, Florida, 121-152.
- Tishler, M., Pfister, K., Babson, R. D., Ladenburg, K. und Fleming A. J. (1947) The Reaction between o-Aminoazo Compounds and Barbituric Acid. A new Synthesis of Riboflavin. *J. Am. Chem. Soc.* **69**, 1487-1492.
- Tolbert, T. J. und Williamson, J. R. (1997) Preparation of Specifically Deuterated and <sup>13</sup>C-Labeled RNA for NMR Studies Using Enzymatic Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 12100-12108.

- Truffault, V., Coles, M., Diercks, T., Abelmann, K., Eberhardt, S., Lüttgen, H., Bacher, A. und Kessler, H. (2001), The solution structure of the N-terminal domain of riboflavin synthase. *J. Mol. Biol.* **309**, 949–960.
- Van Schagen, C. G. und Müller, F. (1981) A  $^{13}\text{C}$  nuclear-magnetic-resonance study on free flavins and *Megasphaera elsdenii* and *Azotobacter vinelandii* flavodoxin.  $^{13}\text{C}$ -enriched flavins as probes for the study of flavoprotein active sites. *Eur. J. Biochem.* **120**, 33-39.
- Vervoort, J., Müller, F., O’Kane, D. J., Lee, J. und Bacher, A. (1986) Bacterial luciferase: a carbon-13, nitrogen-15, and phosphorus-31 nuclear magnetic resonance investigation. *Biochemistry* **25**, 8067-8075.
- Volk, R. und Bacher, A. (1988) Biosynthesis of riboflavin. The structure of the 4-carbon precursor. *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 3651-3653.
- Volk, R. und Bacher, A. (1990) Studies on the four carbon precursor in the biosynthesis of riboflavin. Purification and properties of L-3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase. *J. Biol. Chem.* **265**, 19479-19485.
- Volk, R. und Bacher, A. (1991) Biosynthesis of Riboflavin. Studies on the Mechanism of L-3,4-Dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase. *J. Biol. Chem.* **266**, 20610-20618.
- Wacker, H., Harvey, R. A., Winestock, C. H. und Plaut, G. W. E. (1964) 4-(1'-D-Ribityl-amino)5-amino-2,6,-dihydroxypyrimidine, the second product of the riboflavin synthetase reaction. *J. Biol. Chem.* **239**, 3493-3497.
- Ward, H. R. und Lawler, R. G. (1967) Nuclear magnetic resonance emission and enhanced absorption in rapid organometallic reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **89**, 5518-5519.
- Weber, S., Richter, G., Schleicher, E., Bacher, A., Möbius, K. und Kay, C. W. M. (2001a) Substrate binding to DNA photolyase studied by electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Biophys. J.* **81**, 1195-1204.
- Weber, S., Möbius, K., Richter, G. und Kay, C. W. M. (2001b) The Electronic Structure of the Flavin Cofactor in DNA Photolyase. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 3790-3798.
- Wong, C.-H., Mc Curry, S. D. und Whitesides, G. M. (1980) Practical Enzymatic Syntheses of Ribulose 1,5-Bisphosphate and Ribose 5-Phosphate. *J. Am. Chem. Soc.* **102**, 7938-7939.

- 
- Young D.W. (1972) The biosynthesis of the vitamins thiamin, riboflavin, and folic acid. *Feldsher Akush* **37**, 27-28.
- Zamenhof, P. J. und Villarejo, M. (1972) Construction and properties of *Escherichia coli* strains exhibiting complementation of galactosidase fragments *in vivo*. *J. Bacteriol.* **110**, 171-178.
- Zysmilich, M. G. und McDermott, A. (1994) Photochemically Induced Dynamic Nuclear Polarization in the Solid-State  $^{15}\text{N}$  Spectra of Reaction Centers from Photosynthetic Bacteria *Rhodobacter sphaeroides* R-26. *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 8362-8363.
- Zysmilich, M. G. und McDermott, A. (1996a) Natural abundance solid-state carbon NMR studies of photosynthetic reaction centers with photoinduced polarization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 6857-6860.
- Zysmilich, M. G. und McDermott, A. (1996b) Photochemically Induced Nuclear Spin Polarization in Bacterial Photosynthetic Reaction Centers: Assignments of the  $^{15}\text{N}$  SSNMR Spectra. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 5867-5873.