

Lehrstuhl für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität
München

Biosynthese von Vitamin B₂

Die Lumazinsynthese: Charakterisierung und Anwendung.

Ilka Haase

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. A. Gierl

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Dr. A. Bacher
2. Univ.-Prof. Dr. S. Weinkauff

Die Dissertation wurde am 30.09.02 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 13.11.02 angenommen.

Für meine Familie.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von April 1999 bis September 2002 am Lehrstuhl für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität München unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Dr. A. Bacher durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Dr. A. Bacher möchte ich herzlich für die engagierte Betreuung und das grosse Interesse am Fortschritt dieser Arbeit danken.

Ein besonderer Dank geht an Dr. Markus Fischer, der mich die Jahre hindurch betreut hat und durch seine Vorarbeiten und sein Wissen auf diesem Gebiet diese Arbeit erst ermöglicht hat.

Meinen Arbeitskolleginnen Steffi Echt, Susi Schiffmann, Annie Schott und Kristina Kemter möchte ich für das angenehme Arbeitsklima, für hilfreiche Diskussionen und die mir entgegengebrachte Freundschaft danken.

Ganz besonders möchte ich mich bei Nick Schramek bedanken, mit dem ich so manche Stunden vor dem Stopped-Flow-Gerät verbracht habe und der mir auch bei sämtlichen grossen und kleinen Computerkatastrophen zur Seite stand.

Ein herzlicher Dank gilt auch der Gruppe von Herrn Prof. Dr. R. Huber der Abteilung für Strukturforschung am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried, insbesondere meinem „Laborkollegen“ Stefan Gerhardt, Stefan Steinbacher, Jens Kaiser und Gerd Bader. Die ausserordentlich erfolgreiche Zusammenarbeit mit Euch hat viel zu dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Dr. G. Richter danke für die Hilfe bei der analytischen Ultrazentrifugation.

Nicht zu vergessen sind Richard Feicht, Annett Kiekebusch und Lars Schulte, die mir bei so einigen Proteinreinigungen sehr unter die Arme gegriffen haben.

Frau Prof. Dr. S. Weinkauff und deren Mitarbeitern Johannes Scheuring und Lidia Rodriguez gebührt ein besonderer Dank für die Mithilfe bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen.

Herrn Matthias Tristl vom Lehrstuhl für Biophysik unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Sackmann danke ich für die Bereitstellung der biophysikalischen Ergebnisse und für die Nachhilfe in physikalischen Fragen.

Allen anderen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Organische Chemie und Biochemie danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Ein liebevoller Dank geht an meine Schwester Lynn, die immer an mich geglaubt hat und mir einen grenzenlosen Rückhalt in allen Dingen gibt. Meinem Vater danke ich für sein Vertrauen und seine Unterstützung während meines Studiums.

1	EINLEITUNG	1
1.1	Überblick.....	1
1.2	Riboflavinbiosynthese.....	2
1.3	Die Rolle der Lumazinsynthese in der Riboflavinbiosynthese.....	5
1.4	Struktur der Lumazinsynthese	7
1.5	Die Rolle der Lumazinsynthese als Funktionsprotein	9
1.5.1	Biofunktionalisierung von Oberflächen.....	9
1.5.2	Lumazinsynthese als biokompatible Zwischenschicht.....	11
1.6	Aufgabenstellung	12
2	MATERIAL UND METHODEN	14
2.1	Material	14
2.1.1	Geräte.....	14
2.1.2	Chemikalien	16
2.1.3	Bakterienstämme	17
2.1.4	Plasmide.....	17
2.1.5	Proteine und Enzyme.....	17
2.1.6	Expressionsstämme.....	18
2.1.7	Trennmaterialien	19
2.1.8	Puffer	19
2.2	Methoden	20
2.2.1	Molekularbiologische Methoden.....	20
2.2.1.1	Polymerasekettenreaktion.....	20
2.2.1.2	DNA-Verdau mittels Restriktionsenzymen.....	21
2.2.1.3	Reinigung von DNA-Fragmenten	21
2.2.1.4	Ligation von Vektor und Insert.....	22
2.2.1.5	Transformation in chemisch kompetente Zellen.....	22
2.2.1.6	PCR-Screen.....	23

2.2.1.7	Fermentation und Zellernte	23
2.2.1.8	Zellaufschluss	26
2.2.1.9	Plasmidisolierung	26
2.2.1.10	DNA-Sequenzierung	27
2.2.2	Gelelektrophorese.....	27
2.2.2.1	Agarosegelelektrophorese	27
2.2.2.2	SDS-Gelelektrophorese	28
2.2.2.3	Native Gelelektrophorese.....	29
2.2.3	Proteinchemische Methoden.....	29
2.2.3.1	Säulenchromatographie	29
2.2.3.2	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford.....	31
2.2.3.3	Proteinaufkonzentrierung	32
2.2.3.4	N-Terminale Aminosäuresequenzierung	32
2.2.3.5	Massenspektrometrie.....	33
2.2.3.6	Analytische Ultrazentrifugation	33
2.2.3.7	Western-Blot Analyse.....	35
2.2.3.8	Kinetische Untersuchungen	37
2.2.3.9	Fluoreszenzquench-Titration	42
2.2.3.10	Gleichgewichtsdialyse	42
2.2.3.11	Circulardichroismus-Spektroskopie	43
2.2.3.12	Elektronenmikroskopische Untersuchungen.....	44
2.2.3.13	Messungen an der Filmwaage.....	44
2.2.3.14	Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie.....	45
2.2.3.15	Neutronenreflexion	45
2.2.3.16	Röntgenstrukturanalyse	46
3	DURCHFÜHRUNG.....	47
3.1	Lumazinsynthase als Enzym	47
3.1.1	Lumazinsynthasemutanten	47
3.1.1.1	Klonierung der Lumazinsynthasemutante E126A aus <i>B. subtilis</i>	47
3.1.1.2	Herstellung der Mutanten der Lumazinsynthase aus <i>S. pombe</i>	47
3.1.2	Expression und Reinigung	50
3.1.2.1	Expression	50
3.1.2.2	Reinigung von Lumazinsynthasen über ein Zweisäulensystem	50

3.1.2.3	Reinigung von Lumazinsynthasen über Ein- oder Mehrsäulensysteme	51
3.1.3	Charakterisierung.....	52
3.2	Lumazinsynthese als Funktionsprotein.....	54
3.2.1	His ₆ -Lumazinsynthese.....	54
3.2.2	Deuterierte His ₆ -Lumazinsynthese	54
3.2.3	Fluoreszenzmarkierte His ₆ -Lumazinsynthese.....	55
3.2.4	Hisactophilin-Lumazinsynthese (HisAc-Lumazinsynthese).....	55
3.2.5	Biotinylierte Lumazinsynthese (CBio-Lumazinsynthese)	55
3.2.6	Bifunktionelle Kapside aus CBio- und His ₆ -Lumazinsynthese	56
4	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	57
4.1	Lumazinsynthese als Enzym	57
4.1.1	Quartärstruktur – Pentamer oder Ikosaeder ?.....	57
4.1.1.1	Lumazinsynthasen bekannter Struktur aus <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Spinacia oleracea</i> und <i>Aquifex aeolicus</i>	57
4.1.1.2	Lumazinsynthese aus der Hefe <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	61
4.1.1.3	Lumazinsynthese aus dem thermophilen Archaeobakterium <i>Methanococcus jannaschii</i>	74
4.1.1.4	Lumazinsynthasen aus pathogenen Mikroorganismen und der Pflanze <i>A. thaliana</i>	77
4.1.1.5	Diskussion.....	82
4.1.2	Reaktionskinetik.....	88
4.1.2.1	Der Reaktionsablauf der Lumazinsynthese aus <i>B. subtilis</i> unter Single-Turn-Over Bedingungen	88
4.1.2.2	Die Lumazinbildung unter Steady-State Bedingungen	101
4.1.2.3	Diskussion.....	122
4.2	Lumazinsynthese als Funktionsprotein.....	128
4.2.1	His ₆ -Lumazinsynthese.....	128
4.2.2	Deuterierte His ₆ -Lumazinsynthese	132
4.2.3	Fluoreszenzmarkierte (Texasrot) Lumazinsynthese	134
4.2.4	Hisactophilin-Lumazinsynthese	135

4.2.5	Biotinylierte Lumazinsynthase	137
4.2.6	Bifunktionelle Kapside	139
4.2.7	Diskussion	142
5	ZUSAMMENFASSUNG	145
6	ANHANG	146
7	LITERATUR	150

Verwendete Abkürzungen:

AQ:	<i>Aquifex aeolicus</i>
AT:	<i>Arabidopsis thaliana</i>
BCIB:	5-Brom-4-Chlorindol-3-yl-phosphat
BS:	<i>Bacillus subtilis</i>
BSA:	Bovine serum albumin
CD :	Circulardichroismus
DEAE:	Diethylaminoethyl
DMPC:	L- α -Dimyristoyl-1,2-diacyl-sn-glycero-3-phosphaditylocholin
dNTPs:	Desoxyribonukleotid-Triphosphate
DOGS-Ni-NTA:	1,2-Diolelysn-glycero-3-[N-(5-Amino-1carboxypentyl)- Iminodiacetat]-succinyl-Nickel-NTA
DTT:	Dithiothreitol
EC:	<i>Escherichia coli</i>
EDTA:	Ethylendiamintetraacetat
GuHCl:	Guanidiniumhydrochlorid
HI:	<i>Haemophilus influenzae</i>
HisAc:	Hisactophilin
HRP:	Horseraddish Peroxidase
IgG:	Immunoglobulin G
IPTG:	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
Lusy:	Lumazinsynthase
MJ:	<i>Methanococcus jannaschii</i>
MT:	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NBT:	Nitroblautetrazoliumchlorid
NM:	<i>Neisseria meningitidis</i>
NTA:	Nitrilotriaceticacid
OD ₂₈₀ , OD ₆₀₀ :	Optische Dichte bei 280 bzw.600 nm
PF:	<i>Pyrococcus furiosus</i>
SA:	<i>Staphylococcus aureus</i>
SC:	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS:	Natriumdodecylsulfat
SPR:	Surface-Plasmon-Resonance-Spectroscopy

SSP:	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
STP:	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
PCR:	Polymerasekettenreaktion
TAE:	Tris/Acetat/EDTA
TCA:	Trichloressigsäure
TEMED:	N, N, N,`N`-Tetramethylethylendiamin
Tris:	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

1 Einleitung

1.1 Überblick

Der Begriff „Vitamin“ leitet sich vom lateinischen „vita“ = Leben und „amin“ ab und geht auf das als lebensnotwendige Amin erkannte Thiamin zurück (Funk, 1912). 1929 wurde der Nobelpreis für Medizin an die beiden Wissenschaftler Eijkman und Hopkins für ihre Arbeiten auf dem Gebiet der Vitaminforschung verliehen. Hofmeister definierte Vitamine als „im Tier- und Pflanzenreich verbreitete, in der Nahrung nur in kleinen Mengen vorhandene Stoffe, die für das Wachstum und die Erhaltung des tierischen Körpers unentbehrlich sind.“ Die erste Unterteilung der Vitamine erfolgte in fettlösliche und wasserlösliche Vitamine, da die chemischen Strukturen nicht bekannt waren. Diese Definitionen müssen nach dem heutigen Stand der Wissenschaft zwar korrigiert und erweitert werden, der Kern der Aussagen trifft aber immer noch zu. Vitamine sind essentielle Bestandteile der Nahrung und können vom menschlichen und tierischen Organismus nicht selbst synthetisiert werden (einzige Ausnahme: Synthese von Vitamin D aus Cholesterin unter Lichteinwirkung beim Erwachsenen).

Vitamin B₂ (7,8-Dimethyl-10-(1'-D-ribyl)-isoalloxazin, Riboflavin) gehört zu der Gruppe der wasserlöslichen Vitamine und spielt in Form seiner Phosphorsäureester Flavinmononukleotid (FMN) und Flavinadenindinukleotid (FAD) eine wichtige Rolle als Cofaktor in Flavoenzymen. Diese katalysieren unter anderem den Elektronentransport in der Atmungskette und den oxidativen Abbau von Pyruvat, Aminosäuren und Fettsäuren. Da die von der WHO empfohlene tägliche Einnahme von 1,2-1,7 mg/Tag über die normale Nahrung ausreichend abgedeckt wird, treten Mangelercheinungen nur selten auf. Dazu zählen in schwacher Form Hautveränderungen, bei starkem Mangel Anämie und degenerative Veränderungen des Nervensystems.

Die Enzyme für die Riboflavinbiosynthese sind nur noch in Mikroorganismen, Pilzen und Pflanzen vorhanden. Säuger haben diese im Laufe der Evolution verloren und sind auf die Aufnahme des Vitamins über die Nahrung angewiesen

(Müller, 1988). Vitamin B₂ wurde 1931 erstmals von Kuhn aus Molke isoliert. Die Aufklärung der Struktur erfolgte 1939 nach Totalsynthese. Danach brauchte es jedoch fast ein halbes Jahrhundert, bis der Biosyntheseweg vollständig aufgeklärt werden konnte.

1.2 Riboflavinbiosynthese

Über die Biosynthese von Riboflavin erschienen regelmässig Übersichtsartikel, in denen die früheren Arbeiten ausführlich diskutiert wurden (Plaut, 1961; Brown et al., 1963; Schlee, 1969; Plaut, 1971; Plaut et al., 1974; Brown et al., 1982; Young, 1986; Bacher, 1991a; Bacher et al., 1993; Bacher et al., 1996; Bacher et al., 2000; Bacher et al., 2001).

Der Reaktionsweg der Riboflavinbiosynthese von Bakterien und Pilzen ist in Abbildung 1.1 zusammengefasst.

Ausgangssubstanz ist GTP (**1**), das unter Ringöffnung, Formiat- und Pyrophosphatabspaltung zu 2,5-Diamino-6-ribosylamino-4(3*H*)-pyrimidinon-5'-phosphat (**2**) reagiert. Katalysiert wird diese Reaktion durch die Cyclohydrolase II (**I**) (Foor et al., 1975; Foor et al., 1980). Die Bildung von 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion-5'-phosphat (**5**) erfordert die Reduktion der Ribosylseitenkette und die Desaminierung an Position 2 des Pyrimidinrings. In Bakterien erfolgt zunächst die Reaktion zum 5-Amino-6-ribosylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion-5'-phosphat (**3**) mit Hilfe einer Desaminase (**II**). Es folgt eine enzymatisch katalysierte Reduktion (**III**) von **3** zu 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion-5'-phosphat (**5**) (Burrows et al., 1978). In Hefen und Pilzen dagegen erfolgt ausgehend von **2** zuerst die Reduktion der Seitenkette zu 2,5-Diamino-6-ribitylamino-4(3*H*)-pyrimidindion-5'-phosphat (**4**). Der Reaktionsweg führt jedoch letztendlich, nach Desaminierung, zum selben Intermediat **5** (Bacher et al., 1970; Nielsen et al., 1981). Erst vor einigen Jahren wurden in den Bakterien *E. coli* und *B. subtilis* für die Umwandlung des Intermediats **2** in **5** bifunktionelle Enzyme gefunden, die eine N-terminale Desaminase (**II**)- und eine C-terminale Reduktase (**III**)-Domäne besitzen (Richter et al., 1997a).

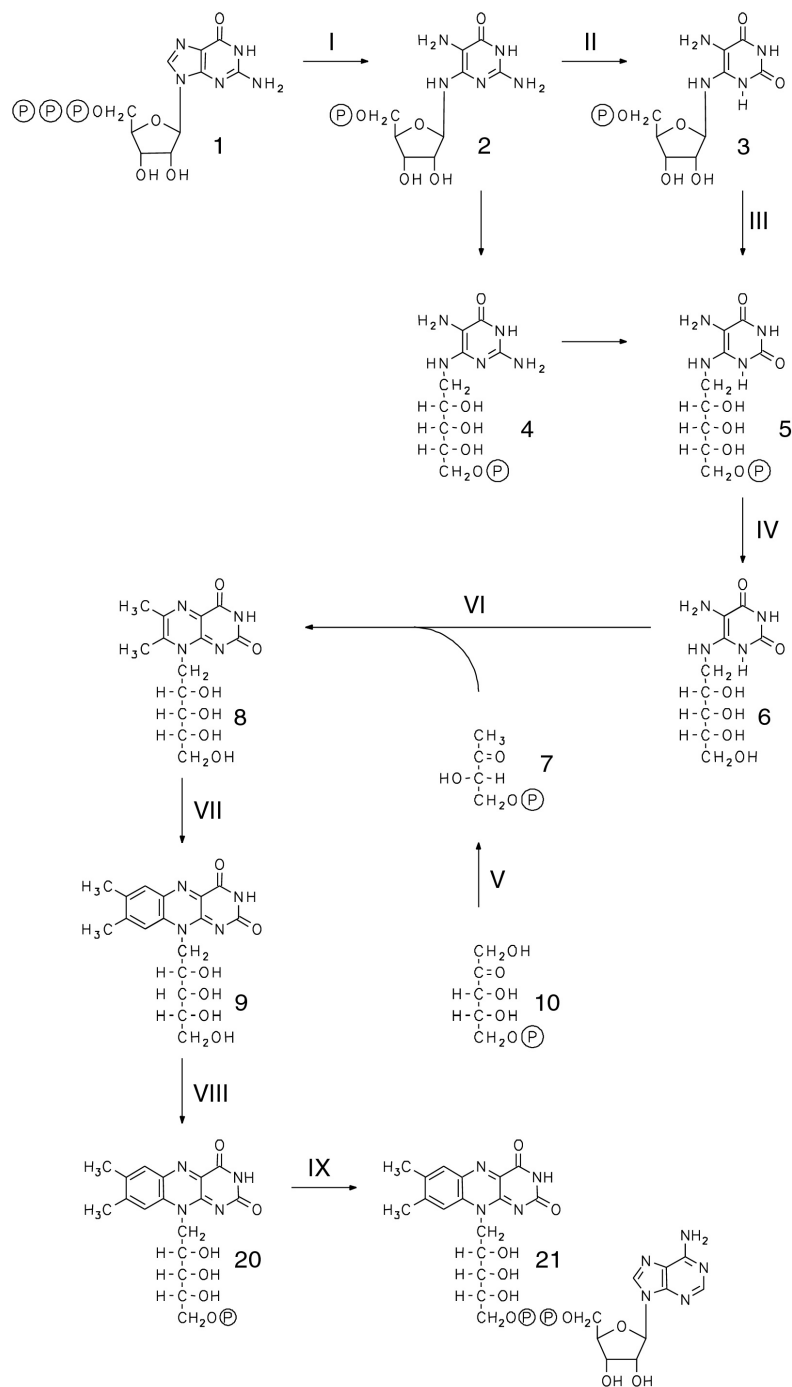


Abbildung 1.1: Riboflavinbiosynthese mit Folgereaktionen zu FMN und FAD.

I: Cyclohydrolase II; II: Desaminase; III: Reduktase; IV: Phosphatase; V: 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphatsynthase; VI: 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazinsynthase; VII: Riboflavinsynthase; VIII: Flavokinase; IX: FAD-Synthetase.

1: GTP; 2: 2,5-Diamino-6-ribosylamino-4(3H)-pyrimidinon-5'-phosphat; 3: 5-Amino-6-ribosylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidindion-5'-phosphat; 4: 2,5-Diamino-6-ribitylamino-4(3H)-pyrimidinon-5'-phosphat; 5: 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidindion-5'-phosphat; 6: 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidindion; 7: 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat; 8: 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin; 9: Riboflavin; 10: Ribulose-5-phosphat; 20: FMN; 21: FAD.

Da nur das unphosphorylierte Intermediat 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (**6**) als Substrat für das nächste Enzym in der Riboflavinbiosynthese dienen kann (Harzer et al., 1978), muss eine Phosphatabspaltung mit Hilfe einer Phosphatase (**IV**) an diesem Punkt stattfinden. Es wird vermutet, dass eine Phosphatase mit geringer Substratspezifität für diesen Umsatz verantwortlich ist. Warum in diesem Fall aber nicht aus dem, zu **5** sehr ähnlichen, Intermediat **4** 2,5-Diamino-6-ribitylamino-4(3*H*)-pyrimidindion gebildet wird, welches durch die Desaminase nicht mehr umgesetzt werden kann (Hollander et al., 1979), ist bis jetzt nicht geklärt.

Das nächste Enzym in der Reaktionsfolge ist die Lumazinsynthese (**VI**), die neben der Verbindung **6** ein weiteres Substrat zur Bildung von 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin (**8**) benötigt. Dieses, lange strukturell unbekannt, Zuckerphosphat **7** wird von dem Enzym 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphatsynthase (**V**) aus D-Ribulose-4-Phosphat (**10**) gebildet. Dabei wird das C₄-Atom der Pentose als Formiat eliminiert (Volk et al., 1988; Volk et al., 1990; Volk et al., 1991).

Lange Zeit bestand Unklarheit über diese C₄-Einheit. Neben Diacetyl und Acetoin wurden zahlreiche Tetrosen und Pentosen und schliesslich auch die Ribitylseitenkette des Pyrimidins **6** diskutiert (Bacher, 1991b). Bei Einbauversuchen mit ¹³C-markierten Vorstufen konnten unterschiedliche Anreicherungen an bestimmten Positionen in Riboflavin mittels NMR-Spektroskopie beobachtet werden und manifestierten den Pentosephosphatweg als Quelle der gesuchten Verbindung (Bacher et al., 1983). Neuberger und Bacher fanden 1985 den Phosphorsäureester einer Kohlenhydratverbindung, den sie „Compound X“ nannten (Neuberger et al., 1985). Von seinen fünf Kohlenstoffatomen wurden jedoch nur C₁ bis C₃ und das C₅-Atom in die Lumazinverbindung eingebaut, wobei eine neue Bindung zwischen C₃ und C₅ entstand (Bacher et al., 1985; Le Van et al., 1985). Es folgte schliesslich die Isolierung eines Enzyms **V**, das aus Ribulose-5-phosphat (**10**) unter Umlagerung und Formiatabspaltung 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat (**7**) bilden kann (Volk et al., 1988; Volk et al., 1990; Volk et al., 1991; Richter et al., 1992).

Eine abschliessende Dismutation von zwei Lumazinmolekülen (**8**) führt zur Bildung von Riboflavin (**9**) und **6**, welches wieder in den Kreislauf eingeht. Katalysiert wird die Reaktion durch die Riboflavinsynthase (**VII**) (Plaut, 1960; Plaut, 1963; Wacker et al., 1964; Harvey et al., 1966).

Riboflavin (**9**) kann mit Hilfe der Enzyme Flavokinase (**VIII**) zu FMN (**20**) und anschliessend durch die FAD-Synthetase (**IX**) zu FAD (**21**) reagieren. Die erste Reaktion erfordert ATP (Bacher, 1991c). Bifunktionelle Flavokinasen/FAD-Synthetasen konnten in den Eubakterien *C. ammoniagenes* und *E. coli* gefunden werden (Kamino et al., 1985; Manstein et al., 1986; Kitatsuji, 1993; Hagihara et al., 1995; Nakagawa, 1995).

1.3 Die Rolle der Lumazinsynthese in der Riboflavinbiosynthese

Die Bildung von 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin (Lumazin, **8**) aus den beiden Substraten **6** und **7** führt über mehrere Intermediate (Abbildung 1.2) und konnte erst vollständig aufgeklärt werden, als die Identifikation des zweiten Substrates 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat **7** im Jahr 1988 erfolgt war (Neuberger et al., 1986; Nielsen et al., 1986; Volk et al., 1988; Kis et al., 1995b).

Die Regiochemie der Reaktion konnte mit ¹³C-markiertem Zuckerphosphat bestimmt werden (Kis et al., 1995b). Die C₁-Methylgruppe von **7** wird immer in die 6 α -Position des Produktes **8** eingebaut. Im Gegensatz dazu ist die Stereoselektivität der Lumazinsynthese bezüglich des C₃-Stereozentrums in **7** nur schwach ausgebildet. Beide C₃-Enantiomere werden als Substrate akzeptiert, allerdings verfügt das S-Enantiomer über eine 5-6 fach höhere Reaktionsgeschwindigkeit.

Der erste Reaktionsschritt ist die Bildung der Schiffschen Base **11** nach nukleophilem Angriff der primären Aminogruppe in 5 Position des Substrates **6** an die Carbonylgruppe des Zuckerphosphates **7** und Wasserabspaltung. Die anschliessende Phosphatabspaltung wird durch die - durch das Iminomotiv erleichterte - Deprotonierung in Position 7 begünstigt und führt zu Intermediat **12**. Nach Rotation (Intermediat **13**) und Tautomerisierung (Intermediat **14**) kann die entstandene Carbonylgruppe durch die Aminogruppe in Position 8 intramolekular angegriffen (Intermediat **15**) und nach Wasserabspaltung Lumazin (**8**) gebildet werden.

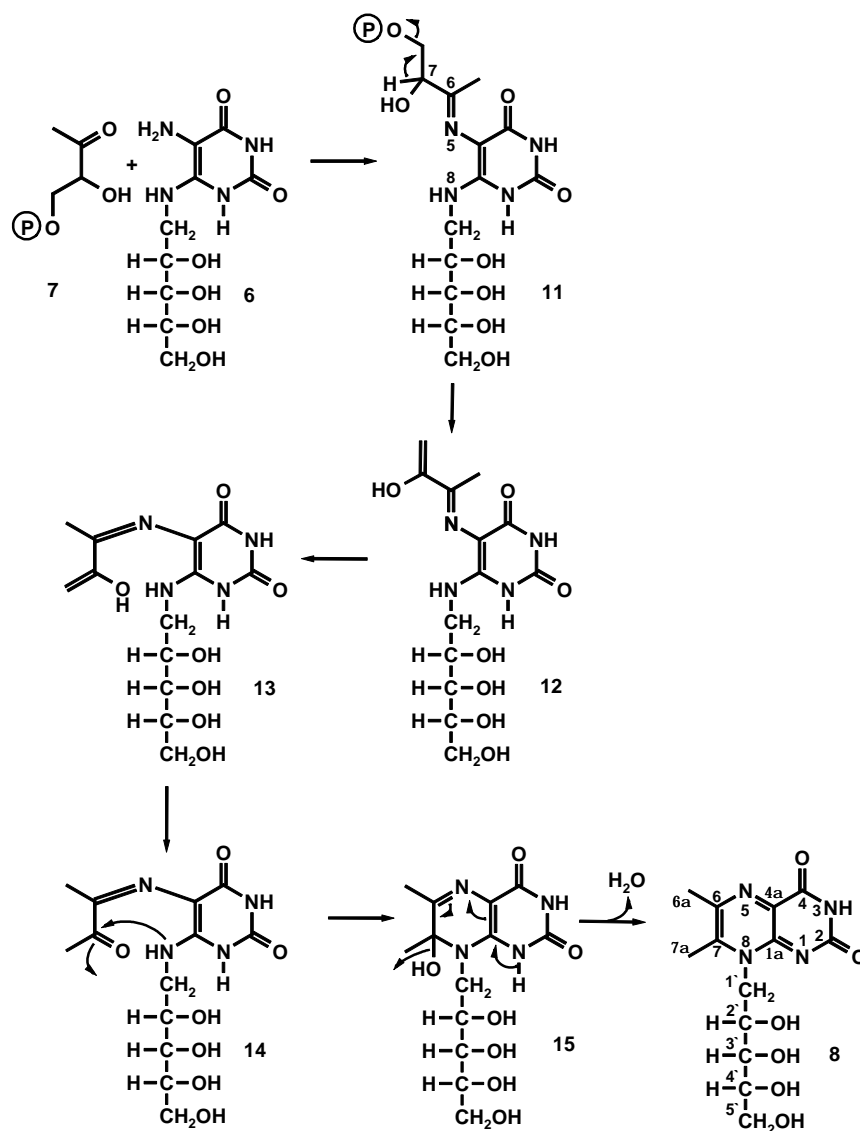


Abbildung 1.2: Reaktionsmechanismus der Lumazinsynthese.

Die Stabilität von 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat (7) ist in neutralen wässrigen Lösungen bei Raumtemperatur begrenzt. Nach Abspaltung von Phosphat bildet sich Diacetyl, welches spontan mit 6 zu Lumazin (8) reagieren kann (Kis et al., 2001). Diese Spontanreaktion zeigte bei NMR-Untersuchungen mit ¹³C-markiertem Zuckerphosphat 7 eine unvollständige Regioselektivität. Der postulierte nicht-enzymatische Reaktionsweg teilt sich in einen regiospezifischen Weg - ähnlich zum enzymkatalysierten in Abbildung 1.2 - und einen nichtregiospezifischen Weg über Diacetyl nach Abspaltung von Phosphat aus 7.

1.4 Struktur der Lumazinsynthase

Die Struktur der Lumazinsynthase aus *B. subtilis*, die in diesem Mikroorganismus als Komplex mit der trimeren Riboflavinsynthase vorliegt (schwere Riboflavinsynthase), wurde intensiv mittels Röntgendiffraktion und Elektronenmikroskopie untersucht (Ladenstein et al., 1983; Bacher et al., 1986; Schott et al., 1990). Das bifunktionelle Enzym besteht aus 60 Lumazinsynthaseuntereinheiten, die ein ikosaedrisches Kapsid mit 532 Symmetrie bilden und ein Homotrimer aus Riboflavinsynthase im hohlen Kern beinhalten. Das 60mer wird auch als Dodecamer von Pentameren beschrieben (Abbildung 1.3).

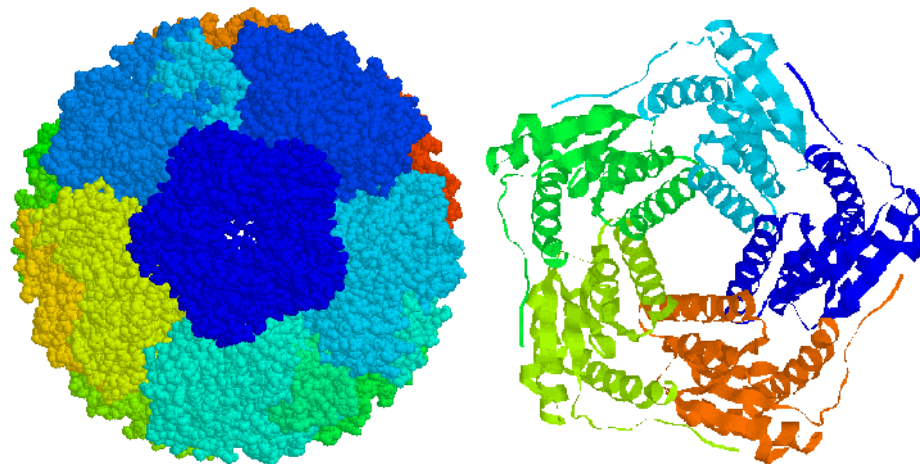


Abbildung 1.3: Links: Kalottenmodell der ikosaedrischen Lumazinsynthase aus *B. subtilis*. Die pentameren Untereinheiten sind unterschiedlich farbig dargestellt. Rechts: Detaildarstellung einer pentameren Untereinheit von links.

Die molekulare Masse beträgt etwa 1 MDa. Die erste Struktur mit einer Auflösung von 3,3 Å gab zwar Aufschluss über die Struktur der ikosaedrischen Lumazinsynthase, konnte jedoch keine Information über die trimere Riboflavinsynthase in deren Inneren geben (Ladenstein, 1988; Ladenstein et al., 1988). Eine verfeinerte Struktur mit 2,4 Å wurde mit leeren Lumazinsynthasekapsiden erreicht (Ladenstein et al., 1994; Ritsert et al., 1995).

Weitere ikosaedrische Lumazinsynthesen sind mittlerweile aus den Bakterien *Aquifex aeolicus* (Zhang et al., 2001), und *Escherichia coli* (Mörthl et al., 1996), sowie aus der Pflanze *Spinacia oleracea* (Persson et al., 1999) bekannt, während die Lumazinsynthesen aus dem Bakterium *Brucella abortus* (Braden et al., 2000) und aus den Hefen *Magnaporthe grisea* (Persson et al., 1999), *Saccharomyces cerevisiae* (Meining et al., 2000) und *Schizosaccharomyces pombe* (Gerhardt et al., 2002) Homopentamere bilden.

Die fünf bzw. 60 aktiven Zentren der Lumazinsynthase liegen an den Kontaktstellen zweier benachbarter Untereinheiten eines Pentamermoduls, wobei beide Untereinheiten zur Bildung des aktiven Zentrums beitragen (Abbildung 1.3). Durch Cokristallisation mit verschiedenen Analoga zum Pyrimidinsubstrat **6**, Intermediatanaloga und Produktanaloga (Abbildung 1.4) und NMR-Untersuchungen mit Fluorolumazinen konnten die, an der Bindung beteiligten, Aminosäuren identifiziert werden (Ritsert et al., 1995; Scheuring et al., 1995; Goetz et al., 1999; Persson et al., 1999; Meining et al., 2000; Scheuring et al., 2001; Gerhardt et al., 2002; Mehta et al., 2002).

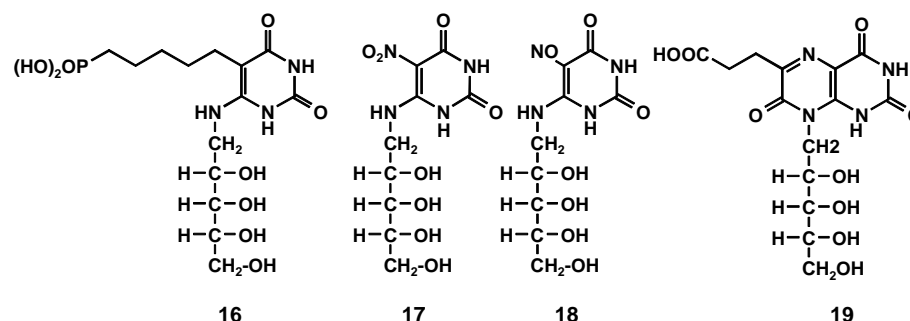


Abbildung 1.4: **16**: Intermediat analogon 5-(6-D-Ribitylamino-2,4-dihydroxypyrimidin-5-yl)-1-pentyl-phosphonat, **17**, **18**: Substrat analoga 5-Nitro- (**17**) bzw. 5-Nitroso-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (**18**), **19**: Produkt analogon 6-Carboxyethyl-7-oxo-8-ribityllumazin.

Abbildung 1.5 zeigt ein Bindungsmodell des Intermediat analogon **16** im aktiven Zentrum von *B. subtilis*.

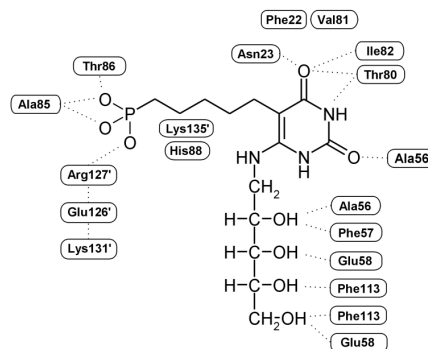


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung des Produktanalogons **16** im aktiven Zentrum nach Sequenzvergleich mit dem Enzym aus *S. cerevisiae*. Die Aminosäuren D138 und S142 liegen im Abstand von 4-8 Å zur Ribitylseitenkette am Eingang des aktiven Zentrums.

1.5 Die Rolle der Lumazinsynthese als Funktionsprotein

1.5.1 Biofunktionalisierung von Oberflächen

Der Einsatz von biokompatiblen Zwischenschichten zwischen festem Untergrundmaterial, wie Halbleitern, Metallen oder Kunststoff, und biologisch aktivem Material spielt eine zunehmende Rolle in der Forschung, aber auch in den biotechnologischen Branchen.

Proteinoberflächenschichten werden in Analysemethoden, wie der Biosensortechnik eingesetzt (Larkey et al., 1998; Van Regenmortel et al., 1998; Lowe, 1999; Nice et al., 1999). Ein Biosensor detektiert eine Änderung oder Reaktion mit Hilfe seines biologisch aktiven Materials und wandelt diese Änderung in ein elektronisches Signal um. Zum Einsatz kommen dabei Enzyme mit ihrem entsprechenden Substratumsatz, das Antikörper/Antigen-System, die Basenpaarung von Nukleinsäuren und das Rezeptor/Ligand-System. Unter Umständen können dabei auch optische Eigenschaften der Moleküle (Fluoreszenz, Absorption) genutzt werden.

Ein gängiges Beispiel für einen Biosensor, mit dem optische Signale detektiert werden, ist der ELISA (enzyme linked immuno absorbent assay). Der einzige kommerzielle elektrische Biosensor ist die Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie (SPR) (Rothenhäusler, 1988; Szabo, 1995), mit dem direkt die Ligandbindung an immobilisierte Proteine gemessen wird (Löfas, 1990).

Ein zweiter wichtiger Anwendungsbereich von organischen Oberflächenschichten ist die Immobilisierung von Enzymen oder Rezeptoren, um damit die Oberfläche von Zell- und Gewebeoberflächen simulieren zu können. In solchen Systemen können wichtige Prinzipien der Zell-Zell-Wechselwirkung und des Zellwachstums untersucht werden. Daneben können durch die Bildung von Lipidmono- und -bilayern Erkenntnisse über Lipid-Protein-Wechselwirkungen in Zellmembranen gewonnen werden (Sackmann, 1996; Rädler et al., 1997; Kantlehner et al., 1999; Sackmann, 2000).

Entscheidend bei der Biofunktionalisierung von Oberflächen ist die Trennung der biologisch aktiven Einheit von der denaturierenden und manchmal sogar toxischen anorganischen Oberfläche. Hier kommen ultradünne Polymerfilme aus synthetisch hergestelltem polymerem Dextran, Filme aus Hyaluronsäure, die Ablagerung mehrere Schichten Cellulose und die Bildung von Lipidmonolayern und -bilayern zum Einsatz (Elender et al., 1996; Sackmann, 1996; Sackmann, 2000). Letztere haben den Vorteil, dass die Dichte und die Mobilität der funktionellen Einheiten, wie Rezeptoren oder von Metallchelatorlipiden, in der Membran kontrolliert werden kann.

Der erste Schritt in der Entwicklung einer biofunktionalisierten Oberfläche ist die Untersuchung der gebildeten Schicht auf ihre Vollständigkeit, Homogenität und Dicke mittels oberflächensensitiver Messmethoden/-techniken:

Ein Massen-Dichte-Profil kann mit Hilfe der *Neutronen-* und *Röntgenstrahlung* aufgenommen werden. Vorteil der Neutronenreflexionstechnik ist die Möglichkeit der Empfindlichkeitssteigerung durch den Einsatz von deuterierten Komponenten, da die mittlere Streulängen von Wasserstoff- und Deuteriumkernen deutlich differieren (Naumann et al., 1996; Sackmann, 2000). Ebenso gibt es die

Möglichkeit die angelagerte Schichtdicke mittels der bereits oben genannten *Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie* (SPR) (Rothenhäusler, 1988; Szabo, 1995) oder des *Schwingquartzsystems* (Wegener et al., 1996; Su et al., 1999) zu bestimmen.

Bei der *Filmwaagentechnik* hingegen wird die Änderung der Oberflächenspannung von Lipidschichten an Luft/Wasser-Grenzschichten bei Anlagerung von Molekülen an diese Schichten gemessen. Beim Einsatz von fluoreszenzmarkierten Proben kann die Detektion mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopen unterstützt werden, wobei die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit vom Abstand des Mikroskopobjektives von der Lipidschicht gemessen wird.

Weitere Messtechniken sind Systeme zur Messung des Membranaufbauvorgangs (Reflektions-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie), der Anordnung funktioneller Gruppen in den Membranen (Mikroellipsometrie) und der lateralen Diffusion funktioneller Einheiten in den Lipidmembranen (Mikrofluoreszenztechniken) (Sackmann, 2000).

1.5.2 Lumazinsynthase als biokompatible Zwischenschicht

Wie unter 1.4 beschrieben besitzt das Enzym je nach Organismus eine pentamere oder ikosaedrische Struktur. Bei dem ikosaedrischen Kapsid der Lumazinsynthase aus *B. subtilis* liegen sowohl der N-Terminus als auch der C-Terminus auf der Oberfläche der Hohlkugel. Dies hat den Vorteil, dass rekombinantes Fusionieren von funktionellen Gruppen, wie Polyhistidin-Schwänze oder Biotin-bindende Peptide, aber auch von ganzen Proteinen auf die Enzymoberfläche möglich ist (Fischer, 2000). Dabei wird die funktionelle Einheit bei allen 60 Untereinheiten regelmässig auf dem Kapsid exprimiert. Wird die Lumazinsynthase an einer Oberfläche verankert, dient sie einerseits als Abstandshalter, andererseits können weitere Wechselwirkungen mit anderen Molekülen stattfinden. Diese Moleküle können zum Beispiel an die Lumazinsynthase gekoppelt werden.

Beim Fusionsprotein Hisactophilin-Lumazinsynthase ist das Hisactophilinpeptid aus *Dictyostelium discoideum* an den C-Terminus der Lumazinsynthase aus *B. subtilis* exprimiert. Dies führt zu Kapsiden mit 60 Hisactophilinmolekülen auf der

Oberfläche. Hisactophilin ist ein kleines Polypeptid aus 118 Aminosäuren (Sequenz in Abbildung 6.3, Anhang) mit einem Molekulargewicht von 13,5 kDa. Die Sekundärstruktur besteht aus 12 antiparallelen β -Faltblättern, die in Form von drei ähnlich aufgebauten Untereinheiten um eine dreizählige Achse liegen. Jeder Abschnitt besitzt ein $\beta_{1/5/9}$ - $\beta_{2/6/10}$ - $\beta_{3/7/11}$ -Loop- $\beta_{4/8/12}$ -Motiv. Das jeweils erste und vierte Faltblatt einer Einheit ($\beta_1, \beta_5, \beta_9$ und $\beta_4, \beta_8, \beta_{12}$) tragen zu einer zylinderförmigen Struktur bei, dessen eine Seite von den anderen Faltblättern flankiert wird ($\beta_2, \beta_3, \beta_6, \beta_7, \beta_{10}$ und β_{11}). Somit liegen die Loops, in denen 90 % (28) der Histidine lokalisiert sind, auf der einen Seite des Zylinders, während die beiden Termini auf der anderen Seite zu finden sind (Habazettl et al., 1992). Hisactophilin ist in der Lage, mit Hilfe der Histidinreichen Loops, bei pH-Werten unter 7,0 Aktin zu binden. Dabei verursacht es (in Abwesenheit von K^+ und Ca^{2+}) die Polymerisation von Aktin. Deshalb wird angenommen, dass es eine wichtige Rolle bei der Aktin/Membran-Kopplung spielt (Stoeckelhuber et al., 1996).

Durch die Fähigkeit der Dissoziation der Lumazinsynthase in seine Untereinheiten durch Harnstoff und Reassoziierung nach Entfernung des Harnstoffes (Bacher et al., 1986; Schott et al., 1990) ist es möglich, Mischungen zwischen Untereinheiten mit verschiedenen funktionalisierten Termini zu mischen und somit bifunktionelle Kapside *in vitro* herzustellen (Fischer, 2000).

1.6 Aufgabenstellung

Die Arbeiten auf dem Gebiet der Lumazinsynthase können in zwei verschiedene Bereiche mit unterschiedlichen Zielsetzungen eingeteilt werden:

Betrachtet man das Protein als **Enzym**, so liegen die Ziele klar in der Strukturaufklärung und der Untersuchung des katalytischen Mechanismus.

Bei der Strukturbestimmung ist die Röntgendiffraktion die Methode der Wahl. Sie macht es möglich Einblicke in die Aminosäuremotive zu bekommen, die im aktiven Zentrum liegen und an der katalytischen Umsetzung mitwirken können. Aber auch wenn die Röntgenstruktur des Enzyms nicht bekannt ist, kann man wichtige

Hinweise auf die Quartärstruktur mit Hilfe anderer analytischer Methoden sammeln und so die beteiligten Aminosäuren eingrenzen.

Der letzte Schritt zur Bestimmung des Einflusses einer Aminosäure auf die katalytische Aktivität des Enzyms ist die gerichtete Mutagenese dieser Position.

Auf diesen Grundlagen sollen in der vorliegenden Arbeit Lumazinsynthasen und deren Mutanten aus verschiedenen Mikroorganismen und Pflanzen auf ihre Struktur und ihre kinetischen Parameter untersucht werden.

Eine weitere wichtige Rolle kann die Lumazinsynthase als sogenanntes **Funktionsprotein** spielen. Die aus der Literatur bekannte ikosaedrische Struktur einiger Lumazinsynthasen macht das Molekül aufgrund seiner Symmetrie interessant für biophysikalische Anwendungen. Werden, wie eingangs beschrieben, funktionelle Gruppen an der Oberfläche des Kapsides angebracht, so kann das Protein als Anker, Koppler oder Vernetzer unterschiedlichste Aufgaben in biophysikalischen Systemen übernehmen.

Aus diesem Grund soll die Lumazinsynthase aus *B. subtilis* mit verschiedenen funktionellen Gruppen auf der Kapsidoberfläche auf ihre Fähigkeit zur Bildung von biokompatiblen Zwischenschichten untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Agarosegelapparatur:

Elektrophoresekammer Appligene 210 (Appligene, Heidelberg)

Brutschrank:

B5060 EK-CO (Heraeus, Hanau)

Elektronenmikroskop:

JEOL-JEM-100CX Mikroskop mit Imago-EM 23 Elektronenmikroskopie
Filmen

Fluorimeter:

Spektralfluorimeter Modell F-2000 (Hitachi, Düsseldorf)

FPLC-Anlage:

LKB-GP10 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)

Gleichgewichtsdialyse-Apparatur:

DIANORM (Bachhofer, Reutlingen)

Hochdrucksterilisator:

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

HPLC:

Pumpe: KNAUER WellChrom Maxi-Star K-1000 V1400 Version 0296 (Berlin)

Säule: Hypersil-ODS-5 μ 250x4,6mm ID SN: 812031R (Schambeck SFB
GmbH, Bad Honnef)

Detektor: Gynkotek Fluorescence Spectromonitor RF-530

Schreiber: Spectra-Physics SP 4270 Integrator (Darmstadt)

pH-Meter:

E 603 mit Standard-Glaselektrode (Deutsche Metrohm, Filderstadt)

Kühlzentrifugen:

Sorval RC 5B Plus mit den Rotoren GS-3 und SS-34 (Du Pont Instruments, Bad Homburg)

Multi-Funktions-Zentrifuge BR4i mit den Rotoren S40 und AB 2.14 (Jouan, Unterhaching)

Photodokumentation:

Video Copy Processor P68E (Mitsubishi, Ratingen)

Photometer:

UV-VIS-Spektralphotometer Ultrospec 2000 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)

Quarzküvetten (Helma, Mühlheim, Baden)

PCR-Maschine:

Biometra Tgradient (Whatman, Maidstone, Kent, UK)

Schüttelinkubator:

Certomat HK (B. Braun International, Melsungen)

SDS-Gel Apparatur:

Mighty Small SE 250 (Hoefer Scientific Instr., San Francisco, USA)

Spannungsquellen:

für Agarosegele: LKB GPS 20/400 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)

für SDS-Gele: Power Pac 1000 (BioRad, München)

Stopped-Flow-Experimente:

SFM4/QS-Reaktionsapparat (BioLogic, Claix, Frankreich)

TIDAS Diodenarray (J&M Analytische Mess- und Regeltechnik, Aalen)

CLD 35 W Deuteriumlampe (J&M Analytische Mess- und Regeltechnik, Aalen)

Thermoblock:

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

Tischzentrifuge:

Micro Fuge Lite (Beckman, Fullerton, USA)

Ultraschallgerät:

Sonifier 250 (Branson SONIC Power Company, Dunbury, Connecticut, USA)

Ultrazentrifuge:

Analytische Ultrazentrifuge XL1 mit integriertem Scanning UV/VIS System und Raleigh Interferenz System (Beckman, Fullerton, USA)

Wasserbad:

D1 (Haake, Karlsruhe)

2.1.2 Chemikalien

Standard-Chemikalien wurde von den folgenden Firmen bezogen:

Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), oder Sigma (Deisenhofen)

- DNA-Marker 100bp Marker (Peqlab, Erlangen)
- DNA-Reinigungskits Cycle Pure und Gel Extraction (PEQLAB Biotech, Erlangen)
- dNTPs (Peqlab, Erlangen)
- Plasmidisolierungskit (Qiagen, Hilden)
- SDS-Marker Dalton Mark VII-L (Sigma, Deisenhofen)
- Texasred-Sulfonylchlorid (Pierce, Rockford)

Lumazin (**8**) wurde freundlicherweise von Frau A. König zur Verfügung gestellt.

Die Liganden 5-Nitro-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (**17**) bzw. 6-Carboxyethyl-7-oxo-8-Ribityllumazin (**19**) wurden freundlicherweise von Prof. M. Cushman (Purdue University, West Lafayette, USA) zur Verfügung gestellt.

2.1.3 Bakterienstämme

Folgende Bakterienstämme wurden für die Expression der Lumazinsynthase verwendet:

Stamm	Genotyp	Literatur
<i>E. coli</i> XL1-Blue	recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1 lac[F', proAB, lacI ^q ZΔM15, Tn10(tet ^r)]	(Bullock et al., 1987)
<i>E. coli</i> M15[pREP4]	lac, ara, gal, mtl, recA ⁺ , uvr ⁺ , [pREP4: lacI, kan ^r]	(Zamenhof et al., 1972)
<i>B. subtilis</i> BR151[pBL1]	trp, met, lys	(Lovett, 1981)

2.1.4 Plasmide

Bei dem **pNCO113-Expressionsplasmid** handelt es sich um einen Vektor zur Überexpression von Genen in *E. coli* (Stüber et al., 1990) (Abbildung 6.1, Anhang). Der **p602/22-Vektor** ist sowohl zur Genexpression in *E. coli* als auch *B. subtilis* geeignet (Schaukelvektor) und ist in Abbildung 6.1 im Anhang gezeigt (Henner, 1990). Er wurde von Fischer (Fischer, 1997) durch Zerstörung des *cat* Gens modifiziert, was zum Vektor p602/-CAT führte.

2.1.5 Proteine und Enzyme

- BSA (New England Biolabs, Schwalbach)
- Lysozym (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
- Phosphoriboisomerase (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)

- Restriktionsenzyme (New England Biolabs, Schwalbach; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg; Boehringer, Mannheim)
- Taq-Polymerase (Eurogentec, Seraign, Belgien)
- T4-Ligase (New England Biolabs, Schwalbach, Boehringer, Mannheim)

Die verwendete 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase aus *E. coli* wurde, wie in der Literatur beschrieben, exprimiert und gereinigt (Richter et al., 1997b).

2.1.6 Expressionsstämme

Folgende Expressionsstämme wurden von Herrn Dr. M. Fischer kloniert:

- BR151[pBL1]-p602-BS-Lusy, sowie sämtliche Lumazinsynthase-Mutanten des *B. subtilis* Enzyms (XL1-pNCO-RibH-Mutante), mit Ausnahme der E126A-Mutante
- XL1-pNCO-AQ-Lusy
- XL1-pNCO-EC-Lusy
- XL1-pNCO-Spinat-Lusy
- XL1-pNCO-SSP-Lusy
- XL1-pNCO-MT-Lusy
- XL1-pNCO-SA-Lusy
- XL1-pNCO-STP-Lusy
- XL1-pNCO-HI-Lusy
- XL1-pNCO-NM-Lusy
- XL1-pNCO-PF-Lusy
- XL1-pNCO-His₆-Lusy
- XL1-pNCO-HisAc-Lusy
- XL1-pNCO-CBio-Lusy

Die Expressionsstämme XL1-pNCO-AT-Lusy, XL1-p602-SC-Lusy und XL1-pNCO-MJ-Lusy wurden von Frau Dr. S. Mörtl kloniert.

2.1.7 Trennmaterialien

DEAE Cellulose DE-52, Q-Sepharose, Hydroxyapatit, Sephacryl S-400, Superdex 200 wurden von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) bezogen, Nickel-NTA-Material von Qiagen (Hilden).

2.1.8 Puffer

Der pH-Wert der Puffer wurde bei Raumtemperatur mit einer Standardglaselektrode eingestellt. Alle Puffer enthielten 0,02 % Natriumazid.

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Polymerasekettenreaktion

Die PCR-Ansätze wurden wie folgt pipettiert:

- 10 µl Pufferkonzentrat*
- 8 µl dNTP`s (je 200 µM)
- 1 µl Primer 1 (100 pmol)
- 1 µl Primer 2 (100 pmol)
- 1 µl Template (10ng)
- 1 µl Taq-Polymerase (0,75 U)

78 µl H₂O

100 µl

*Pufferkonzentrat (10-fach):

750 mM Tris/HCl, pH 9,0

200 mM (NH₄)₂SO₄

0,1 % (w/v) Tween 20

15 mM MgCl₂

Die Polymerasekettenreaktion wurde wie folgt durchgeführt:

Schritt:	1	2	3	4	5	6
Temp. :	95 °C	95 °C	48 °C	72 °C	72 °C	4 °C
Dauer:	5 min	30 s	45 s	35 s	2 min	∞

Die Schritte 2 bis 4 wurden 25 bis 30 mal wiederholt.

2.2.1.2 DNA-Verdau mittels Restriktionsenzymen

Ein präparativer Restriktionsverdau wurde in einem Gesamtvolumen von 100 µl durchgeführt. Dazu wurde dem zu verdauenden DNA-Ansatz 5 µl der Restriktionsendonuklease und 10 µl des Reaktionspuffers (10-fach Konzentrat) des entsprechenden Enzyms zupipettiert und das fehlende Volumen mit sterilem Wasser auf 100 µl ergänzt.

Der Verdau erfolgte 150 min bei der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur.

2.2.1.3 Reinigung von DNA-Fragmenten

Die Reinigung von DNA erfolgte entweder direkt oder nach Trennung der unterschiedlich grossen Fragmente mittels Agarosegelelektrophorese (2.2.2.1) mit den Kits (Cycle Pure Kit und Gel Extraction Kit) von Peqlab (Biotech. GmbH, Erlangen). Dazu wurde der Reaktionsansatz mit dem 5-fachen Volumen eines speziellen Bindepuffers (CP-Puffer, Cycle Pure Kit) gemischt bzw. das Agarosegelstück mit der interessanten Bande ausgeschnitten und durch Erwärmen auf 55 °C in 1,5 ml Bindepuffer (Gel Extraction Kit) gelöst. Die Lösung wurde durch eine HiBind-DNA-Säule zentrifugiert, in der die DNA reversibel an die Silikamembran bindet. Nach zwei Waschschritten mit je 750 µl DNA-Waschpuffer, die eine effiziente Entfernung von Salzen, freien Nukleotiden, Oligonukleotiden und Polymerasen ermöglichen, wurde die DNA mit sterilem Wasser eluiert.

E.N.Z.A. Kits von Peqlab (Biotech. GmbH, Erlangen):

Der CP-Puffer stammte aus dem Cycle Pure Kit, der Bindepuffer aus dem Gelextraktionskit. Der DNA-Waschpuffer (identisch in beiden Kits) wurde mit 1,5 ml Ethanol pro ml Puffer komplettiert. Es wurden die jeweils mitgelieferten HiBind-DNA-Kartuschen verwendet.

2.2.1.4 Ligation von Vektor und Insert

Die enzymatische Verknüpfung des Inserts mit dem Expressionsvektor durch Bildung von Phosphorsäurediesterbrücken zwischen 3`-Hydroxylgruppen und 5`-Phosphatgruppen erfolgte mit Hilfe der T₄-Ligase (Sgamarella et al., 1979). Dazu wurde der verdaute Vektor mit der zwei- bis fünffachen Menge an verdaulichem Insert in einem Gesamtvolumen von 17 µl vermischt. Nach einer zehnmütigen Inkubation bei 50 °C und Abkühlen auf 4 °C (5 min), wurde der Ansatz mit 2 µl T₄-Puffer (10-fach Konzentrat) und 1 µl T₄-Ligase komplettiert und für mindestens 12 h bei 4 °C inkubiert.

T₄-Puffer 10-fach Konzentrat:

500 mM Tris/HCl, pH 7,6

100 mM MgCl₂

10 mM ATP

10 mM DTT

50 % (w:v) Polyethylenglycol-8000

2.2.1.5 Transformation in chemisch kompetente Zellen

Für die Transformation wurde der gesamte Ligationsansatz (2.2.1.4), oder 1 µl Plasmid (2.2.1.9) mit 200 µl chemisch kompetenten XL1-Zellen oder M15[pREP4]-Zellen vermischt und 1h bei 4 °C inkubiert. In dieser Zeit können sich die Vektoren an die Zellwände anlagern. Um die Zellwände für den Vektor durchlässig zu machen, wurde der Ansatz für 90 s auf 42 °C erwärmt. Zur Regeneration der Zellwände wurde anschliessend wieder auf 4 °C abgekühlt (2 min). Nach Zugabe von 800 µl LB-Medium erfolgte die phänotypische Expression für 1h bei 37 °C. Je 20 µl bzw. 200 µl des Ansatzes wurden auf Selektivagarplatten (Vollmedium mit 7 g Agar pro Liter, 2.2.1.7) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C bebrütet.

2.2.1.6 PCR-Screen

Zur Analytik der aus der Transformation hervorgegangenen Klone wurde je 30 µl PCR-Ansatz (2.2.1.1) ohne Matrizen DNA vorgelegt. Mit Hilfe von sterilen Zahnstochern wurde Zellmaterial der jeweiligen Transformante in dem PCR-Ansatz suspendiert und eine Kopie durch Einstechen des Zahnstochers auf eine neue Agarplatte angelegt. Die Agarplatte wurde über Nacht bei 37 °C bebrütet. Die PCR wurde wie unter 2.2.1.1 beschrieben durchgeführt. Ein anschließender Verdau mit einer Restriktionsendonuklease, dessen Schnittstelle spezifisch bei der Klonierung eingeführt wurde, wurde wie unter 2.2.1.2 durchgeführt und das Ergebnis auf 2 oder 3 % Agarosegelen (2.2.2.1.) überprüft.

2.2.1.7 Fermentation und Zellernte

Für die Fermentation im Kolben wurden folgende Medien verwendet (die Angaben beziehen sich auf 1 l):

Vollmedium nach Luria-Bertani:

10 g Casein

5 g Hefe-Extrakt

5 g NaCl

je nach Antibiotikaresistenz wurden folgende Mengen Antibiotikum zu 1 l frisch autoklaviertem, abgekühltem LB-Medium gegeben:

170 mg Ampicillin (für XL1-pNCO-Systeme)

20 mg Kanamycin (für das XL1-p602-System)

170 mg Ampicillin / 20 mg Kanamycin (für M15[pREP4]-pNCO-Systeme)

15 mg Erythromycin / 20 mg Kanamycin (für das BR151[pBL1]-p602-System)

Die Fermentation erfolgte für XL1-Stämme bei 37 °C über Nacht.

Für M15-Stämme wurde eine Vorkultur über Nacht bei 37 °C angezogen und am nächsten Tag damit die Hauptkultur angeimpft. Bei einer OD₆₀₀ von 0,6 wurde mit 2 mM IPTG induziert und weitere 5 h bei 37 °C fermentiert.

Der *B. subtilis*-Stamm BR151 wurde bei 32 °C fermentiert. Hier war ebenfalls eine Vorkultur nötig, die zum Animpfen der Hauptkultur diente. Nach Induktion mit 2 mM IPTG bei einer OD₆₀₀ von 0,6 wurde noch weitere 18h fermentiert.

Zur Herstellung von deuteriertem Protein im Fermenter wurden folgende Stammlösungen hergestellt (Einwaagen beziehen sich auf 1l):

Spurenelementkonzentrat (1000x):

50 g EDTA, freie Säure

8,5 g FeSO₄·7H₂O

13,5g MnCl₂·2H₂O

0,9 g ZnSO₄·7H₂O

0,2 g CuCl₂·2H₂O

0,2 g NiCl₂·6H₂O

0,1 g CoCl₂·6H₂O

0,1 g H₃BO₃

mit 50 % NaOH auf pH 7,4 eingestellt und autoklaviert

Vitamin-Konzentrat (250x):

20 mg Pyridoxamin-Hydrochlorid

40 mg Thiamin-Hydrochlorid

20 mg Riboflavin

20 mg p-Aminobenzoessäure

20 mg Ca-Pantothentat

5 mg Biotin

10 mg Folsäure

15 mg Nicotinsäureamid

100 mg Cyanocobalamin (1:1000 Mannit-Verreibung)

unter Erwärmen gelöst und sterilfiltriert

1 l Minimalmedium setzt sich wie folgt zusammen:

12 g Na_2HPO_4

3 g KH_2PO_4

in 700 ml D_2O gelöst und sterilfiltriert

+ 4 ml Vitaminkonzentrat lyophilisiert und in 4 ml D_2O gelöst*

+ 1 ml Spurenelementkonzentrat lyophilisiert und in 1 ml D_2O gelöst*

+ 2 ml MgSO_4 (1 M) in D_2O *

+ 2 ml CaCl_2 (25 mM) in D_2O *

+ 1 g NH_4Cl

+ 7 g Bernsteinsäure deuteriert

+ x mg des entsprechenden Antibiotikums

* alle sterilfiltriert

Die *Futterlösung* setzte sich aus 10 g deuterierter Bernsteinsäure in 300 ml D_2O (sterilfiltriert) zusammen und wurde automatisch in Abhängigkeit vom pH-Wert zupipettiert.

Eine zusätzliche *Stickstoffquelle* wurde durch 9 g NH_4Cl in 100 ml D_2O (sterilfiltriert) bereitgestellt und bei Bedarf zupipettiert.

Das Medium wurde mit 50 ml Vorkultur (Medium analog Minimalmedium, jedoch mit 1 ml/50 ml Glycerin (75 %) anstatt von deuterierter Bernsteinsäure) angeimpft und bei 37 °C fermentiert. Bei einer OD_{600} von 5 wurde mit 3 mM IPTG induziert und weitere 24 h fermentiert.

Nach erfolgter Fermentation wurden die Zellen mittels Zentrifugation (5000 U min^{-1} , 4 °C, 15 min) geerntet, mit Saline gewaschen (20 % des Volumens der Hauptkultur; Saline: 0,9 % NaCl-Lösung) und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.1.8 Zellaufschluss

Die gramnegativen *E. coli*-Stämme XL1 und M15 wurden ausschliesslich mit Ultraschall aufgeschlossen. Dazu wurden ca. 10 g feuchte Zellmasse in 50 mM Kaliumphosphatpuffer, mit 0,5 mM EDTA, 0,5 mM Na₂SO₃ und 0,02 % NaN₃ (Aufschlusspuffer) resuspendiert und auf Eis gekühlt. Es erfolgte eine Ultraschallbehandlung von 6 x 18 Pulsen der Stufe 4. Dazwischen wurde ca. 3-5 min auf Eis gekühlt, um die entstandene Wärme abzuführen. Anschliessend wurde 15 min bei 15000 U und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand (Rohextrakt) wurde, wie in der Durchführung (3) beschrieben, individuell weiterverarbeitet.

Bei dem grampositivem *B. subtilis*-Stamm BR151 wurde vor dieser Prozedur eine enzymatische Zellyse mittels Lysozym durchgeführt. Die Zellen wurden, wie beschrieben, im Aufschlusspuffer resuspendiert und etwa 20 min bei 37 °C mit Lysozym (3 mg/30 ml) inkubiert. Danach erfolgte, nach Abkühlen, die oben beschriebene Ultraschallbehandlung und Zentrifugation zur Gewinnung des Rohextraktes.

2.2.1.9 Plasmidisolierung

Die Plasmidisolierung erfolgte in Anlehnung an die Methode nach Birnboim (Birnboim, 1979) mit dem Plasmidisolierungskit QIAprep Spin Miniprep von Qiagen (Hilden). Zellen einer Übernachtskultur in 10 ml LB-Medium (mit entsprechendem Antibiotikum) wurden mit Hilfe von SDS und Natronlauge aufgeschlossen (Puffer P1 und P2) und die Lyse mit Puffer N3 gestoppt. Nach Pelletierung der unlöslichen Rückstände (15000 U/4 °C/10 min) wurde der Überstand auf eine QIAprep Spin Kartusche (Silikamembran) geladen. Durch Waschen mit unterschiedlichen Puffern (PB, PE) wurde die Plasmid DNA von Kontaminationen und Enzyminhibitoren befreit und anschliessend mit 60 µl sterilem Wasser eluiert. Die Ausbeute wurde auf 1 % Agarosegelen (2.2.2.1) kontrolliert.

Puffer P1, P2, N3, PB und PE stammten aus dem Plasmidisolierungskit von Qiagen, Puffer P1 wurde durch Zugabe von 100 µg RNase pro ml Puffer, Puffer PE durch Zugabe von 1,5 ml Ethanol pro ml Puffer komplettiert. Es wurden die mitgelieferten QIAprep Spin Kartuschen verwendet.

2.2.1.10 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte aus den isolierten Plasmiden (2.2.1.9). Dazu wurden je 20 µl Plasmid mit 2,5 µl des entsprechenden Primers (Konzentration: 5 pmol/µl) versetzt. Die Sequenzanalyse erfolgte gemäss der Methode nach Sanger (Sanger et al., 1977) durch den Custom-DNA-Sequencing Service von MWG (Ebersberg).

2.2.2 Gelelektrophorese

2.2.2.1 Agarosegelelektrophorese

Zur Trennung von DNA unterschiedlicher Grösse wurde eine Gelelektrophorese auf 1 bis 3 % Agarosegelen durchgeführt. Die Agarose wurde in TAE-Puffer aufgekocht und nach Abkühlen auf 60 °C in den Gelträger gegossen. Durch die Agarose geliert die Lösung beim Abkühlen und der Träger mit dem Gel kann in die Elektrophoresekammern eingesetzt werden. Nach Überschichten des Gels mit TAE-Puffer wurden die Proben (1:10 mit Probenpuffer versetzt) in die Taschen pipettiert und das Gel bei 120 V entwickelt. Die Detektion der DNA-Banden erfolgte, nach 15 minütiger Inkubation in Ethidiumbromidlösung (0,1 %) unter Lichtausschluss, durch Betrachtung im UV-Licht bei 323 nm.

TAE-Puffer: 40 mM Tris/Acetat, pH 8,2
 2 mM EDTA

Probenpuffer: 50 % (v/v) Glycerin
 0,25 % (w/v) Bromphenolblau
 0,25 % (w/v) Xylencyanol
 in TAE-Puffer gelöst

2.2.2.2 SDS-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese erfolgte nach der Methode von Laemmli (Laemmli, 1970). Es wurden 16 % Trenngele und 3 % Sammelgele verwendet.

Acrylamidlösung:	40 % (w/v) Acrylamid / N,N'-Methylen-bis-acrylamid-Lösung (Acrylamid : N,N'-Methylen-bis-acrylamid = 29 : 1)
TEMED-Lösung:	99 % für die Elektrophorese
APS-Lösung:	10 % (w/v)
Trenngelpuffer (4-fach):	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8 0,4 % (w/v) SDS
Sammelgelpuffer (2-fach):	0,25 M Tris/HCl, pH 6,3 0,2 % (w/v) SDS
Laufpuffer:	25 mM Tris/HCl, pH 8,3 192 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS
Probenpuffer:	100 mM Tris/HCl, pH 6,8 20 % (w/v) Glycerin 4 % SDS 4 % Mercaptoethanol 0,05 % Bromphenolblau
Färbelösung:	40 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Eisessig 0,2 % (w/v) Coomassie Blue R250
Entfärbelösung:	40 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Eisessig

Als Marker diente der SDS-Marker Dalton Mark VII-L von Sigma (Deisenhofen), der folgende Banden auf dem SDS-Gel zeigt:



Abbildung 2.1: SDS-Marker auf 16 % SDS-Gel.

2.2.2.3 Native Gelelektrophorese

Die native Polyacrylamidgelelektrophorese erfolgte auf 3 % Flachgelen. Es wurde mit einer 40 % Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung (Acrylamid:Bisacrylamid = 29:1) eine 3 % Acrylamidlösung in 200 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,2, hergestellt, die mit Hilfe von TEMED und APS (vgl. 2.2.2.2) zum Polymerisieren gebracht wurde. Die Elektrophorese wurde mit 200 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,2, (Laufpuffer) über 3 h durchgeführt. Die Stromstärke betrug 45 mA pro Gel. Die Färbung und Entfärbung der Gele erfolgte mit den in 2.2.2.2 angegebenen Lösungen.

2.2.3 Proteinchemische Methoden

2.2.3.1 Säulenchromatographie

Nach jeder Chromatographie wurden die Fraktionen mittels SDS-Gelelektrophorese (2.2.2.2) analysiert. Lumazinsynthasehaltige Fraktionen wurden gepoolt und mittels Ultrazentrifugation oder Ultrafiltration (2.2.3.3) aufkonzentriert.

Puffer:

- P1: 20 mM Kaliumphosphat, pH 7,0
 P2: 1 M Kaliumphosphat, pH 7,0
 P3: 100 mM Kaliumphosphat, pH 8,0
 P4: 50 mM Kaliumphosphat
 300 mM NaCl
 10 mM Imidazol
 pH 8,0
 P5: 50 mM Kaliumphosphat
 300 mM NaCl
 500 mM Imidazol
 pH 8,0
 P6: 100 mM Kaliumphosphat, pH 7,0
 P7: 50 mM Kaliumphosphat, pH 7,0
 P8: 50 mM Kaliumphosphat, pH 7,0
 1 M KCl
 P9: 20 mM Kaliumphosphat, pH 7,0
 1 M (NH₄)SO₄

Tabelle 2.1: Anionenaustauschchromatographie

Stationäre Phase	DEAE	Q-Sepharose	Mono Q
Dimension	5 x 15 cm	1,8 x 25 cm	1 x 10cm
Fluss	1 ml/min	2 ml/min	4 ml/min
Äquilibration	P1	P1	P7
Programm	- 500 ml: 100 % P1 - 1500 ml: 0 – 100 % P2	- 100 ml: 100 % P1 - 900 ml: 0 - 100% P2	- 20 ml: 100 % P7 - 420 ml: 0 – 100 % P8
Fraktionen	10 ml	10 ml	5 ml

Tabelle 2.2: Affinitätschromatographie

Stationäre Phase	Hydroxyapatit	Ni-NTA
Dimension	2,5 x 10 cm	0,5 x 5 cm
Fluss	2 ml/min	1 ml/min
Äquilibration	P1	P3
Programm	- 30 ml: 100 % P1 - 430 ml: 0 – 100 % P2	- 50 ml: 100 % P3 - 60 ml: 50 mM Imidazol ¹ - 70 ml: 100 mM Imidazol ² - 80 ml: 200 mM Imidazol ³ - 90 ml: 300 mM Imidazol ⁴ - 120 ml: 500 mM Imidazol ⁵
Fraktionen	10 ml	2 ml

1: 91,8 % P4, 8,2 % P5; 2: 81,6 % P4, 18,3 % P5; 3: 61,2 % P4, 38,8 % P5; 4: 40,8 % P4, 59,2 % P5; 5: 100 % P5;

Tabelle 2.3: Affinitätschromatographie, Fortsetzung

Stationäre Phase	Streptavidin	Red Sepharose
Dimension	0,5 x 1 cm	1,5 x 8 cm
Fluss	0,5 ml/min	3 ml/min
Äquilibriumierung	P6	P7
Programm	- 5 ml: P6 - 15 ml: 5 mM Biotin ⁶	- 40 ml: 100 % P7 - 110 ml: 0 – 100 % P8
Fraktionen	2 ml	5 ml

6: P6 mit 5mM Biotin

Tabelle 2.4: Hydrophobe Chromatographie

Stationäre Phase	Phenylsepharose
Dimension	1,6 x 10 cm
Fluss	4 ml/min
Äquilibriumierung	P9
Programm	- 40 ml: 100 % P9 - 140 ml: 0 – 100 % P1
Fraktionen	10 ml

Tabelle 2.5: Gelfiltrationschromatographie

Stationäre Phase	Sephacryl S400	Superdex 200
Dimension	2.6 x 60 cm	2.6 x 60 cm
Fluss	3 ml/min	3 ml/min
Äquilibriumierung	P6	P6
Programm	isokratisch mit P6	isokratisch mit P6
Fraktionen	10 ml	3 ml

Eichgerade für die Superdex 200 Säule:

$$\log(\text{Molekulargewicht}) = -0,02418 \cdot \text{Elutionsvolumen} + 9,68407$$

2.2.3.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Für die Konzentrationsbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976) wurde zunächst eine Eichgerade mit BSA aufgestellt. Dazu wurden je 2 µl einer BSA-Lösung der Konzentration 1, 2, 3 bzw. 4 mg/ml mit 1000 µl verdünntem (1:5 mit Wasser) Bradfordreagenz (BioRad, München) versetzt und, nach fünfminütiger Inkubation unter Lichtausschluss, bei 595 nm vermessen. Anschliessend wurde die zu bestimmende Proteinlösung auf etwa 1-4 mg/ml mit 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0 verdünnt und analog zu den Eichlösungen vermessen.

2.2.3.3 Proteinaufkonzentrierung

Die Konzentrierung der Proben erfolgte entweder durch Ultrazentrifugation oder Ultrafiltration.

Für die Ultrazentrifugation wurde bei ikosaedrischen Lumazinsynthasen 16 h mit 32000 rpm, bei pentameren Lumazinsynthasen 16h mit 48000 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Nach dieser Zeit befand sich das Enzym teils als Pellet, teils als flüssiges Konzentrat am Zentrifugenröhrchenboden. Der Überstand wurde bis auf etwa 2 ml entfernt und das Protein im der verbliebenen Lösung resuspendiert.

Bei der Ultrafiltration wurden die Centrifugal Concentrators von Pall Filtron (Pall Gelman Laboratory, USA) in der entsprechenden Volumengröße mit 30 kDa (für Pentamere) oder 100 kDa (für Ikosaeder) Membranen bestückt und bei 3000 g zentrifugiert.

2.2.3.4 N-Terminale Aminosäuresequenzierung

Nach der Methode des Edman-Abbaus (Edman, 1975) werden die N-terminalen Aminosäuren Schritt für Schritt unter Reaktion mit Phenylisothiocyanat als Phenylthiohydantoin-Derivat abgespalten und können über HPLC identifiziert werden.

Zur Sequenzanalyse gereinigter Proteine wurden 50-100 pmol Protein auf eine, mit 10 µl Methanol aktivierte, ProSorb PVDF Membran (Perkin Elmer, Applied Biosystems, Forster City, USA) pipettiert und unter Spülen mit 700 µl Wasser fixiert. Die Sequenzierung wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Köhler am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie der TU München durchgeführt.

2.2.3.5 Massenspektrometrie

Die Ermittlung des Molekulargewichts (pro Untereinheit) von gereinigten Lumazinsynthasen wurde an einem Quadrupol Ionenspray-Massenspektrometer API365 freundlicherweise von Frau Sylvia Koernen am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried durchgeführt. Es wurden 100 µg Protein eingesetzt. Die Eichung der m/z-Skala erfolgte mit Ammonium-Addukten von Polypropylenglykol-Oligomeren. Aus den m/z-Peaks aller erzeugten Molekülionen mit multipler Ladung wurden die durchschnittlichen Molekularmassen ermittelt (Covey et al., 1988; Mann, 1995).

2.2.3.6 Analytische Ultrazentrifugation

Zur Bestimmung des Sedimentationskoeffizienten bzw. der molaren Masse verschiedener Lumazinsynthasen wurde das Enzym auf eine OD₂₈₀ von etwa 1 gebracht und gegen 20 mM Kaliumphosphat, pH 7,0, dialysiert. Die Messzellen bestanden aus Doppelkammern mit einem Aluminiummittelstück und Saphirfenstern. Die Zentrifugationsläufe wurden in der Optima XL-I Analytical Ultrazentrifuge von Beckman mit integrierten optischen Systemen (Scanning UV/VIS Absorbance und Raleigh Interference) durchgeführt. Die Steuerung erfolgte über einen Computer, der mit der XL-1 Analytical Data Analysis Software, Version 2.01, ausgestattet war.

Zur Bestimmung des *Sedimentationskoeffizienten* wurde die dialysierte Probe mit einer OD₂₈₀ von etwa 1 in die eine Kammer und der Dialysepuffer als Referenz in die zweite Kammer gefüllt. Der Sedimentationslauf wurde bei 20 °C mit einer Geschwindigkeit von 48000 rpm für ikosaedrische Lumazinsynthasen bzw von 60000 rpm für pentamere Enzyme durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit der Software Ultrascan Version 5.0 for UNIX mit der Fitmethode von van Holde und Weischet (van Holde et al., 1978). Die Methode entfernt den störenden Beitrag der Diffusion von den Daten und führt zu einem Mittelwert von Sedimentationskoeffizientenscharen.

Zur Bestimmung des nativen Molekulargewichts (*Sedimentationsgleichgewichtsanalyse*) wurden die dialysierte Proben mit Dialysepuffer auf eine OD₂₈₀ von 0,3 verdünnt und 120 µl in der Messzelle mit 15 µl Öl (Fluorochemical FC43, Beckman) unterschichtet. Als Referenz diente 150 µl Dialysepuffer. Die Zentrifugationsläufe wurden bei 4 °C über etwa 72 h (bis zur Einstellung des Gleichgewichts) bei einer Geschwindigkeit von 10000 rpm bzw. 5000 rpm je nach vermuteter Quartärstruktur (Pentamer bzw. 60mer) durchgeführt. Für die Auswertung wurde das Programm Origin single (Origin v 3.78) der Software XLA-Data Analysis (Beckman) verwendet. Das benötigte partielle spezifische Volumen v_4 bei 4 °C wurde näherungsweise aus den partiellen spezifischen Volumina v_{25} der Aminosäuren (Cohn et al., 1943) und einer Temperaturkorrektur T_{corr} (Laue et al., 1992) berechnet:

$$v_4 = v_{25} + T_{corr} = \frac{\sum_i N_i \cdot M_i \cdot V_i}{\sum_i N_i \cdot M_i} + \frac{277,16 - 298,16}{2352,9} \quad (\text{Gleichung 1})$$

mit: N_i = Anzahl der Aminosäure i
 M_i = Molekulargewicht der Aminosäure i
 V_i = partielles spezifisches Teilvolumen der Aminosäure i

Die benötigte Dichte der Pufferlösung $p_{b,4}$ bei 4 °C wurde nach Laue et al., 1992, aus den einzelnen Pufferkomponenten und einem Temperaturkorrekturfaktor p_4 berechnet:

$$p_{b,4} = \frac{(0,998234 + \sum \Delta p_{ci}) \cdot p_4}{0,998234} \quad (\text{Gleichung 2})$$

mit: Δp_{ci} = Dichteinkrement der Pufferkomponente i mit der molaren Konzentration c_i , errechnet sich aus:
 $\Delta p_{ci} = (A_i + B_i c_i^{0,5} + C_i c_i + D_i c_i^2 + E_i c_i^3 + F_i c_i^4) - 0,998234$
 $A_i - F_i$ = Parameter, vgl. Laue et al., 1992

und:

$$p_4 = 1,000028 \cdot 10^{-3} \cdot \left[\frac{999,83952 + 16,945176 \cdot T}{1 + (16,879850 \cdot 10^{-3} \cdot T)} - \frac{(7,9870401 \cdot 10^{-3} \cdot T^2) + (46,170461 \cdot 10^{-6} \cdot T^3)}{1 + (16,879850 \cdot 10^{-3} \cdot T)} - \frac{(105,56302 \cdot 10^{-3} \cdot T^2) - (280,54253 \cdot 10^{-12} \cdot T^5)}{1 + (16,879850 \cdot 10^{-3} \cdot T)} \right] \quad (\text{Gleichung 3})$$

Durch Bestimmung der Absorption (A , A_0) in Abhängigkeit vom Radius (r , r_0) im Sedimentationsgleichgewicht kann so mit Hilfe der Gleichung 4 das Molekulargewicht M ermittelt werden:

$$A = A_0 \cdot e^{[(H \cdot M \cdot (r^2 - r_0^2))] + E}$$

$$\Rightarrow M = \frac{\ln(A - E) - \ln(A_0)}{H \cdot (r^2 - r_0^2)} \quad (\text{Gleichung 4})$$

mit:

$$H = \frac{(1 - \nu \cdot \rho) \cdot \omega^2}{2 \cdot R \cdot T} \quad (\text{Gleichung 5})$$

E = konstante Abweichung durch nichtsedimentierende Substanzen
 R = Gaskonstante = $8,3144 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$
 ω = Winkelgeschwindigkeit

2.2.3.7 Western-Blot Analyse

Die Western-Blot Analyse wurde mit Hilfe von 16 % SDS-Gelen (2.2.2.2) oder mit 3 % nativen Flachgelen (2.2.2.3) durchgeführt. Nach der Entwicklung des Gels wurden die Proteine auf eine Membran durch zweistündiges Blotting bei 40 mA übertragen. Dazu wurde die Blot-Apparatur, wie in Abbildung 2.2 schematisch dargestellt, bestückt. Anschliessend wurde die Membran kurz mit Waschpuffer gewaschen und 1 h in 3 % Milchpulver, gelöst in Waschpuffer, geschwenkt. Dadurch konnte sichergestellt werden, dass die gesamte Oberfläche der Membran von Protein bedeckt ist und somit unspezifische Bindungen des Antikörpers verhindert werden.

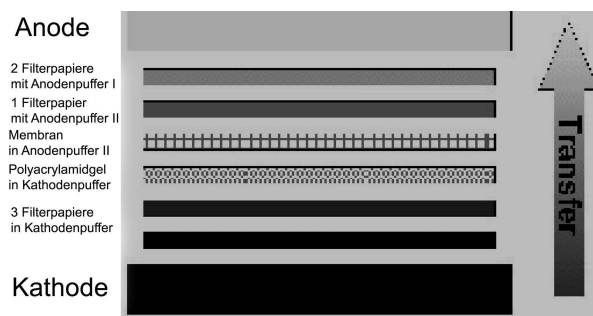


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung des Western-Blots.

Die Detektion der **Lumazinsynthase** erfolgte mit polyklonalen Antikörpern gegen schwere Riboflavinsynthase (anti-sRfs-Antikörper, Kaninchen Rohserum 1:10 verdünnt in 1 mg/ml BSA) (Bacher et al., 1978). Die Membran wurde über Nacht in einer 1:1000 Verdünnung dieses Antikörpers in Waschpuffer (1 % an Milchpulver) geschwenkt und dieser nach gründlichem Waschen mit Waschpuffer mit einem Anti-Kaninchen-IgG-HRP-Konjugat (1:500 Verdünnung in Waschpuffer, 1 % an Milchpulver) durch einstündiges Schwenken gekoppelt. Die Detektion der lumazinsynthasehaltigen Banden erfolgte nach gründlichem Waschen der Membran mit Waschpuffer durch die enzymatische Oxidation von 3,3'-Diaminobenzidin (6 mg in 10 ml Waschpuffer) mit Hilfe von 10 µl 30 % H₂O₂ zu einem unlöslichen braunen Produkt.

Bei Lumazinsynthasen mit Polyhistidin-Schwanz oder mit dem biotinylierten Peptid auf der Oberfläche können diese Reste zur Identifizierung herangezogen werden (Fischer, 2000).

Die **Polyhistidin-Reste** wurden mit einem Anti-Penta-His-Antikörper (Qiagen, Hilden) detektiert (1:1000 Verdünnung in Waschpuffer, 1 % an Milchpulver, über Nacht). Die Detektion erfolgte analog zu oben mit einem Anti-Maus-IgG-HRP-Konjugat.

Das **biotinylierte Peptid** wurde nach dem Bedecken mit 3 % Milchpulver direkt mit einem Streptavidin-alkalische Phosphatase-Konjugat (1:1000 Verdünnung in Waschpuffer, 1 % an Milchpulver, über Nacht) gekoppelt. Hier erfolgte die Detektion mit BCIP und NBT (50 µl bzw. 100 µl Stammlösung in alkalische Phosphatase Puffer) durch Bildung eines unlöslichen, blauen Indigofarbstoffes.

Puffer:

Anodenpuffer I:	300 mM Tris/HCl, pH 10,4 10 % Methanol
Anodenpuffer II:	25 mM Tris/HCl, pH 10,4 10 % Methanol
Kathodenpuffer:	25 mM Tris/HCl, pH 9,4 10 % Methanol 192 mM Glycin

Waschpuffer:	20 mM Tris/HCl, pH 7,4 150 mM NaCl 3mM KCl 0,05 % Tween 20
Puffer für alkalische Phosphatase:	100 mM Tris/HCl, pH 9,5 100 mM NaCl 5 mM MgCl ₂
BCIP-Lösung:	5 % 5-Brom-4-Chlorindol-3-yl-phosphat in Dimethylformamid
NBT-Lösung:	5 % Nitroblautetrazoliumchlorid in 70 % Dimethylformamid

2.2.3.8 Kinetische Untersuchungen

2.2.3.8.1 Herstellung des Substrates 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (**6**)

0,1-0,2 mmol (MW = 306 g/mol) 5-Nitro-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (**17**) wurden in einem 50 ml Rundkolben mit 10 ml Wasser und ca. 40 mg Palladium/Aktivkohle versetzt und 12 h hydriert. Nach Entfernung des Katalysators durch Filtration wurde die Konzentration des Produktes **6** und des eventuell nicht umgesetzten Eduktes **17** in der Lösung photometrisch bei pH 1,0 (0,1 n HCl) bestimmt. Die Lagerung erfolgte nach Zugabe von DTT (80 mM) unter Lichtausschluss bei -80 °C.

Extinktionskoeffizienten bei pH = 1,0:

$\epsilon(\mathbf{17})_{323 \text{ nm}}$: 14200 M⁻¹cm⁻¹ (Cresswell et al., 1960)

$\epsilon(\mathbf{6})_{268 \text{ nm}}$: 24500 M⁻¹cm⁻¹ (Plaut et al., 1971)

2.2.3.8.2 Herstellung des Substrates S-3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat (**7**)

Die Herstellung erfolgte enzymatisch aus D-Ribose-5-Phosphat. Der Ansatz enthielt 1,5 U Phosphoriboisomerase und 2 U 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphatsynthase (Richter et al., 1997b) in einem Puffer aus 200 mM Tris/HCl, pH 8,0, und 20 mM MgCl₂. Nach Zugabe von 240 µmol D-Ribose-5-Phosphat wurde die Reaktion 8 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Denaturierung der Enzyme durch Zugabe von 1 ml 15 % TCA und Einstellung des pH-Wertes auf 7,5 mit frisch hergestellter, gesättigter Ba(OH)₂-Lösung, wurde der unlösliche Niederschlag abzentrifugiert. Zur Ausfällung der Bariumsalze des Zuckerphosphates wurden je 2 ml des Reaktionsansatzes mit einem 25-fachen Überschuss an Aceton versetzt und zwei Tage bei -20 °C inkubiert. Die vollständige Entfernung des Acetons aus dem abzentrifugierten Rückstand erfolgte anschliessend durch einstündiges Lyophilisieren. Das Zuckerphosphat wurde unter Zuhilfenahme von 100 µl Eisessig in 2 ml H₂O gelöst und durch tropfenweise Zugabe von 1 M Na₂SO₄ die Ba-Ionen ausgefällt und abzentrifugiert.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte enzymatisch. Die Reaktionsansätze enthielten Lumazinsynthase (40 µM), das Zuckerphosphat **7** in unterschiedlicher Menge, sowie das zweite Substrat 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (**6**) im Überschuss (2 mM) in 100 mM Kaliumphosphat, pH 7,0, mit 5 mM EDTA. Nach 3 h bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss ist der Substratumsatz vollständig abgelaufen. Das entstandene Lumazin (**8**) ist äquivalent zur eingesetzten Zuckerphosphatmenge. Die Lumazinkonzentration wurde nach Abstoppen der Reaktion mit 15 % TCA (1:1) und Abzentrifugieren des aggregierten Enzyms photometrisch bestimmt (Extinktionskoeffizient von **8** bei pH = 1,0: $\epsilon_{408 \text{ nm}} = 10300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; Plaut, 1971) und die 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat-Konzentration berechnet. Ein Blindwert ohne 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat wurde unter gleichen Bedingungen durchgeführt, um Fehlerquellen durch gelblich gefärbte Abbauprodukte von 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (**6**) auszuschliessen.

2.2.3.8.3 Kinetik unter Steady-State Bedingungen

Die Bestimmung der Michaelis-Menten-Kinetik der Lumazinsynthese für beide Substrate erfolgte photometrisch in Quarzküvetten in einem Gesamtreaktionsvolumen von 200 μl . Der Lichtweg der Küvetten betrug 1 cm. Die Detektion erfolgte im UV-Maximum des Produktes 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin (**8**) bei 408 nm. Die Steuerung des Photometers erfolgte über einen Computer, der mit dem Programmpaket SWIFT (Biochrom Ltd, Cambridge, UK) ausgestattet war. Die Reaktion wurde bei 37 °C in 100 mM Kaliumphosphat pH 7,0 mit 5 mM EDTA durchgeführt. Nach dem Start wurde die Absorptionzunahme bei 408 nm über einen Zeitraum von 15 min aufgezeichnet. Aus der erhaltenen Kurve und deren Steigung liess sich mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten für Lumazin (**8**) ($\epsilon_{408 \text{ nm}} = 12100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) die Reaktionsgeschwindigkeit für eine bestimmte Substratkonzentration errechnen. Für jede Michaelis-Menten-Kinetik wurden mindestens acht verschiedene Substratkonzentrationen vermessen und zu jedem Messpunkt der Blindwert mit Puffer anstatt Enzym bestimmt.

Für die Bestimmung des K_M -Wertes für 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat (**7**) wurde dem Reaktionsansatz das zweite Substrat 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (**6**) im Überschuss (1 mM) zugegeben. Die Enzymkonzentration betrug 5 μM . Die Konzentration von **7** wurde von 10 μM in steigenden Mengen zugegeben, bis die maximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht war.

Für die Bestimmung des K_M -Wertes für **6** wurde dem Reaktionsansatz das Zuckerphosphat **7** im Überschuss zugegeben (1 mM). Bei einer Enzymkonzentration von 1 μM wurde die Konzentration an **6** von 5 μM an so lange gesteigert, bis keine Geschwindigkeitssteigerung zu beobachten war.

Von jeder erhaltenen Reaktionsgeschwindigkeit wurde der entsprechende Blindwert abgezogen.

Die Auswertung erfolgte durch Fitten der Reaktionsgeschwindigkeit/Substratkonzentrationskurve mit dem Programm Microgal Origin 6.0G nach der Michaelis-Menten-Gleichung (Michaelis et al., 1913):

$$v = \frac{[S] \cdot v_{\max}}{[S] + K_M}$$

[S] = Substratkonzentration

v = Reaktionsgeschwindigkeit

v_{\max} = maximale Reaktionsgeschwindigkeit

K_M = Michaelis-Menten-Konstante

2.2.3.8.4 Kinetik unter Single-Turn-Over-Bedingungen

Für die Untersuchungen unter Single-Turn-Over Bedingungen wurde das SF4/QS-Gerät von BioLogic (Claix, France) verwendet. Ein schematischer Aufbau ist in Abbildung 2.3 dargestellt. Das Gerät verfügt über vier unabhängig voneinander steuerbare Spritzen, drei Mischer und eine Küvette mit 0,15 cm Lichtweg. Zwischen Mixer 1 und 2 bzw. 2 und 3 befinden sich Schleifen mit jeweils 19 µl Volumen. Dieser Aufbau ist komplett thermostatisierbar.

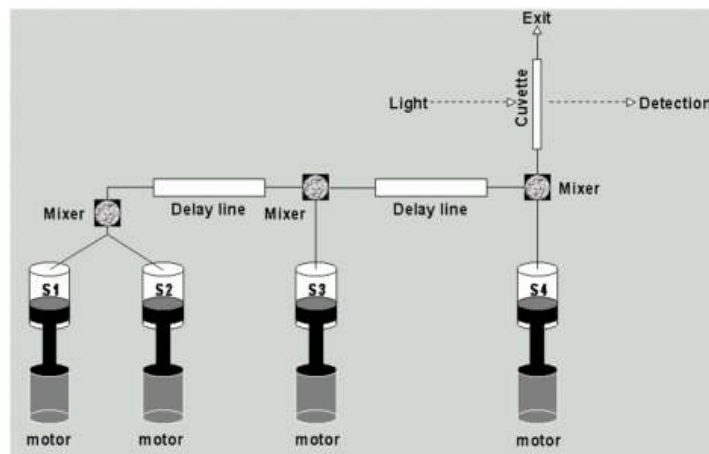


Abbildung 2.3: Schematischer Aufbau des Stopped-Flow-Gerätes von BioLogic. S1-S4: Computergesteuerte Spritzen; Delay line: Auswechselbare Schleifen (hier 19 µl).

Die Steuerung lief über einen Computer der mit dem Programm MPS (BioLogic) ausgestattet ist. Das verwendete Programm ist in Tabelle 2.6 zusammengefasst. Der Beginn der Messungen und der Stop des Flusses wurden synchronisiert.

Tabelle 2.6: Parameter des MPS Programmes zur Steuerung der Stopped-Flow Apparatur

Phase	1	2	3
Zeit [ms]	440	10	50
Spritze 1 [μ l]	1000	0	0
Spritze 2 [μ l]	0	0	0
Spritze 3 [μ l]	0	20	100
Spritze 4 [μ l]	0	0	100
Synchro 1	off	off	on

Licht wurde mittels einer CLD 35 W Deuteriumlampe (J&M Analytische Mess- und Regeltechnik, Aalen) eingestrahlt, die Detektion zeitabhängiger UV-Spektrenserien erfolgte mit einem TIDAS Diodenarray Detektor. Das kleinste Messintervall betrug 100 ms. Die Steuerung des Detektors erfolgte per Computer über das Programm Spectralys 1.55 mit folgenden Parametern:

Tabelle 2.7: Parameter des Programmes Spectralys:

Spektrum	240-500
Integrationszeit	24
Akkumulation	4
Aufnahmezeit	25 min
Gruppierung	1
Autozero	Off
Trigger	External (2)
Shutter	Open for scan

Die Auswertung der Datensätze erfolgte mit dem Programm SPECFIT/32 (Spectrum Software Associates, Marlborough, MA, USA). Das Programm errechnet einen modellabhängigen globalen Fit für einen zeitabhängig aufgezeichneten kinetischen Datensatz.

Das zu vermessende Enzym wurde über Nacht gegen 100 mM entgasten Kaliumphosphatpuffer pH 6,9 (5 mM DTT) bei 4 °C dialysiert. Vor der Messung wurde der Puffer erneut entgast und filtriert. Die Reaktanden wurden ebenfalls filtriert in die Spritzen gefüllt. Sämtliche Verdünnungen wurden mit dem Dialysepuffer hergestellt.

Die Befüllung der Spritzen im jeweiligen Experiment ist in folgender Tabelle beschrieben:

Tabelle 2.8: Spritzenbefüllung während der verschiedenen Experimente.

Spritze	1	2	3	4
Experiment 1	Puffer	Puffer	Enzym mit einem Überschuss an 7	6
Experiment 2	Puffer	Enzym	Enzym 1:1 mit 6	7 im Überschuss

2.2.3.9 Fluoreszenzquench-Titration

Die Fluoreszenzquench-Titrationen wurden im Spektralfluorimeter Modell F-2000 (Hitachi) mit einer Küvette mit 1 x 1 cm Lichtweg durchgeführt. Die Anregung erfolgte im UV-Absorptionsmaximum des jeweiligen Liganden, die Detektion im Emissionsmaximum im 90 ° Winkel zur Anregung. Zunächst erfolgte die Titration in 1 ml Probenpuffer. In Stammlösung 1 betrug die Ligandkonzentration 50 µM, in Stammlösung 2 500 µM. Zunächst wurden 50 µl Stammlösung 1 in 5 µl Schritten zupipettiert und jeweils die Fluoreszenzintensität im Emissionsmaximum notiert. Anschliessend wurde das Pipettierschema mit 50 µl Stammlösung 2 fortgesetzt. Unter Berücksichtigung der Volumenzunahme ergab sich so eine Eichkurve mit 0 bis 25 µM Ligand. Nun wurde 1 ml Proteinlösung (10 µM) vorgelegt und die Titration wiederholt. Unter der Annahme der vollständigen Fluoreszenzlöschung bei Bindung des Liganden ans Enzym konnte aus beiden Kurven die Dissoziationskonstante errechnet werden.

2.2.3.10 Gleichgewichtsdialyse

Eine weitere Methode zur Bestimmung von Bindungskonstanten der Lumazinsynthase zu verschiedenen Liganden ist die Gleichgewichtsdialyse. Dazu wurde die Proteinkonzentration mit der Bradfordmethode (2.2.3.2) bestimmt und die Lösungen auf 125 µM mit 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0, verdünnt. Das Befüllen der Mikrozellen erfolgte mit je 150 µl Enzymlösung in der oberen und 150 µl Ligandlösung (auf verschiedene Konzentrationen verdünnt) in der unteren Mizelle. Als Membran diente ein Visking-Dialyseschlauch.

Zum Einstellen des Gleichgewichts zwischen freiem und gebundenem Ligand wurden die Apparatur bei 4 °C über 2-4 h gedreht. Zur Entfernung des Proteins aus den oberen Kammerinhalten wurden diese mit einer TCA-Lösung (15 %) versetzt (Volumenverhältnis 1:1) und das denaturierte Enzym abzentrifugiert (10 min/15000 U/4 °C). Anschliessend wurden beide Kammerinhalte über HPLC auf die Ligandkonzentration untersucht. Als externer Standard diente der entsprechende Ligand in Puffer gelöst. Die Elutions- und Detektionsbedingungen der einzelnen Liganden sind in Tabelle 2.9 aufgeführt.

Die Bestimmung der Dissoziationskonstanten erfolgte nach Scatchard (Scatchard, 1949).

Tabelle 2.9: Bedingungen für die HPLC

Ligand	Eluent	Fluoreszenz-Detektion (Anregung/Emission)
Lumazin	Methanol (7 Vol%) Ameisensäure (30mM)	408 nm / 498 nm
Riboflavin	Methanol (40 Vol%) Ammoniumformiat (100mM)	445 nm / 516 nm

2.2.3.11 Circular dichroismus-Spektroskopie

Die Circular dichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie) misst Unterschiede in der Absorption der rechts- bzw. links-zirkular polarisierten Komponente von linear polarisiertem Licht.

Die Messungen erfolgten mit einem Spektropolarimeter JASCO J-715 in Quarzküvetten mit einem 5 mm Lichtweg bei 20 °C. Das Protein wurde auf eine Konzentration von 150 µM gebracht und über Nacht gegen 50 mM Kaliumphosphat, pH 7,0 dialysiert. Es wurde ein Vergleichsspektrum mit 150 µM Riboflavin in 50 mM Kaliumphosphat, pH 7,0 aufgenommen.

2.2.3.12 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden nach Negativkontrastierung mit Uranylacetat (2 %) an einem JEOL-JEM-100CX Mikroskop durchgeführt und die Aufnahmen auf Imago-EM 23 Elektronenmikroskopie Filmen festgehalten. Dazu wurden 10 µl Proteinlösung (ca. 1 mg/ml) auf ein, mit Kohle bedecktes, hydrophilisiertes Kupfernetzchen adsorbiert (90 s). Anschliessend wurde überschüssige Lösung vorsichtig entfernt und das Trägermaterial mit 2 % Uranylacetatlösung bedeckt. Nach weiteren 90 Sekunden wurde der Flüssigkeitsüberschuss erneut entfernt, das Netzchen getrocknet und mikroskopiert.

2.2.3.13 Messungen an der Filmwaage

Mit der Filmwaagentechnik kann die Bildung von Filmen an einer Luft/Wasser-Grenzschicht untersucht werden. Die Versuche wurden am Lehrstuhl für Biophysik der Technischen Universität München von Herrn Matthias Tristl durchgeführt. Die Tröge der Filmwaage wurden mit Puffer gefüllt und ein Lipidmonolayer aus DMPC, der mit 10 % DOGS-Ni-NTA versetzt war, an der Luft/Wassergrenzschicht gebildet. Die Oberflächenspannung betrug dabei 30 mN m^{-1} . Nach Zugabe von Protein wurde dessen Anlagerung durch Änderung der Oberflächenspannung beobachtet. Die Kopplung von fluoreszenzmarkierten Aktinfilamenten an eine, mit His₆-Lumazinsynthase funktionalisierte, Doppelmembran wurde ebenfalls von Herrn Matthias Tristl am Lehrstuhl für Biophysik der Technischen Universität München durchgeführt. Die Beobachtungen erfolgten mit dem Fluoreszenzmikroskop unter Zuhilfenahme von fluoreszenzmarkiertem F-Aktin.

2.2.3.14 Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie

Oberflächenplasmonresonanz (SPR) tritt auf, wenn Licht durch dünne Metallfilme zwischen zwei Grenzschichten reflektiert wird. Bei einem bestimmten Einfallswinkel interagiert ein Teil des Lichts mit den delokalisierten Elektronen des Metalls (Oberflächenplasmon). Dadurch wird die Intensität des ausfallenden Lichtstrahls eines bestimmten Ausfallwinkels I verändert (Abbildung 2.4). Bei Änderung des Brechungsindex der Grenzschicht an der Metalloberfläche durch Bindung von biologischem Material wird der Winkel, bei dem SPR auftritt, verändert (Winkel II , Abbildung 2.4). Die Winkeländerung wird detektiert und ist proportional zur gebundenen Masse.

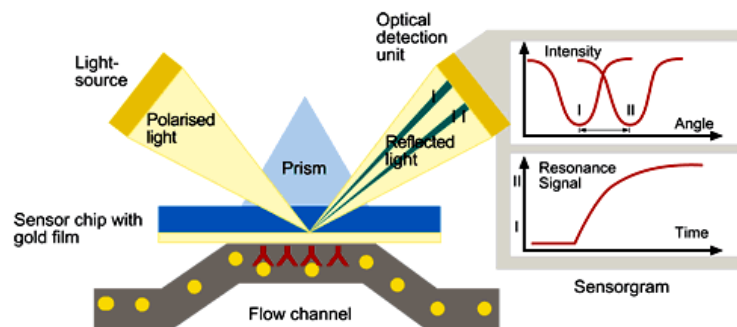


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung des SPR-Gerätes von BiaCore.

Die Messungen wurden an einem BiaCore-Gerät 2000 am Max-Planck-Institut für Biochemie (Martinsried) von Herrn Matthias Tristl (Lehrstuhl für Biophysik der Technischen Universität München) durchgeführt.

2.2.3.15 Neutronenreflexion

Die Experimente wurden am Reflektometer des Reaktors Orfé im Laboratoire Léon Brouillon (LLB) in Saclay, Frankreich von Herrn Matthias Tristl (Lehrstuhl für Biophysik der Technischen Universität München) durchgeführt, und die Daten freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Das Reflektometer misst die Geschwindigkeit (Wellenlänge) der Neutronen anhand der Flugdauer eines Neutrons von einem Startpunkt bis zum Detektor (time of flight instrument, TOF).

Die Messungen beruhen auf Wechselwirkungen der Neutronen mit biologischem Material. Werden Neutronen als Welle angesehen, streuen diese an einem Atomkern in Abhängigkeit von der Streulänge b des Kerns unterschiedlich stark. b variiert von Kern zu Kern bzw. Isotop zu Isotop (z.B. $b(\text{Deuterium}) = 6,7 \text{ fm}$, $b(\text{Wasserstoff}) = -3,7 \text{ fm}$). Da sich Neutronen bei der Reflexion an Grenzflächen mit unterschiedlichen Brechungsindizes ähnlich wie Lichtwellen verhalten, kann das Reflexionsverhalten zur Untersuchung von dünnen Schichtsystemen (1-500 Å) genutzt werden. Dabei ist die Reflexion abhängig von der Streulänge b der Molekülkerne und auch von der Wellenlänge der Neutronen. Die Reflektivität lässt auf das Streulängenprofil senkrecht zur Oberfläche schliessen.

2.2.3.16 Röntgenstrukturanalyse

Die Bestimmung der Quartärstruktur mittels Röntgendiffraktion erfolgte am Max-Planck-Institut für Biochemie in der Abteilung für Strukturforschung, Prof. Dr. Robert Huber, von Dr. Stefan Gerhardt. Die Daten wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Die Kristallisationsansätze erfolgten nach der Dampfdiffusionsmethode im sitzenden Tropfen „sitting drop“. Dabei wurden jeweils 2 µl Proteinlösung (10 mg ml⁻¹) mit 2 µl des Kristallisationspuffers vermischt und gegen 300 µl Reservoirlösung des selben Puffers äquilibriert. Die Bedingungen der Kristallisationsansätze sind im Anhang, Tabelle 6.4 aufgeführt. Die Datensätze wurden auf einer Drehanode (Max-Planck-Institut für Biochemie, Abteilung für Strukturforschung, Martinsried) oder am Synchrotron (Deutsches Elektronensynchrotron DESY, Hamburg) aufgenommen. Die Kristallstrukturen wurden mit der Methode des „Molekularen Ersatzes“ gelöst (Hoppe, 1957a; Hoppe, 1957b; Rossman et al., 1962; Huber, 1965) und anschliessend verfeinert.

3 Durchführung

3.1 Lumazinsynthese als Enzym

3.1.1 Lumazinsynthesemutanten

3.1.1.1 Klonierung der Lumazinsynthesemutante E126A aus *B. subtilis*

Als Template für die PCR diente der Vektor pNCO-RibH, der das Lumazinsynthesegen RibH für die Lumazinsynthese aus *B. subtilis* trägt. Als Primer wurden der Primer BS-*EcoRI* als Forward-Primer und der Mutationsprimer BS-E126A-*BssHII*-*NgoMIV* eingesetzt (vgl. Tabelle 6.1 und Tabelle 6.3, Anhang). Die PCR wurde wie unter 2.2.1.1 beschrieben durchgeführt. Anschliessend wurde das Amplifikat mit *EcoRI* und *NgoMIV* wie unter 2.2.1.2 beschrieben verdaut und in einen, ebenfalls mit BS-*EcoRI* und *NgoMIV* geschnittenen, pNCO-RibH Expressionsvektor ligiert (2.2.1.4). Es erfolgte eine Transformation des so entstandenen Plasmids pNCO-RibH-E126A in XL1 *E. coli*-Zellen (2.2.1.5). Zur Kontrolle der eingeführten Mutation wurde durch den Mutationsprimer eine neue Schnittstelle (*BssHII*) in das Gen eingeführt, die mit Hilfe eines PCR-Screens (2.2.1.6) mit der Primerkombination BS-*EcoRI*/mRNA5 (Tabelle 6.1, Anhang) und anschliessendem Verdau (2.2.1.2) die Mutation nachweisbar machte.

3.1.1.2 Herstellung der Mutanten der Lumazinsynthese aus *S. pombe*

Die Mutanten W27G, W27I, W27S, W27H, W27F und W27Y wurden über zwei PCR Stufen aus dem Template pNCO-SSP-Lusy gewonnen. Als Forward-Primer diente der Mutationsprimer (SSP-W27G-*SacII*, SSP-W27I-*Asel*, SSP-W27S-*AsuII*, SSP-W27H-*SacI*, SSP-W27F-*SphI* bzw. SSP-W27Y-*ApaI*). Als Reverse-Primer wurde in allen Fällen mRNA5 eingesetzt (vgl. Tabelle 6.1 und Tabelle 6.2, Anhang). Die PCR wurde unter Standardbedingungen (2.2.1.1) durchgeführt. Nach Reinigung über präparative 2 % Agarosegele und Kartuschen (2.2.1.3) wurden die Fragmente als Templates für eine zweite PCR eingesetzt.

Dabei wurde die Primerkombination SSP-Rbs-Mut-*EcoRI*/mRNA5 (Tabelle 6.1, Tabelle 6.2) gewählt. Die Amplifikate der zweiten PCR wurden nach Kartuschenreinigung (2.2.1.3) mit *EcoRI* und *Bam*HI wie unter 2.2.1.2 beschrieben verdaut und in einen, ebenfalls mit BS-*EcoRI* und *Bam*HI geschnittenen, pNCO-113-Expressionsvektor ligiert (2.2.1.4). Es erfolgte eine Transformation der so entstandenen Plasmide pNCO-SSP-W27“X“ in XL1 *E. coli*-Zellen (2.2.1.5). Zur Kontrolle der eingeführten Mutationen wurden durch die Mutationsprimer neue Schnittstellen (W27G: *Sac*II, W27I: *As*eI, W27S: *As*uII, W27H: *Sac*I, W27F: *Sph*I, W27Y: *Ap*aI) in das Gen eingeführt, die mit Hilfe eines PCR-Screens (2.2.1.6) mit der Primerkombination BS-*EcoRI*/mRNA5 und anschließendem Verdau die Mutation nachweisbar machten.

Die Mutante L119F wurde nach dem selben Prinzip, jedoch nur mit einer PCR (Primer: BS-*EcoRI*/SSP-L119F-*Hpa*I-*Nco*I, Tabelle 6.1 und Tabelle 6.2) unter Standardbedingungen erhalten. Als Template diente der Vektor pNCO-SSP-Lusy. Die Ligation erfolgte nach Verdau mit *EcoRI* und *Nco*I in einen, ebenfalls mit diesen beiden Restriktionsenzymen geschnittenen, pNCO-SSP-Lusy-Vektor (2.2.1.4). Die Transformation in XL1 und der PCR-Screen wurden wie in 2.2.1.5 und 2.2.1.6 beschrieben durchgeführt. Die eingebaute Mutation wurde nach dem PCR-Screen durch Verdau mit *Hpa*I detektiert.

Die Mutanten W63Y und W63Y/L119F wurden nach einer, bei der Herstellung von Lumazinsynthasemutanten aus *B. subtilis* von Dr. M. Fischer etablierten, Methode durchgeführt (Fischer, 1997). Als Template diente das Expressionsplasmid pNCO-SSP-Lusy. Im ersten Schritt wurde eine PCR mit zwei Ansätzen pipettiert.

Ansatz A enthielt in beiden Fällen (W63Y und W63Y/L119F) die Primerkombination pNCO_{vo}/SSP-W63Y-*Sma*I.

Ansatz B im Fall der W63Y-Mutante den Primer M2 als Forward-Primer und M4 als Reverse-Primer. Bei der Doppelmutante wurden die Primer M2 und SSP-L119F-*Hpa*I-*Nco*I eingesetzt (Tabelle 6.1 und Tabelle 6.2). Der Primer M2 deletiert die *EcoRI*-Schnittstelle aus dem Fragment, während der Primer M4 die Schnittstelle *Bam*HI besitzt bzw. der Primer SSP-L119F-*Hpa*I-*Nco*I neben der Mutation die Schnittstelle *Nco*I einführt.

Nach erfolgter Amplifikation und Reinigung der Fragmente über Agarosegelelektrophorese und Kartuschen (2.2.1.3), wurde im zweiten Schritt eine PCR durchgeführt, bei der folgendes Pipettierschema angewendet wurde:

10 µl Puffer (10-fach Konzentrat)

8 µl dNTP's (je 200 µM)

2 µl PCR-Ansatz A

2 µl PCR-Ansatz B

1 µl Taq-Polymerase (0,75 U)

77 µl H₂O

100 µl

Fragment B dient als Template, Fragment A als Primer und führt so die Mutation in Fragment B ein. Da die Amplifikation jedoch nur mit dem Codonstrang in 5'-3'-Richtung funktioniert, handelt es sich hier nur um eine lineare Vervielfachung.

Im dritten Schritt wird direkt ein Aliquot aus Schritt 2 ohne Reinigung als Template und die Primerkombination pNCO_{vo}/M4 im Fall von W63Y bzw. pNCO_{vo}/SSP-L119F-*HpaI-NcoI* im Fall von W63Y/L119F eingesetzt. Durch diese Vorgehensweise befinden sich als Template folgende Fragmente im PCR-Ansatz:

- Der verlängerte mutierte Codonstrang von Fragment A. Hier können beide Primer angreifen. Er wird somit exponentiell amplifiziert.
- Der kurze Anticodonstrang von Fragment A und das unmutierte Fragment B. Hier kann jeweils nur ein Primer angreifen, die Amplifikation verläuft linear.

Der PCR-Ansatz wurde anschliessend zur Entfernung des kurzen Fragmentes von A über präparative Agarosegelelektrophorese (2.2.2.1) und Kartusche gereinigt (2.2.1.3). Der Verdau erfolgte mit *EcoRI* und *BamHI* (W63Y) bzw. *EcoRI* und *NcoI* (W63Y/L119F) (2.2.1.2) und das Fragment wurde in einen ebenso geschnittenen pNCO-113-Vektor (W63Y) bzw. pNCO-SSP-Lusy-Vektor (W63Y/L119F) ligiert (2.2.1.4). Da das unmutierte Fragment B keine *EcoRI*-Schnittstelle besitzt, findet nach unvollständigem Verdau keine Ligation statt. Die Transformation in XL1-Zellen erfolgte standardmässig (2.2.1.5).

Wie bei den Mutationen an Position 27 und 119 wurden auch bei diesen beiden Mutanten spezifische Schnittstellen in das Gen eingeführt, mit denen die Mutationen nach PCR-Screen (2.2.1.6) (Primer: BSEcoRI/mRNA5, Tabelle 6.1) durch Verdau detektiert werden konnten (W63Y: *Sma*I, W63Y/L119F: *Sma*I und *Hpa*I).

3.1.2 Expression und Reinigung

3.1.2.1 Expression

Die Expression erfolgte bei den Lumazinsynthasen aus *A. aeolicus*, *A. thaliana*, *E. coli*, *H. influenzae*, *M. tuberculosis*, *N. meningitidis*, *S. aureus*, *S. oleracea*, *S. pneumoniae*, *S. pombe* (Wildtyp und Mutanten) und *B. subtilis* (Mutanten) im XL1-pNCO-System.

Für den Lumazinsynthasewildtyp aus *B. subtilis* wurde der BR151-Stamm mit dem p602-Expressionsvektor verwendet.

Das Enzym aus der Hefe *S. cerevisiae* wurde mit Hilfe des Vektors p602-SC-Lusy im *E. coli* XL1-Stamm exprimiert.

Die Plasmide für die Expression der Lumazinsynthasen aus *M. jannaschii* und *P. furiosus* wurden wie unter 2.2.1.9 beschrieben aus dem XL1-Stamm isoliert und zur Expressionssteigerung in das System M15[pREP4] transformiert (2.2.1.5). Die neu entstandenen Expressionsstämme trugen die Namen M15[pREP4]-pNCO-MJ-Lusy bzw. M15[pREP4]-pNCO-PF-Lusy.

3.1.2.2 Reinigung von Lumazinsynthasen über ein Zweisäulensystem

Nach erfolgter Fermentation (2.2.1.7) wurden die Lumazinsynthasen der in Tabelle 3.1 genannten Organismen im ersten Schritt über Anionenaustausch-, oder Affinitätschromatographie und im zweiten Schritt über Gelfiltration (2.2.3.1) aus dem Rohextrakt (2.2.1.8) isoliert.

Die Chromatographie wurde mit den in 2.2.3.1 beschriebenen Parametern durchgeführt. In Tabelle 3.1 sind die für das jeweiligen Enzym verwendeten Säulenmaterialien angegeben.

Tabelle 3.1: Säulenmaterial zur Reinigung der Lumazinsynthasen

Organismus	Anionenaustauscher	Gelfiltration
<i>B. subtilis</i> (Wildtyp/Mutanten)	Q-Sepharose	Superdex 200
<i>E. coli</i>	DEAE-Material	Sephacryl S400
<i>H. influenzae</i>	Q-Sepharose	Sephacryl S400
<i>M. jannaschii</i>	Hydroxyapatit	Sephacryl S400
<i>N. meningitidis</i>	Hydroxyapatit	Superdex 200
<i>P. furiosus</i>	Q-Sepharose ¹	Sephacryl S400 ¹
<i>S. aureus</i>	Q-Sepharose	Sephacryl S400
<i>S. oleracea</i>	DEAE-Material	Sephacryl S400
<i>S. pneumoniae</i>	Q-Sepharose	Sephacryl S400
<i>S. pombe</i> (Wildtyp/Mutanten)	Q-Sepharose	Superdex 200

¹: pH 8,0, 20 °C

3.1.2.3 Reinigung von Lumazinsynthasen über Ein- oder Mehrsäulensysteme

Abweichend von dem in 3.1.2.2 beschriebenen Zweisäulensystem wurde für folgende Lumazinsynthasen eine andere Reinigungsstrategie angewendet.

Bei dem thermostabilen Enzym aus *A. aeolicus* wurde diese Eigenschaft als Reinigungsschritt ins Protokoll miteinbezogen. Nach 20 minütigem Erhitzen des Rohextraktes (2.2.1.8) auf 85 °C denaturierten die meisten Proteine aus *E. coli* und konnten durch Zentrifugation abgetrennt werden (20 min, 15000 rpm, 4 °C). Anschliessend wurde eine Gelfiltration über Sephacryl S400 zur Isolierung durchgeführt (2.2.3.1).

Die pflanzlichen Lumazinsynthase aus *A. thaliana* wurde aus dem Rohextrakt (2.2.1.8) über ein Dreisäulensystem (Q-Sepharose, Hydroxyapatit, Sephacryl S400) isoliert (2.2.3.1).

Aus dem Rohextrakt (2.2.1.8) mit der exprimierten Lumazinsynthase aus ***S. cerevisiae*** wurde über zwei Affinitätssäulen (Hydroxyapatit, Phenylsepharose) und eine Gelfiltration (Superdex 200) das Enzym isoliert (2.2.3.1).

Für die Isolierung des Enzyms aus ***M. tuberculosis*** musste der Rohextrakt (2.2.1.8) über vier Säulen gereinigt werden. Nach zwei unterschiedlich starken Anionenaustauschersäulen (Q-Sepharose und Mono Q) schloss sich eine Affinitätschromatographie über Red-Sepharose Material an. Abschliessend wurde eine Gelfiltration über Superdex 200 durchgeführt (2.2.3.1)

3.1.3 Charakterisierung

Für die Bestimmung der Quartärstruktur wurden bei **allen isolierten Enzymen** das Retentionsverhalten auf den Gelfiltrationsmaterialien herangezogen. Daneben wurden alle Lumazinsynthasen elektronenmikroskopisch, wie unter 2.2.3.12 beschrieben, untersucht.

Weitere Informationen über die Monomer- bzw. Quartärstruktur für die Enzyme aus ***S. pombe*** und ***M. jannaschii*** ergaben sich durch Massenspektrometrie (2.2.3.5), Edmansequenzierung (2.2.3.4) und analytische Ultrazentrifugation (2.2.3.6). Für die Lumazinsynthase aus ***S. pombe*** konnte eine Struktur für das Wildtypprotein in Komplex mit verschiedenen Liganden mittels Röntgendiffraktion (2.2.3.16) bestimmt werden. Details über das aktive Zentrum konnten durch Röntgenstrukturen der Mutanten W27G, W63Y, L119F und W63Y/L119F gewonnen werden.

Die enzymkinetische Charakterisierung der Lumazinsynthase aus ***B. subtilis*** erfolgte durch Untersuchungen unter Single-Turn-Over Bedingungen und im Steady-State (2.2.3.8). Zur Ermittlung der thermodynamischen Parameter der Reaktion wurde die Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Temperatur ermittelt. Die **Mutanten** des Enzyms aus ***B. subtilis*** wurden auf ihre kinetische Aktivität untersucht und in 21 Fällen K_M -Werte für die Substrate und v_{max} bestimmt.

Für die Lumazinsynthesen aus *A. aeolicus*, *A. thaliana*, *E. coli*, *H. influenzae*, *M. jannaschii*, *M. tuberculosis*, *N. meningitidis*, *P. furiosus*, *S. aureus*, *S. cerevisiae*, *S. oleracea*, und *S. pneumoniae* wurden nach der Reinigung die kinetischen Parameter im Steady-State bestimmt (2.2.3.8.3). Die Reaktionstemperatur bei den kinetischen Untersuchungen der Enzyme aus *A. thaliana* und *S. oleracea* betrug 25 °C. Der pH-Wert bei den kinetischen Messungen für das Enzym aus *P. furiosus* wurde auf pH 8,0 erhöht.

Zusätzlich wurden die thermodynamischen Parameter der Enzymreaktion der thermophilen Enzyme aus *A. aeolicus*, *P. furiosus* und *M. jannaschii* in einer Reaktionsgeschwindigkeits-Temperatur-Reihe bestimmt.

Bei der Lumazinsynthese aus *S. pombe* erfolgten die kinetischen Untersuchungen im Steady-State für das Wildtypenzym und für die W27-Mutanten.

Die Charakterisierung des Riboflavinbindevermögens der Lumazinsynthesen aus *S. pombe* und *S. cerevisiae* erfolgte durch mehrere optische Untersuchungen. Für das Wildtyp-Enzym aus *S. pombe*, die W27Y-Mutante aus *S. pombe* und für das Enzym aus *S. cerevisiae* wurden Absorptionsspektren aufgenommen. Weitere Informationen wurden durch die Aufnahme von CD-Spektren (2.2.3.11) des Wildtyp-Proteins und der W27Y-Mutante aus *S. pombe* gewonnen. Die Dissoziationskonstante für Riboflavin wurde für die Lumazinsynthase aus *S. pombe*, deren Mutanten W27Y, W63Y, L119F, W63Y/L119F und für das Enzym aus *S. cerevisiae* mit Hilfe von Fluoreszenzquench-Titrations (2.2.3.9) und/oder Gleichgewichtsdialyse (2.2.3.10) ermittelt.

3.2 Lumazinsynthese als Funktionsprotein

3.2.1 His₆-Lumazinsynthese

Anzucht und Zellaufschluss des rekombinanten Bakterienstamms XL1-pNCO-His₆-Lusy wurden wie unter 2.2.1.7 und 2.2.1.8 beschrieben durchgeführt. Allerdings wurde ein EDTA-freier Aufschlusspuffer verwendet. Die Reinigung erfolgte mit Hilfe einer Ni-NTA-Säule (vgl. 2.2.3.1). Den proteinhaltigen Fraktionen wurde zur Komplexierung von miteluiertem Nickel 0,5 mM EDTA zugegeben. Anschliessend wurde zweimal gegen 50 mM Kaliumphosphat, pH 7,0, dialysiert. Die Messungen zur Bestimmung der Bindung an Membranen wurden an der, mit einem Fluoreszenzmikroskop ausgestatteten, Filmwaage (2.2.3.13), einem BiaCore-Gerät (2.2.3.14) und an einem Neutronenreflexionsspektroskop (2.2.3.15) durchgeführt. Beobachtungen zur Bindung von fluoreszenzmarkierten Aktinsträngen konnten ebenfalls mit der Filmwaage unter Zuhilfenahme des Fluoreszenzmikroskops gemacht werden.

3.2.2 Deuterierte His₆-Lumazinsynthese

Die Herstellung des deuterierten Proteins erfolgte im Fermenter mit Hilfe eines Minimalmediums (2.2.1.7) mit deuterierter Bernsteinsäure und D₂O mit dem Expressionssystem M15[pREP4]-pNCO-His₆-Lusy. Dazu wurde das Plasmid pNCO-His₆-Lusy wie unter 2.2.1.9 beschrieben isoliert und in dem Expressionsstamm M15[pREP4] transformiert (2.2.1.5).

Nach Ernte, Gewinnung des Rohextraktes (2.2.1.8) und Reinigung über eine Ni-NTA-Säule, analog zur nicht deuterierten His₆-Lumazinsynthese, (3.2.1) wurde der Deuterierungsgrad mittels Massenspektrometrie bestimmt (2.2.3.5). Untersuchungen zur Bindung des Proteins an Lipidmembranen (mit integrierten Nickelchelatoren) wurden durch Neutronenreflexion (2.2.3.15) durchgeführt.

3.2.3 Fluoreszenzmarkierte His₆-Lumazinsynthase

Die Fluoreszenzmarkierung wurde mit Texasrotsulfonylchlorid an gereinigter His₆-Lumazinsynthase (3.2.1) durchgeführt. Sulfonylchloride reagieren in einem pH-Bereich von pH 9-10 mit primären Aminen zu Sulfonamiden.

Nach Dialyse über Nacht gegen 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 8,0 wurde für etwa 3,5 h gegen den Reaktionspuffer (100 mM Carbonat/Bicarbonatpuffer, pH 9,0) dialysiert. Die Reaktion erfolgte auf Eis unter Lichtausschluss nach Zugabe von etwa 1,2 mg Texasrot zu 3 ml Proteinlösung (1 mg/ml) für 1 h. Anschliessend wurde über Nacht gegen 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0, dialysiert und erneut über Ni-NTA (2.2.3.1) gereinigt. Die Kontrolle der ikosaedrischen Quartärstruktur nach dieser Prozedur erfolgte mittels Elektronenmikroskopie (2.2.3.12) und Enzymaktivitätsmessungen. Untersuchungen zur Kopplung an Ni-Chelatorlipidmembranen wurden an einer, mit einem Fluoreszenzmikroskop unterstützten, Filmwaage (2.2.3.13) durchgeführt.

3.2.4 Hisactophilin-Lumazinsynthase (HisAc-Lumazinsynthase)

Dieses Fusionsprotein wurde wie unter 2.2.3.1 beschrieben über eine Affinitätssäule mit Nickel-NTA gereinigt und analog zur His₆-Lumazinsynthase durch mehrfache Dialyse von Imidazol, EDTA und Spuren von Nickel befreit. Untersuchungen zu Wechselwirkungen des Proteins mit Nickel-Chelatorlipiden wurden mittels Filmwaagentechnik durchgeführt (2.2.3.13).

3.2.5 Biotinylierte Lumazinsynthase (CBio-Lumazinsynthase)

Dieses Fusionsprotein exprimiert unlöslich und musste renaturiert werden. Nach zweimaligem Ultraschallaufschluss, wie unter 2.2.1.8 beschrieben, wurde der Überstand mit den löslichen Proteinen verworfen. Der Rückstand wurde in 8 M Harnstoff in 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0 suspendiert und für mindestens 48 h inkubiert. Nach Abzentrifugieren nicht gelöster Bestandteile und Zugabe des Inhibitors 5-Nitroso-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (**18**, Abbildung 1.4) zur Stabilisierung (äquimolar zur Untereinheitmenge) schloss sich die Renaturierung (Rückfaltung) durch langsames Entfernen des Harnstoffes an. Dazu wurde jeweils

über Nacht gegen 6 M, 4 M, 2 M, 1 M, 0,5 M, 0,25 M Harnstoff in 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0 und schliesslich gegen 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0 dialysiert. Die Dialysepuffer enthielten jeweils 0,25 mM des Inhibitors **18**.

Kopplungsversuche an Lipidlayer, wurden mit dem Avidin/Biotin-System durchgeführt. Es wurden Lipide mit gebundenem Biotin verwendet und diese im ersten Schritt mit Avidin bedeckt. Die Bindung der CBio-Lusy an diese vorbehandelten Lipidlayer wurde mittels Neutronenreflexion (2.2.3.15) beobachtet.

3.2.6 Bifunktionelle Kapside aus CBio- und His₆-Lumazinsynthase

Für die Herstellung von Lumazinsynthase-Kapsiden mit unterschiedlichen Anteilen an His₆- und CBio-Resten auf der Oberfläche, wurde zunächst die His₆-Lumazinsynthase, wie unter 3.2.1 beschrieben, gereinigt bzw. die CBio-Lumazinsynthase, wie unter 3.2.5 beschrieben, in 8 M Harnstoff (in 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0) gelöst. Anschliessend wurde die His₆-Lumazinsynthase durch Dialyse gegen 6 M Guanidiniumhydrochlorid (in 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0, 100 mM DTT, pH 7,0) entfaltet bzw. die CBio-Lumazinsynthase in den selben Puffer durch Dialyse umgepuffert.

Nach Abschätzung der Proteinkonzentration beider Lumazinsynthasen durch SDS-Gelelektrophorese (2.2.2.2) wurden Mischungen mit unterschiedlichen Anteilen an His₆-Lusy und CBio-Lusy (Ansatz 1: 10 % His₆-Lusy, 90 % CBio-Lusy; Ansatz 2: 50 % His₆-Lusy, 50 % CBio-Lusy; Ansatz 3: 90 % His₆-Lusy, 10 % CBio-Lusy) angesetzt und mindestens für 72 h inkubiert. Anschliessend erfolgte die Rückfaltung durch Umpuffern in 6 M Harnstoff (in 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0) und langsames Entfernen des Harnstoffes durch Dialyse analog zu 3.2.5. Eine Reinigung erfolgte für die Ansätze 2 und 3 über eine Nickelsäule, für den Ansatz 1 über eine Streptavidinsäule (vgl. 2.2.3.1). Der Nachweis beider Reste im Kapsid erfolgte durch Western-Blot-Analyse (2.2.3.7). Kopplungsversuche an mit Nickel-Chelatorlipiden unterstützte Membranen und Abgreifen mit Avidin erfolgte mittels BiaCore-Messungen (2.2.3.14).

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Lumazinsynthese als Enzym

4.1.1 Quartärstruktur – Pentamer oder Ikosaeder ?

4.1.1.1 Lumazinsynthasen bekannter Struktur aus *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Spinacia oleracea* und *Aquifex aeolicus*

Das Enzym aus *B. subtilis* war die erste Lumazinsynthase, deren Struktur aufgeklärt werden konnte. Das ikosaedrische 60mer wurde 1988 in Komplex mit der trimeren Riboflavinsynthase kristallisiert (Ladenstein et al., 1988). Die Struktur des Kapsides konnte mit einer Auflösung von 3,3 Å erhalten werden. Für die trimere Riboflavinsynthase im inneren des Kapsides konnten jedoch keine vollständigen Datensätze erhalten werden. Die Struktur der Lumazinsynthase konnte sieben Jahre später mit leeren rekonstituierten Kapsiden auf 2,4 Å verfeinert werden (Ritsert et al., 1995).

Die Reinigung erfolgte wie unter 3.1.2.2 beschrieben über zwei Säulen. Bei der Gelfiltration über Sephacryl S400 Material eluierte die 60mere Lumazinsynthase nach etwa 130 ml. Elektronenmikroskopische Aufnahmen in Abbildung 4.1A zeigen die für ikosaedrische Lumazinsynthasen typischen „Ringe“ mit einem äusseren Durchmesser von 160 Å. Bei hoher Auflösung ist die Pore im inneren des Kapsides mit 80 Å (Abbildung 4.1 Pfeil) zu erkennen.

Von der Lumazinsynthase aus *E. coli* ist zwar keine Röntgenstruktur bekannt, das Enzym konnte jedoch mit Hilfe von Sedimentationszentrifugations- und Gleichgewichtssedimentationsexperimenten und Elektronenmikroskopie soweit charakterisiert werden, dass von einer 60meren ikosaedrischen Struktur ausgegangen werden kann (Mörthl et al., 1996).

Nach Expression im XL1-pNCO-System konnte das Enzym über zwei Säulenschritte (Anionenaustauschersäule und Gelfiltration) aus dem Rohextrakt bis zur Homogenität gereinigt werden (3.1.2.2). Das Retentionsvolumen auf dem Sephacryl S400 Material betrug etwa 130 ml. Elektronenmikroskopische Aufnahmen in Abbildung 4.1B bestätigen die ikosaedrische Struktur durch das Vorhandensein von 160 Å Partikeln.

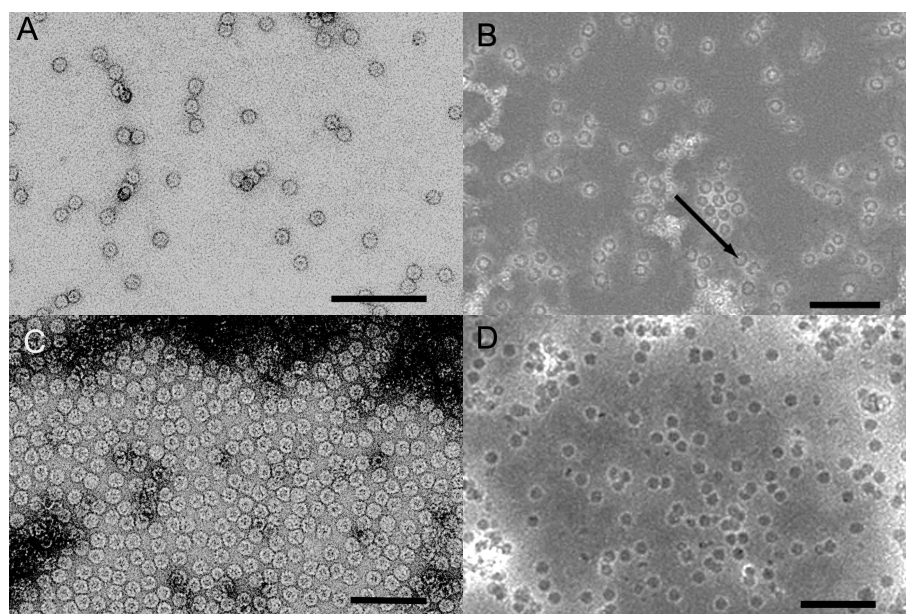


Abbildung 4.1: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Lumazinsynthasen aus A, *B. subtilis*; B, *E. coli*; C, *S. oleracea* und D, *A. aeolicus* nach Negativkontrastierung mit Uranylacetat. Der Hohlraum im Inneren des Proteins ist gut zu erkennen (Pfeil). Die Balken repräsentieren 100 nm.

Die dritte Lumazinsynthase mit ikosaedrischer Struktur wurde 1999 aus der Pflanze ***S. oleracea*** mit einer Auflösung von 3,3 Å erhalten (Persson et al., 1999). Persson et al. amplifizierten das kodierende Gen aus cDNA, während in dieser Arbeit die Lumazinsynthase aus einem vollsynthetischen Gen exprimiert und wie unter 3.1.2.2 beschrieben gereinigt wurde. Anders als bei Jordan et al. wurden während der gesamten Reinigung ausschliesslich Phosphatpuffer verwendet. Auch die kinetischen Untersuchungen wurden in 100 mM Kaliumphosphat, pH 7,0 (5 mM EDTA) durchgeführt. Die Verwendung von Tris-Puffern wurde vermieden, da aus der Literatur die Dissoziation der 60mere und Reaggregation zu strukturell vergrößerten Kapsiden unter Pufferbedingungen mit 100 mM Tris pH 8,0 bekannt ist (Bacher et al., 1986). Nach DEAE-Anionenaustauscher und Gelfiltration konnte

das Enzym aus dem Rohextrakt mit hoher Reinheit erhalten werden. Die Retention auf der Sephacryl S400-Säule verhielt sich analog zu den anderen ikosaedrischen Lumazinsynthasen. Eine elektronenmikroskopische Aufnahme des Enzyms nach Negativkontrastierung mit Uranylacetat, auf dem die 160 Å grossen Kapside zu sehen sind, ist in Abbildung 4.1C dargestellt.

Die Röntgenstruktur der Lumazinsynthase aus *S. cerevisiae* wurde im Jahr 2000 mit einer Auflösung von 1,85 Å gelöst (Meining et al., 2000). Das Enzym war das dritte, nach den Enzymen aus *M. grisea* (Persson et al., 1999) und *B. abortus* (Braden et al., 2000), dem eine pentamere Quartärstruktur zugeordnet werden konnte.

Das Enzym wurde wie unter 3.1.2.3 beschrieben über drei Säulen gereinigt, bis das SDS-Gel nur noch die typische Enzymbande bei ca. 18 kDa zeigte (Abbildung 4.2). Das Elutionsvolumen auf der Gelfiltrationssäule (Superdex 200) betrug 196 ml. Eine für diese Säule ermittelte Eichgerade (2.2.3.1) ergab ein ungefähres natives Gewicht von 88 kDa, was sehr gut mit der bekannten Masse eines Pentamers (93 kDa) korreliert.

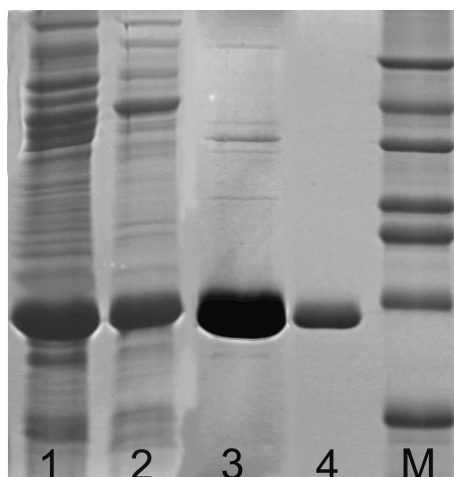


Abbildung 4.2: SDS-Polyacrylamidgel: Lumazinsynthase aus *S. cerevisiae*. 1, Rohextrakt; 2, Protein nach Hydroxyapatit-Säule; 3, Protein nach Phenylsepharose-Säule; 4, Protein nach Superdex 200 Säule; M, Molekulargewichtsmarker.

Erst vor einem Jahr wurde eine Lumazinsynthasestruktur aus einem thermophilen Mikroorganismus zugänglich. Im Jahr 2001 wurde das Enzym aus *A. aeolicus* als ikosaedrisches 60mer mit einer Auflösung von 1,6 Å erhalten (Zhang et al., 2001).

Die Expression erfolgte in dieser Arbeit im *E. coli* XL1-Stamm. Da die optimale Wachstumstemperatur des Bakteriums *A. aeolicus* bei Temperaturen über 80 °C liegt, sind seine Proteine relativ hitzestabil. Die Lumazinsynthase ist bei Temperaturen über 85 °C über einen längeren Zeitraum beständig. Diese Eigenschaft konnte bei der Isolierung genutzt werden. Bei einer 20 minütigen Inkubation des Rohextraktes aggregierten die meisten Proteine aus *E. coli*, während die überexprimierte Lumazinsynthase in Lösung blieb. Nach diesem ersten Reinigungsschritt wurde eine Gelfiltration mittels Sephacryl S400 Material angeschlossen (3.1.2.3), aus der das Protein mit hohem Reinheitsgrad hervorging. Das Retentionsvolumen des Enzyms aus *A. aeolicus* betrug analog zum dem Retentionsvolumen anderer ikosaedrischen Lumazinsynthasen etwa 130 ml. Bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnten die typischen 160 Å Partikel beobachtet werden. Eine Aufnahme ist in Abbildung 4.1D dargestellt.

Das Elutionsverhalten dieser fünf Lumazinsynthasen mit bekannter Raumstruktur auf den Gelfiltrationsmaterialien Superdex 200 und Sephacryl S400 diente als Ausgangspunkt für die Aufklärung der Quartärstrukturen der in den nachfolgenden Kapiteln beschriebenen Lumazinsynthasen.

4.1.1.2 Lumazinsynthese aus der Hefe *Schizosaccharomyces pombe*

Das rekombinante Protein wurde, wie unter 3.1.2.2 beschrieben, exprimiert und gereinigt. Abbildung 4.3 zeigt Fraktionen des Rohextraktes (Spur 1), des Enzyms nach der Q-Sepharose Säule (Spur 2) und nach Gelfiltration über Superdex 200 Material (Spur 3). Aus dem zweiten Reinigungsschritt ging das Enzym mit hoher Reinheit hervor. In Spur 3 ist nur noch die Lumazinsynthasebande bei ca. 18 kDa sichtbar. Das Elutionsvolumen von der Gelfiltrationssäule betrug etwa 196 ml. Durch die für diese Säule ermittelte Eichgerade (2.2.3.1) ergibt sich daraus ein Molekulargewicht von 88 kDa. Bei einer errechneten Monomermasse von 17188 Da ist eine pentamere Quartärstruktur anzunehmen.

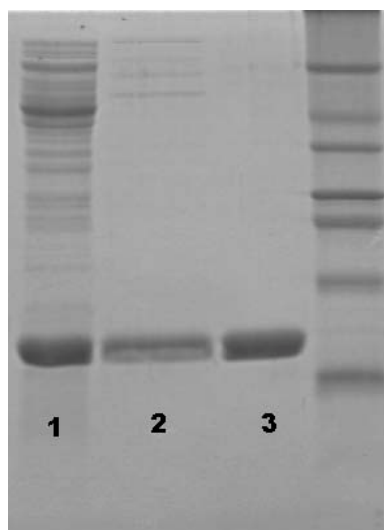


Abbildung 4.3: SDS-Polyacrylamidgel. Reinigung der Lumazinsynthase aus *S. pombe*. 1, Rohextrakt, 2, Lumazinsynthase nach Q-Sepharose; 2, Lumazinsynthase nach Superdex 200.

Bei der Lumazinsynthase aus *S. cerevisiae* wurde beobachtet, dass das N-terminale Methionin posttranslational entfernt wird (Meining et al., 2000). Um festzustellen, ob bei dem Enzym aus *S. pombe* ebenfalls eine posttranslationale Sequenzveränderung stattfindet, wurde eine N-terminale Proteinsequenzierung durchgeführt. Der Edman-Abbau ergab eine N-terminale Sequenz von MFSGIKGPNPSDLKG, die sich nicht von den ersten 15 Aminosäuren des

übersetzten offenen Leserahmens aus der Datenbank unterscheidet. Eine posttranslationale Methioninabspaltung konnte ausgeschlossen werden.

Für die weitere Charakterisierung der Lumazinsynthese wurde das Molekulargewicht eines Monomers mittels Massenspektrometrie bestimmt. Das ermittelte Monomergewicht von 17189 Da stimmte hervorragend mit der berechneten Masse von 17188 Da überein und bestätigte das Vorhandensein einer intakten Enzymuntereinheit.

Durch analytische Ultrazentrifugation konnten weitere wichtige Erkenntnisse über die Quartärstruktur gewonnen werden. Sowohl der Sedimentationskoeffizient von 5.0 S (bei 20 °C in 50 mM Kaliumphosphat, pH 7,0), als auch die aus Gleichgewichtsläufen ermittelte Masse von 87 kDa stehen im Einklang mit dem Ergebnis des Gelfiltrationslaufes, dass es sich bei dieser Lumazinsynthese um ein Pentamer handelt.

Zur genaueren Charakterisierung des aktiven Zentrums der Lumazinsynthese aus *S. pombe* wurden Ligand-Komplexe des Wildtypproteins mit Riboflavin (**9**), mit dem Substratanalogon 5-Nitro-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (**17**) und mit dem Produktanalogon 6-Carboxyethyl-7-oxo-8-ribityllumazin (**19**) kristallisiert und die Strukturen bis zu einer Auflösung von 2,4 Å, 2,4 Å und 2,6 Å verfeinert. Des Weiteren war es möglich, ligandfreie Strukturen der Mutanten W27G, W63Y, L119F und W63Y/L119F mit Auflösungen von 2,0 Å, 3,1 Å, 3,1 Å und 2,7 Å zu bestimmen.

Wildtypprotein: Sekundär- und Quartärstruktur

Eine monomere Untereinheit der Lumazinsynthese aus *S. pombe* ist in Abbildung 4.4 gezeigt. Sie besteht aus einem viersträngigen zentralen β -Faltblatt ($\beta_2\beta_3\beta_4\beta_5$), in der Abbildung rot dargestellt, das auf der einen Seite von den Helices α_1 , α_4 , α_5 und auf der anderen Seite von α_2 und α_3 (blau) flankiert wird.

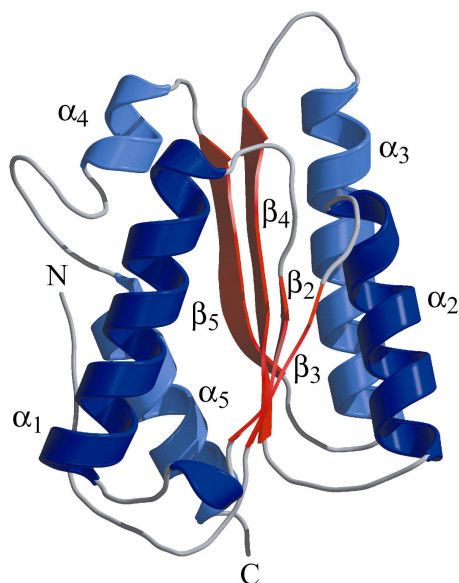


Abbildung 4.4: Bänderdarstellung der Sekundärstrukturelemente eines Monomers der Lumazinsynthase aus *S. pombe*. Blau: α -Helices, rot: β -Faltblätter.

Bezogen auf die Aminosäuresequenz ergibt sich eine Abfolge der Sekundärstrukturelemente von $\beta_2\alpha_1\beta_3\alpha_2\beta_4\alpha_3\beta_5\alpha_4\alpha_5$. Das Fehlen eines β_1 Faltblattes in der Bezeichnung berücksichtigt ein zusätzliches N-terminales Faltblatt, das bei den ikosaedrischen Lumazinsynthasen anderer Mikroorganismen und Pflanzen vorhanden ist (Ladenstein et al., 1988; Ritsert et al., 1995; Persson et al., 1999; Zhang et al., 2001). Der N-Terminus des Enzyms aus *S. pombe* besitzt dagegen keine geordnete Struktur.

Abbildung 4.5 zeigt die Darstellung der pentameren Quartärstruktur entlang der fünfzähligen Achse. Die Monomere sind in unterschiedlichen Farben im Bändermodell, das gebundene Riboflavin im Stabmodell abgebildet. Durch die pentamere Anordnung der Untereinheiten bildet sich in deren Mitte eine Pore, die von den fünf α_3 -Helices begrenzt wird. Diese Pore ist durch das Vorhandensein der polaren Aminosäuren H104, R108, E100 und D112 vorwiegend hydrophil. Der Porendurchmesser, gemessen zwischen den Histidinen in Position 104 gegenüberliegender Untereinheiten, beträgt 6,3 Å. Salzbrücken zwischen R108 und D112 der jeweiligen benachbarten Untereinheit tragen zur Stabilität des Pentamers bei.

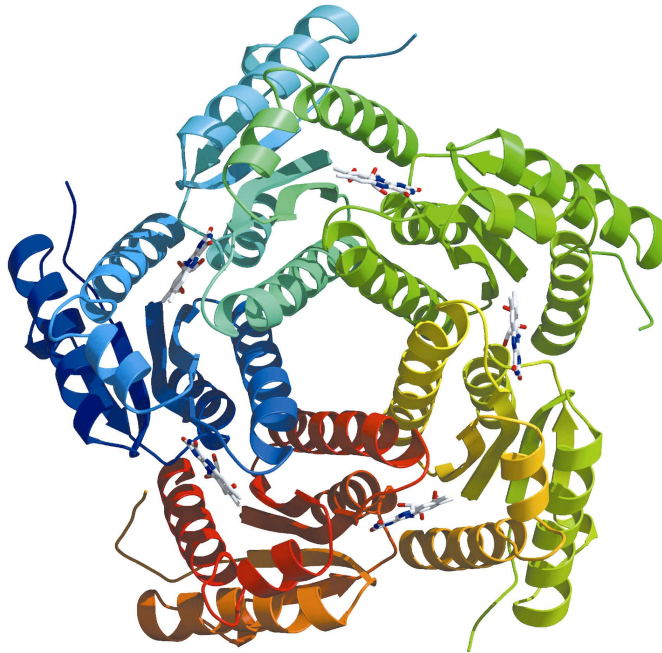


Abbildung 4.5: Bändermodell der Quartärstruktur der Lumazinsynthase aus *S. pombe* entlang der fünfzähligen Achse. Das im aktiven Zentrum gebundene Riboflavin ist im Stabmodell gezeigt.

Durch Vergleich der Aminosäuresequenzen (Abbildung 4.14) und der Sekundärstrukturelemente der Untereinheiten von Lumazinsynthasen bekannter Struktur, werden Hinweise auf unterschiedliche Ursachen für die Bildung eines Pentamers oder Ikosaeders deutlich. Abbildung 4.6 zeigt eine Überlagerung der Monomere aus den pentameren Enzymen von *S. pombe* (gelb), *S. cerevisiae* (hellblau), *M. grisea* (lila) und *B. abortus* (dunkelblau) und der ikosaedrischen Enzyme aus *B. subtilis* (grün) und *S. oleracea* (orange).

Ein grosser Unterschied ist in der Loopregion zwischen den Helices α_4 und α_5 zu erkennen. Der Sequenzvergleich in Abbildung 4.14 macht deutlich, dass in allen ikosaedrischen Proteinen aus Bakterien und Pflanzen dieser Loop ein konserviertes Motiv G(T/G)K(A/H)GN besitzt, das mehrere Kontakte zu den α_1 ' und α_4 ' Helices einer Untereinheit in einem benachbarten Pentamer ermöglicht und die ikosaedrische Struktur stabilisiert.

Die meisten pentameren Enzymstrukturen zeigen in dieser Region ein Fehlen des konservierten Motivs und zusätzlich eine Insertion von einer (*S. pombe*: GLNGGHN), zwei (*M. grisea*: GVIEGSHN), oder vier (*S. cerevisiae*: GIDEAHSMHN) Aminosäure(n). Eine Ausnahme bildet die pentamere Lumazinsynthase aus *B. abortus*, die an dieser Stelle keine Loopregion, sondern eine durchgehende α -helicale Struktur besitzt. Diese Unterschiede in den Sekundärstrukturelementen haben ein Fehlen der Kontakte zwischen den pentameren Modulen zur Folge und die Bildung von Icosaedern wird erschwert.

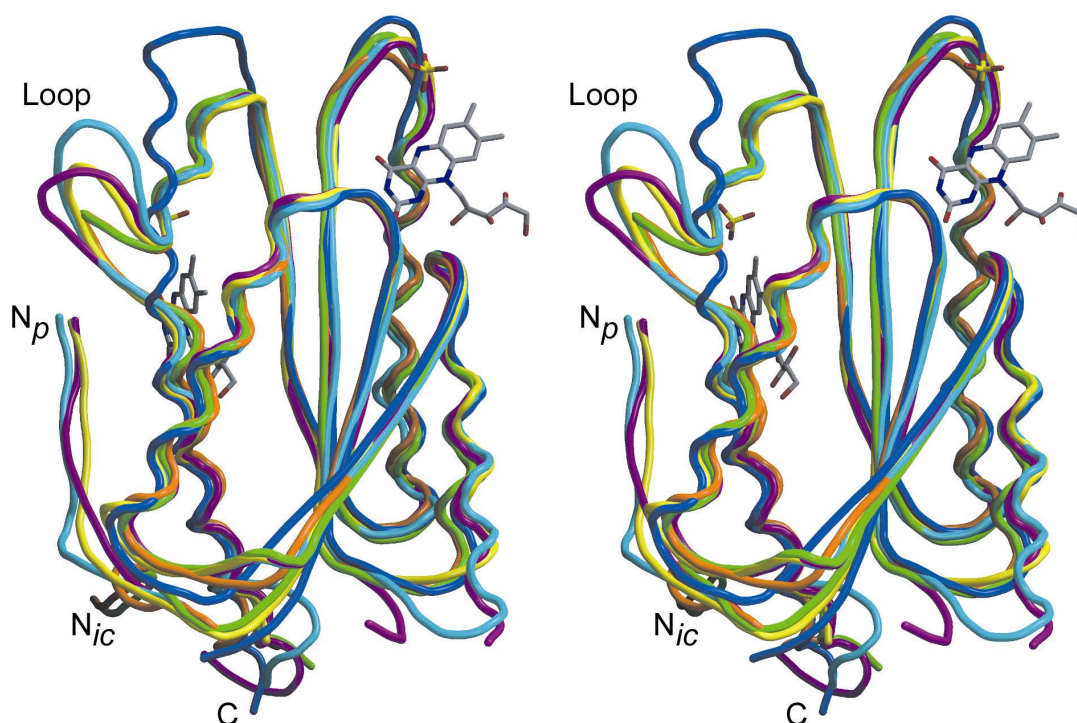


Abbildung 4.6: Stereodarstellung einer Monomerüberlagerung verschiedener ikosaedrischer (*ic*) und pentamerer (*p*) Lumazinsynthasen. Pentamer: *S. pombe* (gelb), *B. abortus* (dunkelblau), *S. cerevisiae* (hellblau), *M. grisea* (lila). Icosaedrisch: *B. subtilis* (grün), *S. oleracea* (orange). Riboflavin und Phosphat sind im Stabmodell gezeigt.

Zusätzlich hat die Lage des N-Terminus einen entscheidenden Einfluss auf die Ausbildung einer höher symmetrischen Struktur. In der Monomerüberlagerung in Abbildung 4.6 sind die N-Termini der ikosaedrischen Lumazinsynthasen mit „*N_{ic}*“ gekennzeichnet.

Diese liegen in Richtung einer benachbarten Untereinheit und sind in der Lage sich in Form eines zusätzlichen, als β_1 -Faltblatt bezeichneten, fünften Stranges an diese anzulagern. Dadurch wird die pentamere Struktur kompakter und die Zusammenlagerung von 12 Pentameren zu einem 60mer wird erleichtert. Die N-Termini der pentameren Enzyme, in Abbildung 4.6 mit „N_p“ gekennzeichnet, erweisen sich als sehr beweglich und weichen stark von der Lage der ikosaedrischen N-Termini ab. Eine mögliche Erklärung ist das Vorhandensein von zwei Prolinen in den ersten 12 Aminosäuren des Enzyms aus *S. pombe* an den Positionen 8 und 10, die durch ihre eingeschränkte Flexibilität die Anlagerung des N-Terminus an die benachbarte Untereinheit verhindern. Abbildung 4.6 zeigt deutlich, dass die Aminosäuren 7 bis 12 in Richtung des Loops zwischen β_4 und α_3 ragen. Diese Region ist an der Bildung des aktiven Zentrums beteiligt. Der Abstand zwischen P8 und W27' beträgt nur 4 Å, womit das Prolin die gegenüberliegende Seite der 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion-Bindungsstelle einnimmt.

Bindung von Liganden im aktiven Zentrum der Lumazinsynthase aus *S. pombe*

Aufgrund der relativ hohen Affinität des Enzyms zu Riboflavin (**9**) (vgl. 4.1.2.2.5), konnte dessen Lage im aktiven Zentrum durch Röntgenstrukturanalyse eindeutig bestimmt werden.

Durch die Position des Riboflavins in Abbildung 4.5 ist zu erkennen, dass das aktive Zentrum an der Kontaktfläche zweier benachbarter Untereinheiten des Pentamers liegt. In Abbildung 4.7a ist ein detaillierter Ausschnitt des aktiven Zentrums wiedergegeben. Von der einen Untereinheit nehmen die Reste zwischen dem Strang β_2 und der Helix α_1 , zwischen dem Strang β_3 und der Helix α_2 und der Strang β_4 und die Helix α_3 an der Bildung des aktiven Zentrums teil.

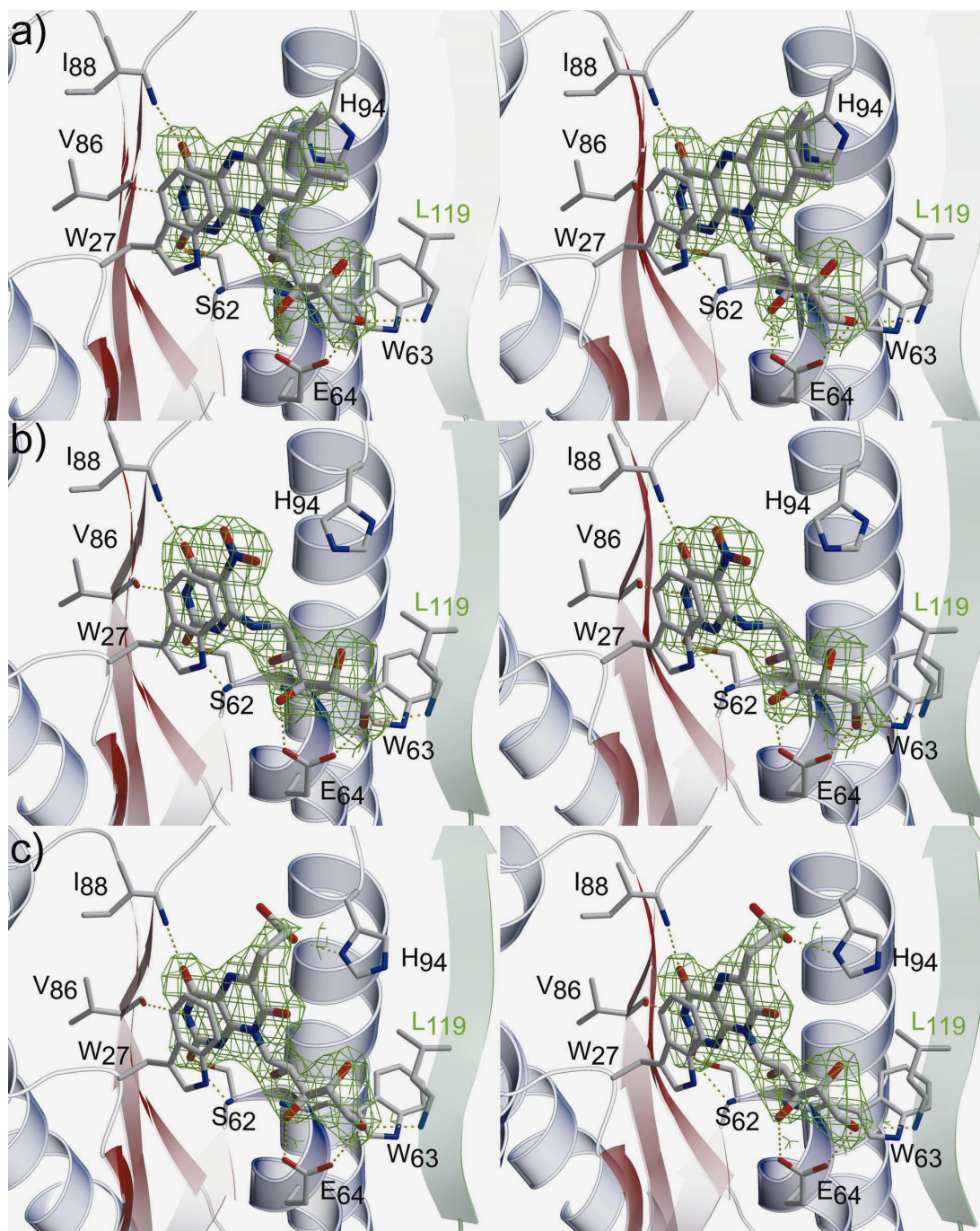


Abbildung 4.7: Stereoabbildung der Bindung von a) Riboflavin (**9**); b), 5-Nitro-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (**17**); und c) 6-Carboxyethyl-7-oxo-8-ribityllumazin (**19**) im aktiven Zentrum. Aminosäuren der benachbarten Untereinheit sind grün dargestellt. Wasserstoffbrückenbindungen zum Ligand sind gestrichelt. Die $2F_o - F_c$ Elektronendichtekarte des Liganden ist bei 1σ konturiert.

Die zweite Untereinheit steuert Reste des Stranges β_5 und der Helices α_4 und α_5 bei. Die Ribitylkette des Riboflavins befindet sich in einer hydrophilen Umgebung (W63, E64, L119), wohingegen der unpolare Isoalloxazinring von Riboflavin (**9**) in einer hydrophoben Tasche des Enzyms gebunden wird. Diese Tasche wird von den Aminosäuren W27, V86, L87, I88, H94 und H142, gebildet. Die polaren Reste des Rings werden durch Kontakte zu Haupt- und Seitenketten ausgeglichen.

Entscheidend für die Ligandbindung sind die Aminosäurepositionen W27 und H94. In einer nahezu parallelen Orientierung zum Isoalloxazinring liegen auf der einen Seite das Indolsystem des Tryptophans 27 und auf der anderen Seite das Ringsystem des Histidins 94 mit einem Abstand von je 3,2 – 3,4 Å. Diese sogenannte „Sandwichpackung“ ist essentiell für die Bindung von Riboflavin (**9**).

Wird dem Kristallisationsansatz das Substratanalogon, 5-Nitro-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (**17**) bzw. das Produktanalogon, 6-Carboxyethyl-7-oxo-8-ribityllumazin (**19**), zugegeben, so wird Riboflavin (**9**) aus dem aktiven Zentrum verdrängt und Röntgenstrukturen des jeweiligen Enzym/Ligand-Komplexes wurden zugänglich. Die Ausschnitte des aktiven Zentrums mit dem entsprechenden Liganden sind in den Abbildung 4.7b und c dargestellt. An der Bindung des aromatischen Rings bzw. der Ribitylseitenkette des jeweiligen Moleküls sind die selben Aminosäuren (W27, V86, L87, I88, H94 und H142 bzw. W63, E64 und L119) beteiligt, wie in der beschriebenen Struktur mit Riboflavin (**9**).

Der grösste Unterschied ist in der Wechselwirkung des Histidins an Position 94 zu beobachten. Der Beitrag zur „Sandwichpackung“ in der Struktur mit gebundenem Riboflavin, ist bei einem Austausch zum Substratanalogon 5-Nitro-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (**17**) nicht mehr möglich. Dieser Ligand besitzt, im Gegensatz zu Riboflavin (**9**), nur den Pyrimidinring. Durch das verkleinerte Ringsystem kann das Histidin nicht mehr mit diesem in Kontakt treten, wie Abbildung 4.7b deutlich zeigt. Noch stärker werden die Veränderungen der Histidin-Wechselwirkungen beim Ersatz durch das Produktanalogon 6-Carboxyethyl-7-oxo-8-ribityllumazin (**19**). Das Histidin 94 wird durch den Carboxyethylsubstituenten aus seiner ursprünglichen Lage verdrängt.

Durch diese komplett veränderte Position ist die Bildung einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem γ -N-Seitenkettenatom des Histidins und der Carboxylseitenkette von **19** möglich (Abbildung 4.7c).

In beiden Fällen ist die koplanare Anordnung des Histidins 94 zum aromatischen Ring des Liganden nicht mehr vorhanden.

Erwähnenswert ist eine zusätzliche Einlagerung eines anorganischen Phosphatrestes in einem Abstand von 6,2 Å zum Pyrimidinring bzw. 4,0 Å zur Nitrogruppe in der Struktur mit 5-Nitro-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (**17**). Das Phosphation repräsentiert die Bindungsstelle des zweiten Substrates, 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat (**7**), und ist durch Wechselwirkungen mit den Aminosäuren S91, T92 und R133` der benachbarten Untereinheit gebunden.

Mutationen im aktiven Zentrum der Lumazinsynthase aus *S. pombe*

Wie im vorherigen Kapitel beschrieben, spielen die Positionen W27 und H94 im Enzym aus *S. pombe* eine entscheidende Rolle bei der Bindung von Riboflavin (**9**). Es lag die Vermutung nahe, dass sich eine Änderung des Aminosäurerestes in der Positionen 27 drastisch auf das Riboflavinbindevermögen der Lumazinsynthase aus *S. pombe* auswirken würde. Durch die Einführung der unter 4.1.2.2.5 beschriebenen Punktmutationen an Position 27 im aktiven Zentrum konnte gezeigt werden, dass beim Tausch des Indolrings von Tryptophan durch andere aromatische Ringe (W27Y, W27H, W27F) bzw. beim Ersatz durch kleinere Reste (W27S, W27I, W27G) das Bindungsvermögen stark beeinflusst wird. Nur bei der W27Y Mutante konnte nach Reinigung durch eine leichte Gelbfärbung gebundenes Riboflavin (**9**) gefunden werden. Der K_D -Wert von 12 μ M bestätigt die schwächere Affinität der Mutante zu Riboflavin (**9**) im Vergleich zum Wildtypprotein (4.1.2.2.5). Bei allen anderen Mutanten konnte kein gebundenes Riboflavin (**9**) gefunden werden. Die Röntgenstruktur der W27G Mutante bestätigte das Ergebnis. Im aktiven Zentrum war kein Ligand vorhanden.

Der Sequenzvergleich in Abbildung 4.14 zeigt jedoch, dass die Position W27 in fünf weiteren Lumazinsynthesesequenzen mit einem Tryptophan belegt ist. Alternativ befindet sich an dieser Stelle ein Phenylalanin in den anderen 11 Sequenzen. Keine dieser Enzyme besitzt jedoch eine derart starke Affinität zu Riboflavin (**9**), wie das Protein aus *S. pombe*. Lediglich für das Enzym aus *S. cerevisiae* konnte ebenfalls ein geringes Bindevermögen für Riboflavin festgestellt werden ($K_D(\mathbf{9})$: 3,9 μM , vgl. 4.1.2.2.5.).

Da das Vorhandensein der Aminosäuren Tryptophan/Histidin aufgrund der hohen Konservierung in allen Sequenzen in diesen Positionen nicht die Ursache für das Riboflavinbindevermögen sein kann, wurde die koplanare Lage dieser Reste genauer betrachtet. Als Vergleich wurde das Enzym aus der Hefe *S. cerevisiae* mit bekannter pentamerer Struktur herangezogen (Meining et al., 2000). Zwischen diesen beiden Enzymen besteht eine sehr hohe Sequenzhomologie (47,4 % Identity, 60,0 % Similarity). Abbildung 4.6 und Abbildung 4.8 zeigen, dass auch die Quartärstrukturen der Lumazinsynthasen aus *S. cerevisiae* und *S. pombe* sehr ähnlich sind. Abbildung 4.8 zeigt eine Überlagerung der aktiven Zentren der Lumazinsynthasen aus *S. pombe* (rot) mit gebundenem Riboflavin (gelb) und der Struktur des Enzyms aus *S. cerevisiae* (blau) mit gebundenem Liganden 5-(6-D-Ribitylamino-2,4-dihydroxypyrimidin-5-yl)-1-pentyl-phosphonat (**16**, grün). Es ist deutlich zu sehen, dass sich die Aminosäurereste W27 (*S. pombe*) bzw. W26 (*S. cerevisiae*) in einer nahezu identischen Position befinden, und die Positionen der beiden Liganden fast perfekt aufeinander passen.

Auffallend ist die stark voneinander abweichende Lage der Histidinreste in Position 94 (*S. pombe*) bzw. 97 (*S. cerevisiae*). Die Beweglichkeit des Histidins im aktiven Zentrum des Enzym aus *S. pombe* konnte schon bei der Bindung unterschiedlicher Liganden beobachtet werden (Abbildung 4.7). Diese Mobilität ist beim Enzym aus *S. cerevisiae* nicht möglich, da sie zu einem sterischen Konflikt zwischen den Aminosäureseitenketten H97 und I101 führen würde.

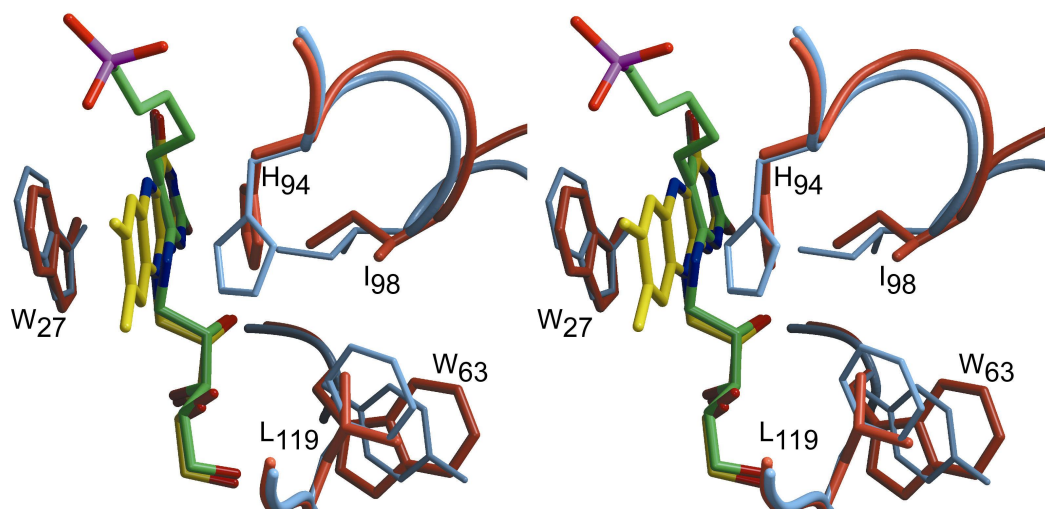


Abbildung 4.8: Aktive Zentren der *S. pombe* Lumazinsynthase (rot) mit gebundenem Riboflavin (**9**, gelb) und der Lumazinsynthase aus *S. cerevisiae* (blau) mit gebundenem 5-(6-D-Ribitylamino-2,4-dihydroxypyrimidin-5-yl)-1-pentyl-phosphonat (**16**, grün) in stereodargestellter Überlagerung. Die Nummerierung bezieht sich auf die Sequenz aus *S. pombe*.

Der Grund ist, dass das I101 beim Enzym aus *S. cerevisiae* um etwa 1 Å (bezogen auf die C_{α} -Atome) weiter in die hydrophobe Bindungstasche hineinragt als das entsprechende I98 beim Enzym aus *S. pombe*. Dass diese Verschiebung durch eine Konformationsänderung bei der Riboflavinbindung hervorgerufen wird, ist aufgrund der Tatsache, dass das Isoleucin in beiden Fällen nicht direkt zum aktiven Zentrum, sondern zum Protein-Rückgrat gehört, unwahrscheinlich. Vielmehr scheint ein Einfluss der unmittelbaren Umgebung, in der sich das aktive Zentrum befindet, logischer. Abbildung 4.8 zeigt den Unterschied in zwei Positionen: das Tryptophan 63 in *S. pombe* ist durch ein Tyrosin (Position 61) und Leucin 119 durch ein Phenylalanin (Position 122) in *S. cerevisiae* ersetzt. Die erhöhte Raumerfüllung dieser Aminosäuren könnte ein Grund für die unterschiedliche Lage des Isoleucins an Position 98 (*S. pombe*) bzw. I101 (*S. cerevisiae*) sein. Zur genauen Analyse dieser Hypothese aus dem Strukturvergleich wurden die Mutationen W63Y, L119F und W63Y/L119F in die Lumazinsynthase aus *S. pombe* eingeführt.

Die Mutante L119F konnte mittels eines PCR-Schrittes aus dem Wildtypplasmid pNCO-SSP-Lusy gewonnen werden. Für die Mutanten W63Y und W63Y/L119F wurde die unter 3.1.1.2 beschriebene Methode einer dreistufigen PCR angewendet (Fischer, 1997). Die Kontrolle der eingeführten Mutationen erfolgte über PCR-Screen mit anschliessendem spezifischen Restriktionsverdau und DNA-Sequenzierung des isolierten Plasmids. Nach Expression (XL1-pNCO-System) und Reinigung (siehe 3.1.2.2) konnten Kristalle erhalten werden, deren Röntgenstrukturen bis zu einer Auflösung von 3,1 Å (W63Y und L119F Mutante) bzw. 2,7 Å (W63Y/L119F Mutante) verfeinert werden konnten. Abbildung 4.9 zeigt die Überlagerung der aktiven Zentren der Strukturen der Mutanten W63Y (grün), L119F (lila), W63Y/L119F (dunkelblau) mit dem Wildtypenzym aus *S. pombe* (rot) mit gebundenem Riboflavin (**9**, gelb) und dem Enzym aus *S. cerevisiae* mit gebundenem 5-(6-D-Ribitylamino-2,4-dihydroxypyrimidin-5-yl)-1-pentyl-phosphonat (**16**, beides hellblau). In allen drei Mutanten des Enzyms aus *S. pombe* liegt das I98 jetzt an ähnlicher Stelle, wie das I101 des Enzyms aus *S. cerevisiae*. Der Einfluss dieser Aminosäure auf die Position H94 bzw. H97 wird deutlich. Die C_β-Atome der Isoleucine der Mutanten aus *S. pombe* und der Lumazinsynthase aus *S. cerevisiae* nehmen die Position des C_γ1-Atoms des Isoleucins des Wildtypenzym aus *S. pombe* ein. Diese Beobachtung steht im Einklang mit der beobachteten 1 Å-Verschiebung zwischen den C_α-Atomen der Isoleucine beider Wildtypstrukturen. Die Lage des I98 C_β-Atoms im Wildtyp aus *S. pombe* ist im Vergleich zum Wildtyp aus *S. cerevisiae* und zu den Mutanten W63Y und L119F um 1,3 Å und im Vergleich zur Doppelmutante W63Y/L119F um 1,6 Å verschoben. Die Bestimmung der Dissoziationskonstanten der Mutanten W63Y (K_D: 5,0 μM) und W63Y/L119F (K_D: 4,4 μM) aus *S. pombe* durch Fluoreszenzquench-Titrations konnten diese strukturelle Angleichung des aktiven Zentrums an das des Enzyms aus *S. cerevisiae* (K_D: 3,9 μM) bestätigen.

Erstaunlicherweise war keine Veränderung bei der Mutante L119F (K_D: 0,3 μM) zu beobachten, welche auch als einzige leicht gelb gefärbt isoliert wurde. Eine Erklärung könnte ein zusätzlich auftretender Van-der-Waals-Kontakt zwischen H94 und F119 in dieser Mutante sein.

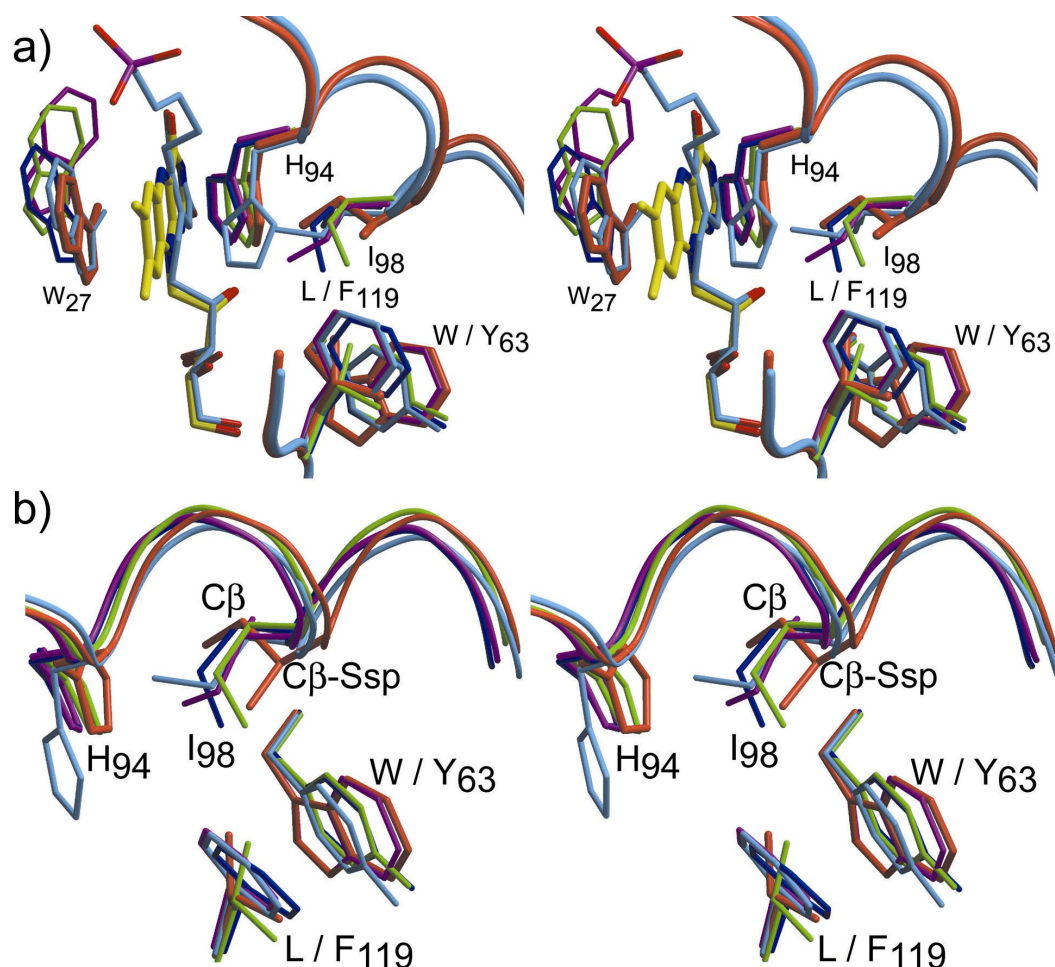


Abbildung 4.9: Stereodarstellungen: a) Überlagerung der aktiven Zentren der Lumazinsynthase aus *S. pombe* (rot) mit gebundenem Riboflavin (**9**, gelb), aus *S. cerevisiae* (hellblau), der W63Y-Mutante (grün), der L119F-Mutante (lila) und der W63Y/L119F-Mutante (dunkelblau). b) Ausschnitt aus a) mit direkter Aufsicht auf die Aminosäure-Position 98. Die Nummerierung bezieht sich auf die Sequenz aus *S. pombe*.

Die Ergebnisse haben gezeigt, dass die Lage des Histidins 94 die entscheidende Rolle bei der Riboflavinbindung spielt. Seine Position wird jedoch durch einen komplexen Vorgang der räumlichen Veränderung an anderer Position (I98) bestimmt, die wiederum durch eine dritte Stelle (W63, L119) hervorgerufen wird. Man kann den Rest I98 als Relais bezeichnen, der räumliche Veränderungen einer Aminosäureposition (W63, L119) an eine zum Ort des Geschehens nicht benachbarte Position (H94) weitergibt.

4.1.1.3 Lumazinsynthese aus dem thermophilen Archaeobakterium *Methanococcus jannaschii*

Bei der Anzucht des Expressionsstammes für die Lumazinsynthese aus *M. jannaschii* (XL1-pNCO-MJ-Lusy) zeigte sich eine sehr schwache Expression. Daher wurde das Plasmid isoliert und in das Expressionssystem M15[pREP4] transformiert (3.1.2.1). Nach Anzucht mit Induktion bei einer Zelldichte (OD_{600}) von 0,6 wurde fünf Stunden weiter bei 37 °C inkubiert und anschliessend geerntet. Die Expression konnte dadurch deutlich verbessert werden.

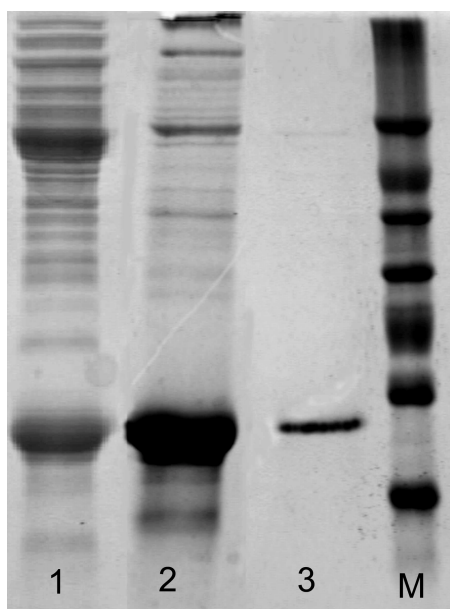


Abbildung 4.10:
Oben: SDS-Polyacrylamidgel: Lumazinsynthese aus *M. jannaschii*. 1, Rohextrakt; 2, Protein nach Hydroxyapatit-Säule, 3, Protein nach S400-Säule, M, Molekulargewichtsmarker.

Der Versuch eine Hitzefällung in das Reinigungsprotokoll, ähnlich wie bei der thermostabilen Lumazinsynthese aus *A. aeolicus*, einzuführen, führte nicht zu befriedigenden Ergebnissen, da schon bei Temperaturen ab 60 °C etwa 50 % des Enzyms präzipitierten.

Die Reinigung erfolgte daher über zwei Säulen. Nach Affinitätschromatographie über Hydroxyapatit (Spur 2) und Gelfiltration (Sephacryl S400, Spur 3) zeigt das SDS-Gel in Abbildung 4.10 nur noch die typische Lumazinsynthesebande bei etwa 16 kDa.

Die Überprüfung der Aminosäuresequenz durch N-Terminale Sequenzierung (Edman-Abbau) ergab eine Aminosäureabfolge von MVLMLVNLGFV. Diese Sequenz ist identisch mit den ersten zehn Aminosäuren, die aus der Gensequenz übersetzt werden können. Eine posttranslationale Methioninabspaltung konnte ausgeschlossen werden.

Zur weiteren Charakterisierung der Lumazinsynthase wurde die Monomermasse mittels Massenspektrometrie bestimmt. Das Ergebnis von 15645 Da entsprach exakt dem aus der Aminosäuresequenz berechneten Molekulargewicht. Somit konnten weitere Veränderungen der Aminosäuresequenz ausgeschlossen werden. Hinweise auf die Quartärstruktur konnten mit Hilfe der Gelfiltration, elektronenmikroskopischen Untersuchungen und analytischer Ultrazentrifugation gewonnen werden. Das Elutionsverhalten bei der Gelfiltration wies auf eine ikosaedrische Quartärstruktur hin. Durch die in Abbildung 6.2A (Anhang) abgebildeten elektronenmikroskopische Aufnahme konnte dieses Ergebnis bestätigt werden. Die nach Negativkontrastierung mit Uranylacetat sichtbaren Partikel zeigten die, für ikosaedrische Lumazinsynthase typischen, „Ringe“ mit einem Durchmesser von etwa 160 Å. Versuche, die Quartärstruktur mittels Sedimentationszentrifugations- und Gleichgewichtssedimentationszentrifugations-Experimenten zu untersuchen, führten zu widersprüchlichen Ergebnissen. Der Sedimentationskoeffizient belief sich auf etwa 11 S, was für eine Lumazinsynthase mit ikosaedrischer Struktur einen ungewöhnlich niedrigen Wert darstellt. Zum Vergleich wurde für die Lumazinsynthase aus *B. subtilis* ein Wert von 26 S festgestellt. Die Messungen folgten keinem homogenen System, wie in Abbildung 4.11 links deutlich zu sehen ist. Dadurch wird die Fehlerbreite dieses Ergebnisses wesentlich erhöht. Abbildung 4.11 rechts zeigt einen Zentrifugationslauf einer Mischung aus den Lumazinsynthasen aus *B. subtilis* und *M. jannaschii*. Die Sedimentationsgeschwindigkeit für das Enzym aus *B. subtilis* befand sich mit einem Sedimentationskoeffizienten von etwa 26 S in einem für ikosaedrische Lumazinsynthasen normalen Bereich, während das Enzym aus *M. jannaschii* wiederum wesentlich langsamer und inhomogen sedimentierte. Auch bei den Gleichgewichtsläufen zeigte das Protein kein ideales Verhalten. Trotzdem konnte aus den Daten ein ungefähres Molekulargewicht von 1 MDa bestimmt und damit die ikosaedrische Struktur mit 60 Untereinheiten bestätigt werden.

Die Wiederholung der Experimente mit dem die Struktur stabilisierenden Substratanalogon, 5-Nitro-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (**17**), führte zu keiner Verbesserung der Qualität der Ergebnisse. Ausgeschlossen werden konnte der Verdacht, dass, aufgrund von Lagerung verursachter Dissoziation des Proteins, inhomogene Lösungen vermessen wurden, da auch frisch eluierte Fraktionen der Gelfiltration das gleiche Verhalten zeigten.

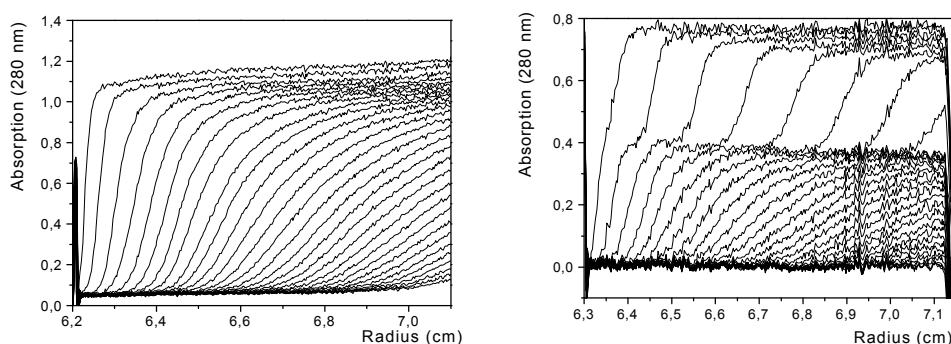


Abbildung 4.11: Links: Sedimentationsgeschwindigkeitslauf der Lumazinsynthase aus *M. jannaschii*. Rechts: Sedimentationsgeschwindigkeitslauf einer 1:1 Mischung der Lumazinsynthasen von *M. jannaschii* und *B. subtilis*.

Denkbar ist, dass das Protein während der Zentrifugation dissoziiert. Dieses Auseinanderbrechen des Kapsides müsste jedoch reversibel sein, da die zentrifugierten Proben auf der Gelfiltration ein normales Verhalten zeigten und bei 130 ml eluierten. Ein Grund für die Dissoziation könnte der verkürzte N-Terminus des Enzyms im Vergleich zum Enzym aus *B. subtilis* sein (vgl. 4.1.1.5 Diskussion), Diese Verkürzung der Aminosäuresequenz (*M. jannaschii*: 141, *B. subtilis*: 154) spiegelt sich im Molekulargewicht wieder (*M. jannaschii*: 15645 Da, *B. subtilis*: 16286 Da) und kann zu einer geringfügigen Verkleinerung des Kapsidradius` führen. Da der Radius stark auf die Sedimentationsgeschwindigkeit und somit auch auf den -koeffizienten einwirkt, kann auch hier der Grund für den stark veränderten Wert gesehen werden. Eine endgültige Klärung der Quartärstruktur ist in diesem Fall nur durch Röntgenstrukturanalyse möglich.

4.1.1.4 Lumazinsynthesen aus pathogenen Mikroorganismen und der Pflanze *A. thaliana*

Neben der Lumazinsynthase aus der Hefe *S. pombe*, deren Struktur mittels Röntgendiffraktion eindeutig der Gruppe der pentameren Enzyme zugeordnet werden konnte (4.1.1.2) und dem Enzym aus *M. jannaschii*, dessen strukturelle Charakterisierung ausführlich in 4.1.1.3 beschrieben wurde, wurden weitere fünf Enzyme aus wichtigen pathogenen Mikroorganismen (*H. influenzae*, *M. tuberculosis*, *N. meningitidis*, *S. aureus* und *S. pneumoniae*), ein weiteres Enzym aus einem thermophilen Mikroorganismus (*P. furiosus*) und die Lumazinsynthase aus der Pflanze *A. thaliana* auf ihre Quartärstrukturen untersucht. Dabei wurde das Retentionsverhalten der Enzyme mit bekannter Struktur aus *B. subtilis*, *E. coli*, *S. oleracea*, *S. cerevisiae*, *A. aeolicus* (4.1.1.1) und *S. pombe* (4.1.1.2) auf den Gelfiltrationsmaterialien Superdex 200 und Sephacryl S400 als Vergleich herangezogen. Zusätzlich wurde eine Untersuchung mittels Elektronenmikroskopie nach Negativkontrastierung durchgeführt. Bei dieser Methode ist es möglich, ikosaedrische Lumazinsynthesen in Form von 160 Å Partikeln zu detektieren.

In Tabelle 4.1 ist die Anzahl der, in der Durchführung (3.1.2.2, 3.1.2.3) oder in 4.1.1.1, 4.1.1.2 und 4.1.1.3 ausführlich beschriebenen, Reinigungsschritte angegeben.

Die meisten Lumazinsynthesen konnten aus dem Rohextrakt über ein Zweisäulensystem (vgl. 3.1.2.2) mit hoher Reinheit isoliert werden. Nach einer Anionenaustauschchromatographie mit einem starken (Q-Sepharose) oder schwachen (DEAE-Material) Anionenaustauscher oder einer Affinitätschromatographie über Hydroxyapatitmaterial wurde im zweiten Säulenschritt bei allen Isolierungen eine Gelfiltration durchgeführt.

Nach diesem Protokoll konnten die Enzyme aus *H. influenzae*, *S. aureus* und *S. pneumoniae* über zwei Reinigungsschritte (Q-Sepharose und Gelfiltration, 3.1.2.2) aus dem Rohextrakt isoliert werden. Aufgrund des Retentionsverhaltens auf der Sephacrylsäule konnte allen drei Enzymen eine ikosaedrische Struktur zugeordnet werden.

Die elektronenmikroskopische Aufnahmen des entsprechenden Enzyms als 160 Å Partikel nach Negativkontrastierung mit Uranylacetat sind in Abbildung 6.2B, C bzw. D im Anhang abgebildet.

Die Enzyme, bei denen Besonderheiten während der Reinigung auftraten, sind im folgenden ausführlicher beschrieben.

Tabelle 4.1: Übersicht über die Charakterisierung aller untersuchten Lumazinsynthasen.

Herkunft des Enzyms	Säulenschritte ¹	Quartärstruktur	Elektronenmikroskopie: 160 Å Partikel sichtbar:	Bemerkung
<i>B. subtilis</i>	2	Ikosaeder	ja	vgl. 4.1.1.1
<i>E. coli</i>	2	Ikosaeder	ja	
<i>A. aeolicus</i>	1	Ikosaeder	ja	
<i>S. oleracea</i>	2	Ikosaeder	ja	
<i>S. cerevisiae</i>	3	Pentamer	nein	
<i>S. pombe</i>	2	Pentamer	nein	vgl. 4.1.1.2
<i>M. jannaschii</i>	2	Ikosaeder	ja	vgl. 4.1.1.3
<i>H. influenzae</i>	2	Ikosaeder	ja	-
<i>S. aureus</i>	2	Ikosaeder	ja	-
<i>S. pneumoniae</i>	2	Ikosaeder	ja	-
<i>M. tuberculosis</i>	5	Pentamer	nein	im folgenden ausführlich beschrieben
<i>N. meningitidis</i>	2	Pentamer	nein	
<i>P. furiosus</i>	2	Ikosaeder	ja	
<i>A. thaliana</i>	3	Ikosaeder	ja	

¹: vgl. 3.1.2.2 und 3.1.2.3

Die Isolierung der Lumazinsynthase aus *A. thaliana* konnte erst durch ein Dreisäulensystem über Anionenaustauschchromatographie, Hydroxyapatitmaterial und Gelfiltration erreicht werden. Aufgrund des Retentionsvolumens der Gelfiltration (Sephacryl S400, 130 ml) konnte dieses Enzym den Lumazinsynthasen mit ikosaedrischer Struktur zugeordnet werden. Bei Untersuchungen mit dem Elektronenmikroskop unter Negativkontrastierung mit Uranylacetat war das Enzym in Form der typischen 160 Å Partikel zu sehen (Abbildung 6.2.E, Anhang).

Bei dem Enzym aus *M. tuberculosis* erwies sich die Reinigung als problematisch, da, wie das SDS-Gel in Abbildung 4.12 zeigt, das Enzym erst nach vier Reinigungsschritten aus dem Rohextrakt (Spur 1) isoliert werden konnte. Nach dem Einsatz von zwei unterschiedlich starken Anionenaustauschern (Spuren 2 und 3) konnte im vorletzten Schritt ein erheblicher Teil der Verunreinigungen durch

eine Red-Sepharose-Säule abgetrennt werden (Spuren 3 und 4). Durch die abschliessende Gelfiltration mittels Superdex-200-Material konnten die letzten Fremdproteine entfernt werden (Spur 5). Durch das Elutionsvolumen von 198 ml ergab sich aus der Eichgerade (2.2.3.1) ein Molekulargewicht von 79 kDa. Bei einem berechneten Monomergewicht von 15901 Da ergibt sich so eine pentamere Quartärstruktur.

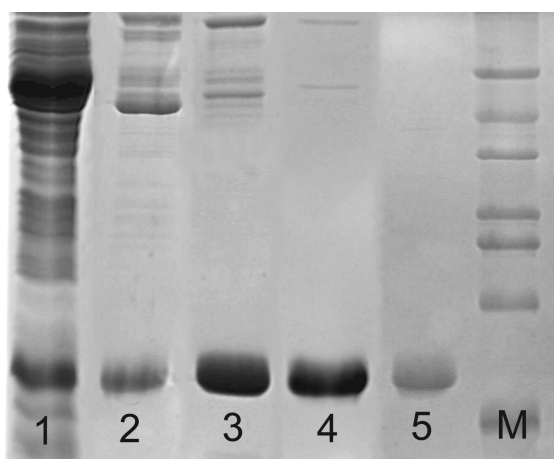


Abbildung 4.12: SDS-Polyacrylamidgel der Lumazinsyntheseisolierung aus *M. tuberculosis*. 1, Rohextrakt; 2, Protein nach Q-Sepharose-Säule, 3, Protein nach MonoQ-Säule; 4 Protein nach Red Sepharose-Säule; 5 Protein nach Superdex-200-Säule M, Molekulargewichtsmarker

Auch die Reinigungsstrategie von *N. meningitidis* musste neu entwickelt werden (3.1.2.3). Der gängige Einsatz einer Anionenaustauschersäule (Q-Sepharose) führte zu dem Ergebnis, dass das Protein auf der Säule zu stark band und nicht mehr eluiert werden konnte. Der berechnete pI-Wert dieses Enzyms von 4,09 ergibt eine daraus errechnete negative Ladung von $-14,92$ bei einem pH-Wert von 7,0. Dies erklärt die in diesem Fall zu starke Affinität zum Anionenaustauschermaterial. Aufgrund dieser Erkenntnis wurde der Einsatz einer Hydroxyapatit-Säule in das Reinigungsprotokoll miteinbezogen, die den gewünschten Reinigungseffekt erzielte. Der zweite Reinigungsschritt über Superdex 200 Material führte zur Isolierung des Proteins mit hoher Reinheit. Das Elutionsverhalten (196 ml) auf der Gelfiltrationssäule war ähnlich zu dem Enzym aus *M. tuberculosis*. Die Berechnung des Molekulargewichts von 88 kDa mit Hilfe der Eichgerade führt bei einem errechneten Monomergewicht von 17073 Da zu einer pentameren Struktur.

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen der Lumazinsynthasen aus *N. meningitidis* und *M. tuberculosis* gaben keinerlei Hinweise auf ikosaedrische 60mere in Form von 160 Å Partikeln. Dies ist eine weitere Bestätigung des Ergebnisses, dass beide Enzyme Multimere aus weniger als 60 Untereinheiten bilden. Die Bildung von Pentameren ist bis zu diesem Zeitpunkt nur von Hefen und dem Enzym aus *B. abortus* bekannt (Braden et al., 2000; Meining et al., 2000; Gerhardt et al., 2002). Bei einem Vergleich des Elutionsverhaltens der strukturell aufgeklärten Enzyme aus *S. cerevisiae* (4.1.1.1) und *S. pombe* (4.1.1.2) auf dem Gelfiltrationsmaterial Superdex 200 mit der Retentionsverhalten der Enzyme aus *N. meningitidis* und *M. tuberculosis*, ergibt sich eine nahezu identische Retention. Dies bestätigt die Annahme einer pentameren Struktur für diese beiden Lumazinsynthasen.

Bei der Reinigung der rekombinanten Lumazinsynthase aus *P. furiosus* ergab sich das genau umgekehrte Problem verglichen mit der Lumazinsynthase aus *N. meningitidis*. Bei einem berechnetem pI-Wert von 7,25 ergibt sich ein nahezu ungeladener Zustand bei pH 7,0 (-0,25). Der Zellaufschluss mittels Ultraschall in einem Standard-Puffer ergab eine sehr schlechte Ausbeute an löslichem Protein, das beim ersten Zentrifugationsschritt, der bei 4 °C (Standard) durchgeführt wurde, durch weitere Herabsetzung der Löslichkeit bei niedrigen Temperaturen vollständig verloren ging. Anzuchten bei einer erhöhten Wachstumstemperatur (42 °C) ergaben keine erhöhte Löslichkeit des Enzyms (Abbildung 4.13, Spuren 4 und 8).

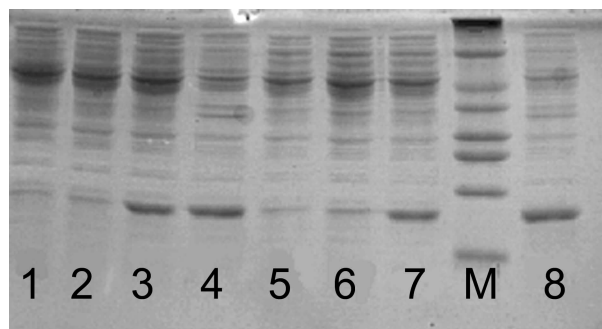


Abbildung 4.13: SDS-Polyacrylamidgel: Lumazinsynthase aus *P. furiosus* bei verschiedenen Temperaturen angezogen und verschiedenen pH-Werten in 20 mM Kaliumphosphat aufgeschlossen. 1: 37 °C, pH 6,0; 2: 37 °C, pH 7,0; 3: 37 °C, pH 8,0; 4: 37 °C, Gesamtprotein; 5: 42 °C, pH 6,0; 6: 42 °C, pH 7,0; 7: 42 °C, pH 8,0; 8: 42 °C, Gesamtprotein.

Durch Zellaufschlüsse bei verschiedenen pH-Werten zeigte sich jedoch eine eindeutig erhöhte Löslichkeit bei pH 8,0. (Abbildung 4.13, Spuren 3 und 7).

Aufgrunddessen wurde das Reinigungsprotokoll derart modifiziert, dass sämtliche Reinigungsschritte bei pH 8,0 und bei Raumtemperatur durchgeführt wurden (3.1.2.2). Auch alle Zentrifugationsläufe während oder nach der Reinigung wurden bei 20 °C durchgeführt. Durch diese Modifikationen konnte das Enzym durch zwei Chromatographieschritte (Q-Sepharose und Sephacryl S400) aus dem Rohextrakt, isoliert werden. Das Elutionsverhalten der Gelfiltration wies auf eine ikosaedrische (60mere) Struktur hin, die durch die Anwesenheit des Enzyms in Form von typischen 160 Å Partikeln in der elektronenmikroskopischen Aufnahme in Abbildung 6.2F im Anhang bestätigt werden konnte.

Die Transformation des Expressionsplasmides (pNCO-PF-Lusy) in ein anderes Expressionssystem (M15[pREP4]), wie sie bei der Lumazinsynthese aus *M. jannaschii* durchgeführt wurde, lieferte zwar eine höhere Expressionsrate im Rohextrakt, trotzdem blieb die Ausbeute nach der Reinigung vergleichbar gering.

4.1.1.5 Diskussion

Neben den ikosaedrischen Lumazinsynthasen aus *B. subtilis*, *E. coli*, *S. oleracea* und *A. aeolicus* und dem pentameren Enzymen aus *S. cerevisiae* und *S. pombe*, deren Strukturen mittels Röntgenstrukturanalyse oder biochemischer Methoden aufgeklärt wurden, wurden weitere fünf Enzyme aus pathogenen Mikroorganismen, zwei Enzyme aus thermophilen Mikroorganismen und die Lumazinsynthase aus der Pflanze *A. thaliana* auf ihre Quartärstruktur untersucht. Dabei wurde das Retentionsverhalten der bekannten Enzyme auf den Gelfiltrationsmaterialien Sephacryl S400 und Superdex 200 als Vergleich herangezogen. Die Möglichkeit ikosaedrische Kapside im Elektronenmikroskop nach Negativkontrastierung mittels Uranylacetat sichtbar zu machen, konnte die Ergebnisse aus der Gelfiltration untermauern.

Für das Enzym aus der Hefe *S. pombe* konnten für das Wildtypenzym Röntgenstrukturen in Komplex mit verschiedenen Liganden gelöst werden. Daneben war es möglich, ligandfreie aktive Zentren durch Röntgenstrukturen verschiedener Mutanten darzustellen. Das Enzym aus *S. pombe* besitzt, wie sein Orthologes aus *S. cerevisiae*, eine pentamere Struktur. Überraschenderweise wurde eine auffällig hohe Affinität zu Riboflavin (**9**) gefunden. Bei keiner anderen Lumazinsynthase wurde eine derart starke Riboflavinbindung beobachtet. Lediglich das Enzym aus *S. cerevisiae* wurde aus der Reinigung leicht gelblich isoliert und eine schwache Affinität für Riboflavin konnte nachgewiesen werden. Nach Aminosäuresequenzvergleich (Abbildung 4.14) und Überlagerung der Strukturen aus *S. pombe* und *S. cerevisiae* in Abbildung 4.6 und Abbildung 4.8 konnten die Unterschiede in der Ligandbindung in beiden aktiven Zentren deutlich gemacht werden. Als Auslöser für das erhöhte Ligandbindevermögen im Enzym aus *S. pombe* wurden die Positionen W63, H94, I98, und L119 verantwortlich gemacht. Durch Einzelaminosäureaustausch (W63Y, L119F) und die Konstruktion einer Doppelmutante (W63Y/L119F) wurde die Sequenz im aktiven Zentrum aus *S. pombe* der Sequenz aus *S. cerevisiae* angeglichen. Die Bestimmung der Dissoziationskonstanten der Mutanten und deren Röntgenstrukturen lieferten den endgültigen Beweis: diese Positionen haben einen Einfluss auf die Affinität zum

Liganden. Die K_D -Werte der Mutanten näherten sich dem Wert des Wildtypenzym aus *S. cerevisiae* an. Die Strukturen in Abbildung 4.9 zeigten keine gebundenen Liganden im aktiven Zentrum.

Neben diesen pentameren Enzymen aus Hefen konnten weitere zwei bakterielle Lumazinsynthasen (*N. meningitidis* und *M. tuberculosis*) gefunden werden, bei denen die Ergebnisse auf eine pentamere Struktur hinweisen.

Für die Zusammenlagerung von 12 Pentameren zu einem Ikosaeder wird unter anderem die Loopregion zwischen den Helices α_4 und α_5 verantwortlich gemacht, die in Abbildung 4.14 deutlich zu sehen ist. Die Region ermöglicht mehrere Kontakte zu benachbarten Pentameren. Der Aminosäuresequenzvergleich Abbildung 4.14 zeigt, dass das bei ikosaedrischen Lumazinsynthasen konservierte Motiv G(T/G)K(A/H)GN bei Enzymen mit pentamerer Struktur durch Insertionen gestört ist bzw. bei der Sequenz aus *B. abortus* fehlt. Die auftretenden Insertionen reichen von einer Aminosäure bei *S. pombe* (L), zwei Aminosäuren bei *M. grisea* (VI), bis zu vier Aminosäuren (IDEA) bei *S. cerevisiae*. Die Sequenz der Lumazinsynthase aus *M. tuberculosis* weist in dieser Region ebenfalls eine Insertion von zwei Aminosäuren (VI) auf und ist direkt in Nachbarschaft zu den vier bekannten pentameren Enzymen aus *M. grisea*, *S. cerevisiae*, *S. pombe* und *B. abortus* angeordnet. Sowohl die beobachtete Insertion als auch die Lage der Sequenz innerhalb der Abbildung stehen im Einklang mit dem Ergebnis aus den biochemischen Untersuchungen, dass das Enzym eine pentamere Struktur besitzt. Oberhalb anschliessend an diesen „pentameren Cluster“ liegt die Sequenz des Enzyms aus *N. meningitidis*. Dem Enzym wurde aufgrund des Retentionsverhaltens auf der Gelfiltrationssäule ebenfalls eine pentamere Struktur zugeordnet. Die Aminosäuresequenz zeigt in der oben diskutierten Loopregion kein konserviertes Motiv. Dies könnte, trotz fehlender Insertionen in diesem Bereich, ein weiterer Hinweis auf eine pentamere Struktur sein. Auffällig ist die extreme Anhäufung saurer Aminosäuren im Bereich des C-Terminus. Unter den letzten zehn Aminosäuren befinden sich fünf Glutaminsäuren und eine Asparaginsäure. Im Vergleich zur Gesamt-Asparagin- und Glutaminsäureanzahl der Lumazinsynthase aus *B. subtilis* (D: 8, E: 9) besitzt das Enzym aus *N. meningitidis* zwar eine Asparaginsäure weniger (D: 7), die Anzahl der Glutaminsäuren ist jedoch mehr als verdoppelt (E: 19).

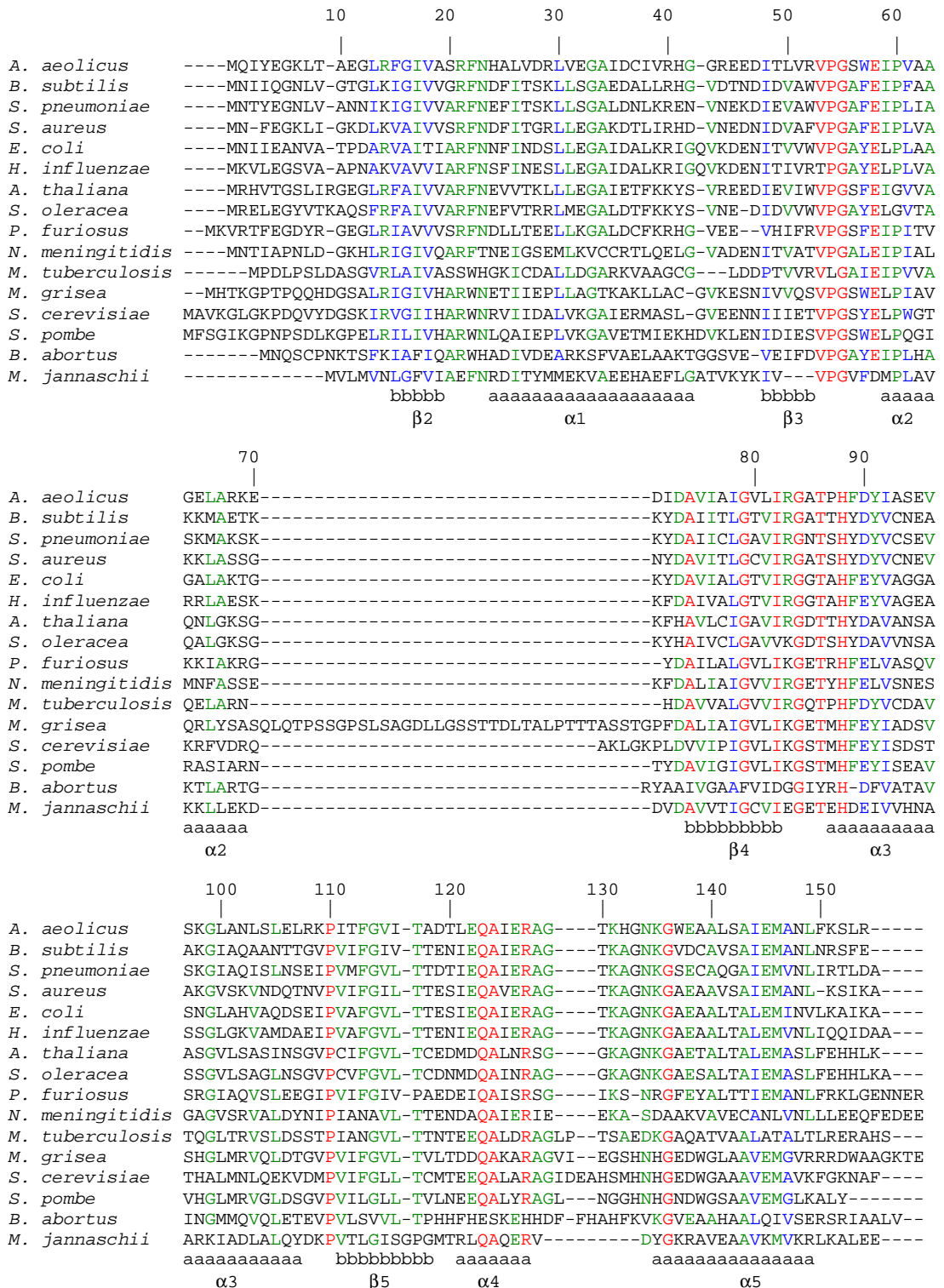


Abbildung 4.14: Sequenzvergleich von Lumazinsynthasen aus verschiedenen Mikroorganismen und Pflanzen. Sekundärstrukturelemente beziehen sich auf die Struktur des Enzyms aus *S. pombe*, die Nummerierung auf die Sequenz aus *B. subtilis*. Rot: hochkonservierte, grün: konservierte Reste, blau: Aminosäuren mit gleicher Polarität.

Da sich die starke negative Ladung auch in der Reinigung bemerkbar machte, ist eine Enzymoberfläche mit stark sauren Regionen anzunehmen. Der C-Terminus liegt bei allen Lumazinsynthasen mit bekannter Struktur ebenfalls auf der Proteinoberfläche. Eine stark negativ geladene Oberfläche könnte sich ungünstig auf die Anlagerung von 12 Pentameren zu einem Ikosaeder auswirken.

Die Lage der N-terminalen Aminosäuren spielt ebenfalls eine entscheidende Rolle bei der Bildung eines 60meren Kapsides. Innerhalb eines Ikosaeders agieren die N-terminalen Aminosäuren als fünfter β -Faltblattstrang (β_1) mit dem zentralen viersträngigen Faltblatt einer benachbarten Untereinheit. Dadurch werden starke Pentamer-Pentamer-Kontakte ausgebildet und eine Formation zum Ikosaeder ermöglicht. In den Enzymen mit bekannter pentamerer Struktur (*S. cerevisiae*, *S. pombe*, *M. grisea* und *B. abortus*) ist die Ausbildung dieses fünfsträngigen β -Faltblattes durch das Vorhandensein eines oder zweier Prolinreste in der N-terminalen Region (Abbildung 4.14) erschwert. Prolin bewirkt eine Richtungsänderung des N-Terminus und die Anlagerung an die benachbarte Untereinheit ist nicht mehr möglich, wie Abbildung 4.6 zeigt. Dadurch ist die Ausbildung des fünfsträngigen β -Faltblattes nicht mehr möglich. Auch bei den als Pentamer postulierten Enzymen aus *N. meningitidis* und *M. tuberculosis* sind Proline in der N-terminalen Sequenz zu finden – eine weitere Bestätigung der postulierten pentameren Quartärstrukturen.

Die anderen drei Lumazinsynthasen aus den pathogenen Mikroorganismen *H. influenzae*, *S. aureus* und *S. pneumoniae* zeigten das Verhalten von ikosaedrischen Enzymen. Auch die elektronenmikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 6.2 bestätigten die 60mere Quartärstruktur. Die Aminosäuresequenzen dieser Enzyme befinden sich im Sequenzvergleich in Abbildung 4.14 in unmittelbarer Nachbarschaft zu den ikosaedrischen Enzymen aus *B. subtilis*, *E. coli* und *A. aeolicus*. Das konservierte Motiv zwischen α_4 und α_5 ist bei allen in Form von GTKAGN vorhanden.

Die Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz der untersuchten pflanzlichen Lumazinsynthase aus *A. thaliana* zu der aus Spinat spiegelt sich ebenfalls im Sequenzvergleich wieder. Beide Sequenzen liegen direkt nebeneinander.

Die Sequenz aus *A. thaliana* besitzt die konservierte Region GGKAGN, die identisch zur Spinatsequenz ist und ein essentielles Merkmal für die Ausbildung einer höhersymmetrisch ikosaedrischen Raumstruktur darstellt. Dadurch wird die aus den Ergebnissen gezogene Annahme einer ikosaedrischen Quartärstruktur untermauert.

Die drei Enzymsequenzen aus thermophilen Mikroorganismen liegen im Sequenzvergleich nicht nebeneinander. Da es sich bei *M. jannaschii* und *P. furiosus* um archeale Bakterien handelt, während *A. aeolicus* zu den Eubakterien gezählt wird, wäre zumindest eine Sequenzähnlichkeit zwischen den beiden erstgenannten zu erwarten gewesen. Die Sequenz aus *P. furiosus* bildet in Abbildung 4.14 die Grenze zwischen den pentameren und den 60meren Enzymen. Da bei den elektronenmikroskopischen Aufnahmen das Enzym als 160 Å Partikel zu beobachten war und sich die Retention des Proteins während der Gelfiltration analog zu der der ikosaedrischen Enzyme verhielt, ist eine 60mere Struktur anzunehmen. Allerdings ist in der konservierten Loopregion zwischen α_4 und α_5 eine Deletion von einer Aminosäure zu beobachten (GIKS-N) und die variable zweite Aminosäure (in allen anderen Sequenzen von Enzymen mit ikosaedrischer Struktur T oder G) ist durch ein Isoleucin ersetzt.

Auch dem Enzym aus *M. jannaschii* wurde aufgrund des Elutionsverhaltens auf der Gelfiltrationssäule und den im Elektronenmikroskop sichtbaren 160 Å Partikeln eine ikosaedrische Struktur zugeordnet. Gleichzeitig wurde jedoch ein auffälliges, multidisperses Verhalten des Enzyms bei Ultrazentrifugationsexperimenten beobachtet. Bei der Aminosäuresequenz von *M. jannaschii*, ist eine Verkürzung der N-terminalen Region zu beobachten. Es ist bekannt, dass die Verkürzung des N-Terminus bei dem pentameren Enzym aus *S. cerevisiae* erst ab der Entfernung von R18 zu unlöslichem und damit fehlgefaltetem Protein führt (Meining et al., 2000), während bei der 60meren Lumazinsynthase aus *B. subtilis* die Fehlfaltung schon ab G6 auftritt (Haase et al., 2002). Ein Aminosäuresequenzvergleich der N-terminalen Domänen von Lumazinsynthasesequenzen aus archealen Mikroorganismen mit der Sequenz aus *B. subtilis* zeigt in vier von fünf Fällen eine Verkürzung (Abbildung 4.15). Das Enzym aus *P. furiosus* dagegen, besitzt einen ebenso langen N-Terminus, wie das Enzym aus *B. subtilis*.

<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	-----MEKVKLG MVVAEFNRDITYMMEIL
<i>Methanococcus jannaschii</i>	-----MVL MVNLGFVIAEFNRDITYMMEKV
<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	-----MKKVRIGAVVAEFNYDITHMMLLEL
<i>Halobacterium sp.</i>	-----MTRLGLVVAEFNRSVTERMEAA
<i>P. furiosus</i>	MKVRTFEGDYRGEGLRIAVVVSFRNDLLTEELKLG
<i>Bacillus subtilis</i>	--MNIIQGNLVGTGLKIGIVVGRFNDFITSKLLSG

Abbildung 4.15: Vergleich der N-terminalen Sequenzen von Lumazinsynthasen aus archealen Bakterien mit dem N-Terminus des Enzyms aus *B. subtilis*.

Durch die Verkürzung des N-Terminus könnte die postulierte ikosaedrische Struktur destabilisiert sein. Eine weitere Auffälligkeit ist das Fehlen der konservierten Loopregion zwischen α_4 und α_5 . Die Sequenz aus *M. jannaschii* besitzt in diesem Bereich keine Aminosäuredomäne, die dem, für ikosaedrische Enzyme typischen, Motiv G(T/G)K(A/H)GN zugeordnet werden könnte. Dadurch könnten die Pentamer-Pentamer-Kontakte innerhalb des Ikosaeders stark erniedrigt sein. Sowohl der verkürzte N-Terminus als auch das fehlende konservierte Motiv könnten eine Erklärung für die Destabilisierung des Ikosaeders und das multidisperse Verhalten der Lösung in den Zentrifugationsläufen sein.

Zusammenfassung:

Die Ergebnisse zur Bestimmung der Quartärstrukturen der untersuchten Lumazinsynthasen stehen im Einklang mit den in der Literatur bekannten Daten. Trotz Unkenntnis über die Raumstruktur durch Röntgendiffraktion in acht von neun Fällen (Ausnahme: das Enzym aus *S. pombe*) konnten durch die biochemischen Methoden dieser Arbeit wichtige Hinweise auf die Strukturen erhalten werden.

Die Quartärstrukturen von drei Lumazinsynthasen (*S. pombe*, *M. tuberculosis* und *N. meningitidis*) konnten der Gruppe der Enzyme mit pentamerer Struktur zugeordnet werden. Bei weiteren sechs Lumazinsynthasen aus verschiedenen Organismen (*H. influenzae*, *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *M. jannaschii*, *P. furiosus* und *A. thaliana*) war es möglich eine höhersymmetrische ikosaedrische Struktur nachzuweisen.

4.1.2 Reaktionskinetik

4.1.2.1 Der Reaktionsablauf der Lumazinsynthese aus *B. subtilis* unter Single-Turn-Over Bedingungen

4.1.2.1.1 Ergebnisse

Die Bildung von Lumazin (**8**) aus den Substraten 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (**6**) und 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat (**7**) führt über mehrere Intermediate (Abbildung 1.2 und Abbildung 4.22). Da neben dem Substrat 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (**6**) auch das Produkt 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin (**8**) optische Eigenschaften besitzt, ist es möglich die Produktbildung optisch bei 408 nm zu detektieren. Der postulierte Reaktionsmechanismus in den Abbildung 1.2 und Abbildung 4.22 zeigt zudem Intermediate, die aufgrund ihrer ausgedehnten π -Elektronensysteme optische Aktivität besitzen. Wird die Reaktion unter Single-Turn-Over-Bedingungen durchgeführt und mit einem Diodenarraydetektor aufgezeichnet, ist es möglich die temporär auftretenden Zwischenstufen zu beobachten.

In einem **ersten Vorversuch** wurde zunächst die Änderung des Absorptionsspektrums von 93 μM 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (**6**) bei der Bindung an 119 μM (bezogen auf aktive Zentren) Lumazinsynthese aus *B. subtilis* photometrisch untersucht. Das Absorptionsspektrum von gebundenen 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (**6**) in Abbildung 4.16 zeigt eine hypsochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums um 7 nm von 284 nm auf 277 nm mit einer verbleibenden Schulter bei 284 nm. Auffällig ist die, durch die Bindung ans Enzym verursachte, starke Erniedrigung des Extinktionskoeffizienten von $15700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (284 nm) auf $10700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (277 nm). Ursache für diesen Prozess könnte die Abstraktion eines Protons entweder von dem Substrat oder von einer der an der Substratbindung beteiligten Aminosäuren sein. In beiden Fällen würde sich die Ladungsänderung auf das Absorptionsspektrum auswirken.

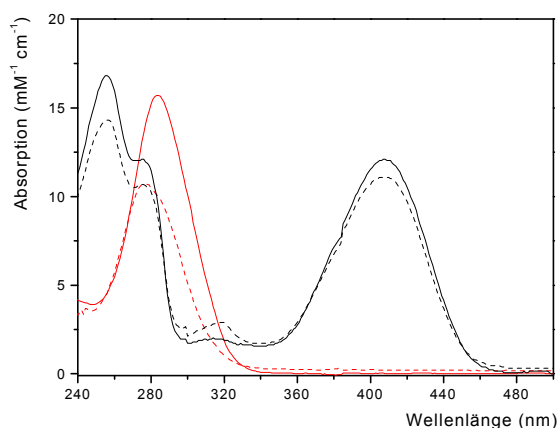


Abbildung 4.16: Absorptionsspektren von —, freiem Lumazin (**8**, $\epsilon_{408\text{nm}} = 12100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$); --, Lumazin (**8**) in Enzymlösung; —, freiem 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidindion (**6**, $\epsilon_{284\text{nm}} = 15700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$); ---, 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidindion (**6**) in Enzymlösung ($\epsilon_{277\text{nm}} = 10700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$);

Abbildung 4.17 stellt die zeitaufgelösten Veränderungen des Absorptionsspektrums von 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidindion (**6**) nach Mischen mit Lumazinsynthase dar. Zur Zeit $t = 0,1 \text{ s}$ ist das gleiche Spektrum wie das des freien 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidindions in Abbildung 4.16 zu sehen, während nach 2 s das, aus Abbildung 4.16 bekannte, Spektrum des gebundenen 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidindions vorliegt. Die Ratenkonstante für diesen Prozess beträgt $0,020 \text{ s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$. Die Bestimmung der Dissoziationskonstante für dieses Substrat ergab einen Wert von $9 \mu\text{M}$. Daraus ergibt sich bei den Versuchsbedingungen ($119 \mu\text{M}$ Enzym, $93 \mu\text{M}$ Ligand) für die gebundene Ligandmenge ein Wert von $77 \mu\text{M}$ (83 %).

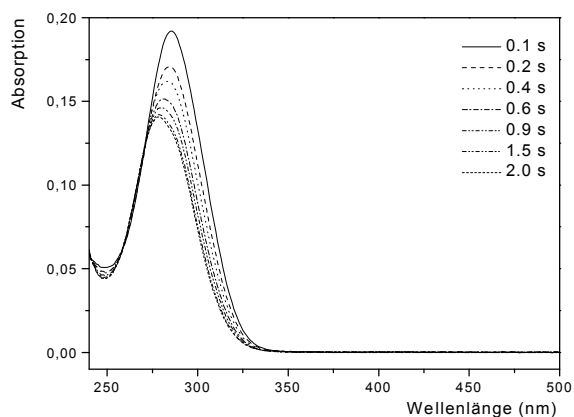


Abbildung 4.17: Zeitaufgelöste Veränderungen des optischen Spektrums von 93 μM 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (**6**) nach Mischen mit 119 μM Lumazinsynthaseuntereinheiten, ohne Zugabe des zweiten Substrates.

In einem **zweiten Vorversuch** konnten bei der Bindung von 71 μM Lumazin (**8**) an 115 μM Lumazinsynthaseuntereinheiten die in Abbildung 4.16 dargestellten Absorptionsspektren beobachtet werden. Freies Lumazin (**8**) besitzt bei pH 6,9 ein charakteristisches Spektrum mit Absorptionsmaxima bei 255 nm und 408 nm und einer Schulter bei 276 nm. Durch Gleichgewichtsdialyse (siehe 2.2.3.10) konnte eine Dissoziationskonstante von 160 μM für die Bindung von Lumazin an das Enzym bestimmt werden. Bei der Bindung von 71 μM Lumazin an 115 μM Enzym ergibt sich daher ein Verhältnis von 65 % (46 μM) freiem Lumazin zu 35 % (25 μM) gebundenem Lumazin. Abbildung 4.16 zeigt demnach ein Mischspektrum von gebundenem und freiem Lumazin. Im Vergleich zum freien Lumazin tritt in dem in Proteinlösung aufgenommenen Spektrum zusätzlich ein Absorptionsmaximum bei 318 nm (beim freien Lumazin ganz schwach zu erkennen) auf. Es ist bekannt, dass die Deprotonierung von Lumazin (pK_a -Wert $\approx 8,3$; Pfeleiderer et al., 1966) zu einer Ausbildung mehrerer anionischer Spezies führt. Durch intramolekulare Addition von OH-Gruppen der Ribitylseitenkette an das Ringkohlenstoffatom in Position 7 entstehen verschiedene tricyclische Strukturen mit Absorptionsmaxima bei 313, 279 und 227 nm. Daneben tritt in geringen Mengen eine Exomethylenverbindung auf, die bei etwa 366 nm absorbiert (Beach et al., 1971; Bown et al., 1986).

Das Maximum bei 318 nm ist folglich ein Hinweis auf enzymgebundene anionische Spezies von Lumazin, die durch die Aminosäureumgebung im aktiven Zentrum zustande kommen.

Um die komplexen Reaktionsabläufe besser interpretieren zu können, wurde bei den **Single-Turn-Over Experimenten** das Substrat 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (**6**) in äquimolaren Verhältnis zu vorhandenen aktiven Zentren eingesetzt. Das zweite – optisch nicht aktive - Substrat 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat (**7**) wurde im Überschuss zugegeben. Bei einem K_M Wert von 55 μM konnte bei einer Endkonzentration von 383 μM im Reaktionsansatz eine etwa 90 % Sättigung erreicht und somit eine Belegung nahezu aller Reaktionszentren mit diesem Substrat garantiert werden. Die Reaktion wurde so durchgeführt, dass das Protein mit einem der beiden Substrate (äquimolare Menge an 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (**6**), oder Überschuss an 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat (**7**)) vorinkubiert wurde; die Reaktion mit dem entsprechenden zweiten Substrat gestartet wurde. In beiden Fällen befand sich in der Küvette eine Mischung aus 115 μM Enzymuntereinheiten, 97 μM 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (**6**) und 383 μM 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat (**7**) (vgl. 2.2.3.8.4).

Optische Spektrenserien beider beschriebenen Experimente sind in Abbildung 4.18A und B zu sehen. Um die Experimente besser vergleichen zu können, sind charakteristische Absorptionsspektren aus frühen und späteren Stadien der Experimente in Abbildung 4.19 dargestellt. Abbildung 4.20 zeigt die Absorptions-Zeit-Kurven ausgewählter Wellenlängen.

Bei der Vorinkubation des Enzyms mit 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat (**7**) und Start der Reaktion mit 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (**6**) (Experiment 1) ist in Abbildung 4.19A **in der ersten Sekunde** die gleiche schnelle Absorptionsänderung von 284 nm auf 277 nm zu sehen, die schon in den Vorversuchen charakterisiert wurde. Der Prozess wird durch die Zeitkurve bei 288 nm in Abbildung 4.20A verdeutlicht.

Beim inversen Experiment mit Vorinkubation mit 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (**6**) und Start mit 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat (**7**) (Experiment 2) fehlt in der Anfangsphase diese durch die Wechselwirkung zwischen dem Pyrimidinsubstrat und dem Enzym bedingte schnelle Abnahme der Absorption bei 284 nm (Abbildung 4.19C, Spektren von 0,1 s bis 0,7 s und Abbildung 4.20B, 280 nm-Kurve).

Nach dieser Anfangsphase verlaufen beide Experimente nahezu identisch.

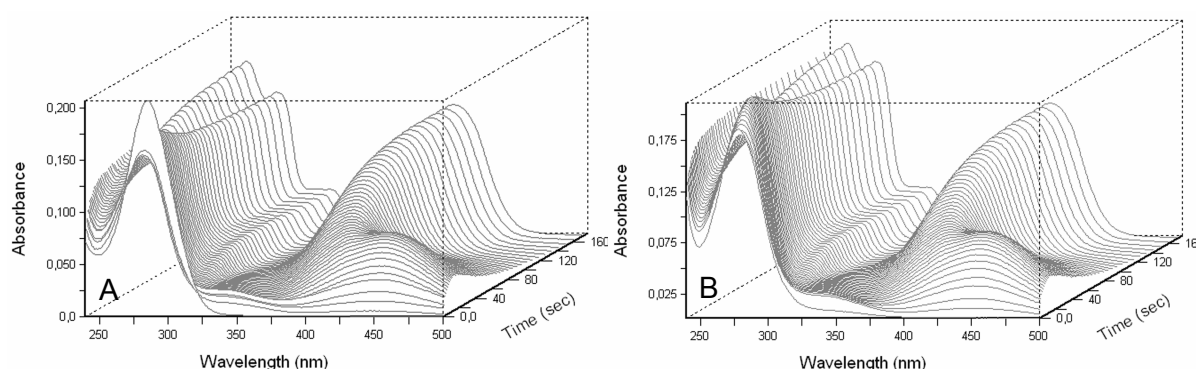


Abbildung 4.18:

A: Single-Turn-Over Experiment 1.

Mischung aus 115 μM Enzymuntereinheiten mit 383 μM 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat (**7**) und Start der Reaktion mit 97 μM 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (**6**).

B: Single-Turn-Over Experiment 2.

Mischung aus 115 μM Enzymuntereinheiten mit 97 μM 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (**6**) und Start der Reaktion mit 383 μM 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat (**7**).

Ein **weiterer schneller Prozess** ist durch die Zunahme der Absorption bei 330 nm in Abbildung 4.19A und C zu beobachten. Dieser Transient ist bei Experiment 2 wesentlich schlechter zu erkennen als bei Experiment 1 (Abbildung 4.20A und B, 330 nm-Kurven).

In der **nächsten Phase** der Reaktion nimmt die Absorption bei 455 nm zu (Abbildung 4.19B und D, Spektren nach 14 s bzw. 20 s). Ein Maximum ist nach 17 s erreicht, wie die 455 nm-Kurven in Abbildung 4.20 zeigen. Parallel dazu ist eine vorübergehende Absorptionzunahme bei 286 nm zu erkennen.

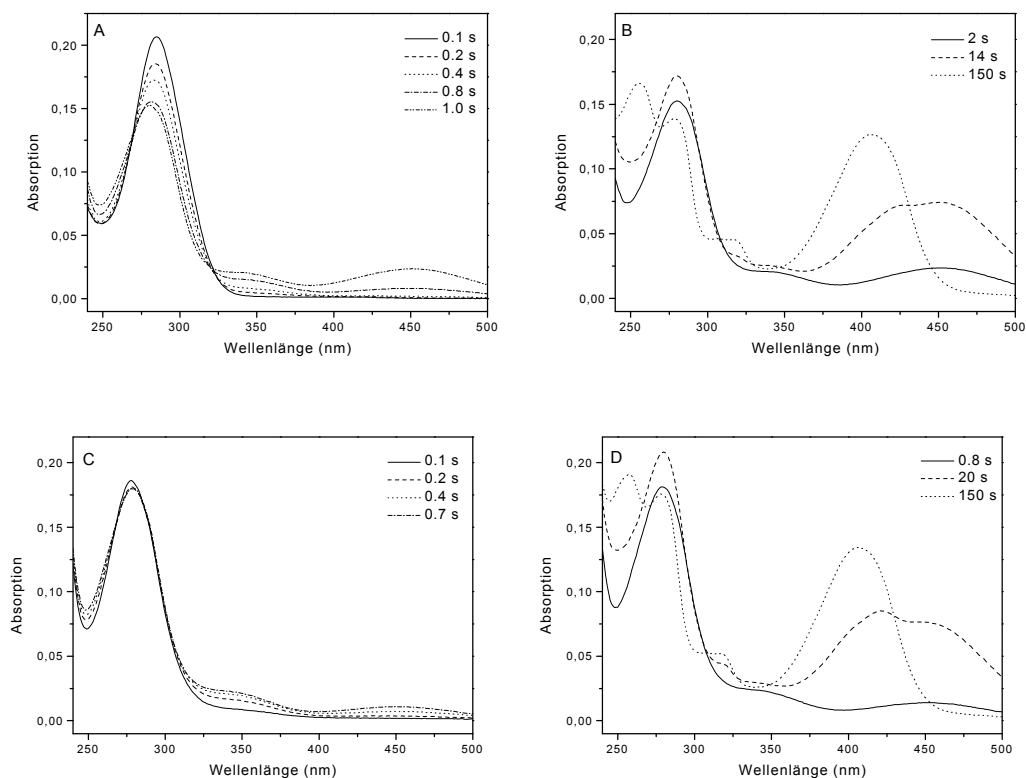


Abbildung 4.19: UV-Spektren der frühen (A/C) und späten (B/D) Phasen der Single-Turn-Over Experimente aus Abbildung 4.18A(A/B) und Abbildung 4.18B (C/D).

Noch während der Rückbildung des Maximums bei 455 nm beginnt sich ein Absorptionsspektrum mit Maxima bei 256 nm, 274 nm, 320 nm und 408 nm zu entwickeln. Die Absorptions-Zeitkurven bei 408 nm in Abbildung 4.20 befinden sich in der steigenden Phase. Das **letzte Spektrum** nach 150 s in Abbildung 4.19B und D ist identisch mit dem, in Abbildung 4.16 bestimmten, Lumazinspektrum in Enzymlösung und kann somit als Mischung aus dem Spektrum freien Lumazins (**8**) und einer anionischen Lumazinspezies verstanden werden, die sich durch die Bindung ans Enzym bildet.

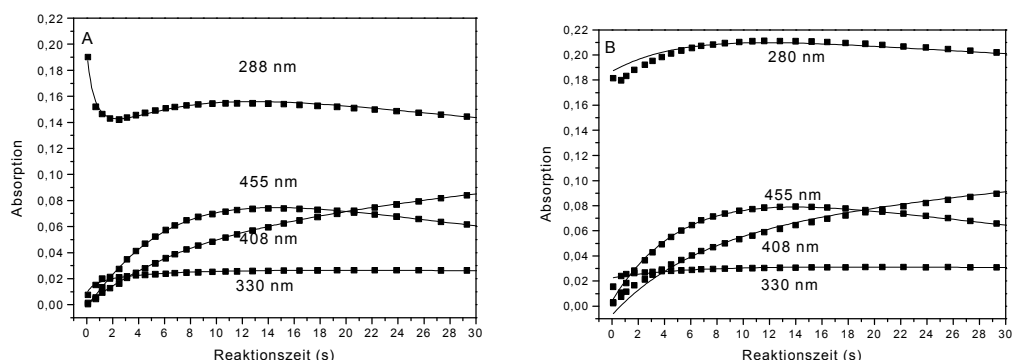
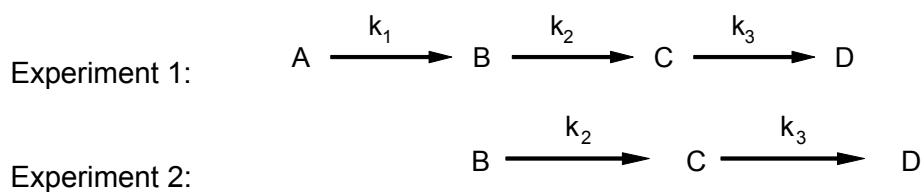


Abbildung 4.20: Änderungen der Absorption während der Stopped-Flow Experimente aus Abbildung 4.18A (A) und B (B). Die Symbole repräsentieren die optischen Daten aus Abbildung 4.19, die Linien stellen die numerischen Simulationen unter Verwendung der kinetischen Konstanten aus Tabelle 4.2 dar.

Die numerische Auflösung der Daten wurde mit dem Programm SPECFIT/32 durchgeführt (Abbildung 4.21). Es konnten die aus den Vorversuchen ermittelten, in Abbildung 4.16 dargestellten, Spektren von freiem bzw. gebundenem 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (**6**) und Lumazin (**8**) in Enzymlösung als bekannt vorausgesetzt werden (Abb. 4.23).

Die Auswertung von Experiment 1 bzw. 2 führte zu drei bzw. zwei linear unabhängigen optischen Prozessen. Für die numerische Simulation wurde daher ein Modell mit drei bzw. zwei Teilschritten verwendet, in Abbildung 4.21A und C dargestellt.



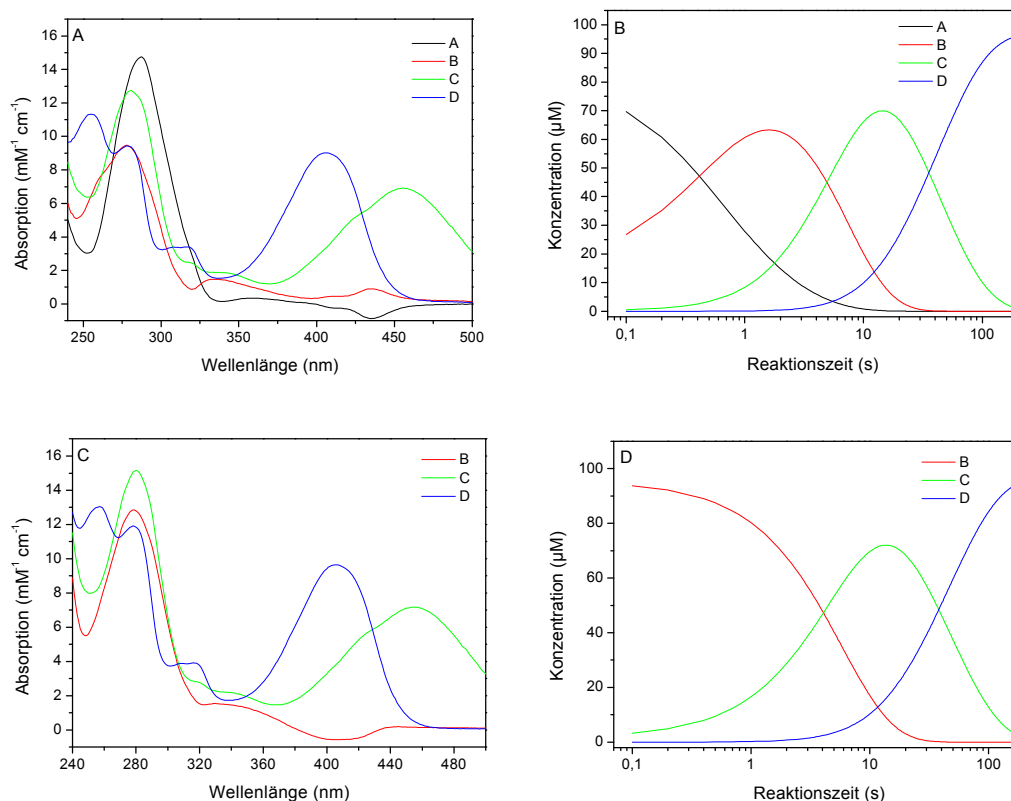


Abbildung 4.21: Numerische Auflösung der Single-Turn-Over Experimente 1 (A/B) und 2 (C/D). A und C: rekonstruierte Absorptionsspektren der auftretenden optisch aktiven Verbindungen; B und D: Konzentrations/Zeit-Verläufe dieser Verbindungen.

Der **erste Teilschritt** (A → B) des Experimentes 1 kann der Bindung des freien 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindions (**6**) an das aktive Zentrum des Enzyms zugeordnet werden, wie die ersten beiden Spektren in Abbildung 4.21A (A und B) bei einem Vergleich mit den Spektren in Abbildung 4.16 deutlich zeigen. Da in Experiment 2 eine Vorinkubation dieses Substrates mit dem Enzym stattfindet und die Reaktion mit 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat (**7**) gestartet wird, findet dieser Prozess schon vor der Aufnahme der Spektren statt.

Die **weiteren Teilschritte** mit den Intermediaten B, C, und D in Abbildung 4.21A und C und deren Konzentrations-Zeit-Verläufe in Abbildung 4.21B und D **sind in beiden Modellen identisch**.

Nach der Bindung des Substrates **6** ans Enzym wird in einem schnellen **Zwischenschritt** der Transient bei 330 nm gebildet. Dieser Zwischenschritt konnte nicht als einzelne optisch aktive Verbindung aufgelöst werden.

Anschliessend erreicht nach etwa 10 s in einem **zweiten Teilschritt** ($B \rightarrow C$) der Transient bei 455 nm sein Maximum (Abbildung 4.21 Verbindung C).

Der **letzte und dritte Schritt** ($C \rightarrow D$) des Modells ist die Bildung von Lumazin (**8**) mit seinem typischen Absorptionsmaximum bei 408 nm (Abbildung 4.21 Verbindung D).

Die berechneten Ratenkonstanten k_1 , k_2 und k_3 der einzelnen Reaktionsschritte sind in Tabelle 4.2 zusammengefasst.

Tabelle 4.2: Ratenkonstanten von Experiment 1 und 2 und dem Vorversuch. Bedingungen vgl. Tabelle 4.2.

Ratenkonstante	Vorversuch	Experiment 1	Experiment 2
k_1 ($\text{s}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$)	0.020 ± 0.0007	0.017 ± 0.01	-
k_2 (s^{-1})	-	0.18 ± 0.003	0.17 ± 0.001
k_3 (s^{-1})	-	0.024 ± 0.0002	0.022 ± 0.0002

4.1.2.1.2 Diskussion

Der postulierte Reaktionsmechanismus in Abbildung 4.22, beinhaltet mehrere Verbindungen, die ein ausgedehntes π -Elektronensystem besitzen und für das Auftreten der beobachteten Absorptionsänderungen während der Reaktion verantwortlich gemacht werden können. Somit lassen sich die optisch aktiven Transienten möglichen Intermediaten bzw. die Ratenkonstanten möglichen Reaktionsschritten zuordnen.

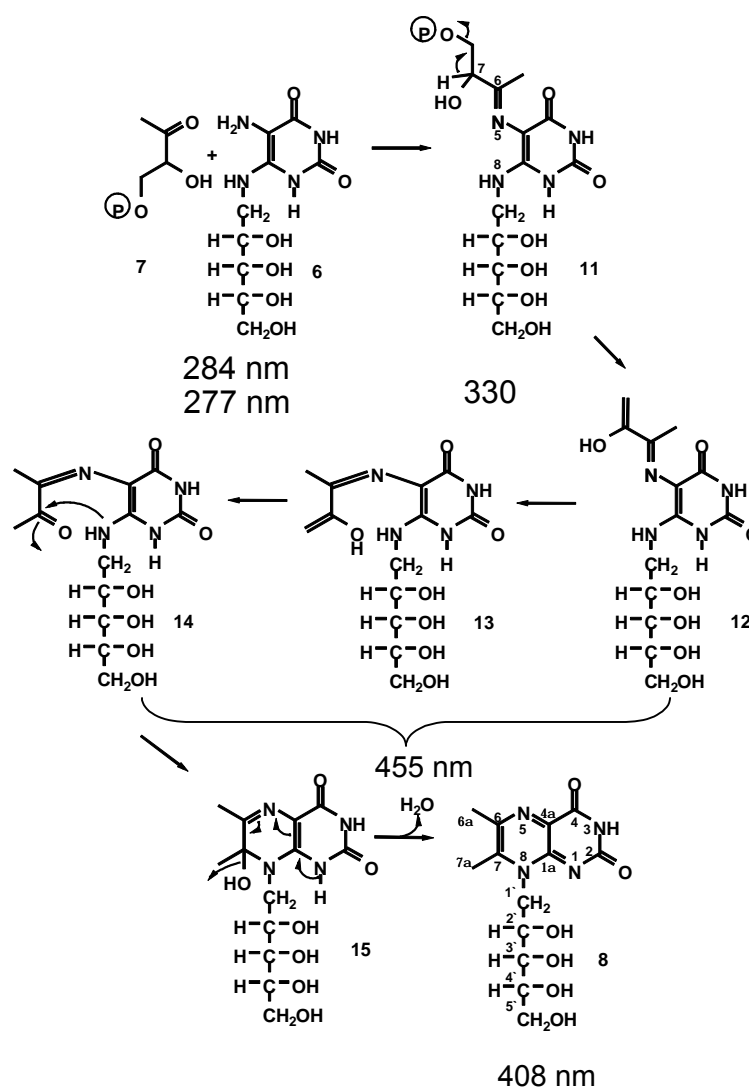


Abbildung 4.22: Reaktionsmechanismus der Lumazinsynthese. Den Verbindungen, die aufgrund eines ausgedehnten π -Systems optische Aktivität besitzen, wurden Absorptionsmaxima zugeordnet, die während der Reaktion zu beobachten sind.

Im **ersten Teilschritt (A ® B)** tritt die Bindung des Substrates 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (**6**) an das Enzym als Reaktion zweiter Ordnung mit einer Ratenkonstante k_1 von $0,017 \text{ s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ in Erscheinung, jedoch unabhängig von der An- oder Abwesenheit des zweiten Substrates (**7**) (Abbildung 4.17, Abbildung 4.19A, Abbildung 4.20A und Abbildung 4.21A und B). Daraus folgt ein relativ niedriger k_{on} -Wert im Vergleich zu anderen Enzymen. Zieht man in Betracht, dass das aktive Zentrum des strukturell aufgeklärten ikosaedrischen Enzyms an der Kapsidinnenwand liegt (Ladenstein et al., 1986; Ladenstein et al., 1988) und die Substrate erst durch Poren in der Kapsidwand in das Innere gelangen müssen, ist das eine mögliche Erklärung für die langsame Geschwindigkeit. Diese Annahme steht im Einklang mit der Beobachtung eines Channelingeffektes zwischen den Lumazinsynthase- und den Riboflavinsynthaseuntereinheiten der schweren Riboflavinsynthase (Kis et al., 1995a). Die Bindung von **6** an das aktive Zentrum bewirkt eine Änderung des Absorptionsspektrums dieses Moleküls. Das Maximum wird hypsochrom von 284 nm auf 277 nm verschoben. Gleichzeitig wird der molare Extinktionskoeffizient und damit die Absorptionsintensität wird verringert.

Nach der Substratbindung, die mit einer Absorptionsabnahme bei 284 nm einhergeht, tritt in einem **schnellen Zwischenschritt** der Transient bei 330 nm in Erscheinung. Dem Reaktionsablauf zur Folge könnte es sich dabei um die Schiffsche Base (**11**) handeln, die aus der Reaktion der Carbonylgruppe des 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphats (**7**) mit der 5-Aminogruppe des 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindions (**6**) unter Wasserabspaltung hervorgeht. Um diese Aussage zu untermauern, wurden Absorptionsspektren ähnlicher Verbindungen zum Vergleich herangezogen. Abbildung 4.23 zeigt, dass Dihydroneopterin strukturell ähnlich zum Intermediat **11** aufgebaut ist und typische Absorptionsmaxima bei 280 nm und 330 nm ($\epsilon_{330 \text{ nm}} = 6300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, Pfeleiderer, 1985) besitzt.

Aufgrund der geringen Population dieses Intermediats konnte dieser Schritt nicht einzeln aufgelöst werden.

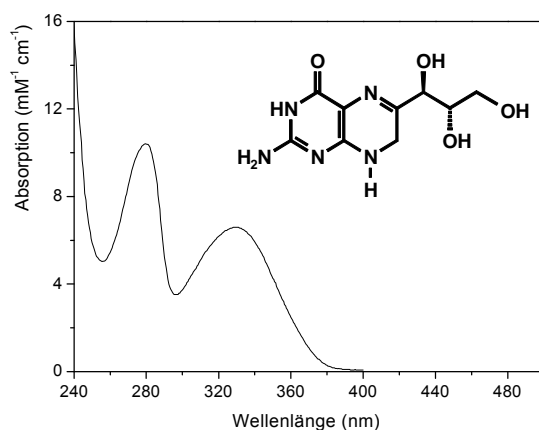


Abbildung 4.23: Absorptionsspektrum von Dihydroneobiopterin.

Die Ratenkonstante k_1 in Experiment 1 setzt sich somit aus zwei Ratenkonstanten k_{on} (Bindung von 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (**6**) an das Enzym) und k'_1 (Bildung des ersten Intermediats) zusammen. In Experiment 2 ist schon im ersten gemessenen Spektrum der Transient bei 330 nm zu beobachten.

Die nachfolgende Bildung des Intermediats bei 455 nm im **zweiten Teilschritt (B ® C)** erfolgt in den Experimenten mit einer Ratenkonstante von 0,17 bzw. 0,18 s⁻¹ (Abbildung 4.21, Verbindung C). Das Reaktionsschema in Abbildung 4.22 geht davon aus, dass nach Phosphatelimination aus der Schiffsbasis (**11**) das Intermediat **12** entsteht und nach Rotation (**13**) und Tautomerisierung das entsprechende Iminoketon **14** gebildet wird. Diese Intermediate verfügen alle über ein ausgeprägteres Doppelbindungssystem als das Lumazin (**8**), das bei 408 nm absorbiert. Sie kommen so als mögliche Kandidaten für die langwellige Absorption bei 455 nm in Frage.

Die Bildung des Produktes Lumazin (**8**) (Abbildung 4.21, Verbindung D) aus dem Transienten bei 455 nm ist der letzte und zugleich, mit einer Ratenkonstante von 0,0022 bzw. 0,0024 s⁻¹, der geschwindigkeitsbestimmende, **dritte Schritt (C ® D)** in dieser Reaktionsfolge. Aufgrund fehlender Zuordnungsmöglichkeit des Intermediats bei 455 nm kann es sich hierbei neben dem abschliessenden Ringschluss durch Reaktion der Carbonylgruppe von Intermediat **14** mit der 8-Aminogruppe unter Wasserabspaltung (Intermediat **15**) auch um die Rotation oder

Enolisierung der Intermediate **12** bis **14** handeln. In der Literatur wird von Zheng et al. (Zheng et al., 2000) der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Reaktion unter Single-Turn-Over Bedingungen in der Rotation bzw. unter Steady-State Bedingungen in der Abdissoziation des Produktes vom Enzym gesehen. Da die Autoren jedoch nur bei einer Wellenlänge (408 nm) gemessen haben und ihre Beobachtungen nur auf die Absorptionzunahme bei 408 nm und damit auf die Lumazinbildungsrate stützen, kann auch hier der geschwindigkeitsbestimmende Schritt im Single-Turn-Over nicht eindeutig definiert werden. Daneben wird bei dieser Interpretation die Tatsache ausser Acht gelassen, dass das auftretende 455 nm Intermediat ebenfalls noch bei 408 nm absorbiert ($\epsilon_{455}/\epsilon_{408} = 0,5$).

Bei einer Dissoziationskonstante von 160 μM für die Bindung von Lumazin (**8**) an das aktive Zentrum des Enzyms aus *B. subtilis* und aufgrund von Beobachtungen bei NOE-NMR-Experimenten (Oschkinat et al., 1992), wonach die Abdissoziation des Lumazins (k_{off} – Rate) innerhalb der Zeitskala des Experiments liegen musste, erscheint es unwahrscheinlich, dass bei Steady-State Bedingungen die Dissoziation des Produkts vom aktiven Zentrum eine Beeinflussung der Reaktionsgeschwindigkeit hervorruft.

4.1.2.2 Die Lumazinbildung unter Steady-State Bedingungen

Die Reaktionsschritte des postulierten Reaktionsmechanismus in Abbildung 1.2 und Abbildung 4.22 weisen auf mehrere Protontransferreaktionen hin. Daher liegt die Vermutung nahe, dass Aminosäuren im aktiven Zentrum, die als Protonendonatoren oder -akzeptoren agieren können, eine wichtige Rolle für die katalytische Aktivität des Enzyms spielen. Durch die kinetischen Untersuchungen von Lumazinsynthasen aus verschiedenen bakteriellen Mikroorganismen, Pilzen und Pflanzen und von im aktiven Zentrum veränderten Punktmutanten des Enzyms aus *B. subtilis* konnten Hinweise auf die an der Reaktion beteiligten Aminosäuren gefunden werden.

4.1.2.2.1 Lumazinsynthese aus *B. subtilis* und ihre Punktmutanten im aktiven Zentrum

Kinetische Untersuchungen im Steady-State ergaben für die Lumazinsynthese K_M -Werte von $9 \mu\text{M}$ für 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (**6**) und $55 \mu\text{M}$ für S-3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat (**7**) bei einer maximalen Reaktionsgeschwindigkeit von $242 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (Abbildung 4.24).

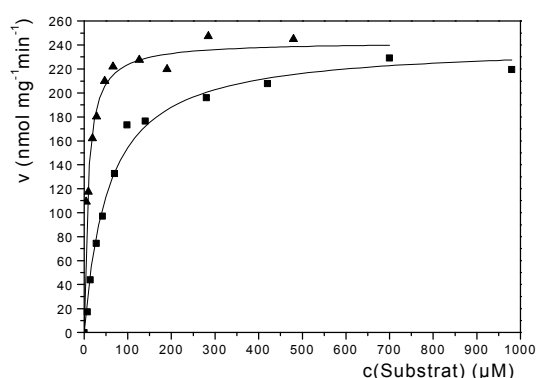


Abbildung 4.24: Reaktionsgeschwindigkeiten bei verschiedenen Substratkonzentrationen. \blacktriangle , **6**; \bullet , **7**. Die durchgezogenen Linien stellen die Fitkurven dar.

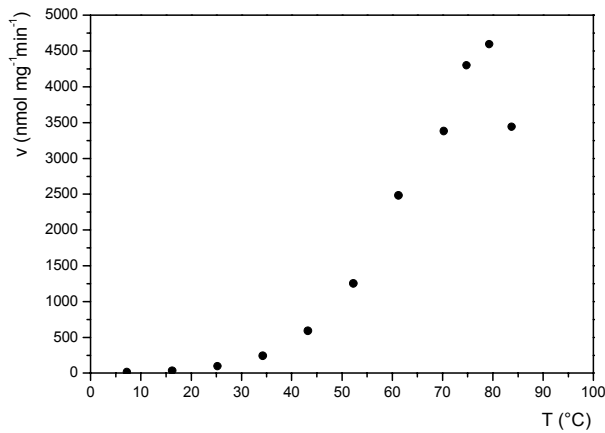
Kinetische Untersuchungen bei verschiedenen Temperaturen ergaben die aus dem Arrhenius-Plot (Abbildung 4.25 Mitte) und dem Eyring-Plot (Abbildung 4.25 unten) ermittelten und in Tabelle 4.3 zusammengefassten thermodynamischen Parameter. Die höchste spezifische Aktivität konnte bei etwa 80 °C festgestellt werden. Dies stellt für ein Enzym aus einem mesophilen Mikroorganismus einen erstaunlich hohen Wert dar. Bei kalorimetrischen Messungen konnte jedoch festgestellt werden, dass das Enzym bis zu einer Temperatur von 93,3 °C stabil ist (Zhang et al., 2001). Die unerwartete hohe Thermostabilität wurde von den Autoren auf die ikosaedrische Kapsidform zurückgeführt.

Im Vergleich zur enzymatischen wurde die biomimetische Lumazinbildung unter gleichen Bedingungen ermittelt. Tabelle 4.3 macht deutlich, dass bei der nicht-enzymatischen Reaktion die Aktivierungsenergie um etwa 30 kJ mol⁻¹ kleiner ist, dafür jedoch die Reaktionsentropie sechsmal grösser ist, als bei der Enzymreaktion.

Tabelle 4.3: Thermodynamische Parameter des Lumazinsynthese Wildtyps aus *B. subtilis* und der nichtenzymatischen Reaktion.

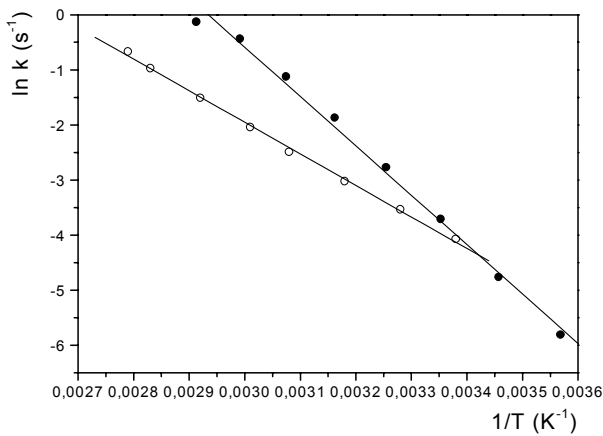
	E_a (kJ mol⁻¹)	DG (kJ mol⁻¹)	DH (kJ mol⁻¹)	DS (J K⁻¹ mol⁻¹)
enzymatisch	74.6 ± 1.1	83 ± 1	76 ± 1	-22.4 ± 3.6
nichtenzymatisch	46.3 ± 0.6	86 ± 0.5	45 ± 0.5	-127.1 ± 1.6

Um den genauen Reaktionsweg der Lumazinbildung aus den beiden Substraten besser zu verstehen und eventuelle Protonentransferreaktionen oder sonstige Interaktionen von Aminosäuren im aktiven Zentrum mit den Substraten und Intermediaten in Abbildung 1.2 zu untersuchen, wurden von nahezu allen Aminosäuren, die die Kavität des aktiven Zentrums bilden, Punktmutationen hergestellt und auf ihre katalytische Aktivität untersucht. Abbildung 1.5 zeigt die wichtigsten Aminosäuren im aktiven Zentrum des Enzyms. Daneben wurden Punktmutationen auch bei solchen Aminosäuren eingeführt, die für die Stabilität des Kapsids eine wichtige Rolle spielen, indem sie zwischen einzelnen Untereinheiten wechselwirken. Somit können die mutierten Aminosäuren in verschiedene Typen unterteilt werden (vgl. Tabelle 4.4):



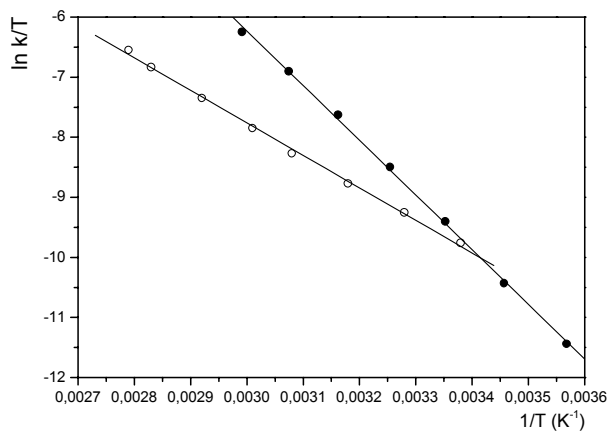
Temperaturabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit des Lumazinsynthasewildtyps aus *B.subtilis*.

Oben: Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Temperatur



Mitte: Arrhenius-Plot

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



unten: Eyring-Plot.

$$\ln\left(\frac{k}{T}\right) = -\frac{\Delta H}{R} \cdot \frac{1}{T} + \frac{\Delta S}{R} - \ln\left(\frac{h}{k_B}\right)$$

- : enzymatische Reaktion
- : nichtenzymatische Reaktion

Abbildung 4.25

- **Typ 1** Aminosäuren bilden die hydrophobe Tasche für den Pyrimidinring des Substrates 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (**6**).
- Aminosäuren, die die hydrophile Tasche für die Ribitylseitenkette von 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (**6**) bilden werden als **Typ 2** bezeichnet.
- Die hydrophile Umgebung für das Substrat S-3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat (**7**) wird von **Typ 3** Aminosäuren gebildet.
- **Typ 4** bzw. **Typ 5** Aminosäuren sind solche, die zusätzlich oder ausschliesslich die Trimer- oder die Pentamerinterfaceregion stabilisieren.
- Die Aminosäure H88 bildet eine Ausnahme, da sie Kontakt zu Intermediaten haben soll und Protonenabspaltungen aus den Intermediaten katalysieren soll.

Es wurden von allen 61 Mutanten Rohextrakte hergestellt (vgl. 2.2.1.8 und 3.1.2.2) und diese auf SDS-Gelen bezüglich ihrer Expression im Vergleich zum Wildtyp untersucht. Anschliessend wurde von jeder Mutante und dem Wildtyp so viel Rohextrakt zum Aktivitätstest eingesetzt, dass die Menge an Lumazinsynthase im Reaktionsansatz identisch war. Jeder Ansatz (200 μ l) enthielt beide Substrate im Überschuss (1 mM). Es wurde ein Blindwert ohne Enzym aufgenommen und von den Daten abgezogen. Die prozentualen Abschätzungen der relativen Reaktionsgeschwindigkeiten der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp sind in Tabelle 4.4 zusammengefasst. Es zeigte sich, dass die Mutation je nach Position und Ersatzaminoäure teilweise einen sehr grossen Einfluss, wie zum Beispiel an Position R127, aber auch unter Umständen nahezu keinen Einfluss, wie zum Beispiel bei E58D, haben kann.

Aus dieser Vorabschätzung wurde fast von jeder Position mindestens eine Mutante ausgewählt und genauer charakterisiert (Tabelle 4.4 grau unterlegte Mutanten). Diese wurden zur weiteren Untersuchung wie unter 3.1.2.2 beschrieben gereinigt. Die Ergebnisse der Michaelis-Menten Kinetiken sind in Tabelle 4.5 zusammengefasst.

Tabelle 4.4: Relative Reaktionsgeschwindigkeit der Mutantenrohextrakte in % bezogen auf Wildtypaktivität.

	G	V	A	L	S	T	D	E	N	Q	K	R	H	F	Y	W	C	Typ
R21			43															5
F22		22			40		12				6	12			91	39		1
N23		<1			20					10								1
K29					18													4
A56					69													1
F57					36													2+5
E58					3		100			62								2
F61					8													5
T80		47			69		3		54									1
V81														3				1
I82					8													1
H88			10		12			7			3	12		6				- ¹
V92			23															1
P110					9													5
F113			3		5						2	3				25		2+5
E126			49															4
R127			2	2	<1	<1	5	2	2		9		62					3+5
K131			<1					3	8				25					3
K135			14					5	18				27					3
D138			78															2
S142	17		92	53			55										57	2

¹: Intermediatkontakt

Bei den **Typ 1** Aminosäuren wäre zu erwarten, dass der Tausch zu einer polareren Aminosäure den grössten Einfluss auf die Aktivität des Enzyms haben sollte. Während bei N23S, A56S und T80V die Mutation auf den K_M Wert für 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (**6**) kaum einen Einfluss zeigt und auch die Reaktionsgeschwindigkeit nur bei N23S deutlich verringert wird, zeigten sich an Position F22 die grössten Veränderungen. Ein Grund ist die koplanare Lage des aromatischen Rings des Phenylalaninrestes zum Pyrimidinring. Diese Anordnung spielt eine wichtige Rolle bei der korrekten Positionierung des Substrates **6** im aktiven Zentrum. Tauscht man diesen Rest gegen kleinere unpolare oder gar polare Aminosäuren aus, zeigen sich unterschiedliche Effekte, wie in Tabelle 4.5 zu sehen. F22W verhält sich sehr ähnlich zum Wildtyp. Das Vorhandensein von Tryptophan an dieser Stelle kann in Aminosäuresequenzen anderer Organismen, wie z.B. *Saccharomyces cerevisiae* in Abbildung 4.36 beobachtet werden. Der Austausch F22W hat somit kaum einen Einfluss auf die kinetischen Parameter. Stärkere Veränderungen zeigen sich bei den Mutanten F22V und F22S. Bei der Valinmutante wird die Reaktionsgeschwindigkeit verringert, während bei der Serinmutante die Affinität des Enzyms zum Substrat (erhöhter K_M -Wert) beeinflusst wird. Diese Effekte sind auf Grösse und Polarität der Mutation zurückzuführen.

Tabelle 4.5: Steady-State Kinetiken der Lumazinsynthasemutanten.

Mutante	K _M 1 (μM)	K _M 2 (μM)	v _{max} ($\text{nmol mg}^{-1}\text{min}^{-1}$)	Typ
Wildtyp	55	9	242	
R21A	72	18	103	5
F22V	124	11	54	1
F22S	140	170	97	
F22D	674	720*	30	
F22W	60	6	94	
N23S	60	12	48	1
A56S	70	4	167	1
F57S	80	34	88	2+5
E58Q	146	173	149	2
T80V	42	4	113	1
H88A	60	150	25	-1
H88K	42	56	8	
F113S	66	278	12	2+5
E126A	36	43	119	4
R127T	n.d.	n.d.	<3	3+5
R127H	3140	85	150	
K131N	280	35	18	3
K131R	50	14	61	
K135A	135	12	35	3
D138A	60	10	188	2
S142L	91	12	128	2

K_M 1: K_M für 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat (**7**)

K_M 2: K_M für 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (**6**)

*Hill-Koeffizient n = 3,6

Die grösste Veränderung ist beim Tausch von Phenylalanin in die saure Asparaginsäure zu beobachten. Die Reaktionsgeschwindigkeit zeigt hier eine sigmoidale Abhängigkeit bezüglich der 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion-Konzentration. Der Hill Koeffizient von 3,6 weist auf eine positive Kooperativität hin. Ein Grund könnte die negative Ladung der Asparaginsäure sein, die erst bei vermehrter Anwesenheit von Substrat **6** eine Bindung an diese Position möglich macht. Bei keiner anderen Position wiederholte sich dieser Effekt.

Auffällig bei allen Mutationen an Position 22 (F22W ausgeschlossen) ist die Erhöhung des K_M-Wertes für das zweite Substrat 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat (**7**).

Die kinetischen Parameter in Tabelle 4.5 zeigen, dass bei Aminosäuren, die mit der Ribitylseitenkette von 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (**6**) wechselwirken (**Typ 2**), fast alle Mutationen eine geringe Auswirkung zur Folge

hatten. Lediglich bei der Mutante F113S wird die Aktivität um ein zwanzigfaches verringert und der K_M -Wert verfünffacht sich. Die meisten dieser Aminosäuren wechselwirken mit ihren Hauptkettenatomen (F57, F113, D138) bzw. über eine Wasserbrücke (S142), womit die geringe Auswirkung eines Seitenkettentausches erklärt wird (Ritsert et al., 1995).

In der Literatur sind zum jetzigen Zeitpunkt Strukturen von sieben Lumazinsynthasen bekannt (Ladenstein et al., 1988; Ritsert et al., 1995; Persson et al., 1999; Braden et al., 2000; Meining et al., 2000; Zhang et al., 2001; Gerhardt et al., 2002). Die Kristallisationsbedingungen enthielten Produkt-, Intermediat- oder Substratanaloga (bezogen auf 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion). Es ist jedoch keine Struktur mit dem zweiten Substrat 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat (**7**) oder einem Substratanalogon vorhanden, so dass über diese Bindungsstelle wenig bekannt ist. Da aber in den meisten Fällen ein Phosphation in der Struktur zu erkennen ist und bei der Kristallisation der Lumazinsynthase aus *Saccharomyces cerevisiae* mit dem Intermediatanalogon 5-(6-D-Ribitylamino-2,4-dihydroxypyrimidin-5-yl)-1-pentyl-phosphonat (**16**) dessen Phosphatgruppe an der selben Position sitzt (Meining et al., 2000), liegt die Vermutung nahe, dass diese Aminosäureumgebung ebenfalls mit der Phosphatgruppe des Substrates **7** wechselwirkt (**Typ 3**). Involviert sind hier die drei basischen Reste R127, K131 und K135. Der Austausch der Lysine in andere basische (K131R), anders polare (K131N) oder unpolare (K135A) hatte einen, in dieser Reihenfolgen gesteigerten, Effekt auf die Enzymkinetik, wie in Tabelle 4.5 zu sehen ist. Die grösste Veränderung war beim Austausch des Arginins an Position 127 zu beobachten. Während Histidin schon grosse Veränderungen hervorruft, eine Aktivität aber eindeutig vorhanden ist, zeigte die R127T-Mutante keine messbare Aktivität mehr.

Um bei allen Mutationen und besonders bei solchen, die die Stabilität des Kapsides beeinflussen, Änderungen der Quartärstruktur erkennen zu können, wurden von allen Mutanten native Gele der Rohextrakte erstellt und die Lumazinsynthase nach Western-Blot (2.2.3.7) mit anti-sRfs-Antikörper detektiert. Es stellte sich heraus, dass solche Positionen, die ausschliesslich oder zusätzlich zur Teilnahme am aktiven Zentrum zur Kapsidstabilität beitragen eine weitere Lumazinsynthasebande auf der Blotmembran erkennen lassen.

Daraufhin wurde bei den beiden gereinigten R127 Mutanten zusätzliche Untersuchungen angestellt. Im Elektronenmikroskop zeigte sich, dass die R127H Mutante aus einer Mischung von zwei verschiedenen grossen Kapsiden besteht. Neben den für Wildtyp typischen 160 Å Kugeln sind Kapside zu sehen, deren Durchmesser etwa doppelt so gross ist. (Abbildung 4.26 links). Die Mehrheit bilden jedoch die 160 Å Partikel. Im Gegensatz dazu zeigt die R127T Mutante ein umgekehrtes Verhältnis mit mehr 300 Å Teilchen (Abbildung 4.26 Mitte).

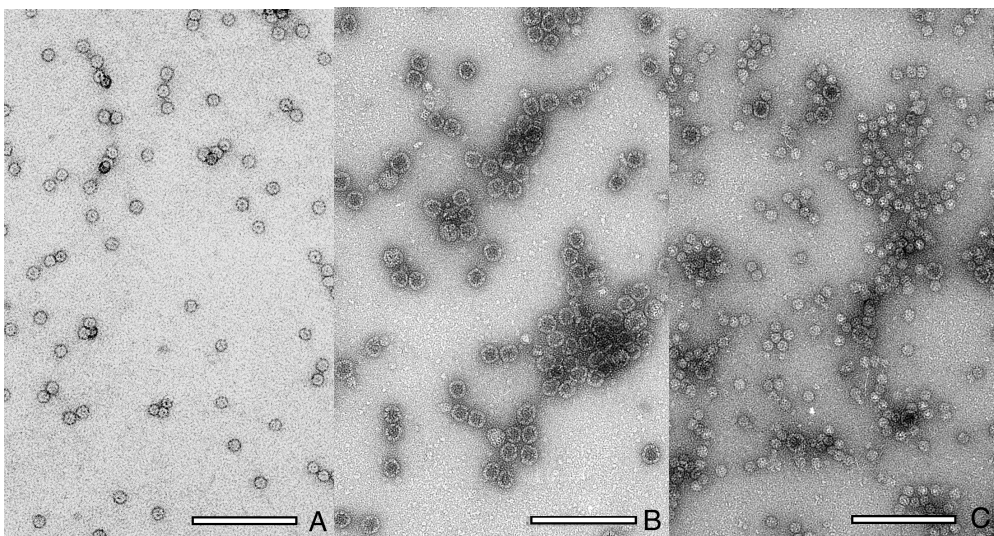


Abbildung 4.26: Elektronenmikroskopische Aufnahme von mit negativ kontrastierter Lumazinsynthase. Links: Wildtypprotein; Mitte: R127T Mutante; rechts: R127H Mutante. Der Balken repräsentiert 100 nm.

Diese Mischungsverhältnisse konnten durch Sedimentationszentrifugation bestätigt werden. Abbildung 4.27 zeigt, dass die Hauptkomponente der R127H Mutante (rechts) ähnlich zum Wildtyp (links) sedimentiert, die Nebenkomponeente wesentlich langsamer. Das umgekehrte Verhalten ist bei der R127T Mutante zu beobachten (Mitte).

Diese Veränderungen der Quartärstruktur führt zu Problemen bei der Interpretation der enzymkinetischen Parameter von R21A (Typ 5), F57S (Typ 2 + 5), F113S (Typ 2 + 5), E126A (Typ 4), R127H (Typ 3 + 5) und besonders der kaum aktiven Mutante R127T (Typ 3 + 5), da nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Änderung in der Aktivität der jeweiligen Mutante auch durch die Änderung der Quartärstruktur zustande kommt und nicht nur auf den Einfluss der Aminosäure auf die Substrate, Intermediate oder das Produkt zurückzuführen sind.

So kann besonders bei der R127T Mutante die nicht mehr messbare enzymatische Aktivität entweder durch die veränderte 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat-Bindungsstelle, aber auch durch die veränderte Quartärstruktur begründet werden.

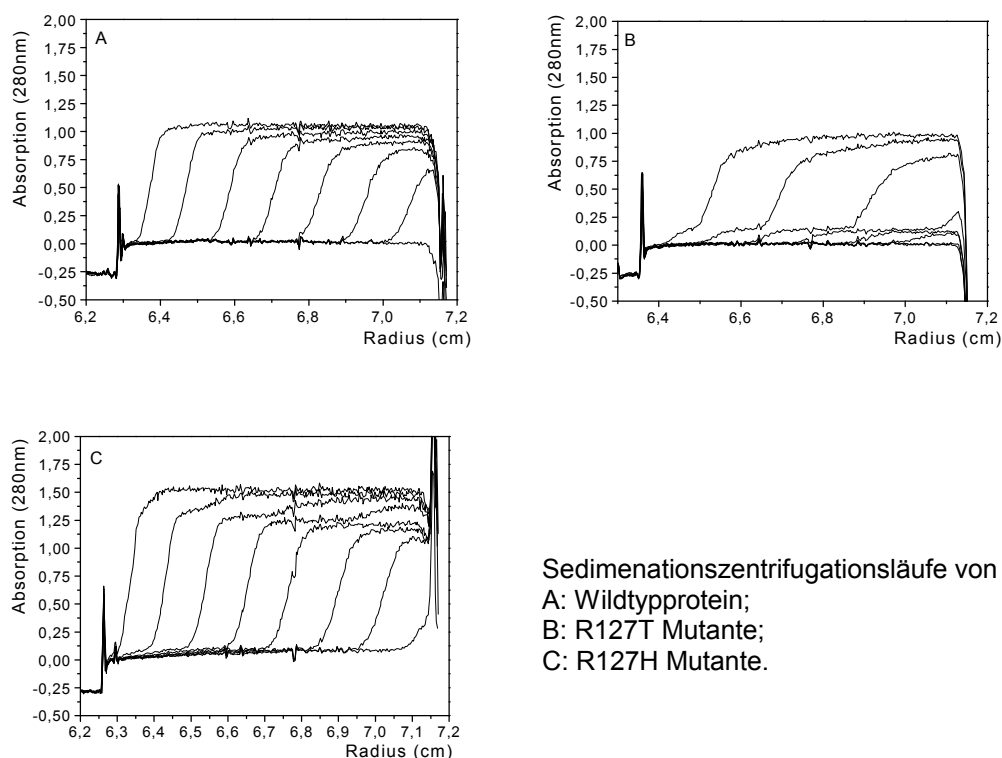


Abbildung 4.27

4.1.2.2.2 Lumazinsynthasen aus den pathogenen Mikroorganismen *H. influenzae*, *M. tuberculosis*, *N. meningitidis*, *S. aureus* und *S. pneumoniae*

Kinetische Untersuchungen bei 37° ergaben für die Enzyme aus *H. influenzae*, *S. aureus* und *S. pneumoniae* maximale Reaktionsgeschwindigkeiten von 141 nmol mg⁻¹min⁻¹, 85 nmol mg⁻¹min⁻¹ und 83 nmol mg⁻¹min⁻¹. Die K_M-Werte, die bei den Enzymen aus *S. aureus* und *S. pneumoniae* im Bereich von 6 – 7 μM für 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (**6**) und 50 – 60 μM für 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat liegen (**7**), sind in Tabelle 4.8 zusammengefasst.

Auffällig war der sigmoide Verlauf der Reaktion bei dem Enzym aus *H. influenzae*, wenn bei Sättigung mit dem Zuckerphosphat **7** die Konzentration an 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (**6**) variiert wurde. Es ergab sich eine positive Kooperativität ($n = 2,6$) für dieses Substrat. Diese Hill-Kinetik wurde bei keinem anderen Wildtypprotein beobachtet. Nur bei der F22D-Mutante des Enzyms aus *B. subtilis* konnte eine entsprechende Abhängigkeit beobachtet werden (vgl. Tabelle 4.5).

Kinetische Untersuchungen mit dem Enzym aus *E. coli* bestätigten die aus der Literatur bekannten kinetischen Parameter. Die K_M -Werte betragen 62 μM bzw. 4 μM für 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat (**7**) bzw. 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (**6**) bei einer maximalen Reaktionsgeschwindigkeit von 200 $\text{nmol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$. Die Werte sind in Tabelle 4.8 mitaufgeführt.

Für die Lumazinsynthase aus *M. tuberculosis* konnten bei den kinetischen Untersuchungen unter Steady-State-Bedingungen ein v_{max} von 110 $\text{nmol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ bei leicht erhöhten K_M -Werten von 117 μM für 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat (**7**) und 20 μM für 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (**6**) bestimmt werden (Tabelle 4.8).

Für die Lumazinsynthase aus *N. meningitidis* ergab sich für das Substrat 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat (**7**) ein unauffälliger K_M -Wert von 51 μM bei einer maximalen Reaktionsgeschwindigkeit von 158 $\text{nmol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$. Der K_M -Wert von 2080 μM für 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (**6**) übersteigt jedoch alle bisher bekannten K_M -Werte für dieses Substrat um ein Vielfaches. Selbst die Mutationen im aktiven Zentrum des Enzyms aus *B. subtilis* (vgl. Tabelle 4.5) konnten keine derart starken Auswirkungen auf den K_M -Wert erreichen. Eine mögliche Erklärung ist die, auch bei der Reinigung zu Unregelmässigkeiten führende, starke negative Ladung des Enzyms bei pH 7,0. Die Affinität des eher unpolaren Pyrimidinsubstrates **6** kann dadurch stark verändert sein. Ist das Substrat im aktiven Zentrum gebunden, findet ein Umsatz unter relativ normaler Reaktionsgeschwindigkeit (158 $\text{nmol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$) statt. Bei einem Überschuss dieses Substrates folgt die Reaktionsgeschwindigkeitskurve in Abhängigkeit des zweiten, hydrophilen Substrates **7** einer normale Michaelis-Menten-Kinetik, mit einem K_M -Wert von 51 μM . Die Bindung des hydrophilen Substrates scheint von der starken Ladung des Enzyms nicht beeinflusst zu werden.

4.1.2.2.3 Lumazinsynthesen aus thermophilen Mikroorganismen

Steady-State-Enzymkinetiken bei 37 °C ergaben für das Enzym aus *A. aeolicus* K_M -Werte für die beiden Substrate von 10 μM (5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion, **6**) und 26 μM (3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat, **7**) bei einer maximalen Reaktionsgeschwindigkeit von 25 $\text{nmol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$. Diese, im Vergleich zum Enzym aus *B. subtilis*, fast zehnfach langsamere Aktivität ist bei einem thermophilen Mikroorganismus nicht ungewöhnlich und konnte durch schrittweise Erhöhung der Reaktionstemperatur auf über 80 °C erheblich gesteigert werden, wie die Reaktionsgeschwindigkeits-Temperatur-Kurve in Abbildung 4.28 eindeutig zeigt. Vergleicht man diese Kurve mit der von dem Enzym aus *B. subtilis* in Abbildung 4.25, befindet sich die Kurve auch noch bei Temperaturen über 80 °C in der steigenden Phase. Aus der Reaktionsgeschwindigkeits-Temperatur-Kurve konnten weitere thermodynamische Parameter ermittelt werden. Die Aktivierungsenergie beträgt 74,2 kJ mol^{-1} . Die Reaktionsenergie ΔG mit 89 kJ mol^{-1} setzt sich aus einem Enthalpieterm ΔH von 72 kJ mol^{-1} und einer Reaktionsentropie ΔS von -54,1 $\text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$ zusammen (Tabelle 4.6). Die dazugehörigen Plots (Arrhenius-Plot bzw. Eyring-Plot) sind in Abbildung 4.31 (Vierecke) dargestellt.

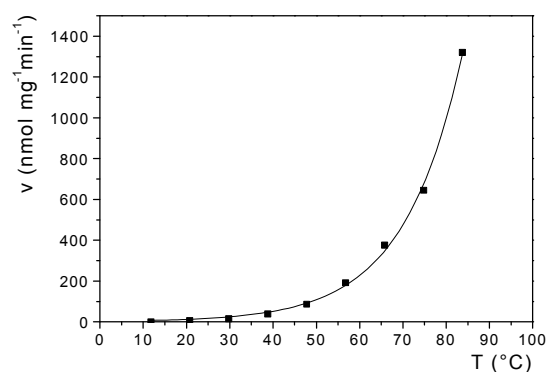


Abbildung 4.28: Temperaturabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der Lumazinsynthese aus *A. aeolicus*.

Während die K_M -Werte der Lumazinsynthese aus *M. jannaschii* bei 37 °C mit 49 μM für das 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat (**7**) bzw. 4 μM für 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (**6**) im normalen Bereich liegen, ist die Reaktionsgeschwindigkeit mit 12 $\text{nmol mg}^{-1} \text{h}^{-1}$ im Vergleich zum Enzym aus *A. aeolicus* halbiert. In Abbildung 4.29 ist zu sehen, dass die Reaktionsgeschwindigkeit bei steigender Temperatur schon bei etwa 75 °C mit 93 $\text{nmol mg}^{-1} \text{h}^{-1}$ ein Maximum zeigt. Die weiteren thermodynamischen Parameter, die aus dem Arrhenius- und dem Eyring-Plot aus Abbildung 4.31 (Dreiecke) ermittelt werden konnten, sind in Tabelle 4.6 zusammengefasst.

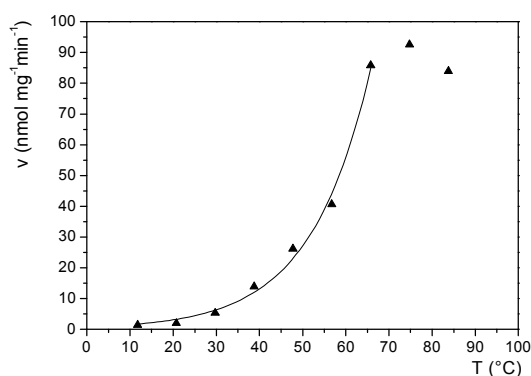


Abbildung 4.29: Temperaturabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der Lumazinsynthese aus *M. jannaschii*.

Die Reaktionsgeschwindigkeits-Temperatur-Kurve der Lumazinsynthese aus *P. furiosus* ergab eine maximale Geschwindigkeit bei 37 °C von etwa 6 $\text{nmol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$. Die stellt eine weitere Halbierung im Vergleich zu den oberen beiden Enzymen dar. Allerdings zeigt die Reaktionsgeschwindigkeits-Temperatur-Kurve in Abbildung 4.30, analog zu der Kurve des Enzyms aus *A. aeolicus* in Abbildung 4.28, kein Maximum bei 85 °C, sondern steigt auch nach dem letzten Messpunkt weiter an. Der Arrhenius- bzw. Eyring-Plot und die daraus ermittelten thermodynamischen Parameter sind in Abbildung 4.31 (Kreise) dargestellt bzw. in Tabelle 4.6 zusammengefasst. Aufgrund der schlechten Ausbeuten bei der Reinigung war es bei dem Enzym nicht möglich, reproduzierbare K_M -Werte für beide Substrate zu erhalten.

Tabelle 4.6: Thermodynamische Parameter aus Arrhenius-Plots und Eyring-Plots ermittelt.

Organismus	E_a (kJ mol ⁻¹)	ΔG (kJ mol ⁻¹)	ΔH (kJ mol ⁻¹)	ΔS (J K ⁻¹ mol ⁻¹)
<i>A. aeolicus</i>	74,3 ± 1,1	88,0 ± 2,3	72 ± 1,1	- 53,8 ± 3,4
<i>M. jannaschii</i>	63,7 ± 3,1	90,1 ± 6,6	61 ± 3,1	-96,8 ± 10,1
<i>P. furiosus</i>	63,1 ± 4,3	92,0 ± 8,9	60 ± 4,3	-105,9 ± 13,4
<i>B. subtilis</i>	74,6 ± 1,1	83,0 ± 1,0	76 ± 1,0	-22,4 ± 3,6
Nicht enzymatisch	46,3 ± 0,6	86,0 ± 0,5	45 ± 0,5	-127,1 ± 1,6

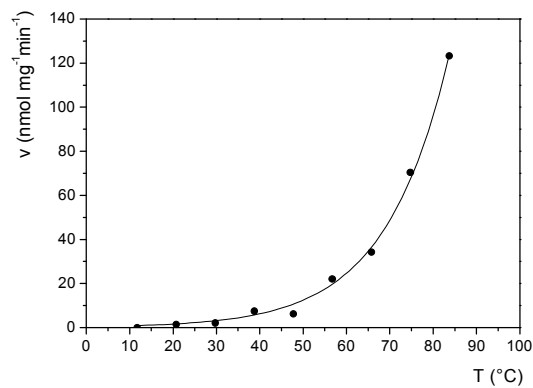


Abbildung 4.30: Temperaturabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der Lumazinsynthese aus *P. furiosus*.

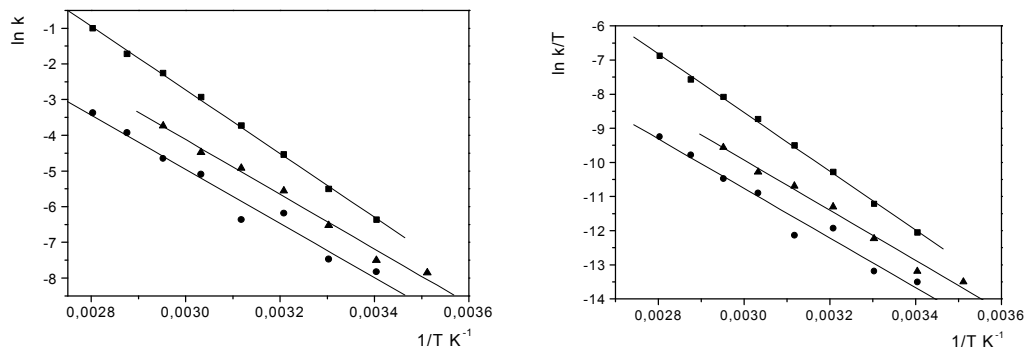


Abbildung 4.31:

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

rechts: Eyring-Plot, mit $\ln\left(\frac{k}{T}\right) = -\frac{\Delta H}{R} \cdot \frac{1}{T} + \frac{\Delta S}{R} - \ln\left(\frac{h}{k_B}\right)$;

■ : AQ-Lusy, ▲ : MJ-Lusy, ● : PF-Lusy

4.1.2.2.4 Lumazinsynthesen aus Pflanzen

Kinetische Untersuchungen für das Enzym aus *A. thaliana* unter Steady-State Bedingungen wurden wie unter 2.2.3.8.3 beschrieben, jedoch bei 25 °C durchgeführt, da es sich bei diesem Enzym um ein pflanzliches Protein handelt. Der K_M beträgt 4 μM für 5-Amino-6-ribitylamino-2,4-(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (**6**) bzw. 15 μM für 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat (**7**). Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit bei 25 °C beträgt 32 $\text{nmol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$. Die kinetischen Daten sind in der Übersichtstabelle 4.8 aufgeführt. Bei einer Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 37 °C, stieg die Reaktionsgeschwindigkeit auf 92 $\text{nmol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ an.

Die bei 25 °C bestimmten Enzymkinetiken (siehe auch Tabelle 4.8) für die Lumazinsynthase aus *S. oleracea* ergaben K_M -Werte von 3 μM für Amino-6-ribitylamino-2,4-(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (**6**) bzw. 40 μM für 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat (**7**) bei einer maximalen Reaktionsgeschwindigkeit von 46 $\text{nmol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$. Bei einer Temperatur von 37 °C verdoppelte sich der v_{max} -Wert auf 100 $\text{nmol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$. Diese Werte weichen von den in der Literatur beschriebenen Daten (Jordan et al., 1999) stark ab. Gründe könnten andere Pufferbedingungen (50 mM Tris/HCl, pH 7,5) und Unterschiede in der Durchführung des Enzymtests liegen (vgl. 4.1.2.3 Diskussion). Ein Sequenzvergleich zeigte einen Ersatz der zweiten Aminosäure Arginin durch Asparagin bei Jordan et al. Der Tausch dürfte jedoch keine Auswirkungen auf die katalytische Aktivität haben, da der N-Terminus nicht an der Bildung des aktiven Zentrums beteiligt ist. Eine veränderte Quartärstruktur der in dieser Arbeit verwendeten Lumazinsynthase und damit ein Grund für die veränderte katalytische Aktivität konnte durch elektronenmikroskopische Untersuchungen ausgeschlossen werden. Abbildung 4.1C zeigt typische 160 Å Kapside. Das Verhalten auf der Gelfiltrationssäule (Elution im Ausschlussvolumen) bestätigte die ikosaedrische Struktur (vgl. 4.1.1.1).

4.1.2.2.5 Lumazinsynthasen aus Hefen und deren ungewöhnliche Affinität zu Riboflavin (9)

Obwohl nach dem zweiten Reinigungsschritt auf den SDS-Gelen nur noch die Lumazinsynthasebande bei ca. 18 kDa sichtbar war, zeigte das Enzym aus *S. pombe* jedoch eine intensive orange-gelbe Färbung. Die Aufnahme von UV-Spektren (Abbildung 4.33 blau) liessen vermuten, dass es sich um Riboflavin (9) handelt. Diese Annahme konnte nach Denaturierung und erneuter Aufnahme eines UV-Spektrums qualitativ (Abbildung 4.33 rot) und nach Bestimmung über HPLC quantitativ bestätigt werden. Neben 0,17 bis 0,21 μmol Riboflavin pro μmol Untereinheit ergab sich aus den HPLC-Messungen ein Lumazingehalt von 0,028 bis 0,032 μmol pro μmol Untereinheit. Die Aufnahme von Fluoreszenzspektren ergab eine relative Quantenausbeute des gebundenen Riboflavins im Vergleich zur gleichen Menge freien Riboflavins von 2 %. Mit Hilfe von Fluoreszenzquench-Titrationen, die in Abbildung 4.32 (links) dargestellt sind und Gleichgewichtsdialyse konnten Bindungskonstanten von 1,2 μM bzw. 1,3 μM bestimmt werden.

Die relativ feste Bindung verlangte drastische Bedingungen, um den Liganden zu entfernen. Dies konnte unter partieller Auffaltung des Enzyms mit 5 M Harnstoff und Rückfaltung durch schrittweise Entfernung des Harnstoffes (Dialyse gegen 50 mM Kaliumphosphat, pH 7,0, mit sinkender Harnstoffkonzentration) erreicht werden. Daneben wurde die Verdrängung des Riboflavins durch die beiden Substrate untersucht. Es stellte sich durch Fluoreszenztitrationen heraus, dass das gebundene Riboflavin (9) nur durch das Substrat 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (6) verdrängt werden kann. Aus der Röntgenstruktur ist bekannt, dass Riboflavin im aktiven Zentrum in der Bindungstasche für dieses Substrat gebunden vorliegt (4.1.1.2). Das zweite Substrat 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat (7) war dazu nicht fähig; es erleichterte lediglich die Verdrängung von Riboflavin durch das Substratanalogon 5-Nitro-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (17). In Abbildung 4.32 rechts ist die Verdrängung von Riboflavin aus Wildtypenzym durch 17 mit (Kreise) und ohne Zugabe (Dreiecke) von 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat dargestellt.

Dies lässt darauf schliessen, dass nach Bindung des Zuckerphosphates eine Konformationsänderung im aktiven Zentrum stattfindet.

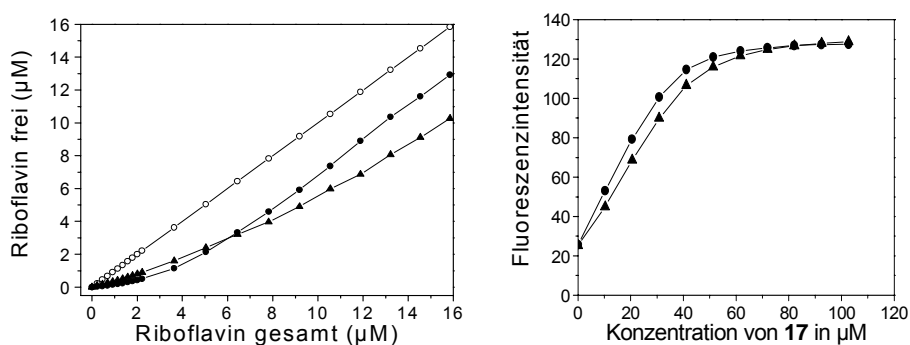


Abbildung 4.32: Links: Fluoreszenzquench-Titrations. O, **9** in Puffer; ● **9** in 10 µM Wildtyp-Lumazinsynthase, ▲ **9** in 10 µM W27Y-Mutante. Rechts: Verdrängung von **9** durch **17** in Wildtypprotein (60 µM) ohne Zusätze (▲) und nach Zugabe von 60 µM **7** (●).

Sowohl das native als auch das von Riboflavin befreite Protein wurde auf seine enzymatische Aktivität untersucht. Der K_M -Werte für 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (**6**) bzw. 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat (**7**) betragen 5 µM bzw. 67 µM bei einer maximalen Reaktionsgeschwindigkeit von 217 nmol mg⁻¹ min⁻¹. Die kinetischen Daten sind in Tabelle 4.7 und Tabelle 4.8 zusammengefasst. Für den gebundenen Liganden Riboflavin (**9**) konnte eine Inhibitorkonstante von 17 µM festgestellt werden. Dieser Wert steht im Einklang mit der Beobachtung, dass Riboflavin durch das Substrat 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (**6**) verdrängt werden kann.

Um die optischen Gegebenheiten des gebundenen Riboflavins besser zu verstehen, wurden sowohl Absorptionsspektren, als auch CD-Spektren aufgenommen. Dazu wurde die Menge an gebundenen Riboflavin durch Riboflavinzugaben im Überschuss erhöht und anschliessend der Anteil an freiem Riboflavin durch Dialyse gegen 50 mM Kaliumphosphat, pH 7,0 so gering wie möglich gehalten. Bei einer Dissoziationskonstante von 1,3 µM konnte so eine nahezu 100 % Sättigung bei einer minimalen freien Riboflavinmenge erreicht werden. Das Absorptionsspektrum von gebundenem Riboflavin (blau) in Abbildung 4.33 unterscheidet sich stark von dem des freien Riboflavins (rot).

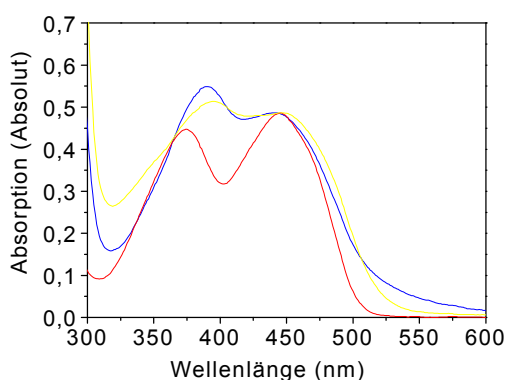


Abbildung 4.33: Absorptionsspektren von freiem Riboflavin (rot), Riboflavin gebunden in Wildtypprotein (blau) und in der Mutante W27Y (gelb).

Die Absorptionsbande bei 370 nm wird um etwa 20 nm bathochrom verschoben. Für das Absorptionsmaximum bei 445 nm ergibt sich eine Bandenverbreiterung im langwelligen Bereich nach 500 nm. Zudem wird das Verhältnis der beiden Bandenhöhen zueinander verändert.

Bei der Aufnahme von CD-Spektren wurde der Unterschied von enzymgebundenen im Vergleich zu freiem Riboflavin (**9**) noch deutlicher sichtbar (Abbildung 4.34). Freies Riboflavin zeigt unter diesen Messbedingungen einen negativen Cotton-Effekt bei 450 nm und einen positiven Cotton-Effekt bei 340 nm (Abbildung 4.34C). Beim Riboflavin/Enzym-Komplex sind positive Cotton-Effekte bei 405 nm und 530 nm und negative Cotton-Effekte bei 360 nm und 460 nm zu erkennen (Abbildung 4.34A). Zusätzlich tritt eine Signalverstärkung bei gleicher Riboflavinmenge durch die Bindung an das Enzym auf.

Beide optischen Untersuchungen deuten auf einen Charge-Transfer-Komplex zwischen einem aromatischen Seitenkettenrest im aktiven Zentrum und dem Isoalloxazinring des Riboflavinrings hin. Die Vermutung konnte durch die Aufnahme von zeitaufgelösten Fluoreszenzspektren bestätigt werden (Kompa, 2002).

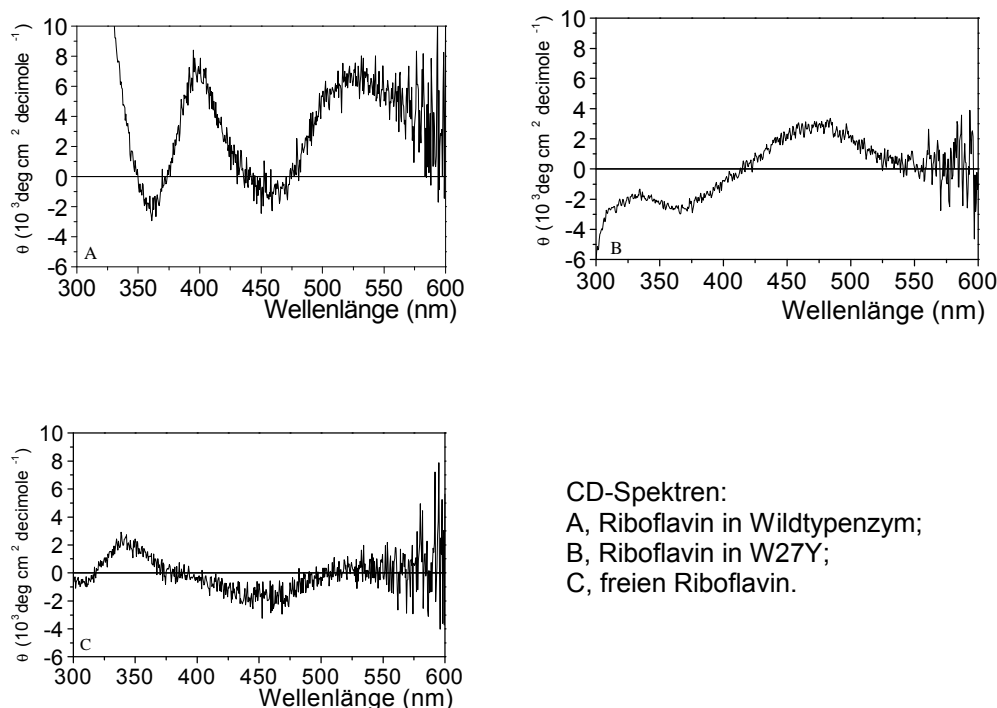


Abbildung 4.34

Um mehr über die katalytischen Eigenschaften und das unerwartete Bindungsvermögen von Riboflavin (**9**) zu erfahren, wurden gerichtete Punktmutationen im aktiven Zentrum durchgeführt. Durch kristallographische Untersuchungen an den Lumazinsynthasen aus *B. subtilis* und *S. cerevisiae* ist bekannt, dass das Substrat 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (**6**) mit seinem heterocyclischen Rest einen koplanaren Komplex mit dem Aminosäurerest F22 im Enzym aus *B. subtilis* bzw. W26 im Hefeenzym eingeht (Ritsert et al., 1995; Meining et al., 2000). Dieser Rest entspricht im untersuchten Enzym der Position W27. Es lag die Vermutung nahe, dass durch Mutationen an dieser Stelle sowohl die katalytische Aktivität des Enzyms, als auch die Fähigkeit Riboflavin zu binden verändert werden könnte. Der unpolare Tryptophanrest wurde durch die Aminosäuren Glycin, Isoleucin, Serin, Histidin, Phenylalanin und Tyrosin ersetzt.

Alle Mutationen konnten durch zweistufige PCR erhalten werden (3.1.1.2). Zur Kontrolle der eingeführten Mutationen wurde von jeder transformierten Mutante ein PCR-Screen mit anschliessendem Verdau durchgeführt. Da nur solche Fragmente die Restriktionsschnittstelle enthielten, die die Mutation besitzen, konnten spezifisch die positiven Transformanten ausgewählt werden. Ein endgültiger Nachweis erfolgte durch DNA-Sequenzierung aus den isolierten Plasmiden. Die Transformation, Expression und Reinigung konnte analog zum Wildtypprotein unter Standardbedingungen durchgeführt werden (3.1.2.2). Die katalytischen Daten sind in Tabelle 4.7 zusammengefasst. Die Reaktionsgeschwindigkeit und die K_M -Werte wurden durch den Ersatz von Tryptophan durch Y oder F nur gering beeinflusst. Durch den Einbau der anderen vier Aminosäurereste wurde v_{max} um das 2,7-fache verringert. Die K_M -Werte für die Substrate 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (**6**) bzw. 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat (**7**) stiegen um etwa das hundert- bzw. das dreifache.

Tabelle 4.7: Kinetische Parameter für die Lumazinsynthese aus *S. pombe* mit Mutanten:

Enzym	K_M 1 (μM)	K_M 2 (μM)	V_{max} ($\text{nmol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$)	K_D 3 (μM)	K_I 4 (μM)
Wildtyp	67	5	217	1.2	17
W27Y	86	3	233	12.0	
W27F	65	3	167		
W27H	145	400	67		
W27S	187	460	72		
W27I	137	230	92		
W27G	168	430	90		

K_M 1: K_M für 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat

K_M 2: K_M für 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion

K_D 3: K_D für Riboflavin

K_I 4: K_I für Riboflavin

Grössere Auswirkungen hatte der Aminosäureaustausch auf die Riboflavinbindung. Nach der Reinigung konnte nur bei der W27Y-Mutante eine Gelbfärbung beobachtet werden, alle anderen Mutante wurden farblos isoliert. Durch Fluoreszenztitration konnte der K_D mit 12 μM ermittelt werden (Abbildung 4.32 links) – ein zehnfach höherer Wert im Vergleich zum Wildtyp.

Bei Dialyseexperimenten mit den anderen fünf Mutanten, bei denen Riboflavin im Überschuss zugegeben und gegen 50 mM Kaliumphosphat, pH 7,0 dialysiert wurde, zeigten auch W27F und W27H ein schwaches Riboflavinbindevermögen.

Für die W27Y-Mutante wurden UV- und CD-Spektren aufgenommen. Abbildung 4.33 zeigt das UV-Spektrum (gelb) dieser Mutante. Im Vergleich zum Spektrum von freiem Riboflavin (**9**) (rot) ist das Verhältnis der beiden Absorptionsmaxima zueinander verändert und das erste Absorptionsmaximum zeigt die gleich bathochrome Verschiebung, wie beim Wildtypprotein. Die Verbreiterung der langwelligen Absorptionsbande bei 455 nm, die beim Wildtyp auf einen Charge-Transfer-Komplex hinweist, ist nur sehr schwach ausgeprägt.

Stärker zeigten sich die Unterschiede in den CD-Spektren in Abbildung 4.34B. Der positive Cotton-Effekt bei 475 nm und der negative Cotton-Effekt bei 365 nm können als ein an der Nulllinie gespiegeltes und um 25 nm in den langwelligeren Bereich verschobenes Spektrum von freiem Riboflavin (**9**) beschrieben werden. Ein Signal im Bereich über 550 nm, das auf einen Charge-Transfer-Komplex zwischen Riboflavin und Protein hinweisen würde, ist nicht zu beobachten. Beide spektroskopischen Methoden deuteten darauf hin, dass die Bindung im Riboflavin/Enzym-Komplex beim Wildtyp anders geartet ist als bei der W27Y-Mutante. Auch diese Vermutung konnte mittels zeitaufgelöster Fluoreszenzspektroskopie bestätigt werden (Kompa, 2002).

Auch das Protein aus *S. cerevisiae* zeigte trotz seiner nahezu 100 % Reinheit nach drei Säulenschritten eine leichte Gelbfärbung. Die Absorptionsspektren in Abbildung 4.40 bestätigten die Vermutung, dass es sich bei diesem gebundenen Chromophor (blau) ebenfalls um Riboflavin (**9**) handelt. Im Vergleich zu dem Absorptionsspektrum des Enzyms aus *S. pombe* (Abbildung 4.33 blau) ist bei dem enzymgebundenen Riboflavin aus *S. cerevisiae* (Abbildung 4.35 blau) kein Hinweis auf ein Charge-Transfer-Komplex zu erkennen. Fluoreszenzquench-Titrations ergaben eine Dissoziationskonstante von 3,9 μM . Die aus der Literatur bekannten kinetischen Daten konnten durch Steady-State Kinetiken bestätigt werden und sind in Tabelle 4.8 aufgeführt (Mörtl et al., 1996). Für die Substrate 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (**6**) und 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat (**7**) wurden K_M -Werte von 4 μM und 90 μM bestimmt. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit betrug 257 $\text{nmol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$.

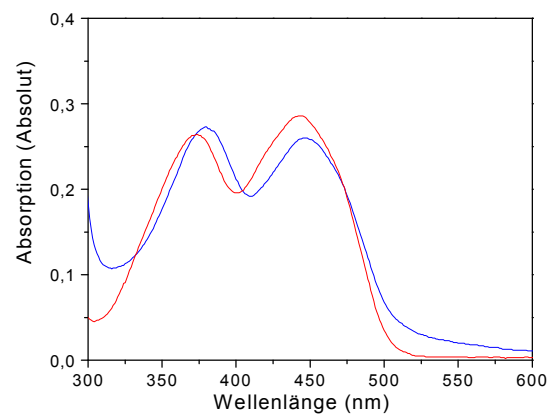


Abbildung 4.35: Absorptionsspektren von freiem Riboflavin (rot), Riboflavin gebunden in Wildtypprotein aus *S. cerevisiae* (blau).

4.1.2.3 Diskussion

Bei einem Vergleich der Aminosäuresequenzen der untersuchten Lumazinsynthasen in Abbildung 4.36, lässt sich im Bereich der Aminosäuren, die die aktiven Zentren bilden, eine relativ hohe Sequenzhomologie beobachten.

An Position 22 (Nummerierung bezieht sich im folgenden immer auf das Enzym aus *B. subtilis*) ist in allen Sequenzen ein Phenylalanin oder ein Tryptophan zu finden. Diese Aminosäure ist für die Bildung eines Sandwichkomplexes mit dem Pyrimidinring des Substrates 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (**6**) mitverantwortlich, da der aromatische Ring des Phenylalanins (Tryptophans) koplanar zum Pyrimidinring liegt und so wesentlich zur Positionierung dieses Substrates im aktiven Zentrum beiträgt. Die Sequenzen, in denen das Phenylalanin durch ein Tryptophan ersetzt ist, sind alle Enzymen zuzuordnen, die eine pentamere Struktur besitzen. Ob tatsächlich ein direkter Zusammenhang zwischen dem Austausch Phenylalanin/Tryptophan an dieser Position und der Quartärstruktur des jeweiligen Enzyms besteht, ist nicht bekannt. Die in dieser Arbeit untersuchte Lumazinsynthase aus *N. meningitidis* besitzt hier ein Phenylalanin, obwohl sie den pentameren Enzymen zugeordnet werden konnte (4.1.1.4 und 4.1.1.5). Ihre pentamere Quartärstruktur wurde auf die übermäßige Anzahl an sauren Aminosäuren vor allem im C-terminalen Sequenzbereich zurückgeführt (vgl. Diskussion 4.1.1.5). Diese erhöhte negative Ladung könnte ebenfalls ein Grund für den sehr stark erhöhten K_M -Wert für 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (**6**) sein.

Ein Vergleich der Position H88, die mit auftretenden Intermediaten wechselwirken soll und für Protonentransferreaktionen verantwortlich gemacht wird, macht eine 100 %ige Konservierung deutlich.

Auch die, für die Bindung des zweiten Substrates Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat (**7**) wichtige Position 127 ist in allen Fällen mit einem Arginin besetzt.

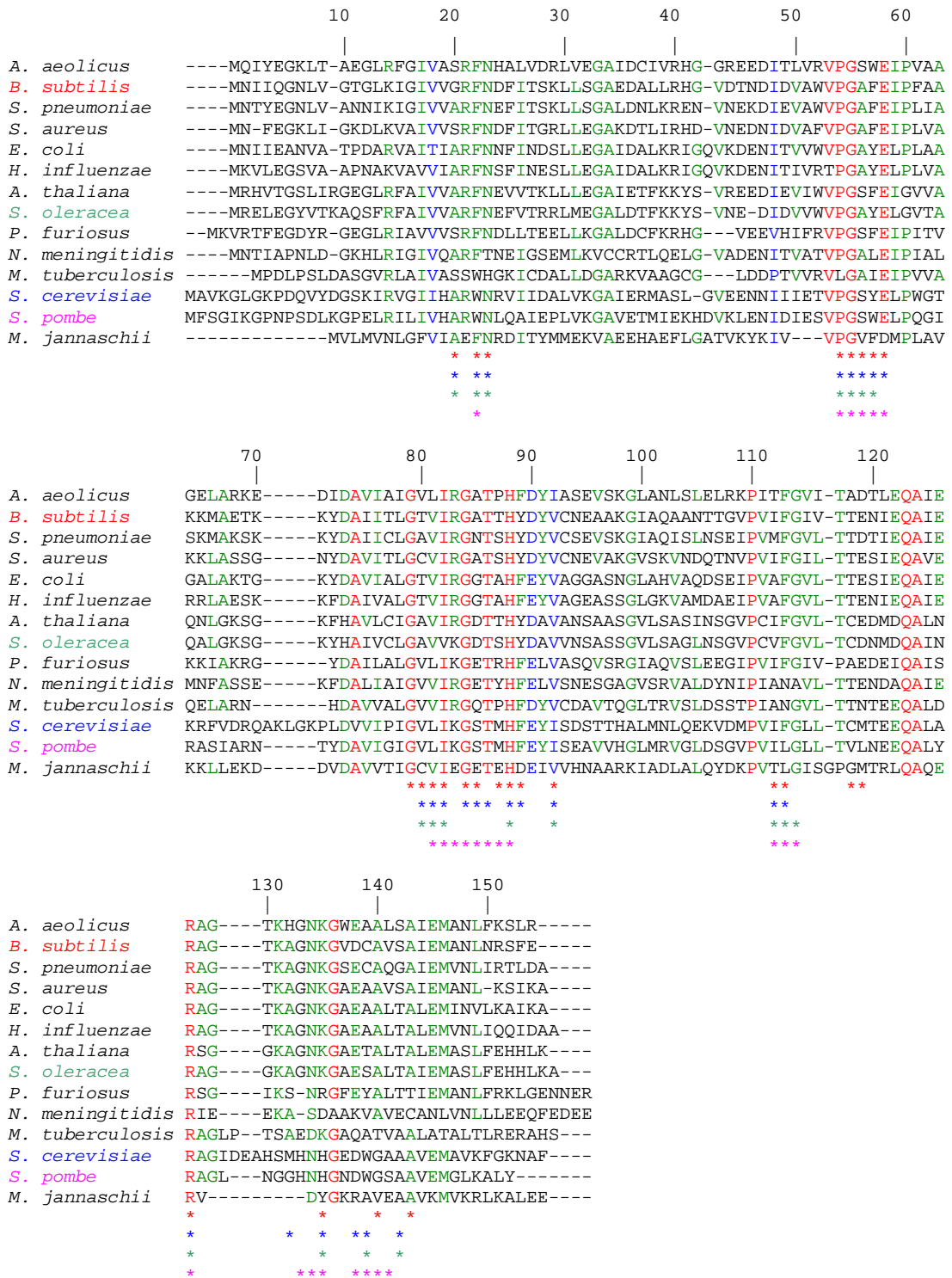


Abbildung 4.36: Sequenzvergleich der untersuchten Lumazinsynthasen. Aminosäuren, die Kontakte zu den Liganden in der entsprechenden Kristallstruktur ausbilden, sind mit einem Stern gekennzeichnet. Rote Sterne: *B. subtilis*; blaue Sterne: *S. cerevisiae*; grüne Sterne: *S. oleracea*; rosa Sterne: *S. pombe*. Die Nummerierung bezieht sich auf die Sequenz aus *B. subtilis*. Rot: hochkonservierte, grün: konservierte Reste, blau: Aminosäuren mit gleicher Polarität.

Bei den Enzymen aus thermophilen Mikroorganismen war in allen drei Fällen im Vergleich zu den mesophilen Mikroorganismen eine Herabsetzung der Reaktionsgeschwindigkeit bei 37 °C zu beobachten (Tabelle 4.8). Die Aktivität betrug im Vergleich zum Enzym aus *B. subtilis* nur noch 2,5 bis 10 %, konnte aber durch Erhöhung der Temperatur erheblich gesteigert werden.

Werden die thermodynamischen Parameter der Lumazinsynthesen aus *B. subtilis*, *A. aeolicus*, *M. jannaschii* und *P. furiosus* mit der nicht-enzymatischen Reaktion verglichen, so sind bei gleichbleibender Reaktionsenergie die Aktivierungsenergien und Reaktionsenthalpien leicht erhöht (Tabelle 4.3 und Tabelle 4.6). Der grösste Unterschied zeigt sich jedoch im entropischen Term. Bei dem mesophilen Enzym aus *B. subtilis* beträgt die Reaktionsentropie nur noch 20 % des nicht-enzymatischen Terms. Bei den thermophilen Mikroorganismen ist die Entropie mehr oder weniger, aber dennoch eindeutig, verringert. Das Reaktionsgeschwindigkeitsmaximum des Enzyms aus dem mesophilen Mikroorganismus *B. subtilis* tritt dabei bei unerwartet hoher Temperatur (ca. 80 °C) auf (Abbildung 4.25). Diese Beobachtung steht im Einklang mit den von Zhang et al. gemachten kalorimetrischen Messungen, wonach das Enzym erst bei 93,3 °C irreversibel zerfällt (Zhang et al., 2001).

Eine sichtbare Verlangsamung der Reaktionsgeschwindigkeit ist bei den pflanzlichen Enzymen in Tabelle 4.8 zu beobachten. Beide pflanzlichen Enzyme bewegen sich mit ihren Daten einem ähnlichen Bereich. Die kinetischen Daten wurden bei einer, für Pflanzen typischen, Wachstumstemperatur von 25 °C bestimmt. Die optimale Wachstumstemperatur für die meisten pathogenen Mikroorganismen beträgt 37 °C. Es wäre zu erwarten gewesen, dass bei den pflanzlichen Enzymen schon bei 25 °C eine vergleichbar hohe Aktivität zu beobachten ist. Im Vergleich zum Enzym aus *B. subtilis* beträgt die Geschwindigkeit jedoch nur noch 16 %. Durch Erhöhung der Temperatur auf 37° war lediglich eine Erhöhung der Geschwindigkeit auf 93-100 nmol mg⁻¹ min⁻¹ zu beobachten. Dies entspricht etwa 40 %, bezogen auf v_{max} des Enzyms aus *B. subtilis*. Jordan et al. stellten für das Enzym aus Spinat K_M-Werte von 20 µM bzw. 26 µM für 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidinon (6) bzw. Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat (7) und eine Reaktionsgeschwindigkeit von 275 nmol mg⁻¹ min⁻¹ bei 37 °C fest (Jordan et al., 1999).

Diese Daten weichen stark von den hier gefundenen ab (Tabelle 4.8). Ein Grund könnte die Verwendung unterschiedlicher Puffer sein. Die Autoren führten die Kinetik in 50 mM Tris/HCl, pH 7,5 durch. Bacher et al. konnten 1986 eine Dissoziation der Kapside in 100 mM Tris/HCl, pH 8,0 beobachten (Bacher et al., 1986). Aus diesem Grund wurden bei allen Messungen Phosphatpuffer verwendet. Eine weitere Erklärung könnte in der Durchführung der kinetischen Untersuchungen zu finden sein. Die Reaktionen wurden bei Jordan et al. mit Enzym gestartet. Aus der Literatur ist jedoch bekannt, dass beide Substrate auch ohne Enzym miteinander reagieren können (Kis et al., 2001). Deshalb wurde in dieser Arbeit ein Substrat mit dem Enzym vorinkubiert und die Reaktion durch Zugabe des zweiten Substrates gestartet. Dazu wurde für jeden Messpunkt ein Blindwert ohne Enzym bestimmt und von der Enzymreaktion abgezogen. Ob ein Blindwert bei Jordan et al. bestimmt wurde, ist aus der Literatur nicht ersichtlich und könnte zu erhöhten v_{\max} -Werten führen.

Tabelle 4.8: Übersichtstabelle der ermittelten kinetischen Parameter für Lumazinsynthasen aus verschiedenen Organismen.

	Organismus	K_M 1 (μM)	K_M 2 (μM)	v_{\max} ($\text{nmol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$)	Unter- einheiten
Patho- gene Bakterien	<i>B. subtilis</i>	55	9,0	242	60
	<i>E. coli</i> ¹	62	4,2	200	60
	<i>H. influenzae</i>	145	66,0 ²	141	60
	<i>M. tuberculosis</i>	117	20,0	110	5
	<i>N. meningitidis</i>	2080	51,0	158	5
	<i>S. aureus</i>	62	6,0	85	60
thermo- phile Bakterien	<i>S. pneumoniae</i>	49	7,0	83	60
	<i>A. aeolicus</i>	26	10,0	25	60
	<i>M. jannaschii</i>	49	4,2	12	60
Pflanzen	<i>P. furiosus</i>	-	-	6	60
	<i>A. thaliana</i>	15	4,0	32 ³	60
Hefen	<i>S. oleracea</i>	40	3,0	46 ³	60
	<i>S. cerevisiae</i> ¹	90	4,0	257	5
	<i>S. pombe</i>	67	5,0	217	5

K_M 1: K_M für Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat

K_M 2: K_M für 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion

¹: (Mörzl et al., 1996)

²: Hill-Koeffizient $n = 2,6$

³: 25 °C

Die auffälligste Veränderung in der Kinetik war bei der Lumazinsynthase aus *H. influenzae* zu beobachten. Während alle anderen Enzyme einer typischen Michaelis-Menten-Kinetik folgten, war bei dem Enzym aus *H. influenzae* für das Substrat 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (**6**) eine sigmoidale Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit zu erkennen (Tabelle 4.8). Der daraus ermittelte Hill-Koeffizient von 2,6 ist ein Hinweis auf eine positive Kooperativität. Dieser Verlauf ist erstaunlich, da aus der Aminosäuresequenz in Abbildung 4.36 keine auffälligen Veränderungen in den Bereichen des aktiven Zentrums hervorgehen. Die einzige vergleichbare Veränderung in der Reaktionskinetik war bei der F22D-Mutante des Enzyms aus *B. subtilis* zu erkennen, bei der die positive Kooperativität eindeutig mit der starken Veränderung der Ligandbindungsstelle zu begründen ist (Tabelle 4.5). Da aber, wie bei der Lumazinsynthase aus *S. pombe* und ihrem Riboflavinbindungsvermögen gezeigt (vgl. 4.1.1.2 und 4.1.2.2.5), schon geringe räumliche Verschiebungen von Aminosäuren erhebliche Auswirkungen haben können, wäre eine Kristallstruktur des Enzyms aus *H. influenzae* mit gebundenem Liganden eine Möglichkeit Lösungsansätze für dieses auffällige Verhalten zu finden.

Zusammenfassung:

Lumazinsynthasen aus verschiedenen Organismen, wie Bakterien, Hefen und Pflanzen besitzen ähnliche kinetische Parameter, die innerhalb der einzelnen taxonomischen Gruppen noch stärker miteinander korrelieren (Tabelle 4.8). Bei den thermophilen Mikroorganismen lässt sich die Reaktionsgeschwindigkeit durch Erhöhung der Reaktionstemperatur erheblich steigern.

Durch kinetische Untersuchungen unter Single-Turn-Over Bedingungen war es möglich einen umfassenden Einblick in den Reaktionsablauf zu bekommen und Reaktionsintermediate des in der Literatur postulierten Reaktionsmechanismus zu bestätigen. Voraussetzung war das Vorhandensein von Zwischenprodukten mit ausgedehnten π -Systemen, die die Verbindungen optisch detektierbar machten. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der katalysierten Reaktion konnte der Lumazinbildung zugeordnet werden.

Durch umfassende Punktmutagenese konnte gezeigt werden, dass keine Aminosäure im aktiven Zentrum durch Austausch zu einem völlig inaktiven Enzym führt. Der Einbau einer sauren Aminosäure an Position F22 im *B. subtilis* Enzym führt zu einer erschwerten Bindung des 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindions (**6**). Als Folge war eine sigmoide Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit mit einem positiven Hill Koeffizient von 3,6 und somit einer positiven Kooperativität zu beobachten. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der Beobachtung, die bei ¹⁹F NMR Untersuchungen mit Fluorlumazinen gemacht wurde, dass diese Mutante (F22D) unfähig ist, diesen Liganden zu binden (Scheuring et al., 2001).

Daneben wird durch den Austausch an manchen Positionen, die zusätzlich oder ausschliesslich zur Stabilisierung des Enzyms beitragen, seine Struktur verändert.

Diese Beobachtungen lassen darauf schliessen, dass das Enzym keine wahre katalytische Aktivität besitzt, sondern vielmehr das Zusammenfinden der beiden Substrate fördert und die Reaktion durch eine optimale Positionierung der Reaktanden zueinander wesentlich erleichtert.

Die Aufgabe der Lumazinsynthesen aller Organismen besteht somit hauptsächlich in der Verringerung der Reaktionsentropie.

4.2 Lumazinsynthese als Funktionsprotein

4.2.1 His₆-Lumazinsynthese

Nach Expression und Zellaufschluss mit einem EDTA freien Puffer wie unter 3.2.1 beschrieben, konnte die eingeführte funktionelle Gruppe bei der Reinigung genutzt werden. Für die Klonierung der His₆-Lusy wurde an den C-Terminus der Lumazinsynthesesequenz aus *B. subtilis* ein sechs Aminosäure langes Peptid (HHHHHH) gekoppelt (Fischer, 2000). Aufgrund der Fähigkeit von Histidinen an freie Koordinationsplätze von komplexierten Metallen zu binden, konnte eine reversible Bindung an eine Ni-NTA-Säule erreicht werden. Das SDS-Polyacrylamidgel in Abbildung 4.37 zeigt deutlich, dass alle anderen Proteine des Rohextraktes (Spur 1) im Durchlauf (Spur 2) oder spätestens beim Waschen mit Puffer einer geringen Imidazolkonzentration eluierten. Durch einen Stufengradienten mit steigender Imidazolkonzentration, konnte das Protein mit 300 mM Imidazol mit einer nahezu 100 %igen Reinheit eluiert werden (Spuren 3-7).

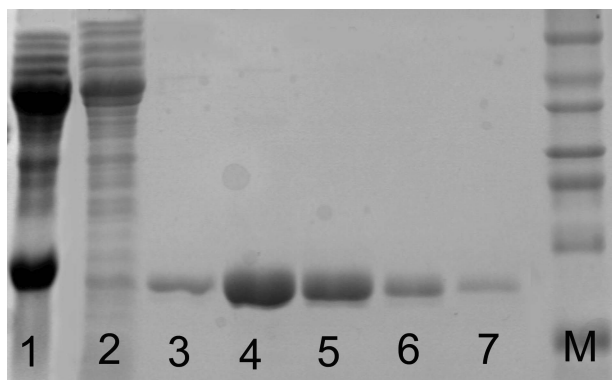


Abbildung 4.37: SDS-Polyacrylamidgel: His₆-Lumazinsynthese. Reinigung über Ni-NTA-Säule. 1, Rohextrakt; 2, Durchlauf; 3-6, Fraktionen bei 300 mM Imidazol; M, Molekulargewichtsmarker.

Nach der Reinigung konnte bei der Lagerung eine Aggregation des Proteins beobachtet werden. Der Grund ist, dass bei der Elution des Proteins mit Imidazol immer geringe Mengen von Nickelionen miteluiert werden. Diese Nickelionen können in der proteinhaltigen Lösung mit den Histidinen wechselwirken und zu

Proteinaggregaten führen. Durch Zugabe von EDTA war es möglich, die Nickelionen zu komplexieren und die Aggregate wieder aufzulösen. Daher wurde den proteinhaltigen Fraktionen der Ni-Chelat-Affinitätssäule 0,5 mM EDTA zugesetzt. Für die weiteren Untersuchungen an Nickelchelatorlipiden mussten anschliessend sämtliche metallkomplexierenden Pufferkomponenten (Imidazol, EDTA) aus dem System entfernt werden. Daher wurde die Proteinlösung mehrfach gegen 50 mM Kaliumphosphat, pH 7,0, dialysiert.

Messungen zur Bindung von His₆-Lusy an Nickel-Chelatorlipid-haltigen Lipidmono- und -bilayern bzw. Untersuchungen zur Interaktion von bereits an den Layer gekoppelter Lumazinsynthase mit Aktinfilamenten wurden mit der Filmwaagenteknik, der Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie (SPR) und der Neutronenreflexion wie unter 3.2.1 beschrieben durchgeführt.

Bei der Filmwaagenteknik konnte die Anlagerung der His₆-Lusy an einen Lipidlayer durch die Änderung des Lateraldruckes beobachtet werden. Wird nach Zugabe des Proteins der an die Histidinreste spezifisch bindende Anti-Penta-His-Antikörper (vgl. Western-Blot 2.2.3.7) und anschliessend ein Texasrotmarkierter Anti-Maus-IgG Antikörper (Anti-Maus-Texasred-Konjugat) zugegeben, so war es möglich, mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops eine homogene Fluoreszenz an der Lipid/Puffer-Grenzschicht zu detektieren. Die Anlagerung des Texasrot-markierten Primär-/Sekundärantikörper-Sandwiches an den Lipidlayer konnte nur bei Anwesenheit der His₆-Lusy im System beobachtet werden.

Die Reversibilität der Anlagerung zeigte sich bei SPR-Messungen am BiaCore Gerät. Die angelagerte Proteinschicht konnte durch Zugabe von EDTA wieder vollständig vom Lipidlayer entfernt bzw. nach erneutem Beladen des Chelatorlipids mit Nickel durch Zugabe von neuem Protein wieder gebildet werden.

Die genaueste Methode die Änderungen am Lipidlayer zu beobachten, ist die Neutronenreflexion. Hier wurde deutlich, dass sich die His₆-Lusy an einen Lipidmonolayer nicht in Form einer Einzelschicht anlagert. Vielmehr konnten die erhaltenen Daten nur interpretiert werden, wenn ein zweiter Layer mit geringerer Dichte angenommen wurde, der sich an den ersten anlagert. Abbildung 4.38 zeigt typische Streulängendichteprofile während eines Versuches. An den Stellen, an

denen das D₂O durch Protein verdrängt wurde, ist die Streulängendichte verringert. Es ist deutlich der Kapsiddurchmesser von 160 Å zu erkennen.

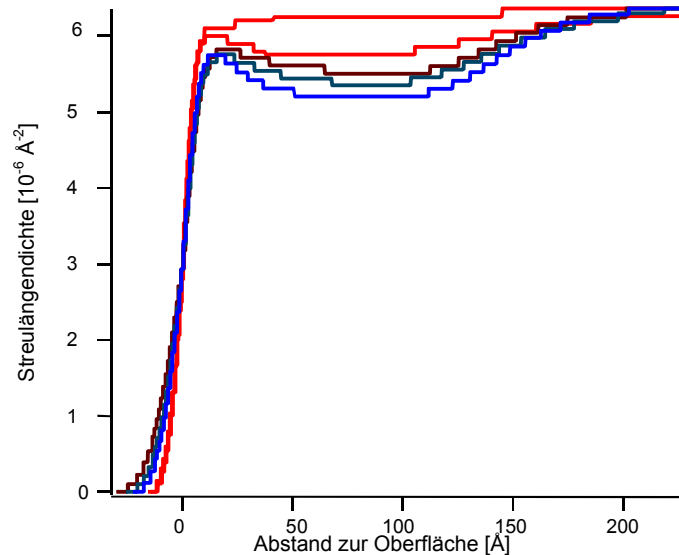


Abbildung 4.38: Streulängendichteprofile. Adsorption von His₆-Lumazinsynthase an einen Lipidlayer. Die Zeit zwischen den Graphen beträgt 1 h (Zeitverlauf von rot nach blau).

In einem weiteren Experiment konnte gezeigt werden, dass die Kapside als Anker und Abstandshalter für Aktinfilamente dienen können. Dazu wurden auf eine Glasoberfläche aufgezogene Bilayer mit Nickelchelator-Lipiden bestückt und die Lumazinsynthase adaptiert. Anschliessend wurden fluoreszenzmarkierte Aktinfilamente in das System gegeben und deren Verhalten untersucht.

Abbildung 4.39 zeigt in der oberen Hälfte den schematischen Aufbau, in der unteren Hälfte eine Mikrofluoreszenzaufnahme eines Aktinnetzwerkes, das an die mit His₆-Lusy funktionalisierte Membran gekoppelt ist.

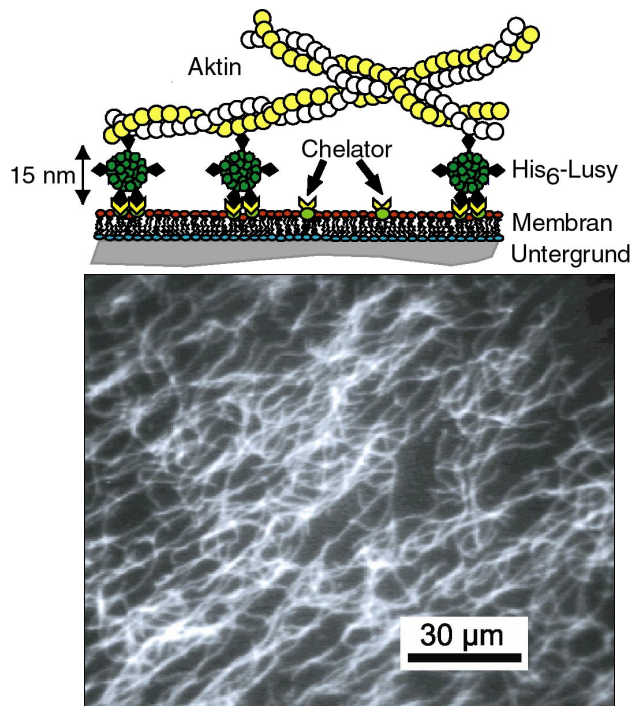


Abbildung 4.39:
 Oben: Schematische Darstellung der Verankerung von Aktinfilamenten an Membranen durch His₆-Lumazinsynthase.
 Unten: Mikrofluoreszenzaufnahme des zweidimensionalen Aktinnetzwerkes auf der mit His₆-Lumazinsynthase funktionalisierten Membran.

Die spezifische Bindung des Aktins ausschliesslich über die Histidinreste des Proteins, konnte sowohl durch die Zugabe von EDTA als auch durch pH-Änderungen nachgewiesen werden.

Das zugegebene EDTA bewirkt durch die Komplexbildung des Nickels ein Ablösen des Lumazinsynthaseankers von der Membran. Das gesamte Aktin/Protein-Konjugat konnte vollständig von der Lipidgrenzschicht abgelöst werden.

Die pH-abhängige Ladungsänderung der Histidine konnte zur reversiblen Ablösung des Aktins von dem Proteinanker genutzt werden. Bei pH 7,2 ist Histidin ungeladen und unfähig Aktin zu binden, während bei pH 6,2 der Aminosäurerest positiv geladen ist und Aktin binden kann. Zu beobachten ist dieser Effekt in Abbildung 4.40 Gebundene Aktinfilamente zeigen keine Bewegungen mehr, während bei steigendem pH-Wert durch die abnehmende Bindung ein zunehmendes „Wedeln“ der Aktinfilamente zwischen noch vorhandenen Fixpunkten zu sehen ist.

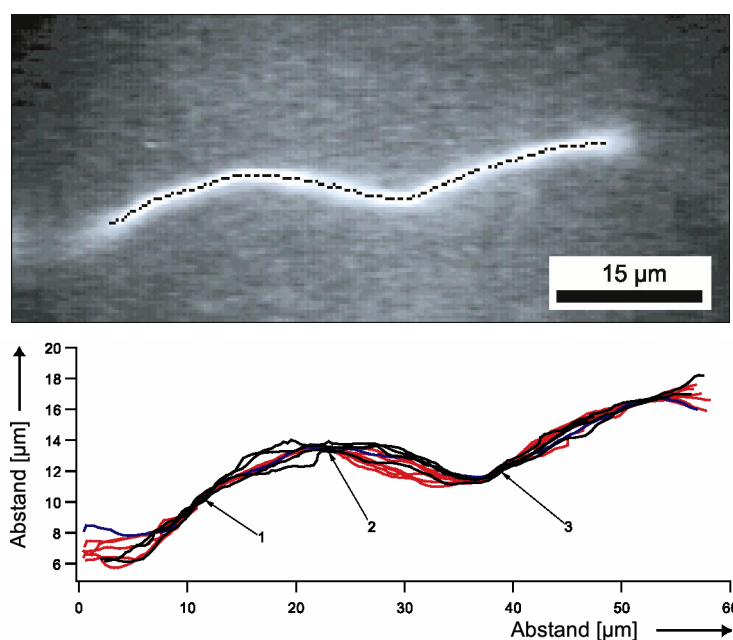


Abbildung 4.40:

Oben: Überlagerung von Fluoreszenzaufnahmen, aufgenommen im Abstand von 0,04 s. Lokale Bewegung des Aktinfilaments.

Unten: Schematische Darstellung von oben. Das Filament ist an den Positionen 1, 2 und 3 fixiert.

4.2.2 Deuterierte His₆-Lumazinsynthase

Die Deuterierung der His₆-Lumazinsynthase konnte nach Transformation des Expressionsplasmids pNCO-His₆-Lusy in das System M15[pREP4] durchgeführt werden. Die Anzucht erfolgte im Fermenter in einem Minimalmedium. Der Deuteriumeinbau in die exprimierten Proteine konnte durch die Verwendung von D₂O und deuterierter Bernsteinsäure als Kohlenstoffquelle erreicht werden (2.2.1.7). Nach einer Wachstumszeit von 140 h bei 37 °C war eine OD₆₀₀ von 5 erreicht und die Proteinexpression wurde mit 3 mM IPTG induziert. Nach weiteren 24 h wurde die Fermentation beendet und die Zellen geerntet.

Durch die Reinigung über eine Ni-Chelator-Säule war es in Analogie zur nicht-deuterierten His₆-Lusy möglich, das Protein mit 100 %iger Reinheit zu gewinnen. Die Markierung hatte keinen Einfluss auf die starke Affinität des Histidin-Schwanzes zum Metall. Die Elution erfolgte in einem Stufengradienten mit 300 mM Imidazol.

Der Deuterierungsgrad konnte mittels Massenspektrometrie (2.2.3.5) bestimmt werden. Dazu wurde die Gesamtanzahl aller im Monomer enthaltenen Wasserstoffatome und damit die maximal mögliche Anzahl an einbaubaren Deuteriumatomen errechnet (1064). Die Differenz aus der theoretisch errechneten Molmasse (17109 Da pro undeutertem Monomer) und der gemessenen (18000 Da pro deuteriertem Monomer) ergab die tatsächliche Anzahl an Deuteriumatomen im Molekül (891). Der Quotient aus der tatsächlichen (891) und der theoretisch berechneten (1064) Deuteriumanzahl ergab einen Deuterierungsgrad von 84 %.

Die Kopplungsversuche an Lipidlayer wurden mittels Neutronenreflexion gemessen (2.2.3.15). Durch die Deuterierung konnte die Empfindlichkeit dieser Methode erheblich gesteigert werden. Neben dem deuterierten Protein wurde ein Lipidlayer aus deuterierten Lipiden verwendet. Abbildung 4.41 zeigt ähnlich zum nichtdeuterten Experiment ein Streulängenprofil mit einem 160 Å Layer an der Lipid/Puffer-Grenzschicht. Wie in der Abbildung deutlich zu sehen, konnten die Daten nur unter der Annahme gefittet werden, dass sich bis zu zwei weitere Schichten Lumazinsynthase an das System anlagern. Eine schematische Darstellung der Proteinmultilayerschicht ist in dem Kasten abgebildet. Gründe dafür könnten eine erhöhte Proteinkonzentration oder das Vorhandensein von Nickel im Puffer im Vergleich zum Versuch mit nichtdeutertem Protein sein.

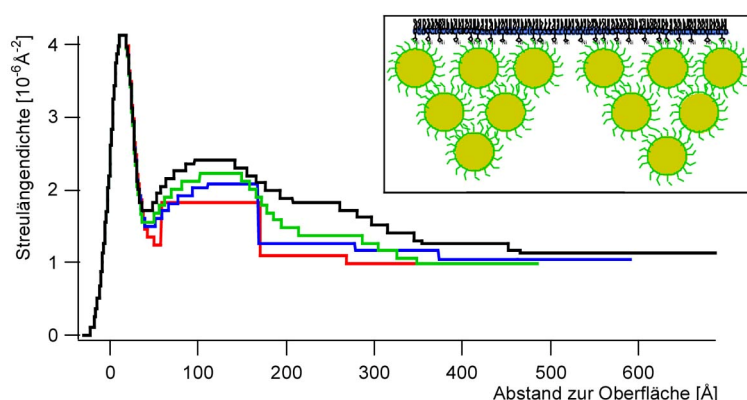


Abbildung 4.41: Streulängendichteprofil von deuterierter His₆-Lusy. Der Peak stellt die deuterierte Lipidschicht dar. Die Zeit zwischen den Graphen beträgt 1 h (Zeitverlauf von rot nach schwarz). Eine schematische Darstellung des Proteinmultilayeraufbaus ist in dem Kasten oben rechts dargestellt.

4.2.3 Fluoreszenzmarkierte (Texasrot) Lumazinsynthase

Die Fluoreszenzmarkierung der His₆-Lumazinsynthase sollte eine weitere Möglichkeit der Detektion des an den Lipidlayer angelagerten Proteins ermöglichen. Es wurde ein Fluoreszenzmarker (Sulfonyl-Texasred, PIERCE) verwendet, der chemisch das fluoreszierende Agens an primäre Aminogruppen im Molekül durch Bildung von Sulfonamiden koppelt. Die Lumazinsynthase besitzt pro Untereinheit neun Lysine, die für die Kopplung je nach Lage mehr oder weniger in Frage kommen. Da bei einer 60meren Quartärstruktur bei Kopplung von je einem Molekül Texasrot pro Untereinheit 60 Texasrot-Moleküle vorhanden wären, ist eine unvollständige Markierung unproblematisch.

Die Reaktion erforderte alkalische pH-Werte von 9 - 10. Da die Lumazinsynthase bei erhöhten alkalischen pH-Bereichen nur begrenzt stabil ist und um das von der Ni-Säulen-Reinigung stammende Imidazol zu entfernen (Imidazol stört bei der Reaktion), wurde die gereinigte His₆-Lusy (siehe 4.2.1) über Nacht zunächst gegen 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 8,0, dialysiert. Erst etwa 3,5 h vor der Reaktion wurde durch Dialyse in 100 mM Carbonat/Bicarbonatpuffer, pH 9,0 umgepuffert. Die Fluoreszenzmarkierung erfolgte wie unter 3.2.3 beschrieben. Die Funktionalität der Histidinreste konnte durch die Wechselwirkung der Histidine mit dem Ni-NTA der Affinitätssäule (2.2.3.1) kontrolliert und nachgewiesen werden. Das Protein konnte analog zu unmarkierter Lumazinsynthase bei einer Imidazolkonzentration von 300 mM Imidazol eluiert werden. Die Stabilität der Kapside zeigte sich ebenfalls durch eine immernoch vorhandene Enzymaktivität. Auch elektronenmikroskopische Aufnahmen bestätigten eine intakte ikosaedrische Quartärstruktur durch die typischen 160 Å Partikel.

Die Anlagerung an einen Lipidlayer konnte direkt mittels Fluoreszenzmikroskopie an einer Filmwaage beobachtet werden. Abbildung 4.42 zeigt deutlich, dass die Proteinkapside und damit die Fluoreszenz zu Beginn des Experiments noch gleichmässig in der Pufferlösung verteilt war (Bereich von -1000 µm bis 0 µm, blaue Kurve). Nach einigen Stunden, wenn die Moleküle an der Lipid/Puffer-

Grenzschicht verankert waren, war dort eine erhöhte Fluoreszenz zu beobachten (Peak in roter Kurve bei 0 μm).

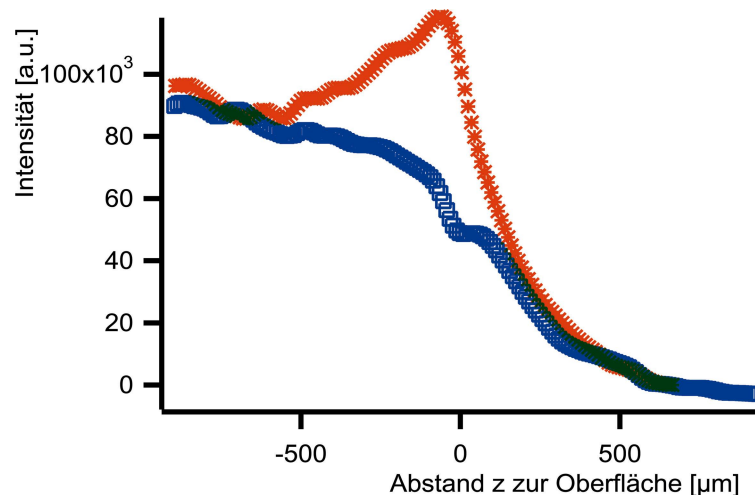


Abbildung 4.42: Fluoreszenzintensitäts-Scans. Blau: Scan direkt nach Injektion der fluoreszenzmarkierten His₆-Lusy; rot: Scan einige Stunden danach.

4.2.4 Hisactophilin-Lumazinsynthese

Nach Fermentation und Zellaufschluss konnte das Fusionsprotein HisAc-Lusy aufgrund seiner Histidinreichen Regionen (siehe 1.5.2) reversibel an eine Ni-NTA-Säule gebunden werden. In Abbildung 4.43 ist zu sehen, dass sich das Protein nach stufenweiser Erhöhung der Imidazolkonzentration im Elutionspuffer auf 50 mM wieder von der Säule löst und mit hoher Reinheit gewonnen werden kann (Spuren 2-4). Das SDS-Polyacrylamidgel zeigt deutlich die Erhöhung der monomeren Molekülmasse von 16 kDa auf 29 kDa durch die Fusion der Lumazinsynthese mit dem 13 kDa Hisactophilinpeptid.

Trotz seiner grossen Histidinzahl war die Affinität zum Säulenmaterial jedoch wesentlich schwächer ausgeprägt als bei der His₆-Lumazinsynthese. Das Protein löste sich schon ab einer Imidazolkonzentration von 50 mM von der Säule, während bei der His₆-Lusy Konzentrationen um die 300 mM nötig waren.

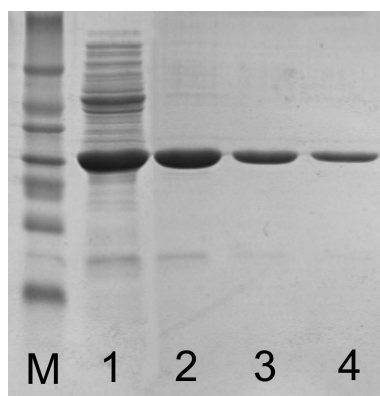


Abbildung 4.43: SDS-Polyacrylamidgel von HisAc-Lusy. 1: Rohextrakt, 2-4: Elution mit 50 mM, 100 mM und 200 mM Imidazol von Ni-NTA-Material, M: Molekulargewichtsmarker.

Nach der Elution wurde den proteinhaltigen Fraktionen EDTA (0,5 mM) zugegeben, um eine Aggregation der Moleküle in Lösung zu verhindern. Zur Entfernung von Nickel, EDTA und Imidazol wurde gegen 50 mM Kaliumphosphat, pH 7,0, dialysiert (4.2.1).

Die schwächere Affinität zu Metallchelatoren spiegelte sich auch in den SPR- und Neutronenreflexionsmessungen wieder. Im Vergleich zu den Messungen mit His₆-Lumazinsynthase waren die Wechselwirkungen zwischen dem Protein und dem Lipidlayer schwächer und die Adsorptionsgeschwindigkeit langsamer.

Auffällig war das Phänomen der Bildung von Proteinaggregaten auch in Abwesenheit von komplexierenden Liganden, wie Nickelionen, bei niedrigen Temperaturen, beobachtbar durch Trübung der Lösung. Wurde auf Raumtemperatur erwärmt, konnte die Aggregation wieder aufgelöst werden. Ein Grund dafür könnte eine relativ ungeladene Oberfläche des Fusionsproteins bei pH 7,0 sein. Weitere Hinweise auf diese Möglichkeit gaben die Tatsache, dass das Protein bei dem Versuch einer Sterilfiltration durch eine Cellulosemischestermembran irreversibel an dieser haften blieb und die Beobachtung von perlenkettenartigen Zusammenlagerungen der einzelnen Moleküle auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen (Abbildung 4.44).

Bei den Probenvorbereitungen für die Elektronenmikroskopie werden normalerweise mit Kohle bedeckte, hydrophilisierte Kupfernetzchen verwendet (2.2.3.12). Bei diesem Fusionsprotein konnte auch eine Anhaftung auf nicht

hydrophilisierten Netzen beobachtet werden. Diese Beobachtung würde ebenfalls mit einer ungeladenen Oberfläche in Einklang stehen.

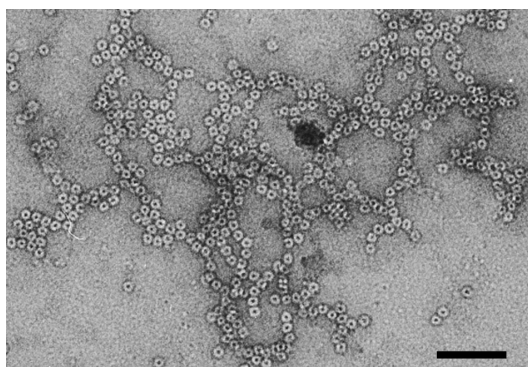


Abbildung 4.44: Elektronenmikroskopische Aufnahme von HisAc-Lusy. Der Balken repräsentiert 100 nm.

4.2.5 Biotinylierte Lumazinsynthese

Bei diesem Fusionsprotein ist an die sich auf der Oberfläche des Kapsides befindlichen C-Termini mit Hilfe eines Linkers, bestehend aus drei Alaninen, die Peptidsequenz LGGIFEAMKMEWR fusioniert, die die Fähigkeit besitzt Biotin zu binden (Fischer, 2000). Durch diese zusätzliche Peptidsequenz exprimierte das Protein unlöslich, konnte aber nach Auffaltung in 8 M Harnstoff durch langsames Entfernen des Harnstoffes unter Zuhilfenahme des, die Struktur stabilisierenden, Substratanalogon 5-Nitroso-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (**18**) in seiner korrekt gefalteten Konformation erhalten werden (3.2.5). Abbildung 4.45 zeigt ein SDS-Polyacrylamidgel mit Fraktionen des Proteins vor (Spur 1) und nach (Spur 2) der Renaturierung. Die Erhöhung des Molekulargewichts eines Monomers von 16 kDa (Lumazinsynthese Wildtyp) auf 20 kDa durch die zusätzlichen 16 C-terminalen Aminosäuren ist deutlich zu erkennen. Durch die Renaturierung konnten ebenfalls störende Verunreinigungen entfernt werden, da diese zum größten Teil als unlöslicher Niederschlag während der Dialyse ausfielen und abzentrifugiert werden konnten (Spur 2). Eine nachträgliche Reinigung war für die weitere Verwendung nicht mehr nötig.

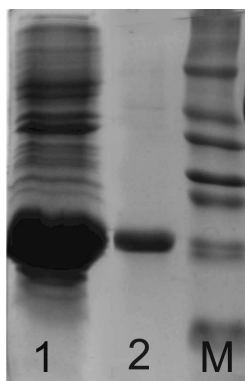


Abbildung 4.45: SDS-Polyacrylamidgel von CBio-Lusy. 1: Rückstand vor Renaturierung (vgl. 3.2.5), 2: Protein nach Renaturierung, M: Molekulargewichtsmarker.

Die Bildung der korrekten ikosaedrischen Quartärstruktur konnte nach der Rückfaltung mittels elektronenmikroskopischer Untersuchung und nativer Gelelektrophorese kontrolliert und bestätigt werden.

Da es keine Lipide gibt, die direkt biotinylierte Moleküle binden, wurden für die Kopplungsversuche Lipidlayer aus Lipiden mit gebundenem Biotin verwendet und diese im ersten Schritt mit Avidin bedeckt (3.2.5). Im Unterschied zu den vorher verwendeten Systemen befand sich dieses System bei einem Lateraldruck von 30 mN m^{-1} (2.2.3.13 und 2.2.3.15) schon in der kristallinen Phase, d.h. eine laterale Diffusion der Moleküle im Layer war nicht mehr möglich.

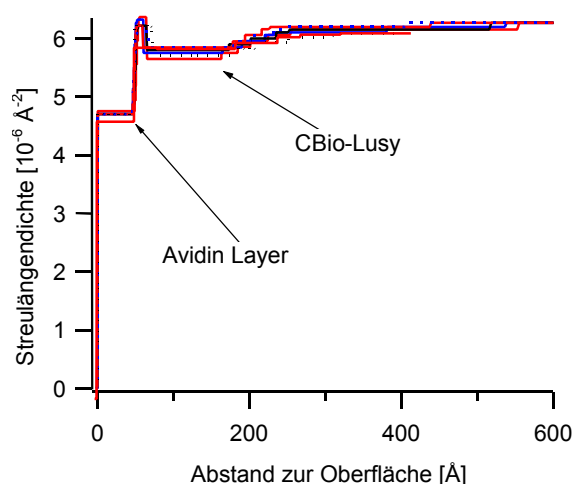


Abbildung 4.46: Streulängendichteprofile. Adsorption von CBio-Lumazinsynthase an einen Lipidlayer. Die Zeit zwischen den Graphen beträgt 1 h (Zeitverlauf von rot nach blau).

Die Streulängendichteprofile von Neutronenreflexionsexperimenten in Abbildung 4.46 zeigen deutlich den Moleküldurchmesser der funktionalisierten

Lumazinsynthase. Zusätzlich war der durch den Avidinlayer verursachte Abstand der Lumazinsynthase zum Lipidlayer sichtbar. Wie in anderen Fällen auch, konnten die Daten nur unter der Annahme einer zweiten dünnen Proteinschicht gefittet werden. Durch das Vorhandensein von Avidin in der Lösung ist dieser zusätzliche Schichtaufbau durchaus denkbar.

4.2.6 Bifunktionelle Kapside

Für die Herstellung von Lumazinsynthasen mit zwei verschiedenen funktionellen Gruppen auf der Kapsidoberfläche wurde die gereinigte His₆-Lusy mit Hilfe von 6 M Guanidiniumhydrochlorid entfaltet und anschliessend in 8 M Harnstoff umgepuffert (4.2.1). Der Versuch direkt mit 8 M Harnstoff zu arbeiten führte zu schlechten Ausbeuten. Die zweite funktionalisierte Lumazinsynthase CBio-Lusy wurde, wie beschrieben, in 8 M Harnstoff entfaltet (4.2.5). Im Gegensatz zur His₆-Lusy führte hier der Versuch mit 6 M GuHCl zu unbefriedigenden Ergebnissen. Um die jeweilige Konzentration des in Untereinheiten vorliegenden Proteins abzuschätzen, wurden beide Lumazinsynthasen in unterschiedlichen Verdünnungen auf ein SDS-Gel aufgetragen. Anschliessend wurde das Volumenverhältnis so gewählt, dass sich eine Untereinheitszusammensetzung von 90 % CBio-Lusy und 10 % His₆-Lusy in Ansatz 1, 50 % CBio-Lusy und 50 % His₆-Lusy in Ansatz 2 und 10 % CBio-Lusy und 90 % His₆-Lusy in Ansatz 3 befand. Nach 72 h Inkubation wurde mit der Rückfaltung begonnen. Durch langsamen Entzug des Harnstoffes aus dem System durch Dialyse wurden Lumazinsynthasekapside gewonnen, die auf der Oberfläche ein unterschiedliches Verhältnis an „CBio“ und „His₆“ trugen. Die Kontrolle konnte über SDS-Gelelektrophorese erfolgen, da die beiden Untereinheiten eine unterschiedliche Masse besitzen (CBio-Lusy: 20 kDa, His₆-Lusy: 16 kDa). Abbildung 4.47 zeigt die Ansätze 1, 2, und 3 mit unterschiedlichen Anteilen der beiden funktionellen Einheiten nach der Reinigung.

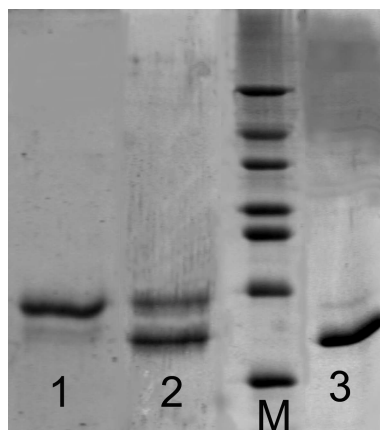


Abbildung 4.47:
SDS-Polyacrylamidgel der bifunktionellen Kapside nach Reinigung:
1: 90 % CBio-Lusy, 10 % His₆-Lusy Untereinheiten
2: 50 % CBio-Lusy, 50 % His₆-Lusy Untereinheiten
3: 10 % CBio-Lusy, 90 % His₆-Lusy Untereinheiten

Die Mischungen, die den Histidin-Rest zu 90 % bzw. 50 % enthielten (Ansatz 2 und 3) wurden über eine Nickel-Säule gereinigt, während für die Reinigung des Ansatzes 1 eine Biotin-bindende Streptavidinsäule (2.2.3.1) verwendet wurde.

Zusätzlich war es möglich die funktionellen Gruppen mittels Western-Blot-Analyse zu detektieren. Der Histidin-Schwanz wurde mit dem Anti-Penta-His-Antikörper/Anti-Maus-IgG-HRP Sandwich-System abgegriffen (2.2.3.7). Die Detektion des biotinylierten Restes erfolgte direkt mit Streptavidin-alkalische Phosphatase, wie in 2.2.3.7 beschrieben.

Das unterschiedliche Kopplungsverhalten an Nickelchelatorlipidmembranen in Abhängigkeit vom Anteil an Histidinresten konnte mittels SPR (2.2.3.14) für die Ansätze 2 und 3 untersucht werden. Dazu wurde die Geschwindigkeit der Kopplung an die Membran im Vergleich zu reiner His₆-Lusy untersucht. Es zeigte sich, dass die reine His₆-Lusy am schnellsten und der Ansatz 2 (50 % „His₆“) am langsamsten adsorbierte. Die Geschwindigkeit von Ansatz 3 (90 % „His₆“) betrug etwas mehr als die halbmaximale Geschwindigkeit von reiner His₆-Lusy.

Anschliessend wurden die Membranen mit Avidin-haltigem Puffer umspült und die Bindung von Avidin untersucht. Während bei der reinen His₆-Lusy keine Bindung zu sehen war, konnte eine Avidinbindung bei beiden CBio-haltigen Ansätzen beobachtet werden.

Die Fähigkeit, Avidin in Abhängigkeit von den vorhandenen CBio-Resten zu binden, zeigte sich in der Tatsache, dass Ansatz 3 mit nur 10 % CBio-Resten wesentlich weniger Avidin binden konnte als Ansatz 2 mit 50 % CBio-Resten.

Die Reversibilität der Kopplung der Proteine über die Histidinschwänze an die Ni-Chelatoren konnte durch Spülen mit EDTA gezeigt werden. Hierbei konnten die Proteine wieder von den Membranen gelöst und die Membranen in ihrem Ausgangszustand regeneriert werden.

4.2.7 Diskussion

Bei einem Vergleich des Adsorptionsverhaltens der verschiedenen funktionalisierten Lumazinsynthasekapside His₆-Lusy, HisAc-Lusy und CBio-Lusy an Chelatorlipid-unterstützte Membranen mittels Neutronenreflexion oder ähnlichen Methoden, sind die in Abbildung 4.48 dargestellten, Unterschiede deutlich zu erkennen.

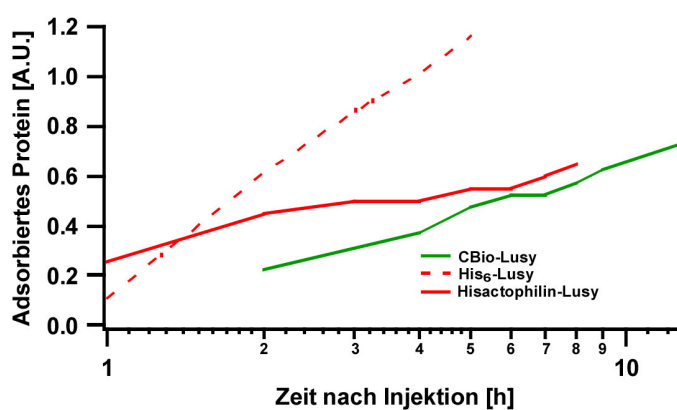


Abbildung 4.48: Adsorptionsprozess verschieden funktionalisierter Lumazinsynthasekapside an einen Lipidlayer. Die Menge an adsorbierten Protein wurde mit Hilfe der Neutronenreflexionsdaten kalkuliert. Grün, CBio-Lusy, rot, HisAc-Lusy; rot-geschichtelt, His₆-Lusy.

Die Adsorptionsgeschwindigkeit der HisAc-Lusy ist wesentlich geringer als die von His₆-Lusy. Hisactophilin besitzt 31 Histidine, von denen 28 an der Oberfläche zugänglich sind. Auf der 60meren HisAc-Lusy stehen somit 1680 Histidine für die Wechselwirkung mit Nickelchelatoren bereit. Auf der Oberfläche der His₆-Lusy sind dagegen nur 360 Histidine exprimiert. Dennoch ist eine bessere Kopplung der His₆-Lusy sowohl an der Ni-NTA-Säule (Elution erst bei 300 mM Imidazol im Vergleich zu 50 mM Imidazol bei HisAc-Lusy) als auch an den Nickelchelatorlipiden zu beobachten. Der Grund ist in der sterischen Anordnung der Histidine zueinander zu finden. Die Funktion eines Histidintags ist speziell dafür ausgerichtet, Proteine an Metallchelatoren zu binden, während Hisactophilin in der Zelle keine solche Aufgabe besitzt. Seine Histidine spielen bei der Wechselwirkungen mit Aktin und der Aktinpolymerisierung eine Rolle. Damit macht die Lage der Histidine auf der

Hisactophilinoberfläche zwar eine Bindung an die Metallchelatoren möglich, die optimale Bindung, die bei der His₆-Lusy zu beobachten ist, findet jedoch nicht statt. Beide Modelle sind jedoch in der Lage als Anker für die Aktinimmobilisierung zu dienen, wie bei der His₆-Lusy ausführlich beschrieben wurde.

Das Avidin/Biotin-System besitzt mit einer Dissoziationskonstante von 1 fM eine der höchsten natürlichen Bindungskonstanten (Lottspeich et al., 1998). Jedes Avidin ist dabei in der Lage vier Biotin-Moleküle zu binden. Unter diesen Voraussetzungen müsste die Adsorption der CBio-Lusy an die mit Avidin bedeckten biotinylierten Lipidmembranen mit der schnellsten Geschwindigkeit und der höchsten Endkonzentration ablaufen. Aber das Gegenteil ist der Fall. Abbildung 4.48 zeigt deutlich, dass sich das CBio-Lusy-System in seiner Adsorptionsgeschwindigkeit und auch in der Endkonzentration ähnlich zum HisAc-Lusy-System verhält. Eine Erklärung ist, dass bei einem Standardlateraldruck von 30 mN m⁻¹ die Membranen, die aus Lipiden mit gebundenem Biotin bestehen, in der kristallinen Phase vorliegen. Das hat zur Folge, dass eine laterale Diffusion der Lipide und damit auch der schon gebundenen CBio-Lusy-Moleküle nicht mehr möglich ist. Die Anlagerung eines neuen CBio-Lusy Moleküls ist nur möglich, wenn das freie Teilchen zu einem unbesetzten Platz diffundiert. Die Anlagerung wird dadurch erschwert und die Adsorptionsgeschwindigkeit verringert. Ein weiterer Grund ist in freiem Avidin im Puffer zu sehen. Bei Neutronenreflexionsmessungen ist es aufgrund des Geräteaufbaus nicht möglich, den Puffer während eines Versuches zu wechseln. So muss nach der Vorbehandlung der biotinylierten Lipide mit Avidin davon ausgegangen werden, dass sich nicht gebundenes Avidin im Puffer befindet. Wird biotinylierte Lumazinsynthase zugegeben, so besteht die Möglichkeit, dass bereits in der Lösung Protein mit Avidin interagiert. Bei vier Biotinbindungsstellen pro Avidinmolekül und 60 Biotinen pro Lumazinsynthasekapsid ist eine Kopplung mehrere Kapside über Avidinbrücken möglich. Solche Cluster diffundieren langsamer und verhindern möglicherweise eine Anlagerung einer intakten Monolayerschicht (siehe 4.2.5) an die Membran durch sterische Hinderung. Daraus erklärt sich sowohl die schlechtere Anlagerungsgeschwindigkeit als auch die geringere Endkonzentration im Vergleich zu His₆-Lusy.

In dieser Arbeit konnte anhand dreier unterschiedlich funktionalisierter Lumazinsynthasekapside (Polyhistidin-Schwanz/mit Hisactophilin funktionalisiert/biotinyliert) gezeigt werden, dass die Lumazinsynthase hervorragend geeignet ist, als Abstandshalter oder Anker in biophysikalischen Systemen zu dienen. Durch weitere Variationsmöglichkeiten (Fluoreszenzmarkierung, Deuterierung oder die Herstellung bifunktioneller Kapside) kann das Molekül auf die Anforderungen speziell zugeschnitten werden. Weitere Möglichkeiten bestehen in der spezifischen Fluoreszenzmarkierung auf der Kapsidaussen- oder innenwand durch die Verwendung von thioreaktiven Markierungsreagenzien und Lumazinsynthasekapsiden, die durch gerichtete Mutagenese zusätzliche Cysteine auf der Kapsidaussen- oder innenwand besitzen. Daneben hat sich gezeigt, dass die Lumazinsynthase in der Lage ist als Bionanoreaktor zur Bildung von Eisenoxidnanopartikeln im Kapsidinneren fähig ist (Shenton et al., 2001). Durch Eisen(III)-Bindung an anionische Domänen im Kapsidinneren wird dabei die Bildung von Kristallisationskeimen begünstigt.

Zusammenfassung:

Durch seine aussergewöhnliche ikosaedrische Struktur mit hoher Stabilität (pH und Temperatur) und der Möglichkeit verschiedene funktionelle Einheiten auf der Kapsidoberfläche oder auch an der Kapsidinnenwand *in vivo* und *in vitro* anzubringen, bietet die Lumazinsynthase ein interessantes Modell auf dem Gebiet der Biofunktionalisierung von Oberflächen.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnten neue Informationen über die Struktur und die Reaktion der 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazinsynthase gewonnen werden. Dazu wurde ein breites Spektrum von Lumazinsynthasen aus verschiedensten Organismen untersucht. Die kinetischen Untersuchungen umfassten Michaelis-Menten-Kinetiken zur Bestimmung der K_M -Werte für die Substrate 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (6) und 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat (7), temperaturabhängige Untersuchungen der Reaktionsgeschwindigkeit zur Ermittlung der thermodynamischen Parameter und die Beobachtung des Substratumsatzes unter Single-Turn-Over-Bedingungen. Zur genauen Charakterisierung des aktiven Zentrums sind dabei auch Kenntnisse über die Quartärstruktur des Enzyms von Bedeutung. Auf diesem Gebiet konnten ebenfalls neue Informationen gewonnen werden.

Die Ergebnisse können als Grundlage für die Entwicklung von Inhibitoren gegen das Enzym dienen. Da Bakterien und Pilze kein Aufnahmesystem für Riboflavin besitzen, sind sie auf eine funktionierende Vitaminbiosynthese angewiesen. Die Inhibitoren können somit als Basis für die Antibiotikaentwicklung gesehen werden. In Anbetracht der steigenden Antibiotikaresistenzen von humanpathogenen Mikroorganismen stellt dies ein immer wichtiger werdendes Forschungsgebiet dar.

Daneben spielt die Entwicklung von vitaminüberproduzierenden Pflanzen und Mikroorganismen in lebensmittel- und futtermitteltechnologischen Branchen eine zunehmende Rolle. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit auch Lumazinsynthasen aus Pflanzen und thermophilen („kochfesten“) Mikroorganismen in die Untersuchungen miteinbezogen.

Aufgrund der höhersymmetrischen ikosaedrischen Struktur einiger Lumazinsynthasen und die daraus resultierende Stabilität, ist das Molekül auch eine interessante Basis für die Entwicklung von Fusionsproteinen. In der Arbeit konnte anhand mehrerer variationsreicher funktionalisierter Kapside gezeigt werden, dass sich dieses Protein als Plattform zur Modellierung von Molekülen eignet, die speziell an ihr Anwendungsgebiet, z.B. die Biofunktionalisierung von Oberflächen, angepasst werden können.

6 Anhang

Tabelle 6.1: Vektorprimer. Die Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen:

Primer:	Sequenz:
pNCO-vo	5 gtg agc gga taa caa ttt cac aca g 3
M2	5 a gat att ttc att aaa gag gag aa 3
M4	5 <u>ctg cag gtc gac gga tcc</u> 3
BS- <i>EcoRI</i>	5 aa ttt <u>gaa ttc</u> att aaa gag gag aaa tta act atg 3
mRNA5	5 ctc cat ttt agc ttc ctt agc tcc tg 3

Tabelle 6.2: Primer zur Klonierung von Mutanten der Lumazinsynthese aus *S. pombe*. Die Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen, die Mutationen sind fett dargestellt:

Primer:	Sequenz
SSP-Rbs- <i>EcoRI</i> -Mutvo	5 ata ata <u>gaa ttc</u> att aaa gag gag aaa tta act atg ttc agt ggt att aaa ggc cct aac cct tca gac tta aag 3
SSP-W27G- <i>SacII</i>	5 aaa ggc cct aac cct tca gac tta aag gga cca gaa ttg cgc att ctt att gtc cat <u>gcc cgc ggt</u> aat ctt caa g 3
SSP-W27I- <i>Asel</i>	5 aaa ggc cct aac cct tca gac tta aag gga cca gaa ttg cgc att ctt att gtc cat <u>gcc cgc att aat</u> ctt caa g 3
SSP-W27S- <i>AsuII</i>	5 aaa ggc cct aac cct tca gac tta aag gga cca gaa ttg cgc att ctt att gtc cat <u>gcc cgt tcg aat</u> ctt caa g 3
SSP-W27H- <i>SacI</i>	5 aaa ggc cct aac cct tca gac tta aag gga cca <u>gag ctc</u> cgc att ctt att gtc cat <u>gcc cgc cat</u> aat ctt caa g 3
SSP-W27F- <i>SphI</i>	5 aaa ggc cct aac cct tca gac tta aag gga cca gaa ttg cgc att ctt att gtc <u>cat gcc cgc ttt</u> aat ctt caa g 3
SSP-W27Y- <i>Apal</i>	5 aaa ggc cct aac cct tca gac tta aag <u>ggg ccc</u> gaa ttg cgc att ctt att gtc cat <u>gcc cgc tac</u> aat ctt caa g 3
SSP-W63Y- <i>SmaI</i>	5 g agc aag ttc ata gct <u>tcc cgg</u> gac ac 3
SSP-L119F- <i>HpaI-NcoI</i>	5 ta tta tta tcc atg gaa atg gcc gcc att caa acc tgc acg ata aag ggc ttg ctc ttc att taa aac <u>tgt taa</u> cag acc aaa aat gac 3

Tabelle 6.3: Primer zur Klonierung von der E126A-Mutante der Lumazinsynthese aus *B. subtilis*. Die Restriktionsschnittstelle ist unterstrichen, die Mutation ist fett dargestellt:

Primer:	Sequenz:
BS-E126A- <i>BssHII-NgoMIV</i>	5 tat tat tat gcc ggc <u>gcc cgc</u> gat agc ctg ttc gat gtt ttc agt tg 3

Tabelle 6.4: Kristallisationsbedingungen für die Kristallisation von Lumazinsynthese aus *S. pombe* und deren Mutanten

Enzym	Ligand	Kristallisationsbedingung
Wildtyp	Riboflavin 17 19	0,1 M Citrat, pH 5,0, 1,5 M Na-Formiat 0,1 M Citrat, pH 5,2, 0,3 M NH ₄ H ₂ PO ₄ 0,1 M Citrat, pH 5,2, 0,6 M NH ₄ H ₂ PO ₄
W27G	-	0,1 M Citrat, pH 5,6, 1,0 M NH ₄ H ₂ PO ₄
W63Y	-	0,1 M Citrat, pH 5,0-5,6, 0,9-1,2 M NH ₄ H ₂ PO ₄
L119F	-	0,1 M Citrat, pH 5,0-5,6, 0,9-1,2 M NH ₄ H ₂ PO ₄
W63Y7L119F	-	0,1 M Citrat, pH 5,0-5,6, 0,9-1,2 M NH ₄ H ₂ PO ₄

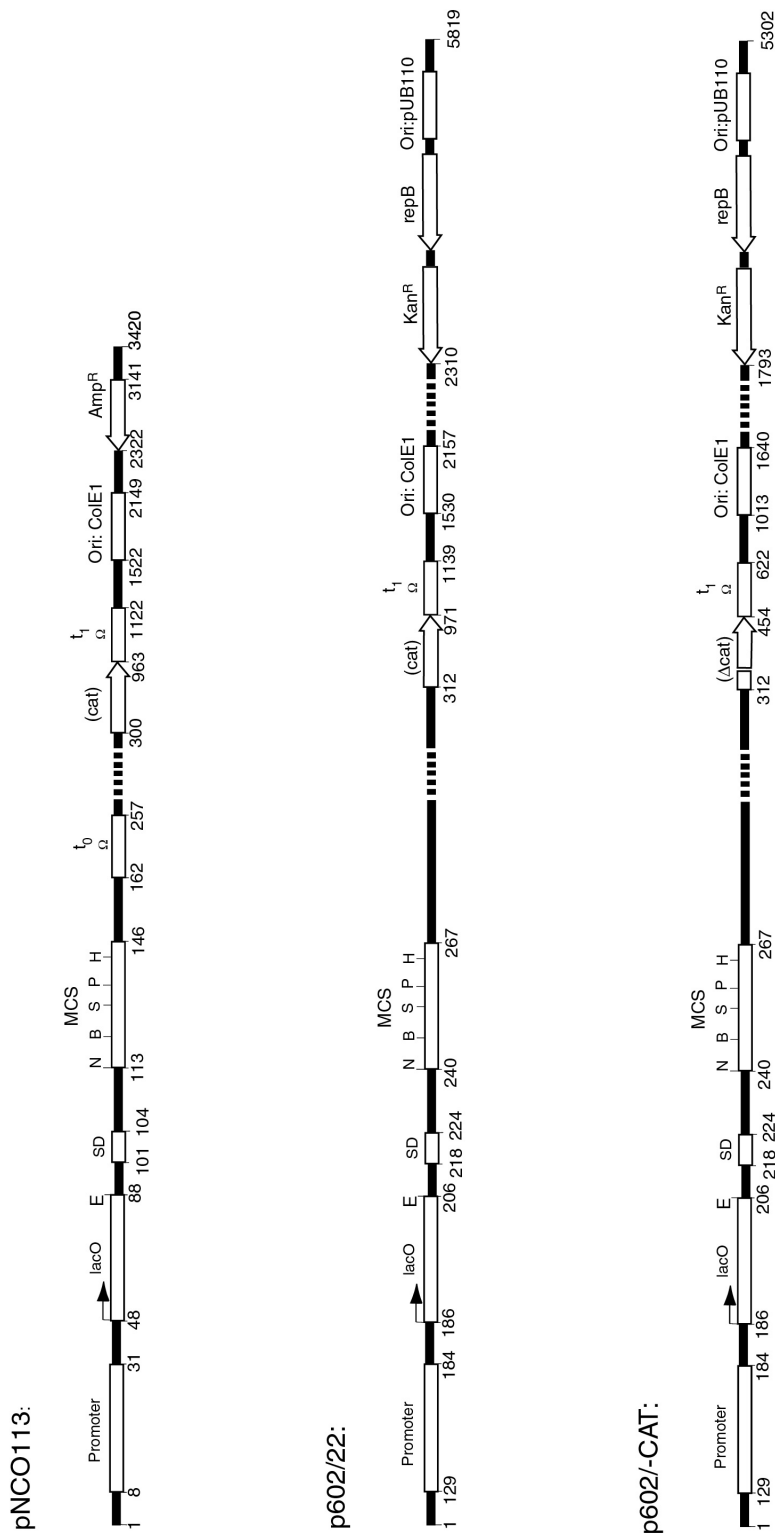


Abbildung 6.1: Schematische Darstellung der verwendeten Vektoren: SD: ribosomale Bindungsstelle; MCS: multiple cloning site mit singulären Schnittstellen; t₀, t₁: Terminatorsequenzen; (cat): nicht aktives Gen für die Chloramphenicoltransferase (verschobener Leserahmen); (Δcat): inaktives Gen für die Chloramphenicoltransferase (Deletion). Restriktionsschnittstellen: B: *Bam*HI; E: *Eco*RI; H: *Hind*III; N: *Nco*I; P: *Pst*I; S: *Sal*I.

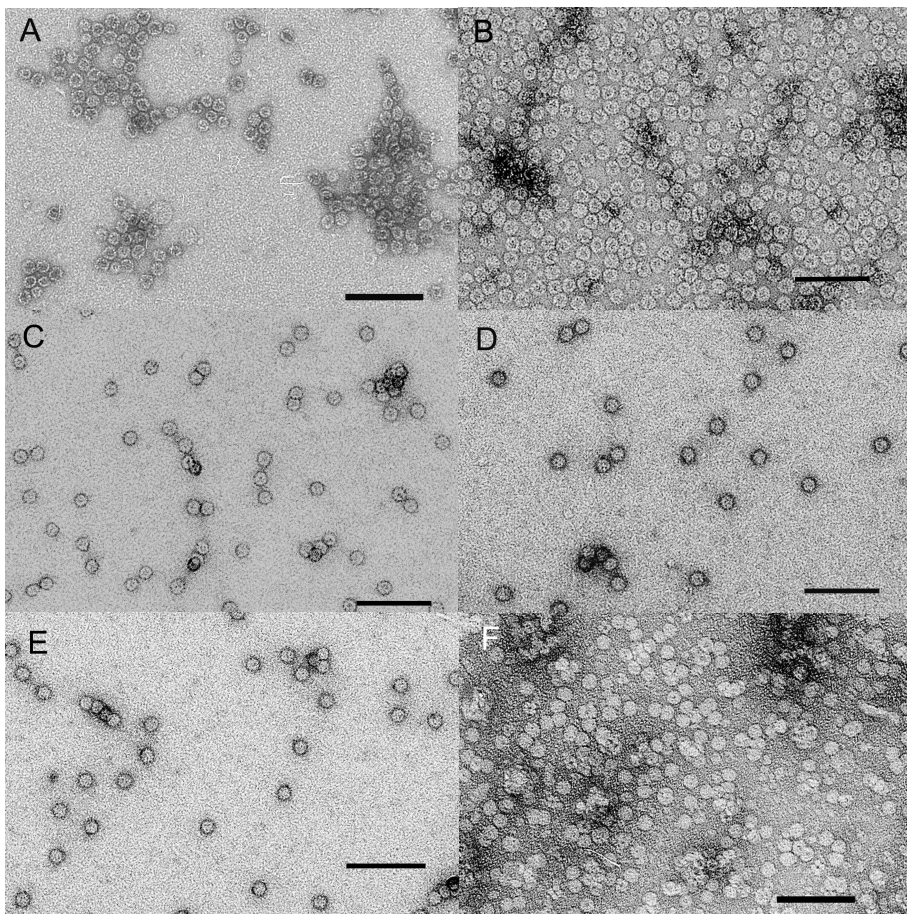


Abbildung 6.2: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Lumazinsynthasen nach Negativkontrastierung. Lumazinsynthase aus

A: *M. jannaschii*

B: *H. influenzae*

C: *S. aureus*

D: *S. pneumoniae*

E: *A. thaliana*

F: *P. furiosus*

Die Balken repräsentieren 100 nm.

7 Literatur

- Bacher, A. (1991a). Biosynthesis of flavins. *Chem. Biochem. Flavoenzymes* **1**, 215-259.
- Bacher, A. (1991b). Riboflavin kinase and FAD synthetase. *Chem. Biochem. Flavoenzymes* **1**, 349-370.
- Bacher, A. (1991c). Riboflavin kinase and FAD-synthetase. In Müller, F. (Hrsg.), *Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes*, CRC Press, Boca Raton, FL. **1**, 349-370.
- Bacher, A., Eberhardt, S., Eisenreich, W., Fischer, M., Herz, S., Illarionov, B., Kis, K., Richter, G. (2001). Biosynthesis of riboflavin. *Vitamins and Hormones* **61**, 1-49.
- Bacher, A., Eberhardt, S., Fischer, M., Kis, K., Richter, G. (2000). Biosynthesis of vitamin B2 (Riboflavin). *Annu. Rev. Nutr.* **20**, 153-167.
- Bacher, A., Eberhardt, S., Richter, G. (1996). Biosynthesis of riboflavin. In *Escherichia and Salmonella* (Neidhardt, F. C., Ingraham, J. L., Low, K. B., Magasanik, B., Schaechter, M. & Umberger, H. E., eds.), Vol. 1, pp. 657-664, Washington, D.C.
- Bacher, A., Eisenreich, W., Kis, K., Ladenstein, R., Richter, G., Scheuring, J., Weinkauff, S. (1993). Biosynthesis of flavins. *Bioorg. Chem. Front.* **3**, 147-192.
- Bacher, A., Le Van, Q., Keller, P. J., Floss, H. G. (1983). Biosynthesis of riboflavin. Incorporation of ¹³C-labeled precursors into the xylene ring. *J. Biol. Chem.* **258**, 13431-13437.
- Bacher, A., 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., Ludwig, H. C., Schnepfle, H., Ben Shaul, Y. (1986). Heavy riboflavin synthase from *Bacillus subtilis*. Quaternary structure and reaggregation. *J. Mol. Biol.* **187**, 75-86.
- Bacher, A., Mailander, B. (1978). Biosynthesis of riboflavin in *Bacillus subtilis*: function and genetic control of the riboflavin synthase complex. *J. Bacteriol.* **134**, 476-482.

- Bacher, A., Van, Q. L., Keller, P. J., Floss, H. G. (1985). Biosynthesis of riboflavin. Incorporation of multiply ^{13}C -labeled precursors into the xylene ring. *J. Am. Chem. Soc.* **107**, 6380-6385.
- Beach, R. L., Plaut, G. W. E. (1971). The synthesis, properties, and base-catalyzed interactions of 8-substituted 6,7-dimethylumazines. *J. Org. Chem.* **36**, 3937-3943.
- Birnboim, H. C., Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl.Acids.Res.* **7**, 1513-1522.
- Bown, D. H., Keller, P. J., Floss, H. G., Sedlmaier, H., Bacher, A. (1986). Solution structures of 6,7-dimethyl-8-substituted-lumazines. Carbon-13 NMR evidence for intramolecular ether formation. *J. Org. Chem.* **51**, 2461-2467.
- Braden, B. C., Vekilovsky, C. A., Cauerhff, A. A., Polikarpov, I., Goldbaum, F. A. (2000). Divergence in macromolecular assembly: X-ray crystallographic structure analysis of lumazine synthase from *Brucella abortus*. *J. Mol. Biol.* **297**, 1031-1036.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Brown, G. M., Reynolds, J. J. (1963). Biogenesis of the water-soluble vitamins. *Annu. Rev. Biochem.* **32**, 419-462.
- Brown, G. M., Williamson, J. M. (1982). Biosynthesis of riboflavin, folic acid, thiamine, and pantothenic acid. *Adv. Enzymol. Relat. Areas. Mol. Biol.* **53**, 345-381.
- Bullock, W. O., Fernandez, J. M., Short, J. M. (1987). XL-blue: a high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with β -galactosidase selection. *BioTechniques* **5**, 376-379.
- Burrows, R. B., Brown, G. M. (1978). Presence in *Escherichia coli* of a deaminase and a reductase involved in biosynthesis of riboflavin. *J. Bacteriol.* **136**, 657-667.
- Cohn, E. J., Edsall, J. T. (1943). *Proteins, amino acids and peptides as ions and dipolar ions*. Am. Chem. Soc. Monograph, No. 90, Reinhold, New York.
- Covey, T. R., Bonner, R. F., Shushan, B. I., Henion, J. (1988). The determination of protein, oligonucleotide and peptide molecular weights by ion-spray mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass. Sp.* **2**, 249-256.

- Cresswell, R. M., Neilson, T., Wood, H. C. S. (1960). The biosynthesis of pteridines. II. Self-condensation of 5-amino-4-(substituted amino)uracils. *J. Chem. Soc.*, 4776-4779.
- Edman, P., Henschen, A. (1975). Sequence determination. *Protein Sequence Determination. Springer Verlag, Heidelberg.*
- Elender, G., Kuhner, M., Sackmann, E. (1996). Functionalization of Si/SiO₂ and glass surfaces with ultrathin dextran films and deposition of lipid bilayers. *Biosens. Bioelectron.* **11**, 565-577.
- Fischer, M. (1997). *Effiziente Methoden zur in vitro Mutagenese: Untersuchungen zum Mechanismus von Lumazinsynthese und GTP-Cyclohydrolase I.* Dissertation. Lehrstuhl für Organische Chemie und Biochemie, Technische Universität, München.
- Fischer, M., Bacher, A. (2000). Protein conjugates, methods, vectors, proteins and DNA for producing them, their use, and medicaments and vaccines containing containing a certain quantity of said protein conjugates. *PCT Int. Appl.* **PCT/EP00/01899**.
- Foor, F., Brown, G. M. (1975). Purification and properties of guanosine triphosphate cyclohydrolase II from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **250**, 3545-3551.
- Foor, F., Brown, G. M. (1980). GTP-cyclohydrolase II from *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* **66**, 303-307.
- Gerhardt, S., Haase, I., Steinbacher, S., Kaiser, J. T., Cushman, M., Bacher, A., Huber, R., Fischer, M. (2002). The structural basis of riboflavin binding to *Schizosaccharomyces pombe* 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase. *J. Mol. Biol.* **318**, 1317-1329.
- Goetz, J. M., Poliks, B., Studelska, D. R., Fischer, M., Kugelbrey, K., Bacher, A., Cushman, M., Schaefer, J. (1999). Investigation of the binding of fluorolumazines to the 1-MDa capsid of lumazine synthase by ¹⁵N{¹⁹F} REDOR NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 7500-7508.
- Haase, I., Mörtl, S., Köhler, P., Bacher, A., Fischer, M. (2002). Biosynthesis of riboflavin in Archea: 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazine synthase of *Methanococcus jannaschii*. *J. Bacteriol.* **submitted for publication**.

- Habazettl, J., Gondol, D., Wiltscheck, R., Otlewski, J., Schleicher, M., Holak, T. A. (1992). Structure of hisactophilin is similar to interleukin-1 β and fibroblast growth factor. *Nature* **359**, 855-858.
- Hagihara, T., Fulio, T., Aisaka, K. (1995). Cloning of FAD synthetase gene from *Corynebacterium ammoniagenes* and its application to FAD and FMN production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **42**, 724-729.
- Harvey, R. A., Plaut, G. W. E. (1966). Riboflavin synthase from yeast: Properties of complexes of the enzyme with lumazine derivatives and riboflavin. *J. Biol. Chem.* **241**, 2120-2136.
- Harzer, G., Rokos, H., Otto, M. K., Bacher, A., Ghisla, S. (1978). Biosynthesis of riboflavin. 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazine 5'-phosphate is not a substrate for riboflavin synthase. *Biochim. Biophys. A.* **540**, 48-54.
- Henner, D. (1990). Expression of heterologous genes in *Bacillus subtilis*. Gene expression technology. *Methods Enzymol.* **185**, 199-228.
- Hollander, I., Brown, G. M. (1979). Biosynthesis of riboflavin: Reductase and deaminase of *Ashbya gossypii*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **89**, 759-763.
- Hoppe, W. (1957a). Die Faltmolekülmethode und ihre Anwendung in der röntgenographischen Konstitutionanalyse von Biflorin. *Z. Elektrochem.* **61**, 1076-1083.
- Hoppe, W. (1957b). Die Faltmolekülmethode: eine neue Methode zur Bestimmung der Kristallstruktur bei ganz oder teilweise bekannten Molekülstrukturen. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **10**, 750-751.
- Huber, R. (1965). Die automatisierte Faltmolekülmethode. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **19**, 353-356.
- Jordan, D. B., Bacot, K. O., Carlson, T. J., Kessel, M., Viitanen, P. V. (1999). Plant riboflavin biosynthesis. Cloning, chloroplast localization, expression, purification, and partial characterization of spinach lumazine synthase. *J. Biol. Chem.* **274**, 22114-22121.
- Kamino, Y., Lin, C. K., Regue, M., Wu, H. C. (1985). Characterization of the *ileX-lsp* operon in *Escherichia coli*: Identification of an open reading frame upstream of the *ileX* gene and potential promotor(s) for the *ileS-lsp* operon. *J. Biol. Chem.* **260**, 5616-5620.

- Kantlehner, M., Finsinger, D., Meyer, J., Schaffner, P., Jonczyk, A., Diefenbach, B., Nies, B., Kessler, H. (1999). Selektive RGD-vermittelte Adhäsion von Osteoblasten an Implantat-Oberflächen. *Angew. Chem.* **111**, 587-590.
- Kis, K., Bacher, A. (1995a). Substrate channeling in the lumazine synthase/riboflavin synthase complex of *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **270**, 16788-16795.
- Kis, K., Kugelbrey, K., Bacher, A. (2001). Biosynthesis of riboflavin. The reaction catalyzed by 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase can proceed without enzymatic catalysis under physiological conditions. *J. Org. Chem.* **66**, 2555-2559.
- Kis, K., Volk, R., Bacher, A. (1995b). Biosynthesis of riboflavin. Studies on the reaction mechanism of 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase. *Biochemistry* **34**, 2883-2892.
- Kitatsuji, K., Ishino, S., Teshiba, S., Arimoto, M. (1993). Process for producing flavin nucleotides. *Eur. Pat. Appl. EP 05422240 A2 92119308.2*.
- Kompa, C. (2002). Persönliche Mitteilungen. Lehrstuhl für Physikalische Chemie, Technische Universität, München.
- Ladenstein, R., Ludwig, H. C., Bacher, A. (1983). Crystallization and preliminary X-ray diffraction study of heavy riboflavin synthase from *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **258**, 11981-11983.
- Ladenstein, R., Meyer, B., Huber, R., Labischinski, H., Bartels, K., Bartunik, H. D., Bachmann, L., Ludwig, H. C., Bacher, A. (1986). Heavy riboflavin synthase from *Bacillus subtilis*. Particle dimensions, crystal packing and molecular symmetry. *J. Mol. Biol.* **187**, 87-100.
- Ladenstein, R., Ritsert, K., Huber, R., Richter, G., Bacher, A. (1994). The lumazine synthase/riboflavin synthase complex of *Bacillus subtilis*. X-ray structure analysis of hollow reconstituted beta-subunit capsids. *Eur. J. Biochem.* **223**, 1007-1017.
- Ladenstein, R., Schneider, M., Huber, R., Bartunik, H. D., Wilson, K., Schott, K., Bacher, A. (1988). Heavy riboflavin synthase from *Bacillus subtilis*. Crystal structure analysis of the icosahedral beta 60 capsid at 3.3 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **203**, 1045-1070.

- Ladenstein, R., Schneider, M. Huber, R., Schott, K. Bacher, A. (1988). The structure of the icosahedral β 60 capsid of heavy riboflavin synthase from *Bacillus subtilis*. *Z. Kristallographie* **185**, 122-124.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lakey, J. H., Ragett, E. M. (1998). Measuring protein-protein interactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**, 119-123
- Laue, T. M., Shah, B. D., Ridgeway, T. M., Pelletier, S. L. (1992). *Computer-aided interpretation of analytical sedimentation data for proteins*. In analytical ultracentrifugation in biochemistry and polymer science (Harding, S.E., Rowe, A.J., Horton, J.C., Eds.) Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- Le Van, Q., Keller, P. J., Bown, D. H., Floss, H. G., Bacher, A. (1985). Biosynthesis of riboflavin in *Bacillus subtilis*: origin of the four-carbon moiety. *J. Bacteriol.* **162**, 1280-1284.
- Löfas, S., Johnsson, B.J. (1990). A novel hydrogel matrix on gold surfaces in surface plasmon resonance sensors for fast and efficient covalent immobilization of ligands. *Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1526-1528.
- Lottspeich, F., Zorbach, H. (1998). *Bioanalytik*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- Lovett, P. S. (1981). BR151ATCC 33677 - *Bacillus subtilis* BR151. *J. Bacteriol.* **146**, 1162-1165.
- Lowe, C. R. (1999). Chemoselective biosensors. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3**, 106-111.
- Mann, M., Wilm, M. (1995). Electrospray mass spectrometry for protein characterization. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 219-224.
- Manstein, D. J., Pai, E. F. (1986). Purification and characterization of FAD synthetase from *Brevibacterium ammoniagenes*. *J. Am. Chem. Soc.* **34**, 16169-16173.
- Mehta, A. K., Studelska, D. R., Fischer, M., Giessauf, A., Kemter, K., Bacher, A., Cushman, M., Schaefer, J. (2002). Investigation of the binding of Epimer A of the covalent hydrate of 6,7-bis(trifluoromethyl)-8-D-ribityllumazine to a recombinant F22W *Bacillus subtilis* lumazine synthase mutant by $^{15}\text{N}\{^{19}\text{F}\}$ REDOR NMR. *J. Org. Chem.* **67**, 2087-2092.

- Meining, W., Mörtl, S., Fischer, M., Cushman, M., Bacher, A., Ladenstein, R. (2000). The atomic structure of pentameric lumazine synthase from *Saccharomyces cerevisiae* at 1.85 Å resolution reveals the binding mode of a phosphonate intermediate analogue. *J. Mol. Biol.* **299**, 181-197.
- Michaelis, L., Menten, M. L. (1913). Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochem. Z.* **49**, 333-369.
- Mörtl, S., Fischer, M., Richter, G., Tack, J., Weinkauff, S., Bacher, A. (1996). Biosynthesis of riboflavin. Lumazine synthase of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **271**, 33201-33207.
- Müller, F., Ghisla, S., Bacher, A. (1988). Vitamin B₂ und natürliche Flavine. in: *Islar, O. et al. (Hrsg.) Vitamine II; Wasserlösliche Vitamine, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York*, 50-159.
- Nakagawa, S., Igarashi, A., Ohata, T., Hagihara, T., Fuijo, T., Aisaka, K. (1995). Nucleotide sequence of the FAD synthetase gene from *Corynebacterium ammoniagenes* and its expression in *Escherichia coli*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **59**, 694-702.
- Naumann, C., Dietrich, C., Behrisch, A., Bayerl, T., Schleicher, M., Bucknall, D., Sackmann, E. (1996). Hisactophilin-mediated binding of actin to lipid lamellae - a neutron reflectivity study of protein membrane coupling. *Biophys. J.* **71**, 811-823.
- Neuberger, G., Bacher, A. (1985). Biosynthesis of riboflavin. An aliphatic intermediate in the formation of 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine from pentose phosphate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **127**, 175-181.
- Neuberger, G., 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.
- Nice, E. C., Catimel, B. (1999). Instrumental biosensors: New perspectives for the analysis of biomolecular interactions. *Bioassays* **21**, 339-352.
- Nielsen, P., Bacher, A. (1981). Biosynthesis of riboflavin. Characterization of the product of the deaminase. *Biochim. Biophys. A.* **662**, 312-317.
- Nielsen, P., Neuberger, G., Fujii, I., Bown, D. H., Keller, P. J., Floss, H. G., Bacher, A. (1986). Biosynthesis of riboflavin. Enzymatic formation of 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine from pentose phosphates. *J. Biol. Chem.* **261**, 3661-3669.

- Oschkinat, H., Schott, K., Bacher, A. (1992). Conformation of 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine bound to aggregates of β subunits of heavy riboflavin synthase. Transferred nuclear Overhauser effect (TrNOE) studies employing w_1 - ^{13}C -filtered NOESY and 2D-heteronuclear relayed-NOESY-spectroscopy. *J. Biomol. NMR* **2**, 19-32.
- Persson, K., Schneider, G., Douglas, B. J., Viitanen, P. V., Sandalova, T. (1999). Crystal structure analysis of a pentameric fungal and icosahedral plant lumazine synthase reveals the structural basis of differences in assembly. *Protein Science* **8**, 2355-2365.
- Pfleiderer, W. (1985). in *Folates and Pterins* (Blakely, R. L. & Benkovic, S. J., Eds.), 2, John Wiley & Son, New York.
- Pfleiderer, W., Bunting, J. W., Perrin, D. D., Nuebel, G. (1966). Synthese und Struktur 8-substituierter Lumazine. *Chem. Ber.* **99**, 3503-3523.
- 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. (1971). Metabolism of water-soluble vitamins: The biosynthesis of riboflavin. In: *Florkin, M., Stotz, E.H. (Hrsg.). Comprehensive Biochemistry, Elsevier, Amsterdam* **21**, 11-45.
- Plaut, G. W. E., Harvey, R. A. (1971). The enzymatic synthesis of riboflavin. *Methods Enzymol.* **18**, 515-538.
- Plaut, G. W. E., Smith, C. M., Alworth, W. (1974). Biosynthesis of water-soluble vitamins. *Annu. Rev. Biochem.* **43**, 899-922.
- Rädler, J., Sackmann, E. (1997). Functionalization of solids by ultrathin soft polymer- lipid composites: Modeling of cell surface and cell recognition processes. *Current opinion in Solid State & Material Science* **2**, 330-336.
- Richter, G., Fischer, M., Krieger, C., Eberhardt, S., Lüttgen, H., Gerstenschläger, I., Bacher, A. (1997a). Biosynthesis of riboflavin. Characterization of the bifunctional deaminase/reductase of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **179**, 2022-2028.

- Richter, G., Krieger, C., Volk, R., Kis, K., Ritz, H., Gotze, E., Bacher, A. (1997b). Biosynthesis of riboflavin: 3,4-dihydroxy-2-butanone-4-phosphate synthase. *Methods Enzymol.* **280**, 374-382.
- Richter, G., Volk, R., Krieger, C., Lahm, H. W., Röthlisberger, U., 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.
- Ritsert, K., Huber, R., Turk, D., Ladenstein, R., Schmidt-Bäse, K., Bacher, A. (1995). Studies on the lumazine synthase/riboflavin synthase complex of *Bacillus subtilis*: crystal structure analysis of reconstituted, icosahedral beta-subunit capsids with bound substrate analogue inhibitor at 2.4 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **253**, 151-167.
- Rossmann, M. G., Blow, D. M. (1962). The detection of subunits within the crystallographic asymmetric unit. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **15**, 24-31.
- Rothenhäusler, B., Knoll, W. (1988). Surface-plasmon microscopy. *J. Appl. Phys.* **67**, 3572-3575.
- Sackmann, E. (1996). Supported membranes: Scientific and practical applications. *Science* **271**, 43-48.
- Sackmann, E., Tanaka, M. (2000). Supported membranes on soft polymer cushions: fabrication, characterization and applications. *Trends Biotechnol.* **18**, 57-64.
- Sanger, F., Niklen, S., Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- Scatchard, G. (1949). The attractions of proteins for small molecules. *Ann. N. Y. Academ. Sci.* **51**, 660-672.
- Scheuring, J., Cushman, M., Bacher, A. (1995). Elimination of the 7-trifluoromethyl group from 6,7-bis(trifluoromethyl)-8-ribityllumazines. Stereoselective catalysis by the lumazine synthase of *Bacillus subtilis*. *J. Org. Chem.* **60**, 243-245.
- Scheuring, J., Kugelbrey, K., Weinkauff, S., Cushman, M., Bacher, A., Fischer, M. (2001). ¹⁹F NMR ligand perturbation studies on 6,7-bis(trifluoromethyl)-8-ribityllumazine-7-hydrates and the lumazine synthase complex of *Bacillus subtilis*. Site-directed mutagenesis changes the mechanism and the

- stereoselectivity of the catalyzed haloform-type reaction. *J. Org. Chem.* **66**, 3811-3819.
- Schlee, D. (1969). Bildung von Riboflavin in höheren Pflanzen (Spermatophyten). *Biol. Rundsch.* **7**, 17-25.
- Schott, K., Ladenstein, R., König, A., Bacher, A. (1990). The lumazine synthase/riboflavin synthase complex of *Bacillus subtilis*. Crystallization of reconstituted icosahedral β subunit capsids. *J. Biol. Chem.* **265**, 12686-12689.
- Sgamarella, V., van de Sande, J. H., Khorana, H. G. (1979). Studies on the polynucleotides. A novel joining reaction catalysed by the T4-polynucleotidyligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **67**, 1468-1475.
- Shenton, W., Mann, S., Colfen, H., Bacher, A., Fischer, M. (2001). Synthesis of nanophase iron oxide in lumazine synthase capsids. *Angew. Chem., Int. Ed.* **40**, 442-445.
- Stoeckelhuber, M., Noegel, A. A., Eckerskorn, C., Köhler, J., Rieger, D., Schleicher, M. (1996). Structure/function studies on the pH-dependent actin-binding protein hisactophilin in *Dictostelium* mutants. *Journal of Cell Science* **109**, 1825-1835.
- Stüber, D., Matile, H., Garotta, G. (1990). *System for high level production in E. coli and rapid purification of recombinant proteins: application to epitope mapping, preparation of antibodies and structure function analysis*. Immunological Methods IV (Lefkovits, I., Pernis, P., Ed.).
- Su, X., Chew, F. T., Li, S. F. (1999). Self-assembled monolayer-based piezoelectric crystal immunosensor for the quantification of total human immunoglobulin E. *Anal. Biochem.* **273**, 66-72.
- Szabo, A., Stolz, L., Granzow, R. (1995). Surface plasmon resonance and its use in biomolecular interaction analysis (BIA). *Curr. Opin. Struc. Biol.* **5**, 699-705.
- Van Holde, K. E., Weischet, W. O. (1978). Boundary analysis of sedimentation velocity experiments with monodisperse and paucidisperse solutes. *Biopolymers* **17**, 1387-1403.
- Van Regenmortel, M. H., Altschuh, D., Chatellier, J., Christensen, L., Rauffer-Bruyere, N., Richalet-Secordel, P., Witz, J., Zeder-Lutz, G. (1998).

- Measurement of antigen-antibody interactions with biosensors. *J. Mol. Recognit.* **11**, 163-167.
- Volk, R., Bacher, A. (1988). Biosynthesis of riboflavin. The structure of the four-carbon precursor. *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 3651-3653.
- Volk, R., Bacher, A. (1990). Studies on the 4-carbon precursor in the biosynthesis of riboflavin. Purification and properties of L-3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase. *J. Biol. Chem.* **265**, 19479-19485.
- Volk, R., 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., Plaut, G. W. E. (1964). 4-(1'-D-Ribitylamino)-5-amino-2,6,-dihydroxypyrimidine, the second product of the riboflavin synthetase reaction. *J. Biol. Chem.* **239**, 3493-3497.
- Wegener, J., Sieber, M., Galla, H. J. (1996). Impedance analysis of epithelial and endothelial cell monolayers cultured on gold surfaces. *J. Biochem. Biophys. Methods* **32**, 151-170.
- Young, D. W. (1986). The biosynthesis of the vitamins thiamin, riboflavin, and folic acid. *Nat. Prod. Rep.* **3**, 395-419.
- Zamenhof, P. J., Villarejo, M. (1972). Construction and properties of *Escherichia coli* strains exhibiting α -complementation of β -galactosidase fragments in vivo. *J. Bacteriol.* **110**, 171-178.
- Zhang, X., Meining, W., Fischer, M., Bacher, A., Ladenstein, R. (2001). X-ray structure analysis and crystallographic refinements of lumazine synthase from the hyperthermophile *Aquifex aeolicus* at 1.6 Å resolution: determinants of thermostability revealed from structural comparisons. *J. Mol. Biol.* **306**, 1099-1114.
- Zheng, Y. J., Viitanen, P. V., Jordan, D. B. (2000). Rate limitations in the lumazine synthase mechanism. *Bioorg. Chem.* **27**, 89-97.