

INAUGURALDISSERTATION

vorgelegt zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften am
Fachbereich Biologie der Justus-Liebig-Universität Giessen



Röntgenstrukturanalyse von LytB aus *Aquifex aeolicus* und *Plasmodium falciparum*

von

Ingo Rekittke, Diplom Biochemiker

angefertigt am Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin,
UKGM

Erstgutachter: Prof. Dr. Peter Friedhoff, JLU Gießen

Zweitgutachter: PD Dr. Hassan Jomaa, UKGM

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Peter Friedhoff von der JLU Giessen möchte ich für die Übernahme der Erstbetreuung dieser Promotion danken.

Mein besonderer Dank geht an Herrn PD Dr. Hassan Jomaa, der mich in seine Arbeitsgruppe am UKGM aufgenommen und mir diese Promotion ermöglicht hat.

Herrn PD Dr. Ulrich Ermler vom MPI für Biophysik danke ich für die ausgezeichnete Kooperation bei meinem Projekt. Ohne seine Expertise wäre diese Arbeit nicht durchführbar gewesen.

Herrn Prof. Dr. Dr. Norbert Katz möchte ich dafür danken, dass er für die Laufzeit des Projekts Räumlichkeiten in seinem Institut für klinische Chemie und Pathobiochemie zur Verfügung gestellt hat.

Desweiteren möchte mich bei allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern der AG Jomaa und AG Ermler für die tatkräftige Unterstützung bei meiner Arbeit bedanken. Ein besonderer Dank gilt Nadine Englert für ihre beständige moralische und fachliche Unterstützung im Verlauf dieser Arbeit.

Zusätzlich möchte ich Thorsten Schröter für das Korrekturlesen und Karina Makiola-Zappor für ihre stets aufmunternden Worte danken.

Ein besonderer Dank geht an meine Eltern die mich zum Studium ermutigt, mich in meinem Wunsch zur Erlangung der Promotion bestärkt und immer unterstützt haben.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Isoprenoide	1
1.2	Isoprenoid-Biosynthese	2
1.3	Synthese von DMAPP und IPP	4
1.4	Mechanismen des DOXP-Weges	5
1.4.1	DOXP-Synthase (DXS)	6
1.4.2	DOXP-Reduktoisomerase (DXR/IspC)	7
1.4.3	CDP-ME-Cytidyltransferase (YgbP/IspD)	8
1.4.4	CDP-ME-Kinase (YchB/IspE)	9
1.4.5	MEcPP-Synthase (YgbB/IspF)	11
1.4.6	HMBPP-Synthase (GcpE/IspG)	12
1.4.7	HMBPP-Reduktase (LytB/IspH)	13
1.5	Klinische Relevanz des DOXP-Weges	15
2	Zielsetzung	17
3	Material und Methoden	18
3.1	Materialien	18
3.1.1	Geräte	18
3.1.2	Verbrauchsmaterialien	20
3.1.3	Chromatographiepuffer	21
3.1.4	Chromatographiesäulen	22
3.1.5	Stationäre Phasen für die Chromatographie	22
3.1.6	Plasmide und Konstrukte	23
3.1.7	Bakterienstämme	25

3.2	Methoden	26
3.2.1	Allgemeine Methoden	26
3.2.2	Expression und Aufreinigung von rekombinantem LytB aus <i>Aquifex aeolicus</i>	29
3.2.3	Expression und Aufreinigung von rekombinantem LytB aus <i>Plasmodium falciparum</i>	33
3.2.4	Expression und Aufreinigung von rekombinantem GcpE aus <i>Thermus thermophilus</i>	37
3.2.5	Kristallisation	41
3.2.6	Röntgenkristallographie	42
3.2.7	Charakterisierung des Eisen-Schwefel-Clusters über Aktivi- tätsbestimmung	46
3.2.8	Bioinformatische Techniken	47
4	Ergebnisse	48
4.1	<i>Aquifex aeolicus</i> LytB	48
4.1.1	Expression und Aufreinigung	48
4.1.2	Kristallisation	49
4.1.3	Datensammlung	50
4.1.4	Phasenberechnung und Strukturbestimmung	51
4.1.5	Struktur von <i>Aquifex aeolicus</i> LytB.	52
4.1.6	Strukturanalyse	53
4.1.7	Aktivitätsbestimmung	54
4.2	<i>Plasmodium falciparum</i> LytB	57
4.2.1	Expression und Aufreinigung	57
4.2.2	Kristallisation	58
4.2.3	Datensammlung	59
4.2.4	Phasenberechnung und Strukturbestimmung	59
4.2.5	Struktur von <i>Plasmodium falciparum</i> LytB	61
4.2.6	Strukturanalyse	62
4.2.7	Bindungsexperimente mit Ferredoxin	63
4.3	<i>Thermus thermophilus</i> GcpE	65
4.3.1	Expression und Aufreinigung	65

4.3.2	Kristallisation	66
4.3.3	Datenaquisition	67
5	Diskussion	68
5.1	LytB	68
5.1.1	Struktur	68
5.1.2	Aktives Zentrum	71
5.1.3	Eisen-Schwefel-Cluster	73
5.1.4	Bindung von HMBPP an LytB	74
5.1.5	Bindung des Elektronendonors	77
5.2	GcpE	80
5.2.1	Kristallisation	80
6	Zusammenfassung	81
7	Abkürzungsverzeichnis	82
	Literaturverzeichnis	86

1 Einleitung

1.1 Isoprenoide

Isoprenoide, auch Terpenoide genannt, besitzen essentielle Funktionen in allen lebenden Organismen. Mit mehr als 35000 bekannten Verbindungen zeigen sie eine enorme strukturelle und chemische Diversität. Unter anderem erfüllen sie Funktionen in der Regulation der Genexpression, als Vitamine, in der Signaltransduktion, in der Immunabwehr, als Hormone und Pheromone und in der Photosynthese [1, 2, 3].

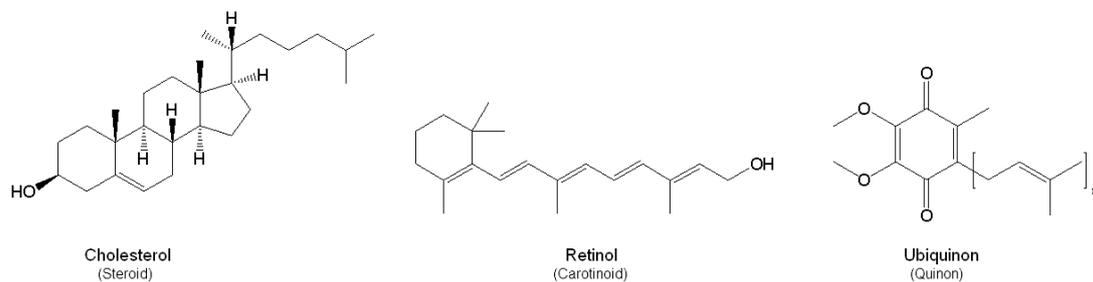


Abbildung 1.1: Exemplarische Beispiele der Isoprenoid-Stoffklasse.

Bekannte Beispiele der Isoprenoidverbindungen sind Cholesterol, Retinol und das Ubiquinon (Abb. 1.1). Cholesterol, welches eine wichtige Zellmembran-Komponente von Wirbeltieren darstellt, ist gleichzeitig die Vorstufe der Steroidhormone. Das Carotinoid Retinol, welches auch als Vitamin A₁ bekannt ist, wird vom Menschen über tierische Nahrungsmittel aufgenommen und dient in seiner Aldehydform (Retinal) als Kernkomponente der visuellen Wahrnehmung. Das Chinon Ubiquinon,

auch als CoenzymQ bekannt, ist ein Teil der mitochondrialen Atmungskette in Eukaryonten.

1.2 Isoprenoid-Biosynthese

Trotz der großen strukturellen Unterschiede innerhalb der Isoprenoide basiert die Synthese aller dieser Verbindungen auf zwei einfachen 5-C Einheiten. Diese beiden Verbindungen sind das Isopentylpyrophosphat (IPP) und das Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP), welche über die IPP-Isomerase (IDI) in ihr jeweiliges Isomer umgebaut werden können.

Der Kern der Isoprenoidsynthese ist die sequenzielle Kondensation von IPP an DMAPP durch die Enzymfamilie der Isoprenyldiphosphat-Synthasen, auch als Prenyltransferase bezeichnet. Innerhalb dieser Enzymfamilie unterscheiden sich die einzelnen Isoprenyldiphosphat-Synthasen durch das akzeptierte Allylsubstrat, die Kettenlänge des Produkts und die E-/Z-Stereochemie der gebildeten Doppelbindung. Bedingt durch die Kondensation von IPP erfolgt die Kettenverlängerung immer um 5 C-Einheiten: Ausgehend von DMAPP (5 C) werden Geranylpyrophosphat (GPP, 10 C), Farnesylpyrophosphat (FPP, 15 C), Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP, 20 C), Geranylarnesylpyrophosphat (GFPP, 25 C), Hexaprenylpyrophosphat (HexPP, 30 C), Heptapyrophosphat (HepPP, 35 C), Octapyrophosphat (OPP, 40 C), Solanesylpyrophosphat (SPP, 45 C) und Decaprenylpyrophosphat (DPP, 50 C) im durch die E-Isoprenylpyrophosphat-Synthase katalysierten Elongationszweig synthetisiert. Abzweigend von diesen Prenylketten werden die finalen Isoprenoide synthetisiert (Abb.1.2).

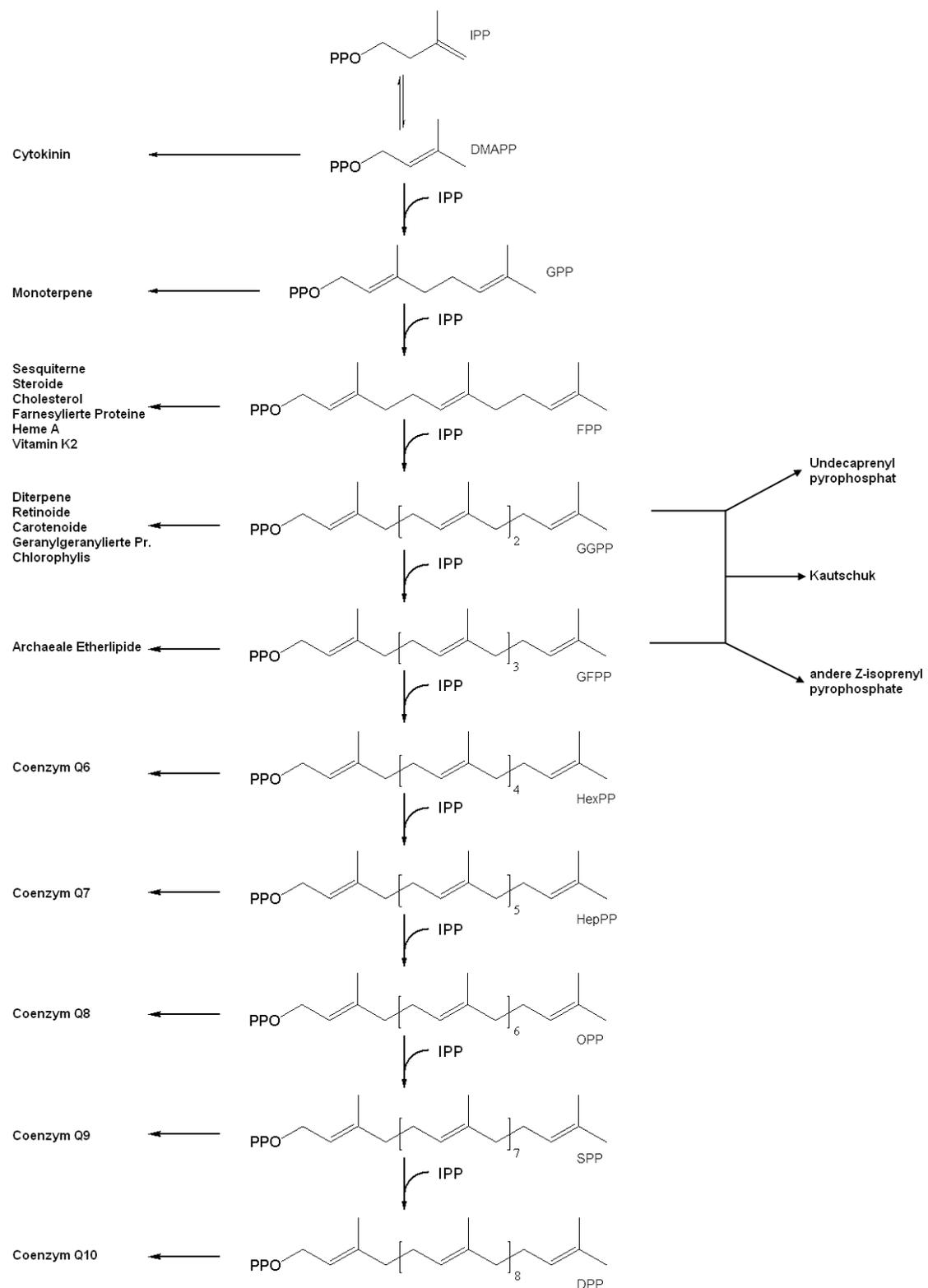


Abbildung 1.2: Die Kondensation von DMAPP und IPP, katalysiert durch Isoprenyldiphosphat-Synthasen, führt zur Elongation der Prenyl-Ketten. Ausgehend von diesen Vorstufen sind die Syntheseprodukte gezeigt. Adaption von Wang und Ohnuma [4].

1.3 Synthese von DMAPP und IPP

Im Laufe der Evolution haben sich zwei verschiedene Syntheserouten für die Hauptbausteine der Isoprenoidbiosynthese DMAPP und IPP entwickelt [5].

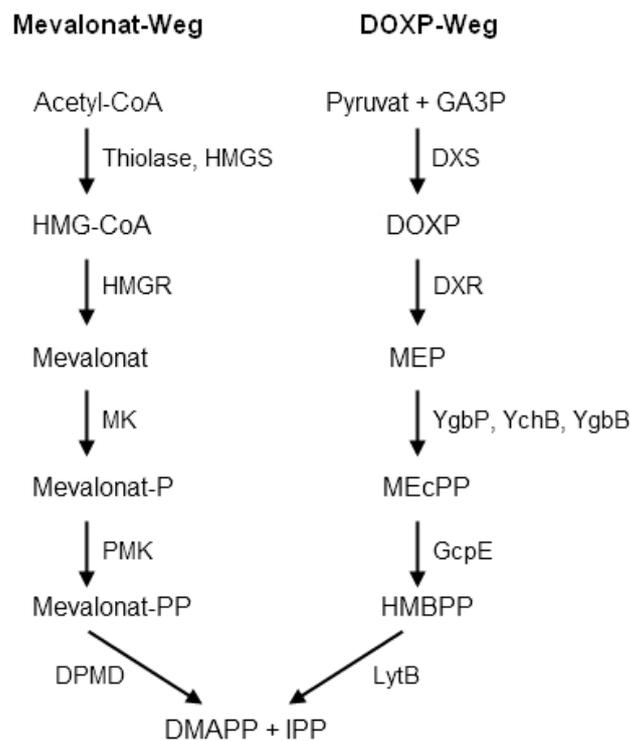


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der beiden Synthesewege für DMAPP und IPP.

Der Mevalonat-Weg ist schon länger bekannt; und es wurde lange Zeit angenommen, dass dieser der einzige Weg zur Synthese von DMAPP und IPP in der Natur ist. Er umfasst eine aus sieben Enzymen bestehende Reaktionskette, in der, ausgehend von Acetyl-CoA über das namensgebende Intermediat Mevalonat, IPP synthetisiert wird (Abb.1.3). Das durch den Mevalonat-Weg synthetisierte IPP wird teilweise durch die IPP-Isomerase zu DMAPP umgesetzt. Der Mevalonat-Weg ist der alleinige Syntheseweg für IPP und DMAPP in den meisten Eukaryoten (allen Säugetieren), Archaeen und einigen Eubakterien; weiterhin ist er im Cytosol und

in Mitochondrien von Pflanzen, Pilzen, *Trypanosoma* und *Leishmania* lokalisiert [6]. Bedingt durch seine frühe Entdeckung und seine klinische Relevanz für die Reduktion erhöhter Cholesterinwerte über die Inhibition der HMG-CoA-Reduktase ist der Mevalonat-Weg sehr ausgiebig erforscht [7, 8].

Im Gegensatz dazu wurde ein alternativer Syntheseweg für DMAPP und IPP erst vor vergleichsweise kurzer Zeit entdeckt [5, 9, 10, 11, 12]. Dieser Syntheseweg wird als Mevalonat-unabhängiger-Weg bezeichnet. Basierend auf den zwei in der Reaktionskette vorkommenden Intermediaten DOXP (1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat) und MEP (2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat) finden auch die alternativen Bezeichnungen DOXP-Weg und MEP-Weg Verwendung. Der DOXP-Weg wurde in Cyanobakterien, Eubakterien, Algen, Plastiden von Pflanzen und Apicomplexa vorgefunden. Als Edukte des DOXP-Weges dienen Pyruvat und Glyceraldehyd-3-phosphat (GA3P). Diese werden in einer sieben Schritte und sieben Enzyme umfassenden Reaktionskette zu DMAPP und IPP umgesetzt (Abb.1.3). Im Gegensatz zum Mevalonat-Weg sind zwei Enzyme des DOXP-Weges strukturell noch nicht charakterisiert [13].

1.4 Mechanismen des DOXP-Weges

Die Enzyme des DOXP-Weges sind durchweg lösliche Proteine, deren Gene über das Genom verteilt sind. Ausgenommen davon sind die Gene *ispD* und *ispF*, welche transkriptionell gekoppelt oder sogar fusioniert (*ispDF*) sind. Es gibt aber keine Hinweise auf eine globale transkriptionelle Regulation des DOXP-Weges [13]. Eine posttranskriptionelle Regulation von DXS und DXR konnte aber schon in Pflanzen nachgewiesen werden [14].

1.4.1 DOXP-Synthase (DXS)

Der erste Schritt im DOXP-Weg besteht aus der Kondensation von Pyruvat und GA3P zu DOXP, katalysiert durch die 1-Deoxy-D-Xylulose-5-phosphat-Synthase (DXS). Bisher gelöste Strukturmodelle der DXS-Enzyme von *Escherichia coli* und *Deinococcus radiodurans* zeigten eine strukturelle Verwandtschaft von DXS zu Transketolase und der E1-Untereinheit von Pyruvatdehydrogenase (PDH) [15]. Im Vergleich zu Transketolase und Pyruvatdehydrogenase sind die Domänen von DXS anders angeordnet, so dass das aktive Zentrum der DXS zwischen den Domänen I und II eines Monomers gelagert ist und nicht an der Schnittstelle der Monomere. Als hypothetischer Reaktionsmechanismus wird vermutet, dass der DXS-Coenzym-Komplex ein kovalentes Addukt zwischen Thiaminpyrophosphat und dem C2 von Pyruvat im Laufe der enzymatischen Reaktion bildet (Abb.1.4) [16]. Die Verifizierung dieser mechanistischen Vermutungen durch entsprechende Kristall- oder NMR-Strukturen steht noch aus.

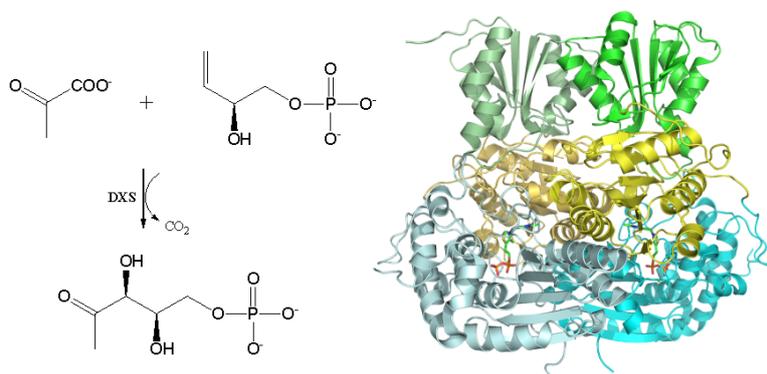


Abbildung 1.4: Umsetzung von Pyruvat und GA3P zu DOXP und Struktur des DXS-Dimers von *Deinococcus radiodurans* (pdb: 2O1X [15]) mit gebundenem Co-Faktor Thiamindi-phosphat. Markiert sind die N-terminale Domäne (grün), Transketolase-ähnliche Pyruvatbindungsdomäne (gelb) und die Transketolase-ähnliche C-terminale Domäne (türkis). Die einzelnen Monomere sind durch unterschiedliche Farbtintensität voneinander abgehoben.

1.4.2 DOXP-Reduktoisomerase (DXR/IspC)

Im zweiten Schritt des DOXP-Weges wird DOXP durch die 1-Deoxy-D-Xylulose-5-phosphat-Reduktoisomerase (DXR/IspC), eine Klasse B Dehydrogenase, zu 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat (MEP) umgesetzt.

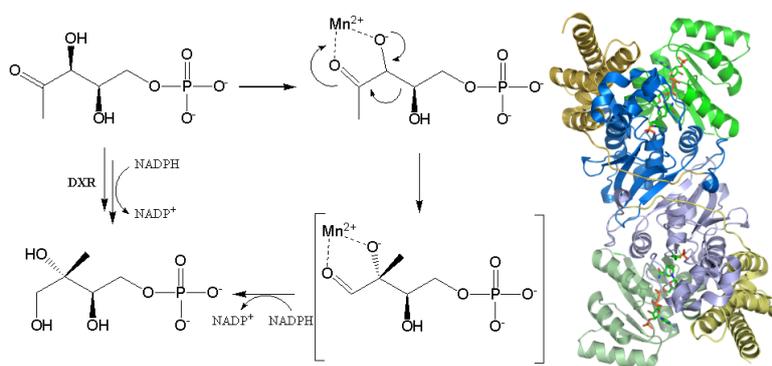


Abbildung 1.5: Umsetzung von DOXP zu MEP und Struktur des *Escherichia coli* DXR-Dimers (pdb: 2EGH [17]). Die sigmatrope Umlagerung des mit Mangan koordinierten DOXP und anschließende NADPH-getriebene Reduktion des Intermediats sind gezeigt. Die Domänen der Monomere sind wie folgt markiert: C-terminale NADPH-Bindungsdomäne (grün), zentrale Domäne mit aktivem Zentrum (blau) und N-terminales 4-Helix-Bündel (gelb).

Diese NADPH-getriebene Reaktion besteht aus zwei Schritten: Einer sigmatropen Umlagerung und einem anschließenden Reduktionsschritt. Die DXR ist eines der am besten erforschten Enzyme des DOXP-Weges, basierend auf der Entdeckung, dass DXR die Zielstruktur des antimikrobiellen Inhibitors Fosmidomycin ist [18, 19, 20].

Mehrere Kristallstrukturen des DXR-Enzyms wurden bereits aus verschiedenen Organismen bestimmt. Die ersten gelösten Strukturen stammen von *Escherichia coli* DXR [21]. In der Folgezeit wurden weitere DXR-Varianten von *Zymomonas mobilis* [22], *Mycobacterium tuberculosis* [23, 24] und *Yersinia pestis* [25] sowie mehrere Substrat- und Inhibitor Komplexe [17, 26, 27, 28, 29] kristallisiert und strukturell gelöst. Diese Strukturen zeigen ein Homodimer, dessen Untereinheiten aus drei strukturell unterscheidbaren Domänen aufgebaut sind: Eine N-terminale

NADPH-Bindungsdomäne, eine zentrale Domäne, welche das aktive Zentrum und einen die Bindungstasche abschließenden flexiblen Loopbereich enthält, und ein C-terminales Helixbündel (Abb.1.5).

Die Reaktion folgt einem sequentiellen Ablauf, in dem der Cofaktor NADPH zuerst bindet und sich anschließend der Komplex aus Mn^{2+} , DOXP und NADPH in der Bindungstasche von DXR bildet [30]. Diese Bindungstasche wird durch einen flexiblen Loop im Verlauf der Reaktion von der Umgebung abgeschirmt [29].

1.4.3 CDP-ME-Cytidyltransferase (YgbP/IspD)

Im Anschluss der Umsetzung zu MEP wird das Nukleotidderivat CTP in den Syntheseweg eingeführt; und es kommt zu einer Reaktion von MEP mit CTP zu 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol (CDP-ME) mit Pyrophosphat als Abgangsgruppe. Diese Reaktion wird durch die 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-Cytidyltransferase, auch als YgbP oder IspD bezeichnet, katalysiert.

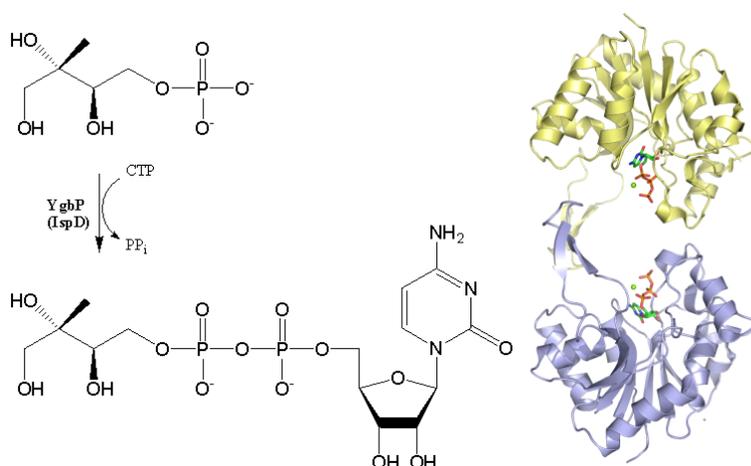


Abbildung 1.6: YgbP-gesteuerte nukleophile Reaktion von MEP mit dem α -Phosphat von CTP zu CDP-ME mit Pyrophosphat als Abgangsgruppe und YgbP-Dimer von *Escherichia coli* (pdb: 1I52 [31]). Die YgbP-Monomere liegen in gebundenem Komplex mit CTP und einem Magnesium-Ion vor.

Bis heute wurden YgbP-Strukturen von *Escherichia coli* [31, 32], *Neisseria gonorrhoeae* [33], *Thermotoga maritima* [34], *Arabidopsis thaliana* [35] und *Thermus thermophilus* [36] gelöst. Zusätzlich wurde eine bifunktionale Variante in *Camphylobacter jejuni* strukturell gelöst, welche zusätzlich die Funktion der zwei Reaktionen nachgeordneten 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat-Synthase (YgbB/IspF) erfüllt [37, 38]. Diese wird daher als IspDF bezeichnet.

Das YgbP-Monomer besteht aus einer einzigen α/β -Domäne, deren Kern ein gewundenes 7-strängiges β -Faltblatt darstellt. Aus diesem Faltblatt ragt ein verlängerter „ β -Arm“, welcher mit dem „ β -Arm“ des zweiten YgbP-Monomers die Interaktionsfläche für die Dimerbildung liefert (Abb.1.6).

Das aktive Zentrum wird durch sechs Polypeptid-Segmente eines Monomers und ein Peptid-Segment des Partnermonomers gebildet. Der vorgeschlagene Mechanismus geht davon aus, dass CTP als Ionenpaar mit Mg^{2+} zuerst bindet. Dann folgt eine Bindung der vier Phosphate der Substrate an das katalytische Zentrum, welche durch Lysine stabilisiert wird. Dadurch wird ein pentavalenter Übergangszustand generiert, welcher den nukleophilen Angriff des MEP-Phosphats auf das α -Phosphat von CTP ermöglicht [39, 40].

1.4.4 CDP-ME-Kinase (YchB/IspE)

Im durch die 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-Kinase (YchB/IspE) katalysierten vierten Schritt des DOXP-Weges kommt es zu einer ATP-abhängigen Anlagerung eines Phosphats an die 2C-Position von CDP-ME. Dadurch kommt es zur Bildung von 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-2-phosphat (CDP-MEP). Bisher wurden YchB-Strukturen aus *Escherichia coli* [41], *Thermus thermophilus* [42] und *Aquifex aeolicus* [42, 43, 44] erfolgreich aufgeklärt.

Das YchB-Monomer ähnelt in seiner Sekundärstruktur der α/β -Faltung der GHMP-Kinase (Galacto-, Homoserin-, Mevalonat-, Phosphomevalonat-Kinase) Proteinsuperfamilie [45], in der das Enzym in eine Cofaktor- und Substratbindungs-Domäne unterteilt ist. Das aktive Zentrum von YchB liegt in einer Kavität nahe der Grenzfläche der beiden Domänen. Dabei bilden drei konservierte Peptidsequenzen die

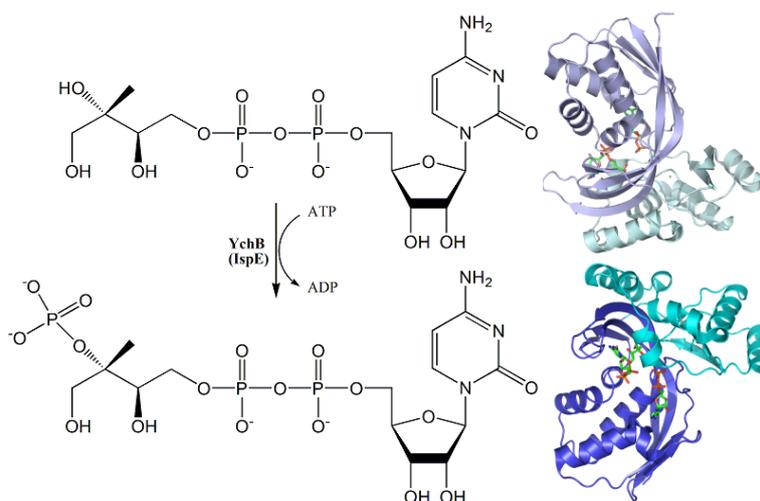


Abbildung 1.7: ATP-abhängige Reaktion von CDP-ME zu CDP-MEP, katalysiert durch YchB und YchB-Dimer von *Aquifex aeolicus* (pdb: 2V2Z [43]). Die gezeigte YchB-Kristallstruktur liegt im Komplex mit ADP und CDP-ME vor. Die Kofaktor- und Substratbindenden Domänen sind farblich abgesetzt (blau und türkis).

Grundbausteine des katalytischen Zentrums (Abb.1.7): Die Peptidsequenz 1 ist auf $\beta 1$ der N-terminalen Domäne lokalisiert und interagiert mit CDP-ME. Die Sequenzen 2 und 3 interagieren mit dem Triphosphat von ATP. Dabei liegt die Sequenz 2 in einem Loop-Bereich zwischen $\alpha 2$ und $\beta 4$ und die Sequenz 3 erstreckt sich über den $\beta 8$ - $\beta 9$ -Loop.

Die Peptidsequenz 3 übt zusätzlich eine stabilisierende Wirkung über Wasserstoffbrücken auf die Sequenzen 1 und 2 aus. Als Reaktionsmechanismus wird eine Wasserstoffbrückenbindung eines Lysin-/Aspartatpaares mit CDP-ME angenommen, durch welche die O2M-Hydroxylgruppe polarisiert wird. Durch das als Base fungierende Aspartat wird die Hydroxylgruppe dann abgespalten. Der Lysin-Rest stabilisiert den entstandenen Übergangszustand, so dass dieser das γ -Phosphat von ATP nukleophil angreifen kann. Es kommt zur Bildung von CDP-MEP und ADP.

1.4.5 MEcPP-Synthase (YgbB/IspF)

Der fünfte Schritt des DOXP-Weges besteht aus der Abspaltung des Nucleotids von CDP-MEP und der Bildung der zyklischen Verbindung 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat (MEcPP). Diese Reaktion wird durch das Zn^{2+} -/ Mg^{2+} -abhängige Enzym 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat-Synthase (YgbB/IspF) katalysiert. Mehrere Kristallstrukturen des Trimers YgbB aus *Escherichia coli* [46, 47, 48], *Haemophilus influenzae* [33, 49], *Shewanella oneidensis* [50] und *Arabidopsis thaliana* [51] konnten zusätzlich zum bifunktionalen IspDF von *Camphylobacter jejuni* [38] aufgeklärt werden.

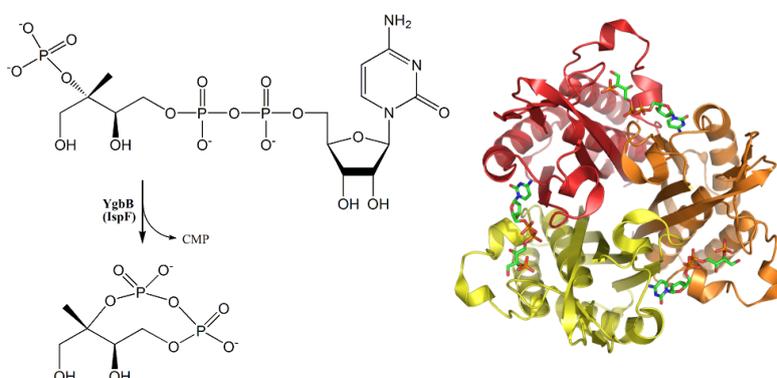


Abbildung 1.8: YgbB-gesteuerte Umsetzung von CDP-MEP zu MEcPP mit CMP als Abgangsgruppe und YgbB-Trimer von *Escherichia coli* (pdb: 1U43 [46]). Gezeigt ist der Komplex von YgbB mit CDP-MEP. Die Monomere des Trimers sind farblich markiert.

YgbB besteht aus einer einzelnen α/β -Domäne, welche aus einem gemischten 4-strängigen β -Faltblatt mit drei einseitig flankierenden α -Helices zusammengesetzt ist. Drei Untereinheiten bilden zusammen ein glockenförmiges Trimer. An den Schnittstellen der Monomere wird das aktive Zentrum von Aminosäureresten der benachbarten Monomere gebildet (Abb.1.8). In diesem katalytischen Zentrum liegt ein durch zwei Histidine, ein Aspartat und ein Wasser bzw. Phosphat tetrahedral koordiniertes Zn^{2+} -Ion vor [46, 47]. Zusätzlich wird im Laufe der Reaktion ein Mg^{2+} -Ion eingebracht, welches mit den α - und β -Phosphaten von CDP-MEP und YgbB oktahedral koordiniert. Beide divalenten Kationen sind essentiell für

die Katalyse. Es wird angenommen, dass die α - und β -Phosphate durch die beiden Kationen so koordiniert und polarisiert werden, dass als erster Schritt ein intramolekularer, nukleophiler Angriff des terminalen CDP-MEP-Phosphats an das β -Phosphat stattfinden kann. Dieser würde einen durch die Metallionen stabilisierten pentakoordinierten Übergangszustand ergeben, welcher sich zu CMP und 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat (MEcPP) auflöst.

1.4.6 HMBPP-Synthase (GcpE/IspG)

Der vorletzte Schritt des DOXP-Weges besteht in der Umsetzung der zyklischen Verbindung MEcPP zu (E)-4-Hydroxy-3-methyl-but-2-enyldiphosphat (HMBPP). Diese Reaktion wird durch die (E)-4-Hydroxy-3-methyl-but-2-enyldiphosphat-Synthase (GcpE/IspG) katalysiert (Abb.1.9).

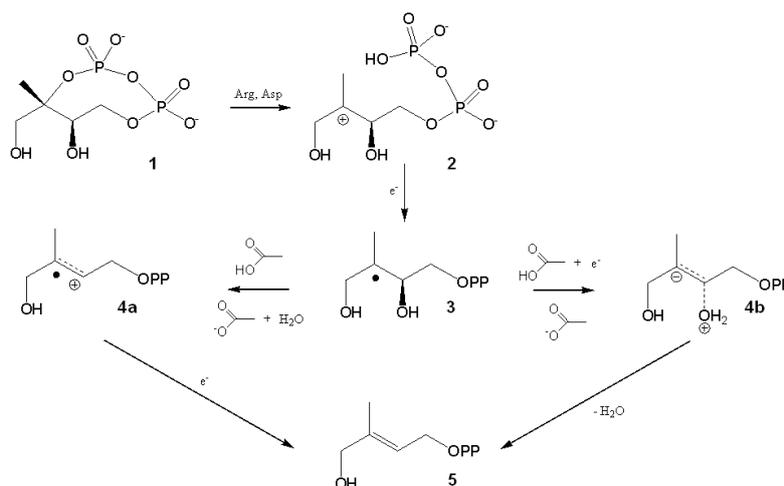


Abbildung 1.9: Modell für den katalytischen Mechanismus von GcpE. Das zyklische MEcPP (**1**) wird an Arginin- und Aspartatresten gespalten. Es bildet sich ein Carbokation an C3 (**2**). Übertragung eines Elektrons vom Eisen-Schwefel-Cluster führt zur Bildung eines neutralen radikalischen Übergangszustandes (**3**). Bildung von HMBPP (**5**) über ein kationisches Radikal (**4a**) oder Carbanion (**4b**) als Intermediat.

Bisher konnten keine Strukturen von GcpE gelöst werden. Es ist bekannt, dass das GcpE-Enzym einen Eisen-Schwefel-Cluster enthält, welcher wahrscheinlich ein Ferredoxin-Typ [4Fe-4S]-Cluster ist [52, 53].

Die Umsetzung von MEcPP zu HMBPP läuft mutmaßlich in zwei Schritten ab: Einer reduktiven Ringöffnung an C3 und der anschließenden Eliminierung der C2-Hydroxy-Gruppe mit der Bildung einer Doppelbindung zwischen C2 und C3. Dabei werden 2 Elektronen übertragen, was die Beteiligung des Eisen-Schwefel-Clusters von GcpE an der Reaktion als wahrscheinlich erscheinen lässt. Bedingt durch die fehlenden Strukturdaten gibt es mehrere Reaktionsmodelle, welche sich vor allem in Bezug auf den Zeitpunkt der Elektronenübertragung und die Art der Übergangszustände unterscheiden. Ein Ansatz ist eine Protonenübertragung von einem postulierten Arginin auf das an C3 gebundene Sauerstoff-Atom [53]. Das durch die Ringöffnung entstandene C3-Carbokation reagiert dann mit zwei Elektronen vom Eisen-Schwefel-Cluster und einem von Aspartat oder Glutamat stammenden Proton zu HMBPP. Für diese Reduktion wurde sowohl ein kationisches Radikal [53] als auch ein mögliches Carbanion an C3 [54] als Übergangszustand vorgeschlagen (Abb.1.9). Ein weiterer Alternativmechanismus ist die Bildung eines Epoxidintermediats nach der Ringöffnung und der Übertragung nur eines einzelnen Elektrons vom Eisen-Schwefel-Cluster [55].

1.4.7 HMBPP-Reduktase (LytB/IspH)

Der terminale Schritt des DOXP-Weges wird durch die (E)-4-Hydroxy-3-methylbut-2-enyldiphosphat-Reduktase (LytB/IspH) katalysiert [56]. Zu Beginn dieser Arbeit lagen noch keine strukturellen Daten vor. Ebenso wie GcpE enthält LytB einen Eisen-Schwefel-Cluster. Bei diesem handelt es sich wahrscheinlich ebenso wie bei GcpE um einen [4Fe-4S]-Cluster [57]. Es wurden aber auch EPR-Messungen durchgeführt, die auf einen [3Fe-4S]-Cluster als Alternative hingewiesen haben [58]. LytB setzt HMBPP in einer Reduktion zu DMAPP und IPP um. Im Gegensatz zum Äquivalent DPMD (Diphosphomevalonat-Decarboxylase) aus dem Mevalonat-Weg, welcher nur IPP synthetisiert, wird durch die LytB-katalysierte Reaktion

sowohl DMAPP als auch IPP hergestellt [59]. Ungewöhnlicherweise werden diese Produkte nicht äquivalent produziert, sondern IPP wird in einem Überschuss zu DMAPP synthetisiert. Es wurden von verschiedenen LytB-Enzymen Produktverhältnisse von 4:1 bis 6:1 (IPP:DMAPP) dokumentiert [57, 59, 60]. Die IPP-Überproduktion korrespondiert mit dem höheren Bedarf an IPP für die Isoprenoid-Biosynthese (1.2).

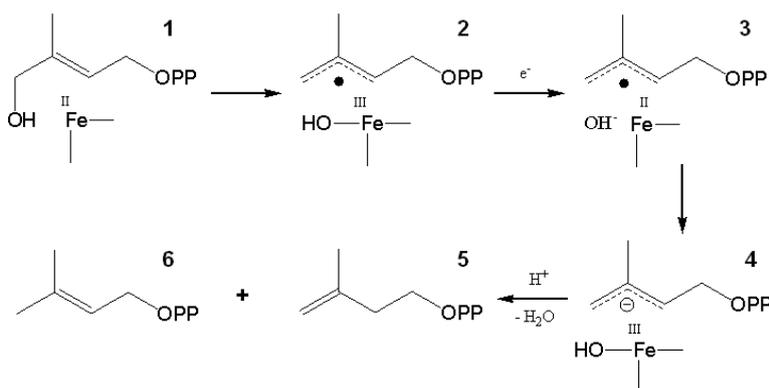


Abbildung 1.10: Mechanistisches Modell für die HMBPP-Katalyse von LytB. Die Hydroxylgruppe von HMBPP interagiert mit dem [4Fe-4S]-Cluster von LytB (1). Das Hydroxyl bindet kovalent an den Cluster; dabei wird ein delokalisierte radikalischer Übergangszustand gebildet (2). Elektronentransfer auf den Eisen-Cluster; das Hydroxyl wird abgespalten, bleibt aber weiterhin mit dem Eisen koordiniert (3). Elektronentransfer vom Cluster auf das Substrat und Formierung eines Carbanions (4). Protonentransfer vom Enzym und Eliminierung von Wasser, Bildung von IPP (5) oder DMAPP (6).

Bisher ist nur wenig über den Reaktionsmechanismus von LytB bekannt; und der Modus, über den sowohl DMAPP als auch IPP vom gleichen Enzym produziert werden können, ist noch vollkommen unklar. Überlegungen wurden angestellt, dass die LytB-Reaktion das biologische Äquivalent einer Birch-Synthese sein könnte (Abb.1.10) [55].

Forschungsergebnisse konnten dagegen das Elektronendonorsystem für LytB in den Organismen *Escherichia coli* und *Plasmodium falciparum* aufklären: Während in *Escherichia coli* das Elektronendonorsystem durch Flavodoxin und Flavodoxin-

Reduktase gestellt wird [55], ist in *Plasmodium falciparum* der Elektronentransfer auf LytB durch Ferredoxin und Ferredoxin-NADP⁺-Reduktase gegeben [60].

1.5 Klinische Relevanz des DOXP-Weges

Die Enzyme des DOXP-Weges sind seit ihrer Entdeckung zu einem attraktiven Ziel für die Entwicklung antibakterieller und herbizider Wirkstoffe geworden. Dieses basiert auf der Tatsache, dass der DOXP-Weg nicht im Menschen vorkommt, aber gleichzeitig die Vorstufen der überlebenswichtigen Terpenoide in zahlreichen pathogenen Erregern synthetisiert. Besonders vorteilhaft ist, dass die vom DOXP-Weg benötigten Substrate und generierten Produkte spezifisch für den DOXP-Weg sind und gleichzeitig kein alternativer Stoffwechselweg den Ausfall eines Enzyms des DOXP-Weges kompensieren kann [61]. Zusätzlich haben Vergleiche zwischen verschiedenen Organismen ergeben, dass Substrat- und Cofaktorbinding mit hoher Wahrscheinlichkeit stark konservierter Natur sind, so dass von Versuchen an einfachen Modellorganismen (z.B. *Escherichia coli*) auf die Wirkung an pathogenen Erregern geschlossen werden kann [32].

Neben der Entwicklung von antibakteriellen und herbiziden Wirkstoffen sind die Enzyme des DOXP-Weges als Zielstrukturen für die Entwicklung von Medikamenten für parasitäre Erreger, wie *Plasmodium* und damit für die Malariatherapie, interessant geworden.

Bemerkenswerterweise besitzt das parasitäre Protozoon *Plasmodium*, das die Malaria im Menschen auslöst, ebenfalls nur den DOXP-Weg [62]. Dieser ist in einer als Apicoplast bezeichneten, nicht-photosynthetischen, Plastiden-ähnlichen Organelle lokalisiert [63]. Trotz der Tatsache, dass die Enzyme des DOXP-Weges im Nukleus von *Plasmodium falciparum* kodiert und erst in den Apicoplasten transportiert werden, wird davon ausgegangen, dass der DOXP-Weg in *Plasmodium falciparum* und der Apicoplast seinen evolutionären Ursprung in einem cyanobakteriellen Endosymbionten hat [64].

Einige Ansätze für strukturbasierte Wirkstoffentwicklung für die Enzyme YchB und YgbB wurden schon durchgeführt [65]; aber der bisher größte Erfolg für

die klinische Applikation des DOXP-Weges war die Entdeckung, dass das 1980 publizierte [66] Antibiotikum Fosmidomycin ein spezifischer Inhibitor der DOXP-Reduktoisomerase ist.

Fosmidomycin ist eine natürlich vorkommende, aus *Streptomyces lavendulae* isolierbare Verbindung [18]. Es konnte experimentell gezeigt werden, dass Fosmidomycin die DXR-Enzyme verschiedener Organismen, unter ihnen auch *Plasmodium*, in nanomolarer Konzentration *in vitro* inhibiert [19]. Ausgehend davon wurde die klinische Entwicklung von Fosmidomycin als Anti-Malaria-Therapeutikum aufgenommen.

Fosmidomycin wurde in einer klinischen Phase-II-Studie getestet. Die Monotherapie mit Fosmidomycin führte zu überraschend kurzen Parasiten- und Fiebereliminationszeiten von ca. 48 Stunden. Dabei zeigte die Medikation mit Fosmidomycin eine hohe Verträglichkeit; nur gelegentliche gastrointestinale Nebenwirkungen konnten beobachtet werden, welche möglicherweise auf die antibakterielle Aktivität von Fosmidomycin zurückzuführen sind. 7 Tage nach Beginn der Therapie waren sämtliche Patienten klinisch und parasitologisch geheilt. Allerdings konnte 3 Wochen nach Therapieende bei einem Anteil von 50 % der Patienten eine Rekrudescenz der Parasitämie beobachtet werden [67, 68].

Als Konsequenz wurde die Möglichkeit des Einsatzes von Fosmidomycin in Kombinationstherapie mit anderen Antimalariawirkstoffen untersucht. In Wirkstoffinteraktionsstudien zeigte sich, dass Fosmidomycin synergistische Wirkung mit Clindamycin zeigte. Clindamycin, welches gewöhnlich als Antibiotikum gegen Infektionen anaerober und gram-positiver Bakterien eingesetzt wird, hatte bisher in der Malaria-therapie auf Grund seiner langsamen Wirkung keine Bedeutung. Vom Wirkungsmechanismus von Clindamycin wird angenommen, dass es die Proteinsynthese in den Parasiten-Apicoplasten und damit deren Replikation inhibiert. Der Synergismus mit Fosmidomycin könnte auf der Tatsache beruhen, dass Fosmidomycin die im Apicoplasten lokalisierte DXR inhibiert. Erste klinische Studien dieser Kombinationstherapie wurden inzwischen durchgeführt, welche die erwartete schnelle Wirkung und eine vollständige klinische und parasitologische Heilung der behandelten Patienten zeigen konnten [69, 70, 71].

2 Zielsetzung

Durch die hohe Relevanz in der Entwicklung neuer Medikamente und Herbizide ist die vollständige strukturelle Aufklärung der Enzyme des DOXP-Weges von großem Interesse. Bedingt durch die hohe Sauerstoffempfindlichkeit der letzten beiden Enzyme des DOXP-Weges, GcpE und LytB, hervorgerufen durch ihre gebundenen Eisen-Schwefel-Cluster, konnten beide Enzyme noch nicht für Röntgenstrukturanalysen zur Kristallisation gebracht werden.

In dieser Arbeit soll schwerpunktmässig die 3D-Struktur von LytB gelöst werden. Dazu soll als erster Schritt die Röntgenstruktur von rekombinantem *Aquifex aeolicus* LytB ermittelt werden. Dieses bietet sich an, da rekombinant in *Escherichia coli* exprimiertes *Aquifex aeolicus* LytB sich unter sauerstofffreier Lagerung als sehr langzeitstabil gezeigt hat (> 6 Monate). Bei erfolgreicher Kristallisation und Strukturanalyse von *Aquifex aeolicus* LytB soll anschließend die Röntgenstrukturaufklärung von *Plasmodium falciparum* LytB in Angriff genommen werden. Die Gene beider Enzyme lagen zu Beginn dieser Arbeit schon als Expressionsplasmide vor.

Zusätzlich sollen, aufbauend aus den bei der Röntgenstrukturanalyse von *Aquifex aeolicus* und *Plasmodium falciparum* LytB etablierten Methoden, erste Schritte für eine Strukturaufklärung von rekombinantem *Thermus thermophilus* GcpE gemacht werden. Das Gen für *Thermus thermophilus* GcpE lag ebenfalls zu Beginn dieser Arbeit als Expressionsplasmid vor.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Geräte

Zentrifugen

Capsule HF-120

Tomy Seiko

Biofuge Pico

Heraeus Instruments

EBA 35

Hettich

Rotina 46R

Hettich

RC5C

Sorvall

Avanti J-25

Beckman Coulter

Rotoren

GSA, SS-34

Sorvall

JA-10, JA-25.50

Photometer

Nicolet Evolution 100

Thermoelectron

SpectraMAX 340PC

Molecular Devices

Vortex

VV3

VWR

Reax 1

Heidolph

Ultraschall

Sonoplus HD 2200

Bandelin

Sonoplus UW 2200

Bandelin

Sonotrode VS70T	Bandelin
Sonorex Digitec DT 514	Bandelin
Wasserbad	
Typ 1003	GFL
pH-Meter	
pH 422	WTW
Elektrode Inlab 412/170	Mettler Toledo
Heizblöcke	
Thermomixer compact	Eppendorf
Reacti-Therm Heating Module	Pierce
Gelelektrophorese	
Mini-Protean 3	BioRad
PowerPac 200	BioRad
Slab Gel Dryer	Savant
Duomax 1030	Heidolph
Waagen	
3716 MP	Sartorius
PG5002-S Delta Range	Mettler Toledo
BP221 D	Sartorius
FPLC/HPLC	
Pump P-6000	Pharmacia
Gradient Programmer GP-250	Pharmacia
600S Controller	WATERS
626 Pump	WATERS
996 Photodiode Array Detector	WATERS
474 Scanning Fluorescence Detector	WATERS
9125 Valve	Rheodyne
Model 300C	Gynkotek
Pumpen (sonstige)	
Pump P-500	Pharmacia

Miniplus 3	Abimed Gilson
steriles Arbeiten	
Sterilbank 76102	Thermoelectron
Varioklav Dampfsterilisator	H+P
anaerobes Arbeiten	
<i>anaerobic chamber</i>	Coy laboratory products
Palladium-Katalysator	Coy laboratory products
Sauerstoffdetektor	Coy laboratory products
Wasseraufbereitung	
MilliQ _{Plus}	Millipore
Inkubator	
TH-30 Hood	Edward Bühler GmbH
SM-30 Control	Edward Bühler GmbH
Pipettierhilfen	
Pipetman 10, 20, 200, 1000 μ l	Abimed Gilson
Multipette Plus	Eppendorf
Pipetboy Plus	Integra Biosciences

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

D-Tube Dialyzer Midi (6-8 kD)	Merck
D-Tube Dialyzer Maxi (12-14 kD)	Merck
D-Tube Dialyzer Mega	Merck
B.Braun Injekt 10ml, 20ml, 50ml	B.Braun
pH-Fix 0-14	Roth
Millex GP 0,22 μ m	Millipore
Amicon Ultra-4 10kD, 30kD	Millipore
Parafilm M	Pechiny Plastic Packaging
Nitra-Tex M	Ansell
EIA/RIA Plate, 96-well	Costar
Reagiergefäß 1,5 ml	Sarstedt

3.1.3 Chromatographiepuffer

Aquifex aeolicus LytB

Co-TALON Puffer A:	30 mM Tris-HCl, pH 7,5 100 mM NaCl
Co-TALON Puffer B:	30 mM Tris-HCl, pH 7,5 100 mM NaCl 200 mM Imidazol
SourceQ Puffer A:	30 mM Tris-HCl, pH 7,5
SourceQ Puffer B:	30 mM Tris-HCl, pH 7,5 1 M NaCl
SEC Puffer:	30 mM Tris-HCl, pH 7,5 150 mM NaCl
SEC Puffer:	30 mM Tris-HCl, pH 7,5 150 mM NaCl

Plasmodium falciparum LytB

Co-TALON Puffer A:	30 mM Tris-HCl, pH 7,5 150 mM NaCl
Co-TALON Puffer B:	30 mM Tris-HCl, pH 7,5 150 mM NaCl 300 mM Imidazol
SourceS Puffer A:	30 mM Tris-HCl, pH 7,5 50 mM NaCl
SourceS Puffer B:	30 mM Tris-HCl, pH 7,5 1 M NaCl
SEC Puffer:	30 mM Tris-HCl, pH 7,5 150 mM NaCl

Thermus thermophilus GcpE

DEAE Puffer A:	30 mM Tris-HCl, pH 7,5
DEAE Puffer B:	30 mM Tris-HCl, pH 7,5 1 M NaCl
Source15Q Puffer A:	30 mM Tris-HCl, pH 8
Source15Q Puffer B:	30 mM Tris-HCl, pH 8 1 M NaCl

3.1.4 Chromatographiesäulenvorgepackte Sephadex G-25 Säulen

PD-10	Amersham Biosciences
NAP 5	Amersham Biosciences

vorgepackte Superdex Säulen

10/300 GL	Amersham Biosciences
-----------	----------------------

Glaskörper

XK 26	Amersham Biosciences
TAC 15/250	Kronlab
TAC 25/250	Kronlab
TAC 25/500	Kronlab
TAC 50/250	Kronlab
ECO 25/750	Kronlab

3.1.5 Stationäre Phasen für die Chromatographie

Co-TALON [72]	Clontech
Source15Q	Amersham Biosciences
Source15S	Amersham Biosciences
Superdex200	Amersham Biosciences

3.1.6 Plasmide und Konstrukte

Plasmid

pASK-IBA33plus-AaLytB
 pASK-IBA33plus-PfLytB
 pQE60-ThGcpE

Ursprungsplasmid

pASK-IBA33plus (IBA)
 pASK-IBA33plus (IBA)
 pQE60 (Qiagen)

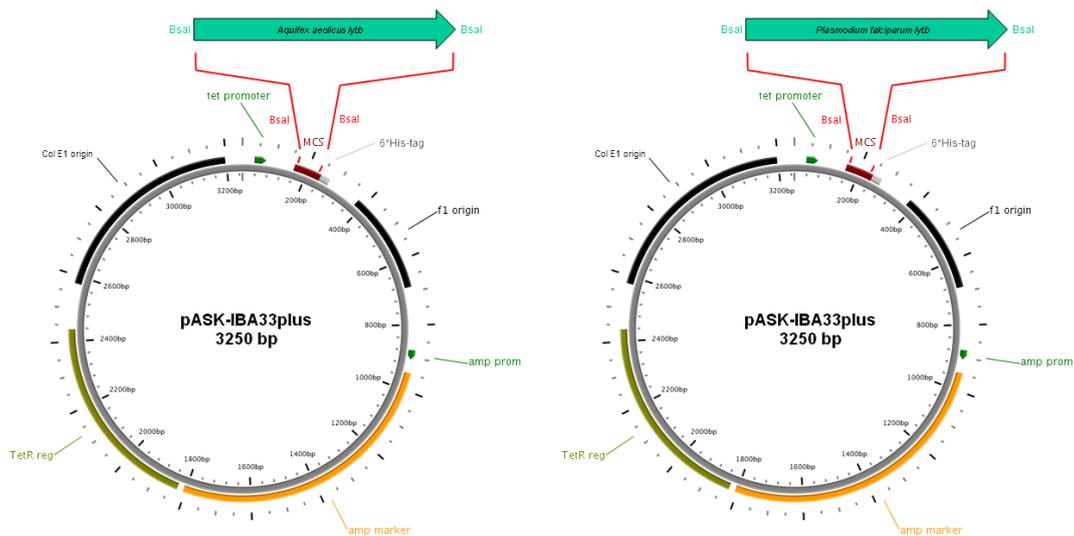


Abbildung 3.1: Vektorkarten von pASK-IBA33plus-AaLytB (links) und pASK-IBA33plus-PfLytB (rechts). Der pASK-IBA33plus-Vektor besitzt einen Ampicillinresistenz-Marker, Tetracyclin-Repressor (TetR) und -Promoter und f1 und Col E1 Replikationsursprünge. Klonierung der *lytb*-Gene erfolgte an den *Bsa*I-Schnittstellen des Polylinkers (MCS) mit einer His₆-Sequenz im Leserahmen. Die Vektorkarten wurden mit PlasmMapper erstellt [73].

Die *lytb*-Gene von *Aquifex aeolicus* und *Plasmodium falciparum* liegen als Expressionsplasmide in dem Tetracyclin-induzierbaren [74] Vektor pASK-IBA33plus vor. Die Klonierung des Expressionsplasmids pASK-IBA33plus-PfLytB wurde von Röhrich et. al. durchgeführt [60]. Analog dazu wurde das Expressionsplasmid pASK-IBA33plus-AaLytB aus dem ursprünglich von Altincicek et. al. [59] klonierten Plasmid pQE60-AaLytB-Plasmid von René Röhrich hergestellt. Beide Gene wur-

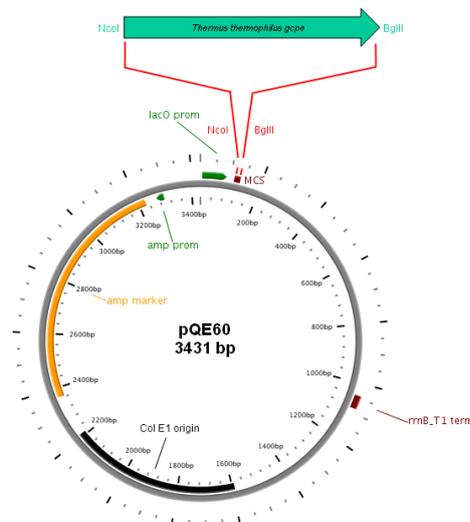


Abbildung 3.2: Vektorkarte von pQE60-ThGcpE. Der pQE60-Vektor besitzt einen gegenläufigen Ampicillinresistenz-Marker, ein Laktose Operon (*lacO*), eine *rrnB* T1 transkriptionale Terminatorregion und einen Col E1 Replikationsursprung. Das *Thermus thermophilus gcpe*-Gen wurde an den *NcoI* und *BglII*-Schnittstellen des Polylinkers (MCS) einkloniert. Die Vektorkarte wurde mit PlasMapper erstellt [73].

den jeweils mittels *BsaI* in den pASK-IBA33plus-Vektor kloniert. Da die Gene jeweils im Leserahmen der im Vektor kodierte His₆-Sequenz kloniert sind, besitzen die exprimierten LytB-Proteine eine C-terminale RSHHHHHH-Modifikation. Da das *lytb*-Gen von *Plasmodium falciparum* ein N-terminales 217 Aminosäuren umfassendes Signalpeptid zum Transport in den Apicoplast besitzt, wurde dieser Bereich bei der synthetischen Erstellung des muren *lytb*-Gens nicht berücksichtigt [60].

Das synthetische *Thermus thermophilus gcpe*-Gen liegt als Expressionsplasmid in dem IPTG-induzierbaren [75] pQE60-Vektor vor. Die Klonierung dieses pQE60-ThGcpE-Vektors erfolgte durch Kollas et. al. [52]. Das Gen wurde mit Hilfe der Restriktionsenzymen *NcoI* und *BglII* in das Plasmid kloniert. Der C-terminale His₆-Marker wurde durch einen Restriktionsverdau mit *BglII* und *HindIII* und anschließender Religation entfernt [52].

3.1.7 Bakterienstämme

<u>Stamm</u>	<u>Genotyp</u>
<i>E.coli</i> TOP10 (Invitrogen)	F ⁻ <i>mcrA</i> (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) 80 <i>lacZ</i> M15 <i>lacX74 recA1 ara139 (ara-leu)</i> 7697 <i>galU</i> <i>galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i>

3.2 Methoden

3.2.1 Allgemeine Methoden

Proteinbestimmung mit Bicinchoninsäure (BCA)

Für die Konzentrationsbestimmung von Proteinproben wurde das BCA Protein Assay Reagent Kit von Pierce verwendet [76]. Die Proteinbestimmung erfolgte auf 96-well Platten (3.1.2) mit einem eingesetzten Probenvolumen von 10 μl und 200 μl BCA/ CuSO_4 -Reagenz. Die Messung bei $\lambda = 562 \text{ nm}$ erfolgte in einem Spectra Max 340PC Elisa-Reader (3.1.1) in Doppelbestimmung. Als Proteinkonzentrationsstandards wurden voreingestellte BSA Standards der Firma Oz Biosciences verwendet.

SDS-Gelelektrophorese

Die SDS-Gelelektrophorese erfolgte nach der Methode von Laemmli [77]. Die Elektrophoreseläufe wurden in Elektrophoresekammern der Marke BioRad bei einer konstanten Stromstärke von 30 mA pro Gel durchgeführt. Als Laufpuffer wurde Rotiphorese-Puffer der Firma Roth verwendet.

Tabelle 3.8: Zusammensetzung der Gelkomponenten

Sammelgel 5 %	Trenngel 12 %
125 mM Tris pH 6,8	375 mM Tris-HCl, pH 8,8
5 % Acrylamid	12 % Acrylamid
0,1 % SDS	0,1 % SDS
0,1 % (w/v) APS	0,1 % (w/v) APS
0,1 % (v/v) TEMED	0,05 % (v/v) TEMED

Nach der Auftrennung der Proteine wurde das Gel mit Coomassie-Blau für 30 min gefärbt. Die Färbelösung enthielt 0,25 % (v/v) Coomassie Brilliant Blue R 250,

50 % (v/v) Ethanol und 10 % (v/v) Essigsäure. Die überschüssige Färbelösung wurde mit der Entfärbelösung (10 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure) ausgewaschen.

Analytische Gelfiltration

Die analytische Gelfiltration wurde mittels einer mit Superdex200 (*analytic grade*) vorgepackten 10/300 GL-Säule durchgeführt. Für die Analyse von Proteinproben wurde 100 μ l Proteinprobe mit einer Konzentration von ungefähr 2 mg/ml verwendet. Die analytische Gelfiltration erfolgte isokratisch (30 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl) bei einem konstanten Fluss von 0,4 ml/min. Der Probenauftrag erfolgte über ein Rheodyne-Ventil mit einer angeschlossenen 200 μ l Probenschleife. Die Detektion erfolgte mittels Dioden Array Detektor (analytische Messzelle) und Fluorometer.

Methylviologen-Aktivitätstest

Für die *in vitro* Messung der Elektronen-angetriebenen Reaktionen von GcpE und LytB wurde ein Aktivitätstest auf Methylviologenbasis verwendet. Die Messung basiert auf dem Umschlag von reduzierten Methylviologen in Lösung (blau) zu seinem oxidierten Grundzustand (farblos). Dadurch können enzymatische Reduktionsreaktionen *in vitro* gemessen werden. Auf Grund des oxidativen Potentials von Sauerstoff müssen Methylviologen-basierende Reaktionen unter Sauerstoffabschluss erfolgen.

Für die Aktivitätsbestimmung von GcpE und LytB wurden Stocklösungen von 2,35 mM Methylviologen und 40 mM SDT in entgastem Tris-Puffer (30 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl) angesetzt. Methylviologen, SDT und Proteinlösung (GcpE oder LytB) wurden in einer 1 ml Quarzküvette vermischt (Endkonzentrationen siehe Tab. 3.9). Der Start der Reaktion erfolgte durch die Zugabe des entsprechenden Substrates (MEcPP für GcpE, HMBPP für LytB). Die Messung der

Extinktionsabnahme bei $\lambda = 732$ nm wurde in einem Nicolet Evolution 100 Photometer mit Probenwechsler durchgeführt. Die Dauer der Extinktionsmessung betrug 5 min bei einem Messintervall von 30 sec. Als Referenz diente der verwendete Tris-Puffer (30 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl). Die Einstellung einer konstanten Temperatur erfolgte über ein Peltier Element.

Tabelle 3.9: Aktivitätsansatz

Komponente	Endkonzentration
Methylviologen	2 mM
SDT	1 mM
Substrat	1 mM
Protein	1 mg/ml

Umpuffern von Proteinproben

Für die Entfernung von niedermolekularen Pufferkomponenten, welche die Aktivität (3.2.1) beeinträchtigen könnten, wurden PD-10 Entsalzungssäulen (3.1.2) verwendet. Dazu wurde 2,5 ml der Probe auf eine mit Elutionspuffer (30 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5) voräquilibrierte PD-10 Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte mit 3,5 ml Elutionspuffer unter Gravitationsfluss. Die Konzentration der eluierten Proteinprobe wurde mittels BCA-Test (3.2.1) bestimmt.

3.2.2 Expression und Aufreinigung von rekombinantem LytB aus *Aquifex aeolicus*

Kultivierung

Für die Herstellung von Kulturplatten wurde eine sterile LB-Amp-Agarplatte aus einer TOP10-pAaLytB Kryokultur mittels 3-Sektoren-Ausstrich angeimpft. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C über Nacht.

Aus der Kulturplatte wurden 3×15 ml Vorkulturen (LB, 150 µg/ml Ampicillin) aus Einzelkolonien in 100 ml Erlenmeyerkolben angeimpft. Die Anzucht der Vorkultur erfolgte für 5 h bei 37 °C und 260 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8. Für den Ansatz der Hauptkultur wurde jeweils 2 ml Vorkultur auf 6×400 ml Medium (LB, 150 µg/ml Ampicillin, 300 µM FeCl₃) gegeben. Die Inkubation erfolgte in 1000 ml Schikanekolben bei 37 °C und 120 rpm. Die optische Dichte wurde kontrolliert und bei einem OD₆₀₀-Wert von ca. 0.8 mit 0,2 mg/ml Anhydrotetracyclin induziert. Nach der Induktion erfolgte die Expression bei 30 °C und 120 rpm für 15 h.

Das Zellmaterial wurde nach Ende der Expressionskultur abzentrifugiert (17700 g, 15 min, 4 °C, JA-10) und der Medienüberstand dekantiert. Die Zellfeuchtmasse wurde gewogen und die Zellpellets bei -30 °C eingefroren und gelagert.

Zellaufschluss

Für die Aufreinigung von rekombinantem *Aquifex aeolicus* LytB wurde ca. 20 g gefrorenes Zellpellet in ein mit Formiergas (95 % N₂, 5 % H₂) befülltes Zelt eingeschleust. Die Resuspension der Zellen erfolgte mit entgastem Puffer (30 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl) in einem Verhältnis von 10 ml Puffer auf 1 g Zellpellet. Die Zellsuspension wurde in einen eisgekühlten Dreihenkelhumpen überführt. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschall (Sonotrode V570T) in drei 10-Minuten Zyklen (30 % Cycle, 60 % Power) unter Kühlung und Sauerstoffausschluss. Das Zelllysate wurde zentrifugiert (75600 g, 25 min, 4 °C, JA25) und nach dem Wiedereinschleusen in anaerober Umgebung das Zelldebris verworfen. Ab hier

erfolgte jeder Arbeitsschritt komplett unter Sauerstoffausschluss. Der Zentrifugationsüberstand wurde vereint und mit 0,22 μm Spritzenaufsatzfiltern (Millipore) von Makropartikeln befreit.

Co-TALON-Affinitätschromatographie

Das Filtrat wurde mit einer Pharmacia P-6000 Pumpe auf eine mit 30 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl voräquilibrierte Co-TALON-Säule ($V_{\text{Matrix}} = 50 \text{ ml}$) mit einem Fluss von 10 ml/min aufgetragen. Die Extinktion des Durchflusses wurde mittels eines Dioden Array Detektors (3.1.1) bei $\lambda = 280 \text{ nm}$ und $\lambda = 413 \text{ nm}$ verfolgt. Die Reäquilibrierung der Säule erfolgte mit 30 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl bis nur noch die Extinktions-Basislinie detektiert werden konnte.

Tabelle 3.10: Programm der Co-TALON-Affinitätschromatographie

Schritt	CV (= 50 ml)	c_{Imidazol}	[% Puffer B]
Waschschritt	3	0 mM	0
1. Elutionsstufe	8	150 mM	75
2. Elutionsstufe	4	200 mM	100
Reäquilibrierung	4	0 mM	0

Die Co-TALON-Chromatographie erfolgte mittels eines Stufengradienten (Tab. 3.10) mit den Puffern A (30 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5) und B (30 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 200 mM Imidazol, pH 7,5). Der Gradient wurde mit einem Pharmacia FPLC-System (3.1.1) erzeugt bei einem Fluss von 10 ml/min. Die Chromatographie wurde mittels Dioden Array Detektion und Fluoreszenzmessung verfolgt. Die detektierten Elutionspeaks wurden in 50 ml Zentrifugenröhrchen fraktioniert. Die Elutionsfraktionen wurden mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese analysiert. Die LytB-haltigen Proben mit ausreichender Reinheit ($> 90 \%$) wurden vereint und für die anschließende Rekonstitution weiterverwendet.

Rekonstitution der Eisen-Schwefel-Cluster

Für die Rekonstitution der Eisen-Schwefel-Cluster wurden Stammlösungen von Natriumsulfit, Dithiothreitol, L-Cystein und Eisen(III)chlorid (Konzentrationen siehe Tab. 3.11) mit entgastem 30 mM Tris-HCl (pH 7,5) Puffer angesetzt. Die Natriumsulfit-, DTT- und L-Cystein-Lösungen wurden im gleichen Volumenverhältnis vermischt und anschließend in einem Verhältnis von 3:100 der LytB-Probe zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde vorsichtig gemischt. Danach erfolgte die Zugabe der FeCl_3 -Lösung in einem Verhältnis von 1:100 zum Ansatz. Der Reaktionsansatz wurde kurz gemischt und danach 20 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde erneut FeCl_3 (1:100) zugegeben und nach Vermischung weitere 20 min inkubiert. Nach einer letzten Zugabe von FeCl_3 wurde der Rekonstitutionsansatz über Nacht ruhen gelassen. Am nächsten Tag wurde der Ansatz bei 2240 g für 5 min zentrifugiert (Hettich EBA 35). Der Überstand wurde abgenommen und mit $0,22 \mu\text{m}$ Spritzenvorsatzfiltern von Restpartikeln befreit.

Tabelle 3.11: Rekonstitutionsansatz

Komponente	Stockkonzentration	Endkonzentration
Na_2S	150 mM	1,5 mM
DTT	350 mM	3,5 mM
L-Cystein	140 mM	1.4 mM
FeCl_3	150 mM	4,5 mM

SourceQ-Anionenaustauschchromatographie

Für die Anionenaustauschchromatographie musste die Salzkonzentration der Proteinlösung gesenkt werden. Dieses erfolgte durch Verdünnung der Proteinlösung in 2 Litern 30 mM Tris-HCl (pH 7,5) Puffer.

Die verdünnte Proteinlösung wurde auf eine voräquilibrierte (30 mM Tris-HCl, pH 7,5) SourceQ-Säule (KR15/250, $V_{Matrix} = 20$ ml) mittels der Pharmacia P-6000 Pumpe mit einem Fluss von 9 ml/min aufgetragen. Die Anionenaustauschchromatographie erfolgte über einen linearen Salzgradienten bei einem Fluss von 5 ml/min mit einem WATERS HPLC System (Tab.3.12). Der Chromatographieverlauf wurde mit dem Dioden Array Detektor und Fluorometer detektiert.

Tabelle 3.12: Programm der SourceQ-Anionenaustauschchromatographie

Schritt	CV (= 20 ml)	c_{NaCl}	[% Puffer B]
Waschschritt	3,75	0 mM	0
Elutionsgradient	15	0 mM→500 mM	0→50
Hochsalzstufe	5	1000 mM	100
Reäquilibrierung	5	0 mM	0

Die detektierten Elutionspeaks wurden in 15 ml Zentrifugenröhrchen fraktioniert. Nach der Analyse der Fraktionen mittels SDS-Gelelektrophorese wurden die Fraktionen mit der höchsten Reinheit an isoliertem LytB vereinigt. Die Überprüfung der Probenhomogenität des Fraktionspools erfolgte durch analytische Gelfiltration (3.2.1). Die Proteinkonzentration wurde nach der BCA-Methode bestimmt.

Für die Kristallisation wurde die Konzentration mittels Ultrafiltration auf eine Proteinkonzentration von ca. 20 mg/ml und eine NaCl-Konzentration von 30 bis 40 mM eingestellt.

3.2.3 Expression und Aufreinigung von rekombinantem LytB aus *Plasmodium falciparum*

Kultivierung

Von einer TOP10-pPfl_{YtB} Kryokultur wurde eine sterile St1-Amp-Kulturplatte mit 3-Sektoren-Ausstrich angeimpft. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C über Nacht. Aus Einzelkolonien der Kulturplatte wurden 3×15 ml Vorkulturen (LB, 150 µg/ml Ampicillin) in 100 ml Erlenmeyerkolben angeimpft. Die Anzucht der Vorkultur erfolgte für 5 h bei 37 °C und 260 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8. Der Ansatz der Hauptkultur erfolgte im 1000 ml Schikanekolben. Dafür wurden je 2 ml Vorkultur auf 12×400 ml Medium (LB, 150 µg/ml Ampicillin, 300 µM FeCl₃) gegeben. Die Inkubation erfolgte bei einer Temperatur von 37 °C und einer Umdrehung von 120 rpm. Die optische Dichte wurde kontrolliert und bei einem OD₆₀₀-Wert von ca. 0.8 mit 0,2 mg/ml Anhydrotetracyclin induziert. Nach der Induktion erfolgte die Expression bei 30 °C und 120 rpm für 15 h.

Die Zellernte erfolgte über Zentrifugation (17700 g, 15 min, 4 °C, JA-10). Der Medienüberstand wurde dekantiert. Nach der Ermittlung der Zellfeuchtmasse wurden die Zellpellets bei -30 °C eingefroren und bis zur Weiterverwendung gelagert.

Zellaufschluss und Rekonstitution

Die Aufreinigung von rekombinantem *Plasmodium falciparum* LytB erfolgte ebenfalls unter Sauerstoffausschluss in einem Zelt (95 % N₂, 5 % H₂). Dafür wurde ca. 30 g gefrorenes Zellpellet in die sauerstofffreie Umgebung eingeschleust. Die Resuspension der Zellen erfolgte mit entgastem Puffer (30 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 15 mM Imidazol) mit einem Volumen $V \leq 280$ ml. Die suspendierten Zellen wurden in einen eisgekühlten Dreihenkelhumpen überführt.

Für die gleichzeitig zum Zellaufschluss durchgeführte Rekonstitution wurde wie bei der Rekonstitution von *Aquifex aeolicus* LytB (3.2.2) Na₂S, DTT und L-Cystein (Tab.3.11) zugegeben. Während des Zellaufschlusses durch Ultraschall in drei 10-Minuten Zyklen (30 % Cycle/ 60 % Power) wurde aus einer 6 ml Glasbürette in

jedem Schallzyklus 2 ml FeCl_3 (150 nM) zugetropft. Die Temperatur des Ansatzes wurde während der Prozedur mit einer Temperatursonde (3.1.1) auf ausreichende Kühlung überprüft. Nach erfolgtem Zellaufschluss und Rekonstitution wurde das erhaltene Zelllysate zentrifugiert (75600 g, 25 min, 4 °C, JA25). Nach dem Rückschleusen in das anaerobe Zelt wurde der Überstand zur Weiterverwendung dekantiert und die abzentrifugierten Zellbruchstücke verworfen. Ab hier erfolgte jeder Arbeitsschritt komplett unter Sauerstoffausschluss und Kühlung. Der Zentrifugationsüberstand wurde vereint und mit 0,22 μm Spritzenaufsatzfiltern (Millipore) von Makropartikeln befreit.

Co-TALON-Affinitätschromatographie

Das Filtrat wurde mit einer Pharmacia P-6000 Pumpe auf eine mit gekühltem und entgastem Puffer (30 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 15 mM Imidazol, pH 7,5) vor-äquilibrierte Co-TALON-Säule ($V_{\text{Matrix}} = 50$ ml) mit einem Fluss von 10 ml/min aufgetragen. Die Extinktion wurde mittels eines Dioden Array Detektors (3.1.1) bei $\lambda = 280$ nm und $\lambda = 413$ nm verfolgt. Die Reäquilibrierung der Säule erfolgte mit 95 % Co-TALON Puffer A, 5 % Co-TALON Puffer B (3.1.3), bis nur noch die Extinktions-Basislinie detektiert werden konnte.

Tabelle 3.13: Programm der Co-TALON-Affinitätschromatographie

Schritt	CV (= 50 ml)	c_{Imidazol}	[% Puffer B]
Waschschritt	2	15 mM	5
1. Elutionsstufe	3	60 mM	20
2. Elutionsstufe	2	120 mM	40
3. Elutionsstufe	5	300 mM	100
Reäquilibrierung	4	0 mM	0

Die Co-TALON-Chromatographie erfolgte mittels eines Stufengradienten mit den Co-TALON Puffern A und B (3.1.3, Tab.3.13). Der Gradient wurde über ein Pharmacia FPLC-System (3.1.1) mit einem Fluss von 10 ml/min erzeugt. Die Detektion

des Chromatographieverlaufs erfolgte mittels Dioden Array Detektion und Fluoreszenzmessung.

Die Elutionspeaks wurden in 50 ml Zentrifugenröhrchen fraktioniert. Nach der Analyse der Fraktionen mittels SDS-Gelelektrophorese (3.2.1) wurden die LytB-haltigen Proben mit einer Reinheit $\geq 90\%$ vereint.

Dialyse

Für die Kationenaustauschchromatographie (3.2.3) wurden die vereinten LytB-Fraktionen mittels Dialyse umgepuffert. Für die Dialyse wurden D-Tube Dialyzer Mega benutzt. Die Dialyseeinheiten wurden 10 min mit $\text{H}_2\text{O}_{bidest}$ voräquiliert. In die entleerten Dialyzer wurden jeweils maximal 20 ml Proteinfraction pipettiert. Die Dialyse erfolgte für 2 Stunden gegen 2 l SourceS Puffer A (3.1.3) unter leichtem Rühren. Nach erfolgter Dialyse wurden die umgepufferten LytB-Lösungen entnommen und wieder vereint.

SourceS-Kationenaustauschchromatographie

Der dialysierte LytB-Pool wurde auf eine mit gekühltem SourceS Puffer A voräquilierte SourceS-Säule (KR15/250, $V_{Matrix} = 20$ ml) mittels einer Pharmacia P-6000 Pumpe aufgetragen (Fluss = 9 ml/min).

Tabelle 3.14: Programm der SourceS-Kationenaustauschchromatographie

Schritt	CV (= 20 ml)	c_{NaCl}	[% Puffer B]
Waschschritt	3,75	50 mM	0
Elutionsgradient	30	50 mM→1000 mM	0→100
Hochsalzstufe	5	1000 mM	100
Reäquilibrierung	5	50 mM	0

Die Kationenaustauschchromatographie erfolgte über einen durch ein WATERS HPLC System (3.1.1) gebildeten linearen Salzgradienten (Tab.3.14) bei einem Fluss von 5 ml/min. Die Detektion des Chromatographieverlaufes erfolgte mit dem Dioden Array Detektor und Fluorometer.

Die Elutionspeaks wurden in 15 ml Zentrifugenröhrchen fraktioniert. Nach der Analyse der Fraktionen mittels SDS-Gelelektrophorese (3.2.1) wurden die Fraktionen mit der höchsten Reinheit an isoliertem LytB vereinigt.

Superdex-Gelfiltration

Die nach der Kationenaustauschchromatographie (3.2.3) vereinigte LytB-Probe wurde mittels Amicon-Konzentrator (10 kDa) bei 2440 g auf ein Volumen von ca. 1 ml aufkonzentriert.

Für die Gelfiltration wurde eine ECO 25/750 Superdex-Säule verwendet (3.1.4). Die Gelfiltrationssäule wurde über Nacht mit entgastem Laufpuffer (30 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl) bei einem Fluss von 1 ml/min voräquiliert. Der Probenauftrag erfolgte über ein Rheodyne-Ventil mit angeschlossener 2 ml Probenauftragsschleife. Die Chromatographie erfolgte isokratisch bei einem Fluss von 1 ml/min. Die Detektion des Elutionsverlaufes erfolgte mittels Dioden Array Detektor und Fluorometer. Die Hauptfraktionen wurden in 15 ml Zentrifugenröhrchen gesammelt.

Die Reinheit der Fraktionen wurde mittels SDS-Gelelektrophorese bestimmt. Die LytB-Proben mit der größten Reinheit wurden vereint und mittels Ultrafiltration (Amicon 10 kDa, 2440 g) auf einen Konzentrationsbereich von 8 bis 15 mg/ml für die Kristallisationsexperimente eingestellt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels BCA-Test. Als Lagerungspuffer wurde der Gelfiltrationspuffer (30 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl) verwendet.

3.2.4 Expression und Aufreinigung von rekombinantem GcpE aus *Thermus thermophilus*

Kultivierung

Für die Kultivierung des TOP10-PQETtGcpE-Zellstammes wurden LB/Glucose-Amp-Agarplatten (0,2 % Glucose) verwendet.

Dazu wurde eine Kulturplatte aus einer TOP10-PQETtGcpE Kryokultur auf einer sterilen Agarplatte mittels 3-Sektoren-Ausstrich angeimpft. Die Inkubation der Kulturplatte erfolgte über Nacht. Aus den Einzelkolonien der Kulturplatte wurden 3×15 ml Vorkulturen (LB, 150 µg/ml Ampicillin, 0,2 % Glucose) in 100 ml Erlenmeyerkolben angeimpft. Die Inkubation der Vorkulturen erfolgte für 5 h bei 37 °C und 260 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8.

Die 4,8 l Hauptkultur (LB, 150 µg/ml Ampicillin, 300 µM FeCl₃) wurde mit jeweils 2 ml Vorkultur auf 12×1000 ml Erlenmeyerkolben verteilt ($V_{Kultur} = 400$ ml). Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 120 rpm. Bei einer optischen Dichte (OD₆₀₀) der Zellkultur von ca. 0,8 wurde mit 1 mM IPTG induziert. Nach der Induktion erfolgte die Expression von rekombinantem *Thermus thermophilus* GcpE bei 32 °C und 120 rpm für 15 h.

Das Zellmaterial wurde nach Ende der Expression mittels Zentrifugation (17700 g, 15 min, 4 °C, JA-10) abgetrennt und der Medienüberstand dekantiert. Die Zellfeuchtmasse wurde ermittelt und die Zellpellets bei -30 °C eingefroren und gelagert.

Zellaufschluss

Für die Aufreinigung von rekombinantem *Thermus thermophilus* GcpE wurde ca. 40 g gefrorenes Zellpellet in ein mit Formiergas (95 % N₂, 5 % H₂) anaerobisiertes Zelt eingeschleust. Die Gesamtmenge an Zellpellet wurde in zwei Chargen von gleicher Größe aufgeteilt.

Die Resuspension des Zellpellets erfolgte mit entgastem Tris-Puffer (30 mM Tris-HCl pH 7,5) in einem Verhältnis von 10 ml Puffer auf 1 g Zellpellet. Die Suspension wurde in einen eisgekühlten Dreihenkelhumpen überführt. Der Zellaufschluss

erfolgte mittels Ultraschall (Sonotrode V570T) in drei 10-Minuten Zyklen (30 % Cycle/ 60 % Power) unter Kühlung und Sauerstoffausschluss. Das Zelllysate wurde zentrifugiert (75600 g, 25 min, 4 °C, JA25) und nach dem Wiedereinschleusen in die anaerobe Umgebung das Zelldebris verworfen.

Ab hier erfolgte jeder Arbeitsschritt komplett unter Sauerstoffausschluss. Der Zentrifugationsüberstand wurde vereint und die verbliebenen Zellfragmente durch 0,22 μm Spritzenaufsatzfilter (Millipore) entfernt. Der gefilterte Überstand wurde auf die Säule für den ersten Chromatographieschritt aufgetragen (3.2.4).

Der zweite Teil des aufgetauten Zellpellets wurde in einem weiteren Aufschluss analog behandelt und ebenfalls für die DEAE-Anionenaustauschchromatographie verwendet.

DEAE-Anionenaustauschchromatographie

Der gefilterte Überstand aus dem Ultraschallaufschluss wurde auf eine mit DEAE Puffer A voräquilibrierte DEAE-Säule (KR50/250, $V_{Matrix} = 200 \text{ ml}$) mittels einer Pharmacia P-6000 Pumpe mit einem Fluss von 20 ml/min aufgetragen. Die Extinktion des Säulendurchflusses wurde mittels eines Dioden Array Detektors (3.1.1) bei $\lambda = 280 \text{ nm}$ und $\lambda = 413 \text{ nm}$ verfolgt. Die Reäquilibrierung der Säule erfolgte mit 30 mM Tris-HCl (pH 7,5), bis nur noch die Extinktions-Basislinie detektiert werden konnte.

Tabelle 3.15: Programm der DEAE-Anionenaustauschchromatographie

Schritt	CV(= 200 ml)	c_{NaCl}	[% Puffer B]
Waschschritt	1	0 mM	0
Elutionsgradient	15	0 mM \rightarrow 1000 mM	0 \rightarrow 100
Hochsalzstufe	1	1000 mM	100
Reäquilibrierung	2	0 mM	0

Der lineare Salzgradient für die Anionenaustauschchromatographie (Tab.3.15) wurde mit einem Pharmacia FPLC-System (3.1.1) erstellt. Der Fluss betrug 20 ml/min.

Die Detektion des Chromatographieverlaufes erfolgte über Dioden Array Detektion und Fluorometrie.

Die Elutionspeaks wurden in 50 ml Zentrifugenröhrchen fraktioniert. Die Fraktionen wurden mittels SDS-Gelelektrophorese (3.2.1) auf GcpE-Gehalt analysiert. Die Fraktionen mit einem Anteil von über 50 % GcpE wurden weiterverwendet.

Hitzefällung

Die aus der DEAE-Anionenaustauschchromatographie erhaltenen Fraktionen wurden auf 15 ml Zentrifugenröhrchen verteilt. Die verschlossenen Zentrifugenröhrchen wurden in einen auf 65 °C vorgeheizten Heizblock (Pierce Reacti-Therm) eingesetzt. Nach 15 Minuten wurden die Zentrifugenröhrchen entnommen und das Präzipitat aus hitzedenaturierten Proteinen abzentrifugiert (Hettich EBA 35, 2440 g, 10 min). Über SDS-Gelelektrophorese (3.2.1) wurden die hitzebehandelten Proben analysiert.

Die Zentrifugationsüberstände wurden anschließend mit 0,22 μm Spritzenaufsatzfiltern (Millipore) filtriert und vereinigt.

SourceQ-Anionenaustauschchromatographie

Durch Verdünnung der aus der Hitzedenaturierung erhaltenen Proteinlösungen in 2 l 30 mM Tris-HCl (pH 8) wurde die Salzkonzentration für die SourceQ-Anionenaustauschchromatographie gesenkt. Gleichzeitig wurde dadurch der pH-Wert auf pH 8 eingestellt. Die so verdünnte Proteinlösung wurde auf eine voräquilibrierte (30 mM Tris-HCl pH 8) SourceQ-Säule (KR15/250, $V_{Matrix} = 20$ ml) mittels der Pharmacia P-6000 Pumpe (Fluss = 9 ml/min) aufgetragen. Die Anionenaustauschchromatographie erfolgte über einen linearen Salzgradienten (Tab.3.16) bei einem Fluss von 5 ml/min mit einem WATERS HPLC System. Der Chromatographieverlauf wurde mit dem Dioden Array Detektor und Fluorometer detektiert.

Tabelle 3.16: Programm der SourceQ-Anionenaustauschchromatographie

Schritt	CV(= 20 ml)	c_{NaCl}	[% Puffer B]
Waschschritt	3,75	0 mM	0
1.Elutionsgradient	15	0 mM→500 mM	0→50
2.Elutionsgradient	6,25	500 mM→1000 mM	50→100
Hochsalzstufe	2,5	1000 mM	100
Reäquilibrierung	2,5	0 mM	0

Die aus der Detektion (Dioden Array Detektion, Fluorometer) ermittelten Elutionspeaks wurden in 15 ml Zentrifugenröhrchen fraktioniert. Nach der Analyse der Fraktionen mittels SDS-Gelelektrophorese (3.2.1) wurden die Fraktionen mit der höchsten Reinheit an isoliertem GcpE vereinigt.

Superdex-Gelfiltration

Die nach der Anionenaustauschchromatographie (3.2.4) vereinigte GcpE-Probe wurde mittels Amicon-Konzentrator (30 kDa) bei 2440 g auf ein Volumen von ca. 1 ml aufkonzentriert.

Für die Gelfiltration wurde eine ECO 25/750 Superdex-Säule verwendet (3.1.4). Diese wurde mit entgastem Laufpuffer (30 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl) über Nacht bei einem Fluss von 1 ml/min voräquilibriert. Das Auftragen der GcpE-Probe erfolgte über ein Rheodyne-Ventil mit einer 2 ml Probenaufragsschleife auf die unter Fluss stehende Superdex-Säule. Die Chromatographie erfolgte isokratisch bei einem Fluss von 1 ml/min. Die Detektion des Elutionsverlaufs erfolgte mittels Dioden Array Detektor und Fluorometer. Die detektierten Fraktionspeaks wurden in 15 ml Zentrifugenröhrchen fraktioniert. Die Chromatographie-Fraktionen wurden mit SDS-Gelelektrophorese analysiert. Die GcpE-Proben mit der höchsten Reinheit wurden vereint und mittels Ultrafiltration (Amicon 30 kDa, 2440 g) auf einen Konzentrationsbereich von 10 bis 20 mg/ml für die Kristallisation eingestellt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels BCA-Test (3.2.1). Für die Kristallisation wurde GcpE im Gelfiltrationspuffer belassen.

3.2.5 Kristallisation

Kristallisationstechniken

Alle Kristallisationsexperimente wurden unter Sauerstoffausschluss in einem anaeroben Zelt am Max Planck Institut für Biophysik (Frankfurt a. M.) bei einer konstanten Temperatur von 18°C durchgeführt. Die Kristallisationsversuche erfolgten nach dem Prinzip der Gasphasendiffusion.

Methode des hängenden Tropfens

Für die Kristallisationsexperimente nach der Methode des hängenden Tropfens wurden 24-well Platten verwendet. In die Reservoirs der 24-well Platten wurden 0,5 bis 1,0 ml der zu testenden Kristallisationsbedingung (Bodenlösung) pipettiert. Der Kristallisationsansatz wurde auf silanisierten (2 % (v/v) Dimethylsilan in Hexan) Deckgläsern angesetzt. Dazu wurde die zu kristallisierende Proteinlösung mit der Kristallisationsbedingung zu einem Tropfen mit einem Gesamtvolumen ≤ 3 ml in unterschiedlichen Verhältnissen vermengt. Das Deckglas mit dem vermischten Kristallisationsansatz wurde mit dem Tropfen zur Bodenlösung zeigend auf die Platte aufgesetzt. Ein gasdichter Abschluss wurde durch das Einfetten mit Baysilon-Paste (hochviskos) gewährleistet.

Methode des sitzenden Tropfens

Die Ansätze für Kristallisationsexperimente mit der Methode des sitzenden Tropfens wurden auf Clover 24-well Platten von Jena Bioscience durchgeführt. Dafür wurden 0,5 bis 1,0 ml der Kristallisationsbedingungen in die Reservoirs pipettiert. Der Kristallisationsansatz, bestehend aus Proteinlösung und Bodenlösung, wurde

in die außerhalb des Hauptreservoirs gelegenen Nebenreservoirs pipettiert. Das Gesamtvolumen des Kristallisationsansatzes betrug maximal 3 ml. Die Gasabdichtung erfolgte durch CrystalClear-Klebefolie.

3.2.6 Röntgenkristallographie

Montage der Proteinkristalle

Zur Montage wurde die Platte mit Proteinkristallen aus dem anaeroben Zelt entnommen. Danach wurde die Abdeckung des Kristallisationsansatzes entfernt und unter einem Binokular ein Einzelkristall mit einer Nylonschleife dem Kristallisationsansatz entnommen. Dieser so aufgenommene Kristall wurde auf dem Goniometerkopf des Röntgendiffraktometers fixiert und im Stickstoffstrahl bei 100 K schockgefroren. Bei Bedarf wurde der Kristall vor der Montage für kurze Zeit (ca. 30 s) in einen geeigneten Kryopuffer überführt, um Eisbildung zu vermeiden.

Vorvermessung der Kristalle

Die Proteinkristalle wurden an dem hauseigenen Röntgendiffraktometer des Max Planck Instituts für Biophysik auf ihre Eignung für die Röntgenstrukturanalyse getestet. Die Röntgenstrahlung wurde durch eine rotierende Kupfer-Anode erzeugt (Rigaku MicroMax-007 HF Generator). Die Aufzeichnung der Streuintensität erfolgte mit einem Rigaku R-Axis IV++ Detektor. Die Messung erfolgte bei einem Abstand von 200 mm zwischen Probe und Detektor, einer Belichtungszeit von 3 min und einem Drehwinkel von $\Theta = 0,5^\circ$ pro Aufnahme. Eine zweite Messung erfolgte nach einer Rotation von $\Theta = 90^\circ$. Die Kristalle mit einer maximalen Auflösung besser als 3 Å wurden in $N_2(l)$ zurückgefroren und gelagert.

Messung am Synchrotron

Ein vollständiger Datensatz der besten Kristalle wurde an der X10SA PXII Messstation der Swiss Light Source (SLS) des Paul-Scherrer-Instituts (PSI) gemessen. Bei nativen Datensätzen erfolgten die Aufnahmen bei einer Wellenlänge von ca. 1 Å in 0,5° Schritten und bei einer Belichtungszeit von 1 Sekunde. Die MAD-Messungen (*multiple anomale dispersion*) wurden an der Fe K_α -Absorptionskante (1,743 Å) bei Wellenlängen von $x\text{Å}$ (*peak*), $y\text{Å}$ (*inflection*) und $z\text{Å}$ (*remote*) durchgeführt.

Datenprozessierung

Die gesammelten Daten wurden am PSI mit dem HKL-Programmpaket [78] vorprozessiert. Für die Bestimmung der Raumgruppe wurde das gemessene Streumuster mit XdisplayF dargestellt und die Streusignale (Reflexe) indiziert. Die Daten wurden mit DENZO integriert und mit Scalepack skaliert. Die möglichen Raumgruppen wurden durch die berechneten R_{merge} -Werte (Gleichung 3.1) und das Signal-Rausch-Verhältnis (I/σ) bewertet. Auf Basis der ermittelten Raumgruppe wurde der nötige Drehwinkel des Kristalls bestimmt, bei dem der gemessene Datensatz eine theoretische Vollständigkeit von mehr als 98% erreicht.

Die endgültige Prozessierung der Messdaten erfolgte mit dem XDS-Softwarepaket [79]. Die statistischen Kriterien zur Bewertung des Datensatzes (R_{sym} , R_{merge} , I/σ , Redundanz und Vollständigkeit) wurden XSCALE entnommen.

$$R_{merge-1} = \frac{\sum_{hkl} \sum_{i=1}^{n_{hkl}} |\langle I(hkl)_{i \in P} \rangle - \langle I(hkl)_{i \in Q} \rangle|}{\frac{1}{2} \sum_{hkl} \sum_{i=1}^{n_{hkl}} |\langle I(hkl)_{i \in P} \rangle| + \sum_{hkl} \sum_{i=1}^{n_{hkl}} |\langle I(hkl)_{i \in Q} \rangle|} \quad (3.1)$$

$$R_{sym-1} = \frac{\sum_{hkl} \sum_{i=1}^{n_{hkl}} |I(hkl)_i - \langle I(hkl) \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_{i=1}^{n_{hkl}} |I(hkl)_i|} \quad (3.2)$$

$I(hkl)_i$ = Intensität des Reflexes i

$\langle I(hkl) \rangle$ = mittlere Intensität der Reflexe hkl

Phasenbestimmung mit *multiwavelength anomalous diffraction* (MAD)

Jeder Reflex (h,k,l) in der Röntgenbeugung eines Kristalles besitzt auf Grund des Inversionszentrums einen punktsymmetrieäquivalenten Reflex $(\bar{h},\bar{k},\bar{l})$. Gemäß des Friedelschen Gesetzes (Gleichung 3.3) besitzen beide Reflexe, auch Friedelpaar genannt, die gleiche Intensität. Kommt es hingegen während eines Röntgenstreuexperimentes zu einer Absorption von Strahlung, verliert das Friedelsche Gesetz seine Gültigkeit.

$$I(h, k, l) = I(\bar{h}, \bar{k}, \bar{l}) \quad (3.3)$$

Dieses macht man sich für die Phasenbestimmung mittels der *multiwavelength anomalous diffraction* (MAD) Methode zu Nutze. Dabei absorbieren die Elektronen auf der K- und L-Schale von Schweratomen Teile der Röntgenstrahlung, sofern die eingesetzte Strahlung nah an der Absorptionskante dieser Elektronen liegt. Diese so energetisch angeregten Elektronen emittieren beim Rückfall in ihren Grundzustand Strahlung, welche eine unterschiedliche Phase zur einfallenden Strahlung besitzt. Die dadurch entstehenden Unterschiede der Friedelpaare $(h,k,l)/(\bar{h},\bar{k},\bar{l})$ können zur Berechnung der Phasen verwendet werden.

$$f = f_0 + f'(\lambda) + f''(\lambda) \quad (3.4)$$

Durch die anomale Streuung enthalten die Strukturfaktoren einen von der Wellenlänge abhängigen anomalen Anteil $f'(\lambda) + f''(\lambda)$ (Gleichung 3.4). Für die Messung dieses im Vergleich zur Gesamtstrahlung kleinen Anteils werden gewöhnlich drei Datensätze aufgenommen, je ein Datensatz am Maximum der f'' -Funktion (*peak*), am Minimum der f' -Funktion (*inflection*) und ein Datensatz mit einer weit von der Absorptionskante entfernten Wellenlänge (*remote*).

Für die MAD-Experimente von *Aquifex aeolicus* und *Plasmodium falciparum* LytB sowie *Thermus thermophilus* GcpE wurde, auf Grund des Vorhandenseins von Eisen-Schwefel-Clustern, an der Absorptionskante von Eisen gemessen. Durch die Proteinumgebung erfolgte eine Verschiebung der Eisen-Absorptionskante. Daher wurde durch die Aufnahme eines Fluoreszenzspektrums die benötigte Wellenlänge ermittelt. Die Messung an den *peak*, *inflection* und *remote* Wellenlängen wurde an

einem einzigen Kristall durchgeführt.

Die Berechnung der Position der Eisen-Atome erfolgte mit SHELXD [80] aus den anomalen Daten des *peak* Datensatzes. Die Positionen wurden unter Verwendung des Programms SHARP [81] verfeinert und eine Phase bestimmt.

Berechnung des Lösungsmittelanteils und der Monomere pro asymmetrischer Einheit

Proteinkristalle besitzen, basierend auf statistischen Untersuchungen, einen Solvensanteil zwischen 27 und 80 %. Sofern Zellparameter und Raumgruppe bekannt sind, kann mit diesen Werten die Anzahl der Monomere pro asymmetrischer Einheit vorhergesagt werden. Für eine verschiedene Anzahl n an Molekülen in der asymmetrischen Einheit kann der Packungsparameter V_M (Matthews-Koeffizient) berechnet werden (Gleichung 3.5). Werte für n , die ein V_M zwischen 1,7 und 3,5 Å³/Da ergeben, gelten als wahrscheinlich. Nach Gleichung 3.6 entspricht das einem Solvensgehalt von 27 bis 65 %.

Basierend auf der Eigenschaft der in dieser Arbeit vermessenen Enzyme, die jeweils ein Eisen-Schwefel-Cluster pro Monomer besitzen, lässt sich die Anzahl der Monomere pro Einheitszelle aus den Daten der MAD-Experimente entnehmen (3.2.6).

$$V_M = \frac{V_z}{n \cdot z \cdot M_r} \quad (3.5)$$

$$V_{solv} = 1 - \frac{1,23}{V_M} \quad (3.6)$$

n = Moleküle pro asymmetrischer Einheit

z = asymmetrische Einheiten pro Elementarzelle

V_z = Volumen der Elementarzelle

M_r = molekulare Masse

V_{solv} = Solvensgehalt

Verfeinerung von Strukturmodellen mit REFMAC5

Die Verfeinerung der mit COOT [82, 83] und ARP/wARP [84] erstellten Strukturmodelle erfolgte mit dem Programm REFMAC5 aus dem CCP4-Paket [44, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91]. Durch REFMAC5 werden Koordinaten und B-Faktoren entweder nach der *maximum likelihood* oder der kleinsten Quadrat-Methode minimiert. Zusätzlich können Verfeinerungen der TLS-Parameter (*translation, liberation, screw rotation*) mit REFMAC5 durchgeführt werden.

Der Fortschritt der Verfeinerung wurde durch die R-Faktoren R und R_{free} verfolgt. Der R-Wert ist ein Maß für die Übereinstimmung zwischen der Fouriertransformierten des erstellten Strukturmodells F_{calc} und dem observierten Strukturfaktor F_{obs} . Auf Grund des ungünstigen Verhältnisses zwischen den beobachteten und den zu bestimmenden Parametern kann es zu einer fehlerhaften Angleichung von F_{obs} und F_{calc} kommen (*model bias*). Daher wurden 10 % der Reflexe nicht in die Verfeinerung mit einbezogen. Diese sind somit unabhängig von möglichen Fehlern in der Verfeinerung. Mit Hilfe dieses Testdatensatzes wurde R_{free} zur Validierung des berechneten Modells bestimmt.

$$R = \frac{\sum_{hkl} |F_{obs}(hkl) - k \cdot F_{calc}(hkl)|}{\sum_{hkl} |F_{obs}(hkl)|} \quad (3.7)$$

$$R_{free} = \frac{\sum_{hkl \in T} |F_{obs}(hkl) - k \cdot F_{calc}(hkl)|}{\sum_{hkl \in T} |F_{obs}(hkl)|} \quad (3.8)$$

3.2.7 Charakterisierung des Eisen-Schwefel-Clusters über Aktivitätsbestimmung

Zur zusätzlichen Charakterisierung des Eisen-Schwefel-Clusters von LytB wurde untersucht, ob durch Zugabe des Eisen-bindenden Chelators EDTA die Aktivität von LytB verringert werden kann und ob im Falle einer Aktivitätsreduzierung diese wieder rückgängig zu machen ist. Dafür wurde eine *Aquifex aeolicus* LytB Probe ($c = 0,9 \text{ mg/ml}$) in zwei 2,5 ml Ansätze aufgeteilt. Ein Ansatz wurde mit EDTA versetzt ($c_{End} = 5 \text{ mM}$) und für 5 Minuten inkubiert, der zweite Ansatz wurde nicht mit EDTA versetzt und diente als Kontrollansatz. Beide Ansätze wurden

über separate PD-10 Säulen entsalzt (3.2.1). Die Proteinkonzentrationen wurden über BCA-Proteinbestimmung (3.2.1) ermittelt und UV/VIS-Spektren von beiden Proben aufgenommen. Aus den ermittelten Spektren wurde ein Differenzspektrum berechnet.

Die Aktivität beider Proben wurde mit dem auf Methylviologen basierenden Aktivitätstest (3.2.1) in Dreifachbestimmung bei 30 °C und einer eingesetzten Proteinkonzentration von $c = 0,9 \mu\text{g/ml}$ gemessen. Anschließend wurde zu dem Aktivitätsansatz der mit EDTA behandelten LytB-Probe $5 \mu\text{l } 7,5 \text{ mM FeCl}_2$ ($c_{\text{End}} = 46,5 \mu\text{Mol}$) gegeben und erneut die Extinktionsänderung gemessen.

3.2.8 Bioinformatische Techniken

Für Sequenzalignments und Homologiebestimmungen verschiedener LytB-Enzyme wurde das Programm ClustalX 2.0 [92] angewandt. Die grafische Darstellung der gelösten Proteinstrukturen erfolgte mit PyMol [93] und die elektrostatische Berechnung der Proteinoberfläche wurde mit APBS [94] durchgeführt. Strukturvergleiche der gelösten LytB-Strukturen gegen bekannte Enzymstrukturen erfolgten mit den Programmen MSDFold (SSM) [95] und Dali [96]. Substrat/Protein-Bindung wurde am *Department of Chemistry der University of Illinois at Urbana-Champaign* in der Arbeitsgruppe von Prof. Eric Oldfield mit Hilfe des Glide Programms [97] durchgeführt. Protein/Protein-Bindung wurde mit Hilfe der ClusPro-Server durchgeführt [98, 99, 100, 101].

4 Ergebnisse

4.1 *Aquifex aeolicus* LytB

4.1.1 Expression und Aufreinigung

Nach Durchführung der Expression von rekombinantem *Aquifex aeolicus* LytB (3.2.2) wurden die *Escherichia coli*-Kulturen bei einer OD₆₀₀ von ca. 2,6 abzentrifugiert. Dabei konnte bei einem Kulturvolumen von 2,4 l eine Zellfeuchtmasse von ca. 20 g gewonnen werden. Die SDS-Gelelektrophorese (3.2.1) der *Escherichia coli*-Kulturen vor Induktion und nach Induktion zeigte die Produktion von rekombinantem *Aquifex aeolicus* LytB (Abb.4.1), erkennbar an der Proteinbande bei ca. 33 kDa.

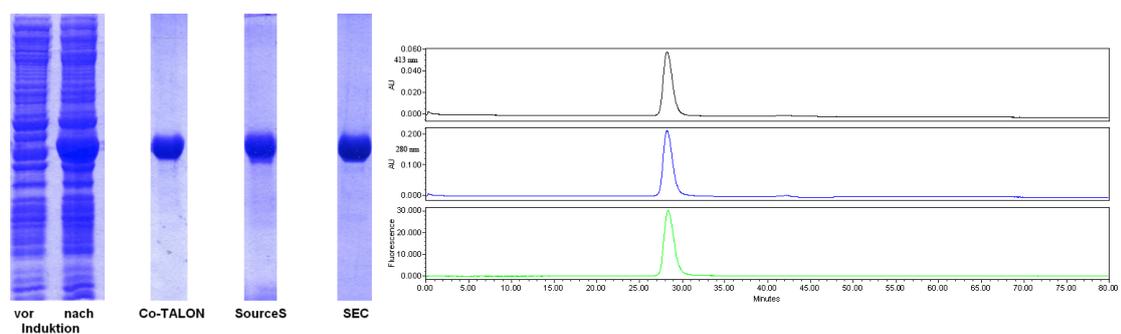


Abbildung 4.1: links: SDS-Gele der Aufreinigung von rekombinantem *Aquifex aeolicus* LytB, rechts: Analytische Gelfiltration der *Aquifex aeolicus* LytB-Endprobe.

Nach zwei Chromatographieschritten mit Hilfe einer Co-TALON- und SourceQ-Säule konnte ca. 80 mg/ml *Aquifex aeolicus* LytB aus 2,4 l Expressionskultur aufgereinigt werden. Die Analyse der Endprobe mittels analytischer Gelfiltration zeigte die hohe Homogenität des aufgereinigten LytB (Abb.4.1).

4.1.2 Kristallisation

Die Suche nach Kristallisationsbedingungen für *Aquifex aeolicus* LytB wurde mit den Hampton und Jena Bioscience Kits durchgeführt. Als Kristallisationstechnik wurde die Methode des hängenden Tropfens angewendet. Für den Kristallisationsansatz wurden 1,5 μ l Proteinlösung und 1,5 μ l Bodenlösung verwendet.

Erste Kristalle zeigten sich bei der Bedingung C6 des JBScreen Classic Kits Nr. 4. Nach Verfeinerung der Bedingungen bildeten sich die besten LytB-Kristalle in einem 1:1-Verhältnis aus 1,5 μ l Bodenlösung (10 % (w/w) PEG 8000, 100 mM Tris-HCl pH 8) und 1,5 μ l Proteinlösung (20 mg/ml LytB, 30 mM Tris-HCl, 40 mM NaCl pH 7,5). Die Kristalle nahmen die Form von gestauchten Tetraedern mit einer maximalen Kantenlänge von 0,3 mm (Abb.4.2) an.



Abbildung 4.2: Kristalle von *Aquifex aeolicus* LytB. Von links nach rechts: Kristalle nach dem Screen, erste Verfeinerung, beste Qualität.

Für die Röntgenanalyse wurden die Kristalle in einen Kryopuffer überführt. Zu den besten Ergebnissen führte ein Kryopuffer aus 10 % (w/w) PEG 8000, 100 mM Tris-HCl pH 8 und 20 % (w/v) Glycerin. Um die Kristalle langsam an den Kryopuffer zu gewöhnen, wurden sie kurz in einen nur 10 % (w/v) Glycerin enthaltenen Puffer gesetzt und dann in den endgültigen Kryopuffer überführt.

Nach 1 bis 2 Minuten Verweildauer im Kryopuffer wurden die Kristalle in einem N₂-Strom schockgefroren.

4.1.3 Datensammlung

Die ersten Röntgenbeugungsexperimente ergaben eine Raumgruppe von $P2_1$ mit den Einheitszellparametern von 60,3 Å, 87,6 Å, 72,1 Å und 95,1° für die Kristalle von *Aquifex aeolicus* LytB. Diese Parameter sind kompatibel mit dem Vorhandensein von zwei Monomeren pro asymmetrischer Zelle ($V_M = 2,3 \text{ Å}^3/\text{Da}$).

Die für die Strukturaufklärung benutzten Röntgenbeugungsdatensätze wurden an der PXII Messstation der Swiss Light Source des Paul Scherrer Instituts (Villigen, Schweiz) aufgenommen. Der native Datensatz erreichte eine Auflösung von 1,65 Å (Tab.4.1). Zusätzlich wurden *peak*, *inflection* und *remote* Datensätze (Tab.4.1) an der Eisenabsorbtiionskante bei einer maximalen Auflösung von 2,1 Å gesammelt. Diese wurden zur Bestimmung der Phasen mittels der MAD-Methode verwendet. Aus den Messungen an der Eisenabsorbtiionskante wurden mit Hilfe der MAD-Methode die Phasen bestimmt.

Tabelle 4.1: Messdaten

Datensatz	high resolution	peak	inflection	remote
Datensammlung				
λ (nm)	0,9828	1,7374	1,7402	1,716
Raumgruppe	$P2_1$	$P2_1$	$P2_1$	$P2_1$
Auflösung (Å)	30,0 - 1,65	30,0 - 2,1	30,0 - 2,5	30,0 - 2,8
äußerste Schale	(1,65 - 1,7)	(2,1 - 2,14)	(2,5 - 2,6)	(2,8 - 2,87)
Zellachse (Å)	60,4 87,8 72,4	60,3 87,6 72,1	60,4 87,5 72,1	60,0 87,0 71,7
Zellwinkel (°)	95,1	95,1	95,0	94,9
Vollständigkeit (%)	90,9 (58,3)	99,6 (97,9)	99,7 (100)	99,5 (99,8)
R_{sym} (%)	4,6 (34,5)	6,6 (37,5)	5,5 (20,7)	6,2 (18,9)
I/sigI	15,3 (3,0)	13,2 (3,3)	19,1 (7,8)	17,0 (7,8)
Redundanz	3,5 (2,3)	3,6 (2,8)	3,6 (3,6)	3,5 (3,5)

4.1.4 Phasenberechnung und Strukturbestimmung

Die Koordinaten der beiden Eisen-Schwefel-Cluster in der asymmetrischen Zelle wurden aus der anomalen Information des *peak* Datensatzes mittels SHELXD berechnet. Die Koordinatenpositionen wurden durch SHARP verfeinert und die Phasen wurden bei einer Auflösung von 2,6 Å durch Einbeziehung der Daten aus den *peak*, *inflection* und *remote* Messungen berechnet. Mit Hilfe des Solvensglättungsverfahrens (*solvent flattening*, Solvensanteil 52 %) konnten die Phasen weiter verbessert werden. Die Qualität der Elektronendichte an den Eisen-Schwefel-Clustern war ausreichend, um die individuellen Atome zu identifizieren. Dadurch konnte die Art der Eisen-Schwefel-Cluster als [3Fe-4S] bestimmt werden, was zu einer zusätzlichen Verbesserung der Phasen führte.

Tabelle 4.2: Verfeinerungsdaten

Datenset	high resolution
Refinement	
Monomere/Zelle	2
Auflösung (Å)	20,0 - 1,65
Reflexe	77992
$R_{working}$	0,194
R_{free}	0,228
Atome	
Protein	4589
[3Fe-4S]-Cluster	14
Wasser + Glycerin	561
B-Faktoren	
Protein	35,1
[3Fe-4S]-Cluster	28,2
Wasser + Glycerin	44,2
Standardabweichungen	
Bindungslänge (Å)	0,017
Bindungswinkel (°)	1,45

Durch die teilweise Modellierung der beiden Monomere in der asymmetrischen Einheit konnten die nicht-kristallographischen Symmetrie-Operatoren bestimmt werden. Durch eine molekulare Mittelung der beiden Monomere der asymmetrischen Einheit in DM wurden klar interpretierbare Elektronendichten für die Domänen A und B der beiden Monomere erzeugt. Folglich konnten die Modelle für diese beiden Domänen automatisch mit arp/wARP erstellt werden. Das Modell für die flexiblere Domäne C wurde manuell mit den Programmen O [102] und COOT gebaut. Mit Ausnahme der C-terminalen Aminosäuren 290 und 291 war die komplette Polypeptidkette in der Elektronendichte sichtbar.

Die Verfeinerung der Daten erfolgte zuerst mit CNS und später mit REFMAC5. Die Daten konvergierten bei einem R_{free} -Faktor von 22,8 % (Tab.4.2). Die Qualität der Daten wurde mittels der Programme CNS und PROCHECK überprüft. Die fertige Struktur wurde unter der ID-Nummer 3DNF in der Protein Data Bank deponiert.

4.1.5 Struktur von *Aquifex aeolicus* LytB.

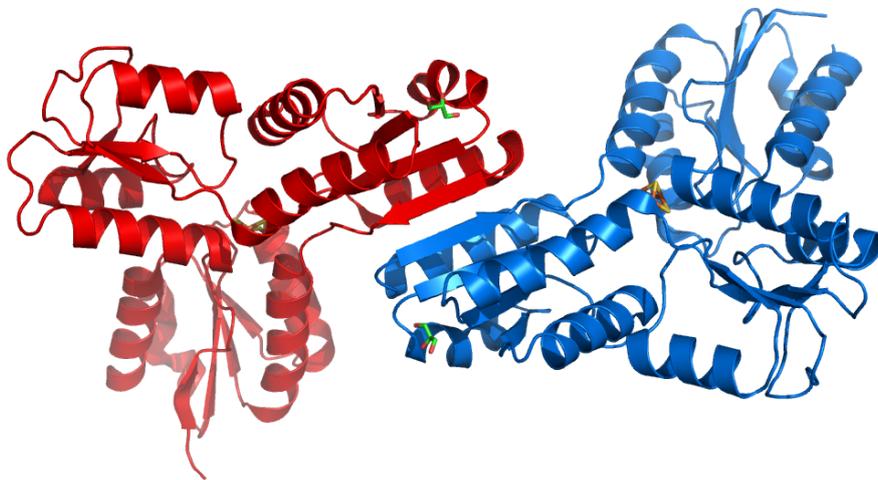


Abbildung 4.3: *Aquifex aeolicus* LytB-Dimer

Die Kristallstruktur zeigt eindeutig, dass LytB aus *Aquifex aeolicus* als Homodimer vorliegt (Abb.4.3).

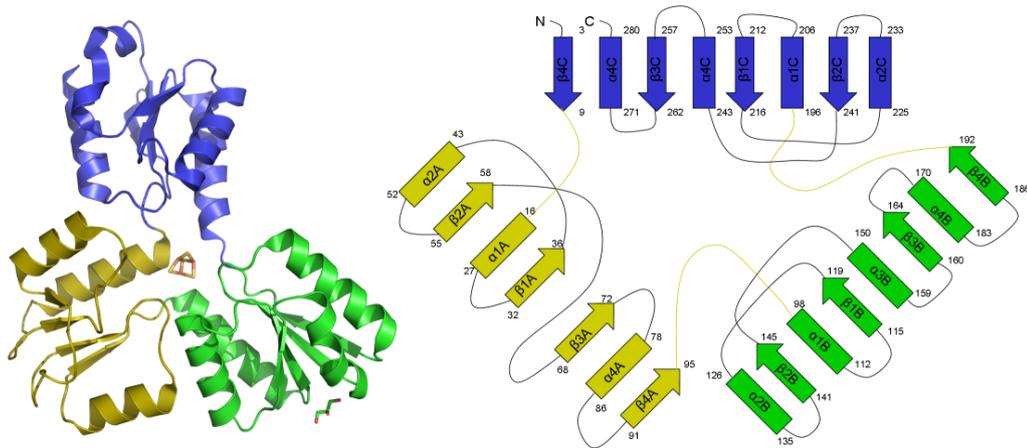


Abbildung 4.4: Domänen und Sekundärstruktur eines *Aquifex aeolicus* LytB Monomers.

Jedes der LytB-Monomere ist aus drei klar abgrenzbaren α/β -Domänen aufgebaut, welche das zentrale [3Fe-4S]-Cluster umschließen (Abb.4.4). Der Kontakt der Monomere erfolgt über die β -Faltblattstrukturen der Domäne B. Das [3Fe-4S]-Cluster ist kovalent an Cys13, Cys96 und Cys193 gebunden, welche auch die Domänengrenzen darstellen. Die Struktur ist mit ca. 20 Å relativ flach und hat einen Durchmesser von ungefähr 60 Å. Auf der Vorderseite von LytB ist eine ausgeprägte 10 Å × 20 Å Kavität lokalisiert, an deren Grund das [3Fe-4S]-Cluster eingebettet ist. Die LytB-Rückseite zeigt keine besonderen Oberflächencharakteristika. Weiterhin konnte in der ermittelten Elektronendichte in beiden Monomeren ein an Domäne B gebundenes Glycerin bestimmt werden. Dieses wird von den Aminosäureresten Lys140, His156 und dem Carbonyl der Gly113-Tyr114 Peptidbindung koordiniert.

4.1.6 Strukturanalyse

Die mit APBS berechnete Oberflächenladung von *Aquifex aeolicus* LytB zeigt, dass die Kavität, an deren Grund das Eisen-Schwefel-Cluster liegt, im Vergleich zum Restprotein deutlich positiver geladen ist. Die Areale außerhalb der Kavität be-

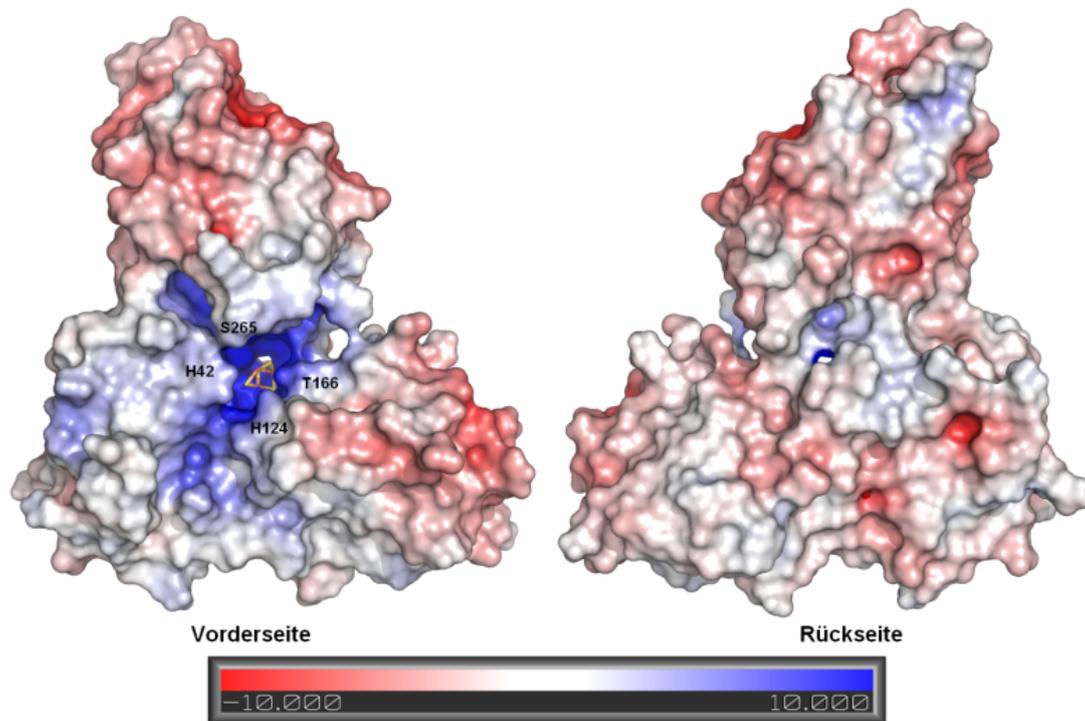


Abbildung 4.5: Elektrostatische Oberfläche von *Aquifex aeolicus* LytB.

sitzen vorrangig neutrale bis leicht negative Ladungen, was mit dem neutralen P_i von *Aquifex aeolicus* LytB korrespondiert (Abb.4.5).

Die durchgeführten Protein/Protein-Dockingexperimente mit ClusPro führten zu keinen verwertbaren Ergebnissen. Weder Docking mit *Aquifex aeolicus* Ferredoxin noch mit *Aquifex aeolicus* Flavodoxin als potentielle Elektronendonoren konnten eindeutige Interaktionsmöglichkeiten zeigen.

4.1.7 Aktivitätsbestimmung

Der Vergleich (3.2.7) einer EDTA-behandelten *Aquifex aeolicus* LytB Probe mit einer unbehandelten Kontrollprobe zeigte einen roten Farbumschlag der mit EDTA behandelten Probe (Abb.4.6 links). Es wurden Spektren der Kontrollprobe und des mit EDTA behandelten LytB vor und nach der Entfernung von EDTA mit-

tels PD-10-Säule (3.2.1) aufgenommen. Die ermittelten Spektren im Bereich von 270 bis 570 nm wurden auf den E_{280} -Wert der Kontrollprobe skaliert. Die EDTA-behandelten Proben zeigten eine gesteigerte Extinktion in den Bereichen um 330 und 480 nm (Abb.4.6 rechts).

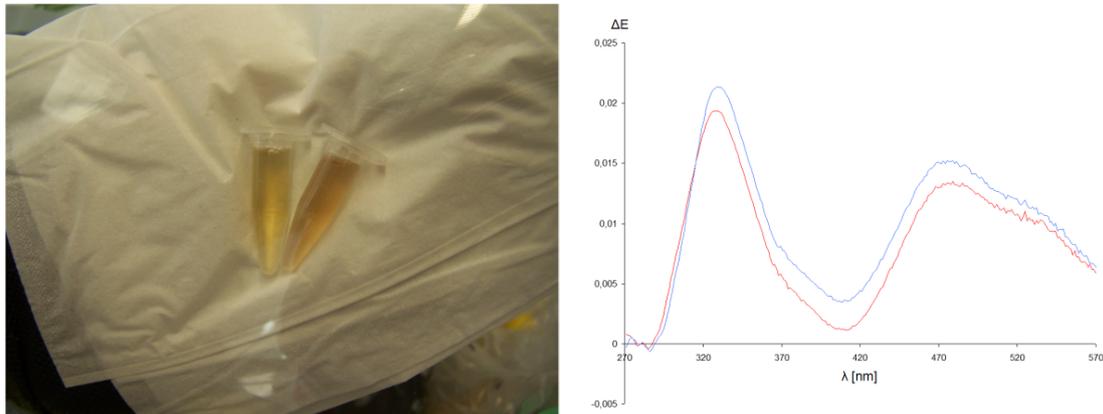


Abbildung 4.6: Links: Vergleich zwischen unbehandeltem und mit EDTA behandeltem *Aquifex aeolicus* LytB. Rechts: Differenzspektrum zwischen beiden Proben.

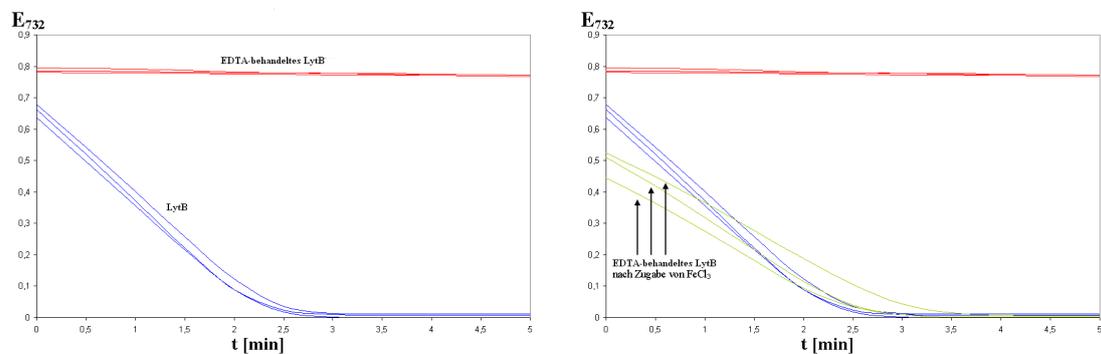


Abbildung 4.7: *in vitro* Aktivitäten von *Aquifex aeolicus* LytB: Aktivität von unbehandeltem LytB (blau), mit EDTA behandeltes LytB (rot), nach Zugabe von $FeCl_3$ zum EDTA-behandeltem LytB (grün).

Bei der Durchführung der *in vitro* Aktivitätsbestimmungen zeigte die Kontrollprobe eine Aktivität von $5,45 \pm 0,14$ kat/mol. Die mit EDTA behandelte Probe zeigte dagegen eine viel geringere Aktivität (0,08 kat/mol). Nach Zugabe von $5 \mu\text{l}$ $7,5$ mM FeCl_3 in die inaktive Probe konnte wieder Aktivität gemessen werden. Die reaktivierte Probe zeigte eine Aktivität von $3,55 \pm 0,29$ kat/mol, was ca. 65 % der Aktivität der Kontrollprobe entspricht. Nach der Zugabe von FeCl_3 konnte eine sofortige Abnahme der Extinktion um 0,2 gemessen werden (Abb.4.7). Die Messung einer Negativkontrolle, bestehend aus dem Aktivitätstestansatz ohne LytB, zeigte nach der Zugabe von FeCl_3 ebenfalls eine Extinktionsabnahme von 0,2, aber nach dieser initialen Abnahme konnte keine weitere Extinktionsänderung gemessen werden.

4.2 *Plasmodium falciparum* LytB

4.2.1 Expression und Aufreinigung

Nach der Durchführung des Protokolls für die Expression von rekombinantem *Plasmodium falciparum* LytB (3.2.3) wurde aus einem Kulturvolumen von 9,6 l eine Zellfeuchtmasse von ca. 30 g gewonnen. Die gemessene OD₆₀₀ der *Escherichia coli*-Kulturen betrug ca. 1,7 vor dem Abzentrifugieren. Die SDS-Gelelektrophorese der uninduzierten und der mit Anhydrotetracyclin induzierten *Escherichia coli*-Kulturen (Abb.4.8) zeigt eine Proteinbande bei ca. 35 kDa, welches mit der theoretischen Masse des *Plasmodium falciparum* LytB-Konstrukts von ca. 37 kDa korrespondiert.

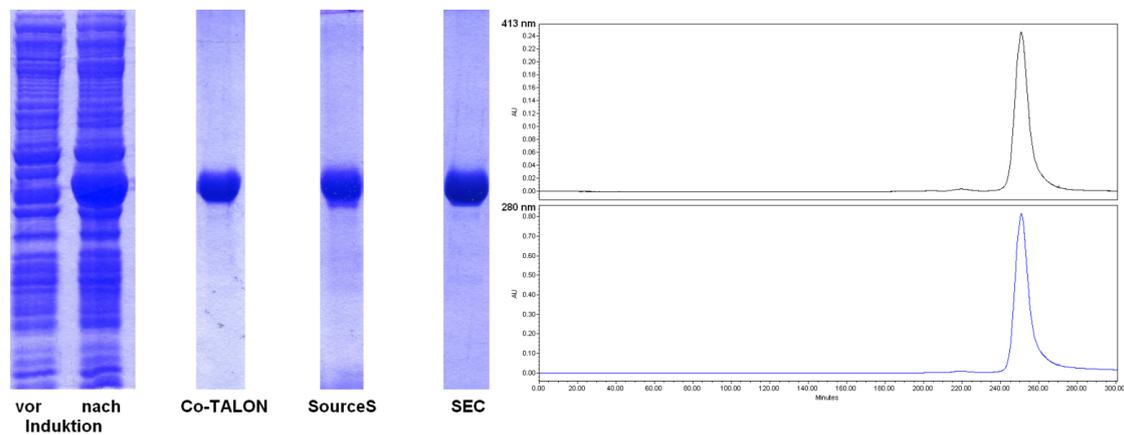


Abbildung 4.8: links: SDS-Gele der Aufreinigung von rekombinantem *Plasmodium falciparum* LytB, rechts: Chromatogramm der präparativen Gelfiltration.

Nach drei Chromatographieschritten mit den Säulen Co-TALON, SourceS und Superdex (Abb.4.8) konnte aus 30 g Zellfeuchtmasse ca. 25 mg gereinigtes *Plasmodium falciparum* LytB gewonnen werden. Durch die präparative Superdex-Gelfiltration konnte eine für die Kristallisation hinreichende Homogenität der Probe erreicht werden. Aus der eingesetzten 30 g *Escherichia coli*-Zellmasse konnten ungefähr 20 bis 25 mg *Plasmodium falciparum* LytB aufgereinigt werden.

4.2.2 Kristallisation

Die Kristallisationsansätze mit *Plasmodium falciparum* LytB wurden mit der Methode des sitzenden Tropfens (3.2.5) unter Verwendung der Jena Bioscience Classic Kits durchgeführt. Für die Kristallisationsansätze wurden verschiedene Konzentrationen zwischen 8 und 15 mg/ml verwendet. Zusätzlich wurden verschiedene Verhältnisse von Protein- und Bodenlösungen getestet.

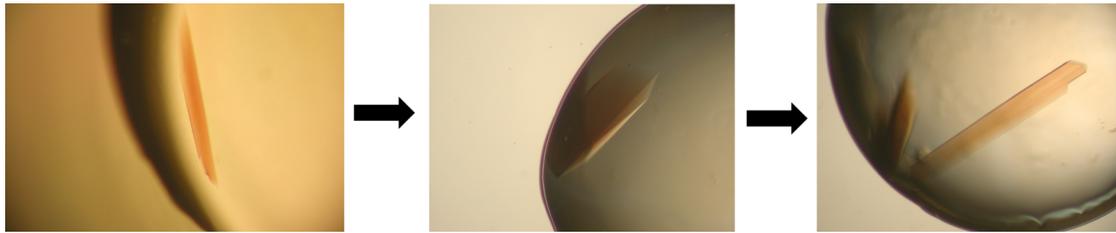


Abbildung 4.9: Kristalle von *Plasmodium falciparum* LytB. Von links nach rechts: Sitzender Tropfen, Hängender Tropfen, Hängender Tropfen (2:1)

Erste Kristalle wuchsen unter der Bedingung D5 des JBScreen Classic Kits Nr. 3. Eine Variation der Bedingungen zeigte keinen Erfolg. Tatsächlich konnte *Plasmodium falciparum* LytB nur mit der kommerziell erhältlichen Bedingung JB3/D5 kristallisiert werden. Die Verbesserung der Kristalle konnte aber durch die Verwendung der *hanging drop* Methode und einem Verhältnis von Proteinlösung zu Bodenlösung von 2 zu 1 erreicht werden (Abb.4.9). Das *Plasmodium falciparum* LytB-Enzym kristallisiert als fragile Stäbchen mit einer Dimension von maximal $0,5 \text{ mm} \times 0,1 \text{ mm} \times 0,05 \text{ mm}$.

Wie bei *Aquifex aeolicus* LytB (4.1.2) wurde ein Kryopuffer verwendet, der aus der Kristallisationsbedingung mit 20 % Glycerin als Additiv besteht. Die Kristalle wurden auf Grund ihrer Fragilität direkt in den Kryopuffer überführt und nach Montage in die Nylonschleife im N_2 -Strom eingefroren.

4.2.3 Datensammlung

Durch die Röntgenbeugungsexperimente an den Kristallen konnte eine $P3_121$ -Raumgruppe mit den Zellachsen 113,3 Å und 76,4 Å ermittelt werden. Dies ist kompatibel mit einer Verteilung von zwei Monomeren pro Einheitszelle ($V_M = 1,97 \text{ Å}^3/\text{Da}$).

Ein nativer Datensatz der *Plasmodium falciparum* LytB-Kristalle mit einer Auflösung von 2,3 Å wurde an der PXII Messstation der Swiss Light Source des Paul Scherrer Instituts (Villigen, Schweiz) aufgenommen (Tab.4.3). Da die Phasenbestimmung auf Basis der *Aquifex aeolicus* LytB-Struktur mittels der Methode MOLREP [103] zu keinen Ergebnissen führte, musste sie ebenfalls mit der MAD-Methode erfolgen. *Peak*, *inflection* und *remote* Datensätze (Tab.4.3) wurden bei einer Auflösung von 2,5 Å an der Eisenabsorptionskante aufgenommen. Die Daten wurden mit den Programmen HKL und XDS prozessiert.

Tabelle 4.3: Messdaten

Datenset	nativ	peak	inflection	remote
Datensammlung				
λ (nm)	0,92	1,7382	1,7406	1,7141
Raumgruppe	$P3_121$	$P3_121$	$P3_121$	$P3_121$
Auflösung (Å)	50,0 - 2,3	50,0 - 2,5	50,0 - 2,7	50,0 - 2,7
äußere Schale	(2,3 - 2,4)	(2,4 - 2,5)	(2,6 - 2,7)	(2,6 - 2,7)
Zellachse (Å)	113,3 76,4	115,8 76,8	115,9 76,6	115,6 76,8
Vollständigkeit (%)	98,7 (95,6)	99,6 (99,2)	99,6 (99,3)	99,7 (99,3)
R_{sym} (%)	6,9 (34,1)	7,4 (69,3)	6,9 (45,4)	8,4 (38,2)
I/sigI	14,0 (4,3)	14,1 (3,0)	17,3 (4,4)	14,5 (5,0)
Redundanz	3,9 (3,7)	5,5 (5,0)	4,9 (4,8)	4,9 (4,9)

4.2.4 Phasenberechnung und Strukturbestimmung

Die Position der beiden Eisen-Schwefel-Cluster in der asymmetrischen Einheit wurde aus den anomalen Daten der *peak* Messung mittels SHELXD berechnet. Die Ver-

feinerung der Koordinaten erfolgte mit SHARP. Unter Einbeziehung der *peak*, *inflection* und *remote* Daten wurden mit SHARP die Phasen bei einer Auflösung von 2,7 Å berechnet. Mit Hilfe des Solvensglättungsverfahrens (Solvensanteils 37,6 %) konnten die Phasen verbessert werden. Die Eisen-Schwefel-Cluster wurden anhand der lokalen Elektronendichte als [3Fe-4S]-Cluster bestimmt. Durch Überlagerung eines *Aquifex aeolicus* LytB Monomers auf die Elektronendichte in COOT konnte der Verlauf der *Plasmodium falciparum* LytB-Peptidkette erkannt werden. Ausgehend von der bekannten *Aquifex aeolicus* LytB-Struktur wurde das Strukturmodell für *Plasmodium falciparum* LytB manuell in COOT erstellt. Die komplette Polypeptidkette konnte in der Elektronendichte modelliert werden. Die Daten wurden mit REFMAC5 verfeinert (Tab.4.4). Der R_{free} -Faktor betrug 22,8 %.

Tabelle 4.4: Verfeinerungsdaten

Datenset	high resolution
Refinement	
Monomere/Zelle	2
Auflösung (Å)	33,37 - 2,40
Reflexe	77992
$R_{working}$	0,194
R_{free}	0,228
Atome	
Protein	4589
[3Fe-4S]-Cluster	14
Wasser + Fe	561
B-Faktoren	
Protein	35,1
[3Fe-4S]-Cluster	28,2
Wasser + Fe	44,2
Standardabweichungen	
Bindungslänge (Å)	0,017
Bindungswinkel (°)	1,45

4.2.5 Struktur von *Plasmodium falciparum* LytB

In Übereinstimmung mit Gelfiltrationsexperimenten liegt *Plasmodium falciparum* LytB im Kristall als Monomer vor. Wie bei *Aquifex aeolicus* LytB besteht das Monomer aus drei α/β -Domänen annähernd gleicher Größe, welche ein zentrales [3Fe-4S]-Cluster umschließen (Abb.4.10).

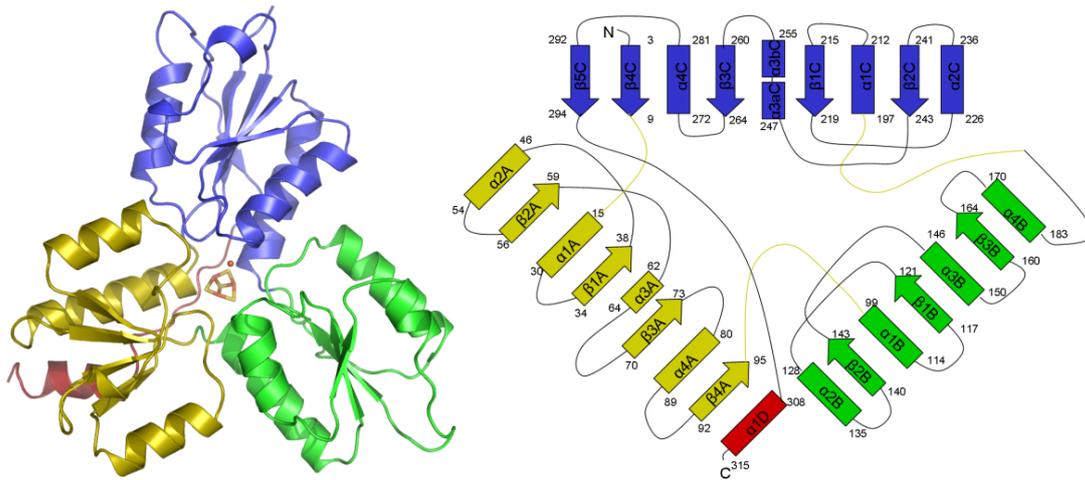


Abbildung 4.10: Domänen und Sekundärstruktur von *Plasmodium falciparum* LytB

Die Domänen sind durch die Eisen-bindenden Cysteine Cys14, Cys98 und Cys196 voneinander abgegrenzt. Zusätzlich ist *Plasmodium falciparum* LytB durch einen C-terminalen Bereich erweitert, der bei Gly295 startet, welcher die Rückseite des Eisen-Schwefel-Clusters passiert und in einer α -Helix endet. Durch diesen zusätzlichen Bereich hat das *Plasmodium falciparum* LytB-Monomer eine Dimension von ungefähr $60 \text{ \AA} \times 30 \text{ \AA}$.

4.2.6 Strukturanalyse

Die Berechnung der Oberflächenladung von *Plasmodium falciparum* LytB zeigt, dass dieses größtenteils neutrale bis positive Bereiche aufweist.

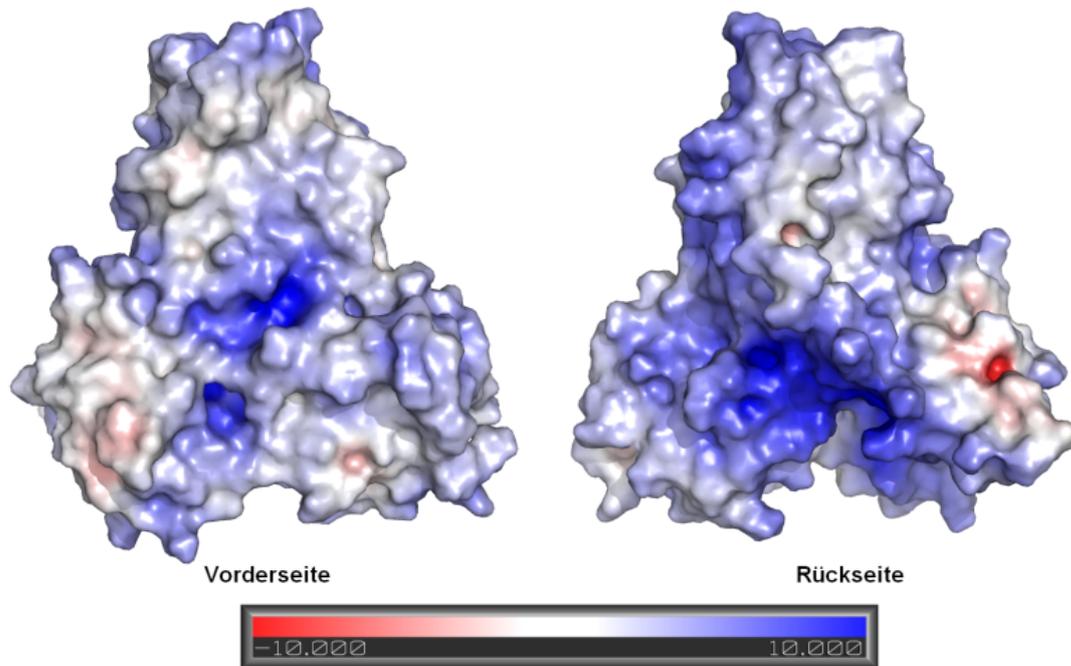


Abbildung 4.11: Elektrostatistische Oberfläche von *Plasmodium falciparum* LytB

Auf der Vorderseite des *Plasmodium falciparum* LytB befindet sich ein Bereich starker positiver Ladung, der durch die Histidine His43, His 76 und His126 hervorgerufen wird. Im Vergleich dazu besitzen die weiter vom Zentrum entfernten Bereiche auf der Vorderseite eine eher neutrale Ladung. Auf der Rückseite zeigt sich ein weitestgehend neutraler Bereich zwischen den Domänen A, C und dem C-terminalen Bereich, während zwischen den Domänen A, B und dem C-terminalen Bereich eine positive Ladung vorherrscht.

Die Struktur zeigt weder auf der Vorder- noch auf der Rückseite zum Eisen-Schwefel-Cluster führende Öffnungen in der Proteinoberfläche. Weiterhin ist ein freies Eisen mit den Histidinen His43, His76 und His126 koordiniert.

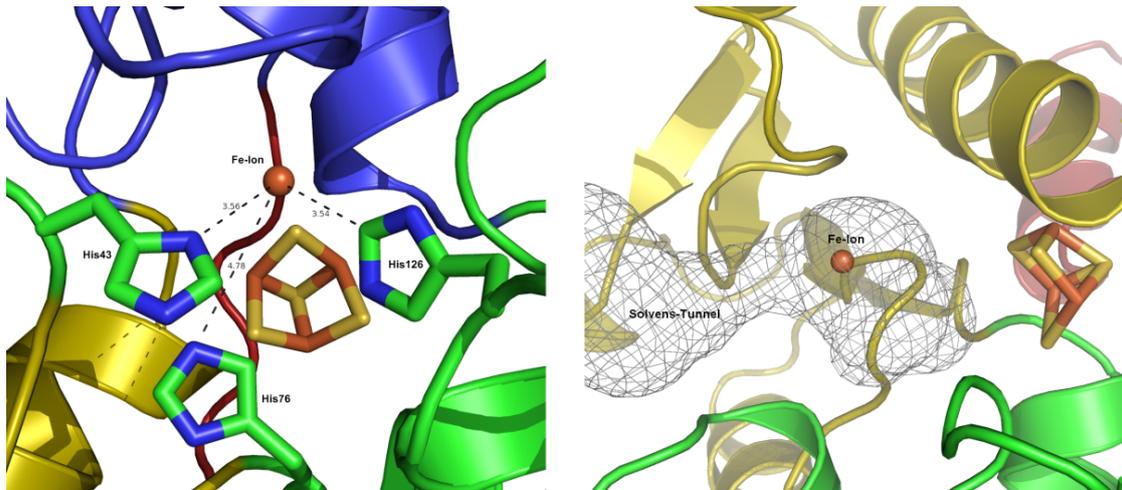


Abbildung 4.12: links: Durch die Histidine H43, H76 und H126 koordiniertes freies Eisen-Ion, rechts: Mit CAVER berechneter Solvenstunnel.

Durch Berechnung mit CAVER konnte ein potentieller ca. 10 Å tiefer Solvenstunnel zum Eisen-Schwefel-Cluster identifiziert werden (Abb.4.12), welcher zu einer möglichen Substratbindetasche führt.

4.2.7 Bindungsexperimente mit Ferredoxin

Die mit ClusPro durchgeführten Protein/Protein-Bindungsexperimente mit *Plasmodium falciparum* Ferredoxin (Abb.4.13) zeigten bei 8 von 10 Interaktionsmodellen eine Präferenzierung des Ferredoxin/LytB-Kontaktes auf der Rückseite von LytB .

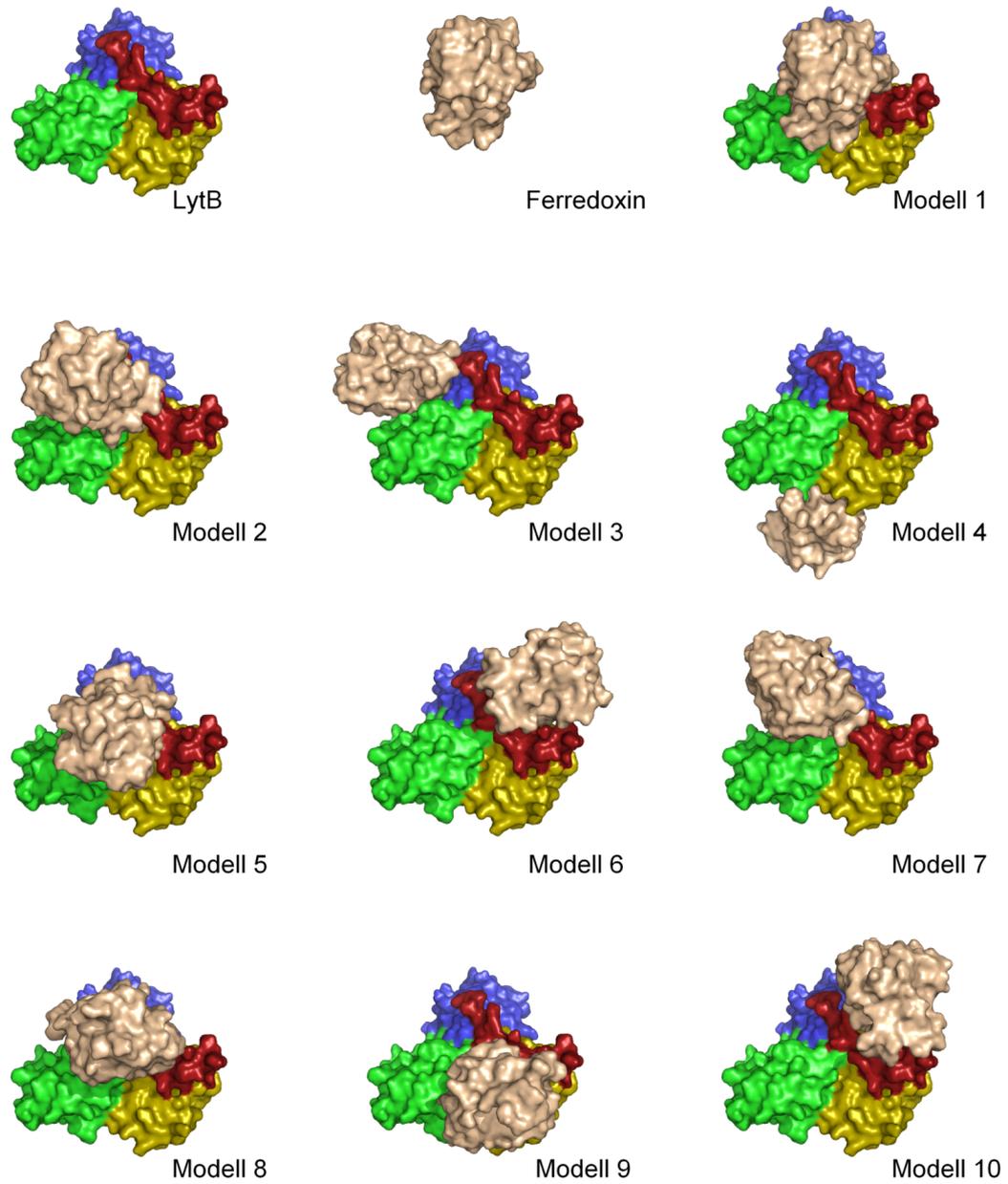


Abbildung 4.13: Mit ClusPro berechnete LytB/Ferredoxin-Bindungsmodelle.

4.3 *Thermus thermophilus* GcpE

4.3.1 Expression und Aufreinigung

Durch das Anzuchtprotokoll für die Herstellung von rekombinantem *Thermus thermophilus* GcpE (3.2.4) konnte aus 9,6 l Zellkultur eine Feuchtmasse an abzentrifugiertem *Escherichia coli*-Zellpellet von ca. 50 g gewonnen werden. Am Ende der Expression nahm die Zellkultur eine grüne Färbung an und die gemessene OD₆₀₀ betrug ca. 2,0. Die SDS-Gelelektrophorese (Abb.4.14) der *Escherichia coli*-Kulturen vor und nach der Induktion mit IPTG zeigte eine durch Induktion erzeugte Proteinbande bei ca. 40 kD, indikativ für *Thermus thermophilus* GcpE.

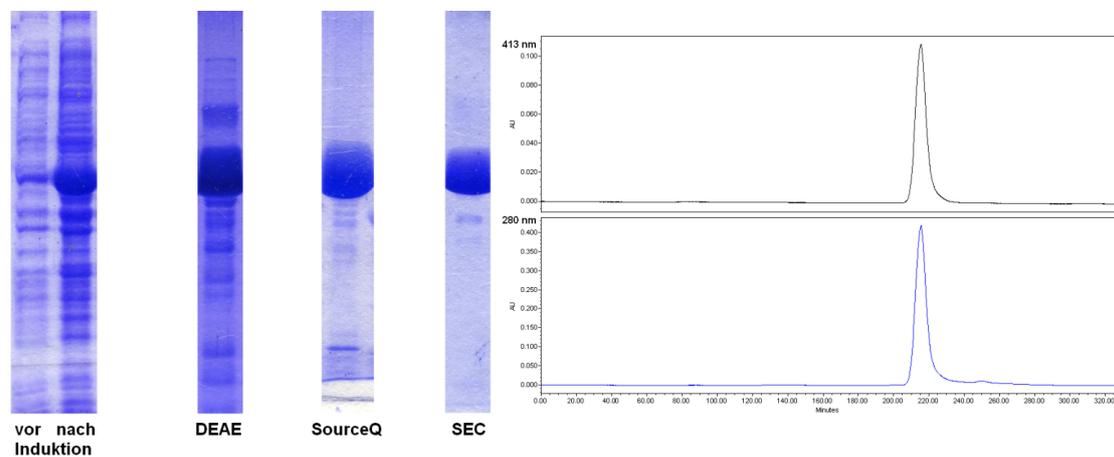


Abbildung 4.14: links: SDS-Gele der Aufreinigung von rekombinantem *Thermus thermophilus* GcpE, rechts: Chromatogramm der präparativen Gelfiltration.

Nach den drei Chromatographieschritten DEAE, SourceQ und Superdex konnte aus 30 mg *Escherichia coli* Zellmasse ca. 80 mg *Thermus thermophilus* GcpE gewonnen werden. Durch die SDS-Gelelektrophorese (Abb.4.14) und die präparative Superdex-Gelfiltration konnte eine für die Kristallisation geeignete Reinheit erreicht werden.

4.3.2 Kristallisation

Die Kristallisationsexperimente mit *Thermus thermophilus* GcpE wurden mit dem Jena Bioscience Classic Kit unter Verwendung der Methode des sitzenden Tropfens (3.2.5) durchgeführt. Die Proteinkonzentration betrug zwischen 3 und 15 mg/ml.



Abbildung 4.15: Variationen von *Thermus thermophilus* GcpE Kristallen.

Erste Kristalle zeigten sich unter verschiedenen Bedingungen bei MPD-Konzentrationen zwischen 30 und 50 % (v/v). Die Optimierungsversuche zeigten, dass *Thermus thermophilus* GcpE bei einer Vielzahl von Bedingungen Kristalle unterschiedlicher Form aber ähnlicher Qualität bildete. Dabei konnten Kristallquader von $0,3 \text{ mm} \times 0,15 \text{ mm} \times 0,15 \text{ mm}$ und große Prismen mit Dimensionen bis zu $0,7 \text{ mm} \times 0,5 \text{ mm} \times 0,5 \text{ mm}$ beobachtet werden (Abb.4.15).

Für die Röntgenstrukturanalyse wurden Kristalle aus Ansätzen, zusammengesetzt aus $1,0 \mu\text{l}$ Proteinlösung (12 mg/ml GcpE, 30 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5) und $1,0 \mu\text{l}$ Reservoirlösung (30 % (v/v) MPD, 20 % (v/v) Ethanol), verwendet. Es musste kein Kryopuffer eingesetzt werden.

4.3.3 Datenaquisition

Die Röntgenbeugungsexperimente ergaben, dass die Kristalle die $P2_1$ -Raumgruppe und die Zellparameter 101,1 Å, 105,7 Å, 104,3 Å und 118° annahmen. Daraus ergibt sich die Anwesenheit von zwei Dimeren pro asymmetrischer Einheit ($V_M = 2,78 \text{ Å}^3/\text{Da}$).

Die *peak*, *inflection* und *remote* Datensätze wurden bei einer Auflösung von 2,7 Å an der PXII Messstation der *Swiss Light Source* des Paul Scherrer Instituts (Villigen, Schweiz) aufgenommen (Tab.4.5). Die Prozessierung der Daten erfolgte mit den Programmen HKL und XDS.

Tabelle 4.5: Messdaten

Datenset	peak	inflection	remote
Datensammlung			
λ (nm)	1,7390	1,7412	1,7149
Raumgruppe	$P2_1$	$P2_1$	$P2_1$
Auflösung (Å)	50,0 - 2,7	50,0 - 2,7	50,0 - 2,7
äußere Schale	(2,7 - 2,8)	(2,7 - 2,8)	(2,7 - 2,8)
Zellachse (Å)	101,1 105,7 104,3	101,1 105,6 103,7	100,9 106 102,8
Zellwinkel (°)	118,0	117,9	117,5
Vollständigkeit (%)	95 (87,1)	94 (84)	79,6 (71,2)
R_{sym} (%)	7,3 (88,2)	38 (374)	37 (306)
I/sigI	6,1 (1,1)	3,4 (0,7)	6,5 (0,8)
Redundanz	1,9 (1,8)	1,8 (1,7)	1,1 (1,1)

5 Diskussion

5.1 LytB

5.1.1 Struktur

Die gelösten 3D-Strukturen von *Aquifex aeolicus* [104] und *Plasmodium falciparum* LytB, ebenso wie die parallel gelöste LytB-Struktur von *Escherichia coli* [105], stellen eine neuartige Proteinfaltung dar. Ein Vergleich dieser drei LytB-Strukturen (Abb.5.1) miteinander zeigt ein gemeinsames Grundmotiv von drei ungefähr gleich großen α/β -Domänen, welche ein zentrales [3Fe-4S]-Cluster umschließen.

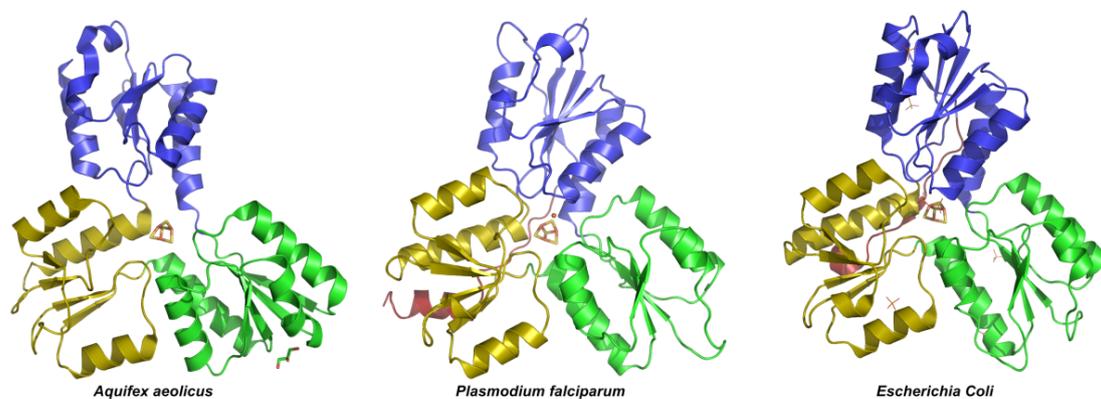


Abbildung 5.1: Vergleich der LytB-Monomere von *Aquifex aeolicus* [104], *Plasmodium falciparum* und *Escherichia coli* [105].

Weiterhin besitzen sowohl *Plasmodium falciparum* LytB als auch *Escherichia coli* LytB ein zusätzliches kurzes C-terminales Segment, welches auf der Rückseite

des [3Fe-4S]-Clusters verläuft. Bemerkenswerterweise ist in *Plasmodium falciparum* und *Escherichia coli* LytB der Eisen-Schwefel-Cluster durch Loop-Segmente aller drei Domänen vom Solvens abgeschirmt, während in *Aquifex aeolicus* LytB das Eisen-Schwefel-Cluster frei zugänglich ist. Dieses deutet auf die Möglichkeit hin, dass LytB zwei unterschiedliche Konformationen einnehmen kann: Eine offene Struktur, in der das Eisen-Schwefel-Cluster zugänglich ist, und eine geschlossene Struktur, welche das Eisen-Schwefel-Cluster vom Solvens abschirmt.

Ein Vergleich der *Plasmodium falciparum* LytB-Struktur mittels MSDfold (*Secondary Structure Matching*) mit allen bisher gelösten Proteinstrukturen der *Protein Data Bank* (PDB) (Abb.5.2) zeigt die erwartete hohe Übereinstimmung der Sekundärstrukturelemente ($\%_{SSE}$) der LytB-Strukturen. Die relativ niedrigen Q-Werte (*Quality of alignment*), 0,38 für *Escherichia coli* LytB und 0,17 für *Aquifex aeolicus* LytB, resultieren aus der Tatsache, dass *Plasmodium falciparum* LytB ein Monomer im Vergleich zu den bisher gelösten Dimerstrukturen von *Escherichia coli* und *Aquifex aeolicus* LytB darstellt. Ein Vergleich der Einzelketten ergibt Q-Werte von 0,76 (A) und 0,75 (B) für die *Escherichia coli* LytB-Monomere und 0,24 (A) und 0,34 (B) für die *Aquifex aeolicus* LytB-Monomere.

Die vergleichsweise größere Übereinstimmung von *Plasmodium falciparum* LytB und *Escherichia coli* LytB basiert vermutlich auf dem zusätzlichen C-terminalen Bereich, welcher in *Aquifex aeolicus* LytB nicht vorhanden ist. Zusätzlich ergibt sich keine signifikante Strukturähnlichkeit zu anderen Proteinen. Ein Strukturvergleich mit dem Programm Dali führt zu gleichen Ergebnissen (Daten nicht gezeigt).

##	Scoring			Rmsd	Nalign	Ng	%seq	Query			Target (PDB entry)			
	Q	P	Z					%sse	Match	%sse	Nres	Title		
1	0.38	18.2	15.5	1.38	302	5	41	92	3f7t	44	620	STRUCTURE OF ACTIVE ISPH SHOWS A NOVEL FOLD WITH A [3FE-4S] CLUSTER IN THE CATALYTIC CENTRE		
2	0.17	-0.0	4.9	2.99	246	18	25	85	3dnf	46	563	STRUCTURE OF (E)-4-HYDROXY-3-METHYL-BUT-2-ENYL DIPHOSPHATE REDUCTASE, THE TERMINAL ENZYME OF THE NON-MEVALONATE PATHWAY		
3	0.055	-0.0	0.5	4.53	139	16	10	42	3h5t	42	338	CRYSTAL STRUCTURE OF A TRANSCRIPTIONAL REGULATOR, LACL FAMILY PROTEIN FROM CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM		
4	0.054	-0.0	0.4	4.60	125	11	6	42	3g85	52	270	CRYSTAL STRUCTURE OF LACI FAMILY TRANSCRIPTION REGULATOR FROM CLOSTRIDIUM ACETOBUTYLICUM		
5	0.047	-0.0	0.2	4.75	145	18	12	42	1dlj	42	402	THE FIRST STRUCTURE OF UDP-GLUCOSE DEHYDROGENASE (UDPGDH) REVEALS THE CATALYTIC RESIDUES NECESSARY FOR THE TWO-FOLD OXIDATION		
6	0.047	-0.0	0.5	4.91	136	15	4	42	1jfs	46	339	PURINE REPRESSOR MUTANT-HYPOXANTHINE-PURF OPERATOR COMPLEX		
7	0.045	-0.0	0.3	4.60	110	13	8	42	3d8e	52	250	THERMUS THERMOPHILUS UROPORPHYRINOGEN III SYNTHASE		
8	0.045	-0.0	0.3	4.88	133	17	4	42	2pug	46	338	CRYSTAL STRUCTURE OF THE LACI FAMILY MEMBER, PURR, BOUND TO DNA: MINOR GROOVE BINDING BY ALPHA HELICES		
9	0.045	-0.0	0.3	4.88	133	17	4	42	2pua	46	339	CRYSTAL STRUCTURE OF THE LACI FAMILY MEMBER, PURR, BOUND TO DNA: MINOR GROOVE BINDING BY ALPHA HELICES		
10	0.045	-0.0	0.5	4.86	132	15	4	42	1bdh	46	338	PURINE REPRESSOR MUTANT-HYPOXANTHINE-PALINDROMIC OPERATOR COMPLEX		
11	0.044	-0.0	0.3	4.93	133	18	4	42	1vpw	46	338	STRUCTURE OF THE PURR MUTANT, L54M, BOUND TO HYPOXANTHINE AND PURF OPERATOR DNA		
12	0.044	-0.0	0.4	4.95	133	14	4	42	1qp7	44	338	PURINE REPRESSOR MUTANT-HYPOXANTHINE-PALINDROMIC OPERATOR COMPLEX		
13	0.044	-0.0	0.3	4.89	132	16	4	42	1bdi	48	338	PURINE REPRESSOR MUTANT-HYPOXANTHINE-PALINDROMIC OPERATOR COMPLEX		
14	0.042	-0.0	0.3	5.06	131	17	5	42	1qp4	44	338	PURINE REPRESSOR-HYPOXANTHINE-PALINDROMIC OPERATOR COMPLEX		
15	0.041	-0.0	0.3	5.04	129	17	4	42	1qp0	46	338	PURINE REPRESSOR-HYPOXANTHINE-PALINDROMIC OPERATOR COMPLEX		
16	0.040	-0.0	0.3	5.03	128	15	4	42	2pud	46	338	CRYSTAL STRUCTURE OF THE LACI FAMILY MEMBER, PURR, BOUND TO DNA: MINOR GROOVE BINDING BY ALPHA HELICES		
17	0.040	-0.0	0.3	4.95	126	17	4	42	2pub	46	338	CRYSTAL STRUCTURE OF THE LACI FAMILY MEMBER, PURR, BOUND TO DNA: MINOR GROOVE BINDING BY ALPHA HELICES		
18	0.040	-0.0	1.1	4.74	122	14	7	42	1qgb	44	338	PURINE REPRESSOR MUTANT-HYPOXANTHINE-PALINDROMIC OPERATOR COMPLEX		
19	0.039	-0.0	1.2	4.76	122	13	7	42	1jh9	46	339	PURINE REPRESSOR MUTANT-HYPOXANTHINE-PURF OPERATOR COMPLEX		
20	0.038	-0.0	1.3	4.29	112	14	6	42	1wet	46	338	STRUCTURE OF THE PURR-GUANINE-PURF OPERATOR COMPLEX		

Abbildung 5.2: MSDfold (SSM) Strukturvergleich der *Plasmodium falciparum* LytB-Struktur gegen die Gesamtheit aller PDB-Einträge.

5.1.2 Aktives Zentrum

Basierend auf den hier präsentierten Strukturmodellen von *Aquifex aeolicus* LytB (4.1.5) und *Plasmodium falciparum* LytB (4.2.5) können Hypothesen über die Lage des katalytischen Zentrums und über den möglichen Ablauf der Umsetzung von HMBPP in IPP und DMAPP entwickelt werden.

Die Umsetzung von HMBPP zu IPP und DMAPP ist eine Reduktionsreaktion. Daher ist die Involvierung des in LytB enthaltenen Eisen-Schwefel-Clusters als Elektronendonator dieser Reaktion notwendig. Bei der Betrachtung der Strukturen ist sowohl bei *Aquifex aeolicus* als auch bei *Plasmodium falciparum* LytB eine potentielle Substratbindungstasche vor dem Eisen-Schwefel-Cluster zu erkennen, welche durch jeweils zwei Loops der drei LytB-Domänen flankiert wird. In *Aquifex aeolicus* LytB sind diese aus Domäne A die Loops Thr36-Asn43 und Ile71-Pro77, aus der Domäne B die Loops Val119-His124 und Gln164-Asn168 und aus der Domäne C die Loops Gly217-Ser221 und Gly263-Pro267. Zusätzlich bauen die Reste Pro125 bis Val127 aus α 2B-Helix und Gly222 bis Thr224 der α 2C-Helix die hypothetische Bindungstasche auf. Diese Bereiche sind zwischen LytB Proteinen verschiedener Organismen hoch konserviert (Abb.5.3). Zusätzlich zeigen die Bereiche um die mit dem Eisen-Schwefel-Cluster gebundenen Cysteine ebenfalls vermehrt konservierte Aminosäurereste. Daher ist wahrscheinlich, dass sowohl der Mechanismus der Substratbindung als auch die enzymatische Umsetzung in allen LytB Proteinen gleich ist. Basierend auf der Annahme, dass HMBPP über sein O4 Atom an den Eisen-Schwefel-Cluster bindet, muss die Diphosphatgruppe von HMBPP mit Aminosäureresten der hypothetischen Bindungstasche interagieren. Typischerweise erfolgt die Bindung von Diphosphaten in Enzymen über DDXXD-Motive oder elektrostatische Interaktionen bzw. Wasserstoffbrücken mit Lysin, Arginin oder Histidin. Da sowohl in der *Aquifex aeolicus* LytB-Struktur als auch bei der *Plasmodium falciparum* LytB-Struktur weder DDXXD-Sequenzen noch konservierte Lysine oder Arginine vorkommen, bietet sich die Annahme an, dass die drei streng konservierten Histidine His42, His74 und His124 komplett oder teilweise an der Bindung des Diphosphats von HMBPP beteiligt sind. Basierend auf dem theoretischen Reaktionsmechanismus (1.4.7, Abb.1.10) kommt als einziger Protonendonator in der Reaktion das konservierte Glu126 in Frage.

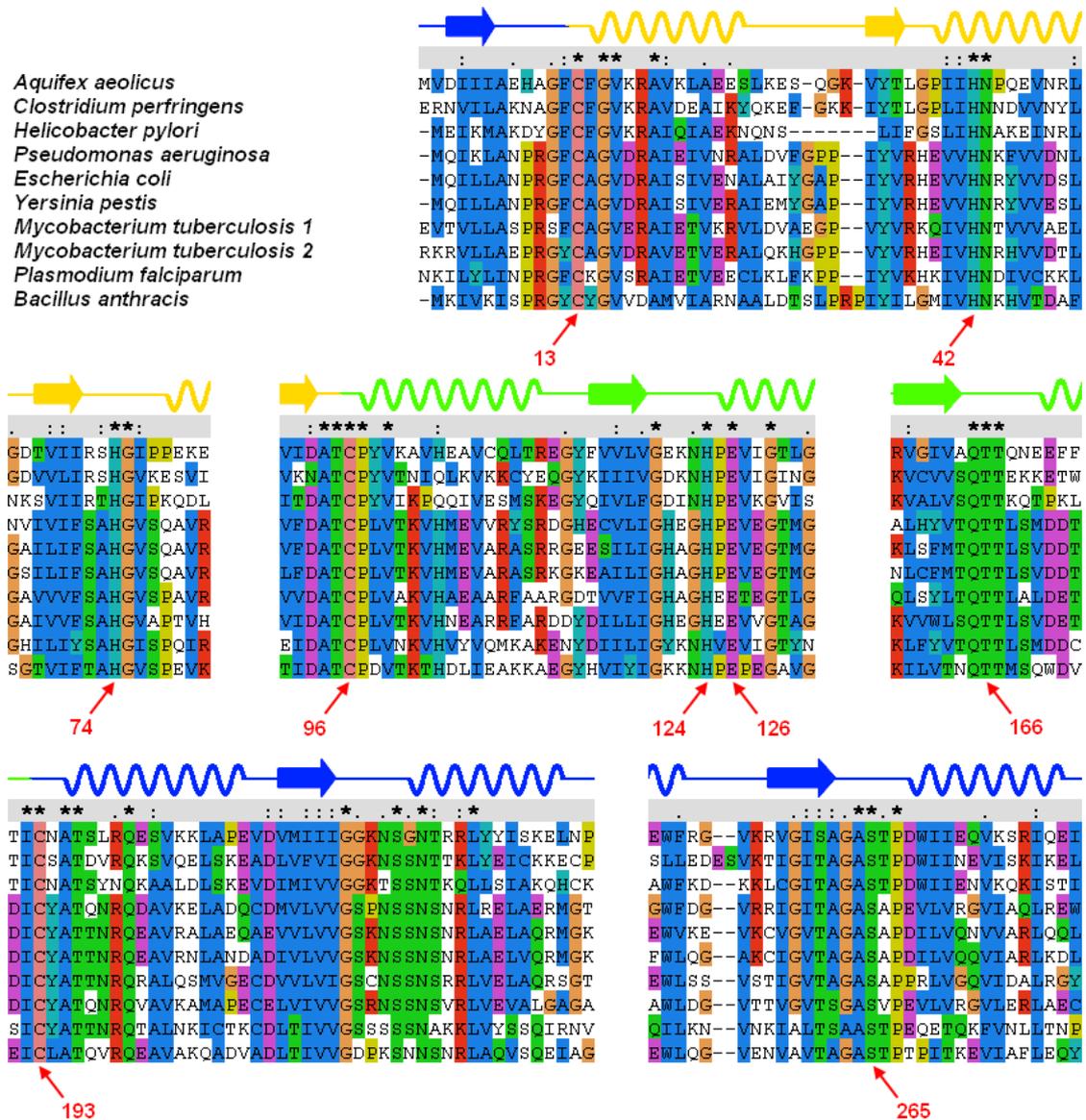


Abbildung 5.3: Sequenzvergleich ausgewählter Bereiche von LytB Proteinen aus verschiedenen Organismen mit ClustalX 2.0. Streng konservierte Aminosäure-Reste sind mit * markiert, einfach konservierte Sequenzbereiche sind mit : und . gekennzeichnet. Die Nummerierung der Aminosäuren ist auf die *Aquifex aeolicus* LytB Primärsequenz bezogen und die korrespondierende Sekundärstruktur aus *Aquifex aeolicus* LytB ist angegeben.

5.1.3 Eisen-Schwefel-Cluster

Neben den potentiell an der Reaktion beteiligten Aminosäureresten muss auch die Art des in LytB gebundenen Eisen-Schwefel-Clusters für ein Verständnis des LytB-Reaktionsmechanismus betrachtet werden. Bevor strukturelle Daten für LytB vorlagen, wurde bei mechanistischen Überlegungen von einem [4Fe-4S]-Cluster ausgegangen, welcher durch EPR experimentell belegt wurde. Nun zeigt sich in den Strukturen von *Aquifex aeolicus* LytB und *Plasmodium falciparum* LytB ein eindeutiger [3Fe-4S]-Cluster. Ebenso zeigt sich in der von Gräwert et al. gelösten Struktur von *Escherichia coli* LytB ein [3Fe-4S]-Cluster [105].

Welche dieser Cluster-Varianten ist nun am plausibelsten? Für einen [3Fe-4S]-Cluster spricht, dass er in allen drei bekannten Strukturen gefunden wurde. Weiterhin fanden Gräwert et al. bei ihren Kristallisationsexperimenten heraus, dass in einem *in vitro* Aktivitätstest eingesetzte Kristalle von *Escherichia coli* LytB weiterhin eine enzymatische Aktivität von 70 % der normalen Aktivität besaßen. Daraus schlossen sie auf [3Fe-4S] als aktive Form des Eisen-Schwefel-Clusters und stellten auf dieser Basis einen Reaktionsmechanismus auf [105].

Für einen [4Fe-4S]-Cluster spricht die bei anderen Eisen-Schwefel-Enzymen gemachte Beobachtung, dass das nicht an Cystein gebundene Eisen eines [4Fe-4S]-Clusters unter oxidativem oder chemischem Stress dissoziiert und ein [3Fe-4S]-Cluster entsteht [106]. Dieser [3Fe-4S]-Cluster kann sowohl zu weiterer Degradierung des Clusters und damit zur Zerstörung des Proteins führen, aber auch als stabiler Zustand bestehen bleiben [107]. Ein Hinweis, dass dieses bei LytB der Fall sein könnte, findet sich in der Kristallstruktur von *Plasmodium falciparum* LytB. In dieser ist ein freies Eisen-Atom an die drei konservierten Histidine in der Substratbindungstasche koordiniert. Da bei der Kristallisation von *Plasmodium falciparum* LytB kein Eisen zugegeben wurde, ist es sehr wahrscheinlich, dass dieses freie Eisen-Atom das dissoziierte vierte Eisen aus dem Eisen-Schwefel-Cluster ist.

Ein weiterer Hinweis auf die leichte Dissoziierbarkeit des vierten Eisens ist, dass eine Zugabe des Chelators für di- und trivalente Metallionen (EDTA) zur vollständigen Inaktivierung von *Aquifex aeolicus* LytB führte (4.1.7). Weiterhin zeigte sich, dass die so hergestellte inaktive LytB-Spezies in ihrer Farbe (Abb.4.6) dem kristallisierten LytB (Abb.4.2 und Abb.4.9) gleicht.

Wäre die [3Fe-4S]-Form die aktive Form, so könnte sie durch die EDTA-Zugabe nicht inaktiviert werden, da die drei Eisen-Atome durch die Schwefelatome abgeschirmt sind. Die Reaktivierung durch alleinige Zugabe von FeCl₃ in reduktiver Umgebung ist ebenfalls ein Indiz dafür, dass die aktive Form von LytB einen [4Fe-4S]-Cluster enthält. Zusätzlich sollte keine Reaktivierung durch alleinige Zugabe von FeCl₃ möglich sein, weil die Entfernung eines Eisen-Atoms aus dem [3Fe-4S]-Cluster die Sekundärstruktur von LytB durch die Spaltung der Eisen-Cystein-Bindung schwächen würde, so dass eine Reaktivierung nur unter Bedingungen für die vollständige Rekonstitution von Eisen-Schwefel-Clustern (3.2.2) möglich wäre. Die von Gräwert et al. getätigte Beobachtung, dass kristallisiertes *Escherichia coli* LytB mit [3Fe-4S]-Cluster immer noch 70 % Aktivität zeigt [105], lässt sich wohl darauf zurückführen, dass durch die Resuspendierung der Kristalle das während der Kristallisation abgespaltene Eisen-Ion wieder an den [3Fe-4S]-Cluster bindet, in einem Prozess ähnlich der Reaktivierung durch FeCl₃-Zugabe nach Behandlung mit EDTA (4.1.7).

Basierend auf diesen Überlegungen scheint es sehr schlüssig, dass [4Fe-4S] die aktive Form des Eisen-Schwefel-Clusters in LytB darstellt. Daher muss für eine korrekte Betrachtung des katalytischen Zentrums von LytB von einem [4Fe-4S]-Cluster ausgegangen werden. Bedingt durch die Geometrie des experimentell bestimmten [3Fe-4S]-Clusters in allen bekannten LytB-Strukturen und des geringen Unterschieds zu einem [4Fe-4S]-Cluster kann das fehlende Eisen einfach modelliert werden.

5.1.4 Bindung von HMBPP an LytB

Auf Basis der Überlegungen zur Art des Eisen-Schwefel-Clusters als [4Fe-4S]-Cluster (5.1.3) und den hochkonservierten Aminosäureresten im vermuteten aktiven Zentrum (5.1.2) lässt sich ein Modell der HMBPP-Bindung an LytB aufstellen.

Die im *Department of Chemistry* der *University of Illinois at Urbana-Champaign* (Arbeitsgruppe Prof. Eric Oldfield) durchgeführte Modellierung der HMBPP-Bindung an *Aquifex aeolicus* bestärken einige der vorher aufgestellten Vermutungen.

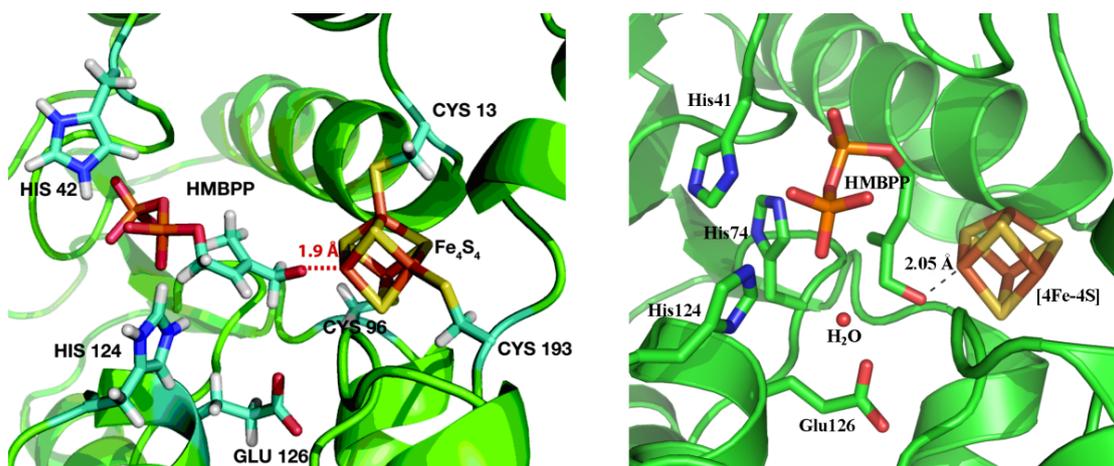


Abbildung 5.4: links: Mit Glide berechnete Bindung von HMBPP an *Aquifex aeolicus* LytB [104], rechts: *Escherichia coli* LytB:HMBPP-Komplex nach Gräwert et al. [108]

HMBPP ist zwischen den konservierten Aminosäuren His42, His124 und Glu126 und dem [4Fe-4S]-Cluster eingelagert (Abb.5.4). In dem Bindungsmodell koordiniert His42 das β -Phosphat, während His124 mit dem α -Phosphat von HMBPP interagiert. Weiterhin ist das O4-Atom von HMBPP nah (ca. 1,9 Å) am vierten Eisen-Atom des [4Fe-4S]-Clusters lokalisiert. Dadurch ist die Carboxylgruppe des vermuteten Protonendonors Glu126 nur ca. 4 Å von dem C2 Atom des HMBPP entfernt. Für die Protonierung müsste das Carboxyl-Proton daher nur ca. 2 Å bis zu seiner Position in dem entstehenden Produkt IPP überwinden; dieser kurze Abstand unterstützt die postulierte Rolle von Glu126 in der Reaktion.

In dem Bindungsmodell ist das Glu126-Carboxyl unter der Doppelbindung angeordnet, welches zu einem Angriff an der *si*-Seite führen würde, resultierend in dem Produkt IPP. In Abwesenheit eines alternativen Protonendonors für die Protonierung des C4 Atoms, welches für die Bildung von DMAPP nötig ist, erscheint es einleuchtend, dass Glu126 dort involviert ist. Das in LytB zu beobachtende Produktverhältnis von 5:1 zwischen IPP und DMAPP lässt sich aus den bisher vorliegenden Daten nicht erklären; aber es erscheint möglich, dass dieses auf unterschiedliche Konformationen der Glu126 Seitenkette zurückzuführen ist.

Kurz vor Abschluss dieser Arbeit wurden von Gräwert et al. mehrere Co-Kristallstrukturen von *Escherichia coli* LytB gelöst. Neben dem LytB:HMBPP-Komplex

konnten Gräwert et al. auch LytB:DMAPP, LytB:IPP, LytB:PP_i und eine LytB-Struktur mit konvertiertem Substrat als Struktur darstellen [108]. In diesen Strukturen konnte das vermutete aktive Zentrum (5.1.2) bestätigt werden. Zusätzlich konnte in der LytB:HMBPP-Struktur erstmals ein intakter [4Fe-4S]-Cluster nachgewiesen werden, welches die angestellten Überlegungen über die Art des Eisen-Schwefel-Clusters (5.1.3) bestätigt (Abb.5.4).

In der von Gräwert et al. vorgestellten Struktur von LytB:HMBPP nimmt HMBPP im katalytischen Zentrum eine haarnadelähnliche Form an, bei der das O4-Atom 2,05 Å vom vierten Eisen-Atom des [4Fe-4S]-Clusters und in Wasserstoffbrücken-Distanz zu Thr167 lokalisiert ist. Die Phosphat-Gruppe ist mit den Histidinen His41, His74 und His124 koordiniert. Zusätzlich konnten Gräwert et al. ein Wassermolekül lokalisieren, welches mit Glu126, Gln166, Thr168 und dem β-Phosphat von HMBPP koordiniert. Zusammen ergibt dieses ein Wasserstoffbrückenbindungssystem [108].

Wie unterscheidet sich dieser experimentell bestimmte Komplex von der mit Glide berechneten Bindungsvorhersage für *Aquifex aeolicus* LytB?

Die Lokalisierung des O4-Atoms nahe dem Eisen-Schwefel-Cluster konnte ebenso wie die Interaktion der Phosphat-Gruppe mit den Histidin-Resten korrekt vorhergesagt werden. Abweichend von der Vorhersage einer eher linearen Anordnung von HMBPP im aktiven Zentrum nimmt HMBPP in der LytB:HMBPP-Struktur eine haarnadelähnliche Konformation in einer dicht gepackten Bindungstasche an. Die Abweichung der Vorhersage basiert auf der Ungenauigkeit solcher Berechnungen, da die berechneten Modelle meist energetische Nebenminima darstellen. Daher kann die signifikante Konformationsänderung von einer offenen LytB-Struktur, wie bei *Aquifex aeolicus* LytB, zu einer wie bei Gräwert et al. experimentell bestimmten geschlossenen LytB:HMBPP-Struktur nicht *in silico* vorhergesagt werden.

Interessanterweise ist die Struktur von *Aquifex aeolicus* LytB die einzige LytB-Struktur, welche eine offene Konformation aufweist. Daher ist diese Struktur das derzeit beste Modell für eine LytB-Struktur ohne Substrat- oder Produkt-Bindung.

5.1.5 Bindung des Elektronendonors

Für den Ablauf der von LytB vermittelten Katalyse von HMBPP nach IPP und DMAPP werden Elektronen benötigt. Dieser Elektronentransfer ist ebenfalls ein potentieller Angriffspunkt für die Entwicklung inhibitorischer Verbindungen.

Die Protein/Protein-Bindungsexperimente mit *Plasmodium falciparum* LytB und Ferredoxin zeigen zum ersten Mal mögliche Wege für die Elektronenübertragung auf LytB. Aus den 10 mit ClusPro errechneten Bindungsstrukturen ist eine Tendenz für eine Bindung von Ferredoxin an der von der Bindungstasche abgewandten Seite von LytB zu erkennen (Tab.5.1).

Tabelle 5.1: Ferredoxin-Interaktion mit LytB.

	Domäne A	Domäne B	Domäne C	C-Terminus
Dockingmodell				
Modell 1	X	X		X
Modell 2		X		X
Modell 3		X	X	
Modell 4	X	X		
Modell 5	X	X		X
Modell 6				X
Modell 7		X		X
Modell 8	X	X		X
Modell 9	X	X		X
Modell 10				X

Dieses bietet sich an, weil die Rückseite des Eisen-Schwefel-Clusters nur wenige Ångström vom Solvens entfernt liegt. Besonders klein ist der Abstand, an der das C-terminale Segment die Schnittstelle der drei anderen Domänen passiert. Zusätzlich sind in diesem Bereich der *Plasmodium falciparum* LytB-Struktur zwei aromatische Aminosäurereste anzutreffen: Tyr197, welches dem Eisen-Schwefel-Cluster-bindenden Cys196 benachbart ist, und Trp303, welches auf dem C-terminalen Segment lokalisiert ist. Neben der Tatsache, dass aromatische Aminosäurereste häufig die Vermittler in Protein/Protein-Interaktionen sind, ist Tryptophan häufig als Elektronenüberträger zwischen Redox-Cofaktoren in Proteinen beteiligt. Bei der

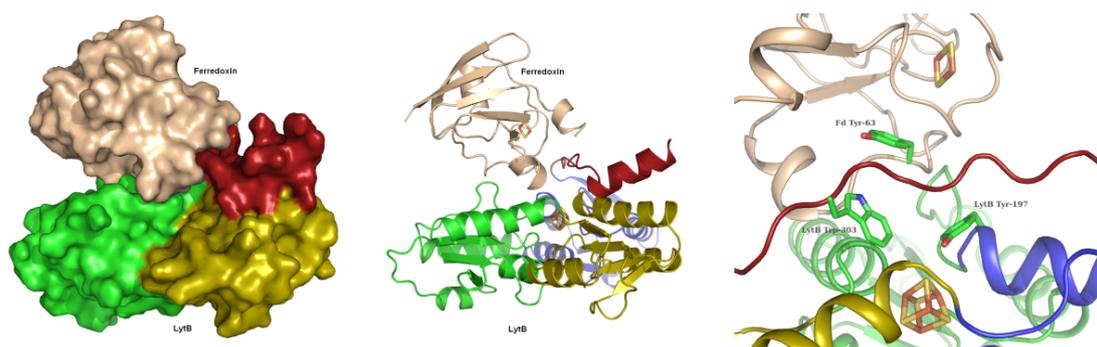


Abbildung 5.5: Ferredoxin/LytB-Bindungsmodell 2.

Bewertung der mit ClusPro berechneten Ferredoxin/LytB-Bindungsmodelle muss die Beteiligung dieser beiden Aminosäurereste als wichtiger Faktor mit einbezogen werden. Weiterhin sollten die Eisen-Schwefel-Cluster beider Proteine im Bindungsmodell möglichst nah beieinander liegen.

Unter der Annahme, dass die Ferredoxin-Bindung auf der dem katalytischen Zentrum abgewandten Seite von LytB erfolgt, können alle berechneten Bindungsmodelle, bei der die Bindung von Ferredoxin in zu großer Entfernung davon erfolgt, außer Acht gelassen werden. Die Bindungsmodelle 1, 2, 5, 7, 8 und 9 (Abb.4.13) zeigen eine Bindung von Ferredoxin an LytB in unmittelbarer Nähe dieses als wahrscheinlichste Bindungsposition angenommenen Bereichs.

Unter Anwendung der oben aufgeführten Überlegungen zeigt Bindungsmodell 2 (Abb.5.5) die größte Kompatibilität mit diesen Kriterien. In diesem Modell beträgt der Abstand zwischen dem Ferredoxin [2Fe-2S]-Cluster und dem LytB [4Fe-4S]-Cluster ca. 16 Å. Zwischen diesen beiden Eisen-Schwefel-Clustern ist ein aromatisches System, bestehend aus Tyr197 und Trp303 von LytB und Tyr63 von Ferredoxin, zu erkennen. Diese bilden ein Dreieck aus aromatischen Aminosäureresten, über das möglicherweise ein Elektron vom Ferredoxin [2Fe-2S]-Cluster übertragen werden kann. Die in PyMol bestimmten Abstände lassen eine Elektronenübertragung über Ferredoxin Tyr63 und LytB Trp303 am attraktivsten erscheinen (Tab.5.2).

Lässt sich dieses Modell auf LytB-Enzyme anderer Organismen übertragen? Aus vorhergehenden Studien ist bekannt, dass das Elektronendonorsystem für LytB abhängig vom Organismus ist. So konnte für *Plasmodium falciparum* LytB ein

Tabelle 5.2: Distanzen im Bindungsmodell 2.

	[2Fe-2S]	Tyr63	[4Fe-4S]	Tyr197	Trp303
[2Fe-2S]	N/A	6 Å	16 Å	11,5 Å	11,4 Å
Tyr63	6 Å	N/A	11,2 Å	8,7 Å	6 Å
[4Fe-4S]	16 Å	11,2 Å	N/A	4,5 Å	4,6 Å
Tyr197	11,5 Å	8,7 Å	4,5 Å	N/A	5,1 Å
Trp303	11,4 Å	6 Å	4,6 Å	5,1 Å	N/A

System aus Ferredoxin und Ferredoxin-NADP⁺-Reduktase als Elektronendonator ermittelt werden. Im Gegensatz dazu wurde für *Escherichia coli* LytB ein Elektronendonorsystem aus Flavodoxin und Flavodoxin-Reduktase bestimmt. Daher ist zu vermuten, dass das Elektronendonorsystem für LytB sehr variabel ist. Weitere Evidenz dafür ist, dass in dem hier gezeigten Bindungsmodell für *Plasmodium falciparum* LytB dem Tryptophan Trp303 eine wichtige Rolle zukommt, obwohl dieses auf dem C-terminalen Segment liegt, welches nicht in allen LytB-Enzymen vorkommt. Ein Beispiel für die Abwesenheit dieses C-terminalen Bereichs ist die in dieser Arbeit gezeigte Struktur von *Aquifex aeolicus* LytB. Zusätzlich haben Sequenzalignments gezeigt, dass der C-terminale Bereich von *Plasmodium falciparum* LytB nur Sequenzähnlichkeiten mit anderen LytB-Enzymen aus anderen *Plasmodium*-Spezies aufweist. Im Kontrast dazu ist das C-terminale Segment in der von Gräwert et al. gelösten Struktur von *Escherichia coli* LytB an der Bindung zwischen den Monomeren im *Escherichia coli* LytB-Dimer beteiligt.

Es erscheint denkbar, dass die Variabilität oder auch Abwesenheit des C-terminalen Segments für die Selektivität der Elektronendonorsysteme verantwortlich ist.

Für eine schlüssige Aufklärung der verschiedenen Elektronendonorsysteme ist es aber für die Zukunft unerlässlich, über den experimentellen Weg strukturelle Daten zu erhalten.

5.2 GcpE

5.2.1 Kristallisation

Die bisher aufgenommenen Datensätze von *Thermus thermophilus* GcpE-Kristallen lassen vermuten, dass ein Strukturmodell auf Basis dieser Daten erstellt werden kann.

Für eine spätere Betrachtung des aktiven Zentrums und eine Beurteilung der enzymatischen Mechanismen auf Strukturbasis ist es zwingend notwendig, Messdaten mit einer Auflösung besser als die bisher erreichten 2,7 Å aufzunehmen. Bisherige *Thermus thermophilus* GcpE-Kristalle zeigten fast nur maximale Auflösungen bis zu 3 Å, und nur bei einem Kristall konnte ein Datensatz bis 2,7 Å aufgenommen werden. Da *Thermus thermophilus* GcpE unter mehreren verschiedenen Bedingungen mit 2-Methyl-2,4-pentandiol kristallisiert, erscheint es vielversprechend, die Kristallisationsbedingungen weiter zu optimieren. Zusätzlich erscheint eine Co-Kristallisation mit dem Substrat MEcPP ratsam.

6 Zusammenfassung

Der MEP-Weg stellt auf Grund seiner besonderen Eigenschaften ein interessantes Ziel für die *de novo* Entwicklung antimikrobieller und herbizider Wirkstoffe dar. Mit Ausnahme der letzten beiden Enzyme GcpE und LytB ist der MEP-Weg schon strukturell geklärt. Um diese Lücke zu schliessen, wurden in dieser Arbeit Kristallisationsexperimente mit *Aquifex aeolicus* und *Plasmodium falciparum* LytB und *Thermus thermophilus* GcpE durchgeführt.

Durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente konnten die Strukturen von *Aquifex aeolicus* und *Plasmodium falciparum* LytB per Röntgenstrukturanalyse geklärt werden. Es konnte gezeigt werden, dass LytB eine bisher unbekannte Proteinfaltung besitzt: Drei α/β -Domänen, welche um ein zentrales Eisen-Schwefel-Cluster im aktiven Zentrum kleeblattähnlich angeordnet sind. Außerdem konnte in *Plasmodium falciparum* LytB ein zusätzliches kurzes C-terminales Segment bestimmt werden. Diese strukturellen Beobachtungen werden von der später gelösten Struktur von *Escherichia coli* LytB durch Gräwert et al. bestätigt. Das zentrale Eisen-Schwefel-Cluster wurde in allen Kristallstrukturen als [3Fe-4S] bestimmt; experimentelle Beobachtungen und mechanistische Überlegungen lassen aber ein [4Fe-4S]-Cluster im aktiven Zentrum als wahrscheinlicher erscheinen. Ausgehend davon wurde HMBPP in die *Aquifex aeolicus* LytB-Struktur modelliert, welches einen ersten Einblick in die Substratbindung und den Reaktionsmechanismus von LytB gewährt. Zusätzlich konnte durch *in silico* Protein/Protein-Bindungsexperimente eine Vorstellung über den Elektronendonator-Mechanismus in *Plasmodium falciparum* entwickelt werden.

Die Strukturaufklärung von *Thermus thermophilus* GcpE konnte experimentell bis zu einer erfolgreichen Bestimmung der Raumgruppe und Phasen gebracht werden. Die Basis für eine baldige Strukturbestimmung dieses Enzyms ist daher gegeben.

7 Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström
Abb.	Abbildung
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CV	<i>column volume</i> (Säulenvolumen)
Da	Dalton
EPR	<i>electron paramagnetic resonance</i>
et. al.	und andere
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
lacO	Laktose Operon
LB-Medium	Luria Bertani medium
MAD	<i>multiple anomale dispersion</i>
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
OD	optische Dichte
PDB	<i>protein data bank</i>
PSI	Paul-Scherrer-Institut
Q-Wert	<i>quality of alignment</i> -Wert
SEC	<i>size-exclusion chromatography</i>
SLS	Swiss Light Source
Tab.	Tabelle
TetR	Tetracyclin Repressor
UV/VIS	Ultraviolett/Visuell
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
z.B.	zum Beispiel

Enzyme

BSA	Bovines Serumalbumin
DPMD	Diphosphomevalonat-Decarboxylase
DXS	1-Deoxy-D-Xylulose-5-phosphat-Synthase
GHMP-Kinase	Galacto-, Homoserin-, Mevalonat-, Phosphomevalonat-Kinase
HMGR	Hydroxymethylglutaryl-CoenzymA-Reduktase
HMGS	Hydroxymethylglutaryl-CoenzymA-Synthase
IspC/DXR	1-Deoxy-D-Xylulose-5-phosphat-Reduktoisomerase
IspD/YgbP	4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol- Cytidyltransferase
IspE/YchB	4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-Kinase
IspF/YgbB	2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat-Synthase
IspG/GcpE	(E)-4-Hydroxy-3-methyl-but-2-enyldiphosphat-Synthase
IspH/LytB	(E)-4-Hydroxy-3-methyl-but-2-enyldiphosphat-Reduktase
MK	Mevalonatkinase
PDH	Pyruvatdehydrogenase
PMK	Phosphomevalonatkinase

Verbindungen

Acetyl-CoA	Acetyl-CoenzymA
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ADP	Adenosindiphosphat
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
CDP-ME	4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol
CDP-MEP	4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-2-phosphat
CMP	Cytidinmonophosphat
CoA	CoenzymA
CTP	Cytidintriphosphat
DEAE	Diethylaminoethylzellulose
DMAPP	Dimethylallylpyrophosphat

DOXP	1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat
DPP	Decaprenylpyrophosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FPP	Farnesylpyrophosphat
GA3P	Glyceraldehyd-3-phosphat
GFPP	Geranylarnesylpyrophosphat
GGPP	Geranylgeranylpyrophosphat
GPP	Geranylpyrophosphat
HepPP	Heptapyrophosphat
HexPP	Hexaprenylpyrophosphat
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoenzymA
HMBPP	(E)-4-Hydroxy-3-methyl-but-2-enyldiphosphat
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IPP	Isopentylpyrophosphat
MEcPP	2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat
MEP	2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat
MPD	2-Methyl-2,4-pentandiol
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
OPP	Octapyrophosphat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
PEG	Polyethylenglykol
PP _i	Pyrophosphat (Diphosphat)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDT	Natriumdithionit
SPP	Solanesylpyrophosphat
Tet	Tetracyclin

Programme

APBS	<i>Adaptive Poisson-Boltzmann Solver</i>
CCP4	<i>Collaborative Computational Project No. 4</i>
CNS	<i>Crystallography and NMR System</i>
COOT	<i>Crystallographic Object-Oriented Toolkit</i>

SSM	<i>Secondary Structure Matching</i>
TLS	<i>translation, liberation, screw rotation</i>
XDS	<i>X-ray Detector Software</i>

Literaturverzeichnis

- [1] M. Rohmer. *Comprehensive Natural Products Chemistry*, volume Vol. 2. Elsevier Science Publishers B.V., 1999.
- [2] J. C. Sacchettini and C. D. Poulter. Creating isoprenoid diversity. *Science*, 277(5333):1788–1789, Sep 1997.
- [3] Tomohisa Kuzuyama and Haruo Seto. Diversity of the biosynthesis of the isoprene units. *Nat Prod Rep*, 20(2):171–183, Apr 2003.
- [4] K. C. Wang and S. Ohnuma. Isoprenyl diphosphate synthases. *Biochim Biophys Acta*, 1529(1-3):33–48, Dec 2000.
- [5] S. Horbach, H. Sahm, and R. Welle. Isoprenoid biosynthesis in bacteria: two different pathways? *FEMS Microbiol Lett*, 111(2-3):135–140, Aug 1993.
- [6] J. L. Goldstein and M. S. Brown. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*, 343(6257):425–430, Feb 1990.
- [7] Carl J Vaughan and Antonio M Gotto. Update on statins: 2003. *Circulation*, 110(7):886–892, Aug 2004.
- [8] James K Liao and Ulrich Laufs. Pleiotropic effects of statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 45:89–118, 2005.
- [9] G. A. Sprenger, U. Schörken, T. Wiegert, S. Grolle, A. A. de Graaf, S. V. Taylor, T. P. Begley, S. Bringer-Meyer, and H. Sahm. Identification of a thiamin-dependent synthase in escherichia coli required for the formation of the 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate precursor to isoprenoids, thiamin, and pyridoxol. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(24):12857–12862, Nov 1997.

-
- [10] M. Rohmer. The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. *Nat Prod Rep*, 16(5):565–574, Oct 1999.
- [11] Manuel Rodríguez-Concepción and Albert Boronat. Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. a metabolic milestone achieved through genomics. *Plant Physiol*, 130(3):1079–1089, Nov 2002.
- [12] W. Eisenreich, A. Bacher, D. Arigoni, and F. Rohdich. Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway. *Cell Mol Life Sci*, 61(12):1401–1426, Jun 2004.
- [13] William N Hunter. The non-mevalonate pathway of isoprenoid precursor biosynthesis. *J Biol Chem*, 282(30):21573–21577, Jul 2007.
- [14] Elizabeth Cordoba, Mari Salmi, and Patricia León. Unravelling the regulatory mechanisms that modulate the mep pathway in higher plants. *J Exp Bot*, 60(10):2933–2943, 2009.
- [15] Song Xiang, Gerlinde Usunow, Gudrun Lange, Marco Busch, and Liang Tong. Crystal structure of 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate synthase, a crucial enzyme for isoprenoids biosynthesis. *J Biol Chem*, 282(4):2676–2682, Jan 2007.
- [16] Erik Fiedler, Stina Thorell, Tatyana Sandalova, Ralph Golbik, Stephan König, and Gunter Schneider. Snapshot of a key intermediate in enzymatic thiamin catalysis: crystal structure of the alpha-carbanion of (alpha,beta-dihydroxyethyl)-thiamin diphosphate in the active site of transketolase from *saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(2):591–595, Jan 2002.
- [17] Shunsuke Yajima, Kodai Hara, Daisuke Iino, Yasuyuki Sasaki, Tomohisa Kuzuyama, Kanju Ohsawa, and Haruo Seto. Structure of 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate reductoisomerase in a quaternary complex with a magnesium ion, nadph and the antimalarial drug fosmidomycin. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 63(Pt 6):466–470, Jun 2007.

- [18] J. Zeidler, J. Schwender, C. Muller, J. Wiesner, C. Weidemeyer, E. Beck, H. Jomaa, and H. K. Lichtenthaler. Inhibition of the non-mevalonate 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate pathway of plant isoprenoid biosynthesis by fosmidomycin. *Z Naturforsch C*, 53:980–986, 1998.
- [19] H. Jomaa, J. Wiesner, S. Sanderbrand, B. Altincicek, C. Weidemeyer, M. Hintz, I. Türbachova, M. Eberl, J. Zeidler, H. K. Lichtenthaler, D. Soldati, and E. Beck. Inhibitors of the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis as antimalarial drugs. *Science*, 285(5433):1573–1576, Sep 1999.
- [20] Philip J Proteau. 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate reductoisomerase: an overview. *Bioorg Chem*, 32(6):483–493, Dec 2004.
- [21] Klaus Reuter, Silke Sanderbrand, Hassan Jomaa, Jochen Wiesner, Irina Steinbrecher, Ewald Beck, Martin Hintz, Gerhard Klebe, and Milton T Stubbs. Crystal structure of 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate reductoisomerase, a crucial enzyme in the non-mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *J Biol Chem*, 277(7):5378–5384, Feb 2002.
- [22] Stefano Ricagno, Sigrid Grolle, Stephanie Bringer-Meyer, Hermann Sahn, Ylva Lindqvist, and Gunter Schneider. Crystal structure of 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate reductoisomerase from *zymomonas mobilis* at 1.9-Å resolution. *Biochim Biophys Acta*, 1698(1):37–44, Apr 2004.
- [23] Lena M Henriksson, Christofer Björkelid, Sherry L Mowbray, and Torsten Unge. The 1.9 Å resolution structure of mycobacterium tuberculosis 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, a potential drug target. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 62(Pt 7):807–813, Jul 2006.
- [24] Lena M Henriksson, Torsten Unge, Jens Carlsson, Johan Aqvist, Sherry L Mowbray, and T. Alwyn Jones. Structures of mycobacterium tuberculosis 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate reductoisomerase provide new insights into catalysis. *J Biol Chem*, 282(27):19905–19916, Jul 2007.
- [25] J. Osipiuk, R. Mulligan, J. Stam, W.F. Anderson, and A. Joachimiak. X-ray crystal structure of 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate reductoisomerase from *yersinia pestis*. To be published.

-
- [26] Shunsuke Yajima, Takamasa Nonaka, Tomohisa Kuzuyama, Haruo Seto, and Kanju Ohsawa. Crystal structure of 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate reductoisomerase complexed with cofactors: implications of a flexible loop movement upon substrate binding. *J Biochem*, 131(3):313–317, Mar 2002.
- [27] Stefan Steinbacher, Johannes Kaiser, Wolfgang Eisenreich, Robert Huber, Adelbert Bacher, and Felix Rohdich. Structural basis of fosmidomycin action revealed by the complex with 2-c-methyl-d-erythritol 4-phosphate synthase (ispC). implications for the catalytic mechanism and anti-malaria drug development. *J Biol Chem*, 278(20):18401–18407, May 2003.
- [28] Shunsuke Yajima, Kodai Hara, John M Sanders, Fenglin Yin, Kanju Ohsawa, Jochen Wiesner, Hassan Jomaa, and Eric Oldfield. Crystallographic structures of two bisphosphonate:1-deoxyxylulose-5-phosphate reductoisomerase complexes. *J Am Chem Soc*, 126(35):10824–10825, Sep 2004.
- [29] Aengus Mac Sweeney, Roland Lange, Roberta P M Fernandes, Henk Schulz, Glenn E Dale, Alice Douangamath, Philip J Proteau, and Christian Oefner. The crystal structure of e.coli 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate reductoisomerase in a ternary complex with the antimalarial compound fosmidomycin and nadph reveals a tight-binding closed enzyme conformation. *J Mol Biol*, 345(1):115–127, Jan 2005.
- [30] Susan Lauw, Victoria Illarionova, Adelbert Bacher, Felix Rohdich, and Wolfgang Eisenreich. Biosynthesis of isoprenoids: studies on the mechanism of 2c-methyl-d-erythritol-4-phosphate synthase. *FEBS J*, 275(16):4060–4073, Aug 2008.
- [31] S. B. Richard, M. E. Bowman, W. Kwiatkowski, I. Kang, C. Chow, A. M. Lillo, D. E. Cane, and J. P. Noel. Structure of 4-diphosphocytidyl-2-c-methylerythritol synthetase involved in mevalonate-independent isoprenoid biosynthesis. *Nat Struct Biol*, 8(7):641–648, Jul 2001.
- [32] Lauris E Kemp, Charles S Bond, and William N Hunter. Structure of a tetragonal crystal form of escherichia coli 2-c-methyl-d-erythritol 4-phosphate

- cytidyltransferase. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 59(Pt 3):607–610, Mar 2003.
- [33] J. Badger, J. M. Sauder, J. M. Adams, S. Antonysamy, K. Bain, M. G. Bergs-
eid, S. G. Buchanan, M. D. Buchanan, Y. Batiyenko, J. A. Christopher,
S. Emtage, A. Eroshkina, I. Feil, E. B. Furlong, K. S. Gajiwala, X. Gao,
D. He, J. Hendle, A. Huber, K. Hoda, P. Kearins, C. Kissinger, B. Laubert,
H. A. Lewis, J. Lin, K. Loomis, D. Lorimer, G. Louie, M. Maletic, C. D.
Marsh, I. Miller, J. Molinari, H. J. Muller-Dieckmann, J. M. Newman, B. W.
Noland, B. Pagarigan, F. Park, T. S. Peat, K. W. Post, S. Radojicic, A. Ra-
mos, R. Romero, M. E. Rutter, W. E. Sanderson, K. D. Schwinn, J. Tresser,
J. Winhoven, T. A. Wright, L. Wu, J. Xu, and T. J R Harris. Structural ana-
lysis of a set of proteins resulting from a bacterial genomics project. *Proteins*,
60(4):787–796, Sep 2005.
- [34] Joint Center for Structural Genomics (JCSG). Crystal structure of 2-c-
methyl-d-erythritol 4-phosphate cytidyltransferase (tm1393) from thermo-
toga maritima at 2.67 a resolution. To be published.
- [35] Mads Gabrielsen, Johannes Kaiser, Felix Rohdich, Wolfgang Eisenreich, Ralf
Laupitz, Adelbert Bacher, Charles S Bond, and William N Hunter. The cry-
stal structure of a plant 2c-methyl-d-erythritol 4-phosphate cytidyltrans-
ferase exhibits a distinct quaternary structure compared to bacterial homolo-
gues and a possible role in feedback regulation for cytidine monophosphate.
FEBS J, 273(5):1065–1073, Mar 2006.
- [36] L. Chen, M. Tsukuda, A. Ebihara, A. Shinkai, S. Kuramitsu, S. Yokoyama, L-
Q. Chen, Z-J. Liu, D. Lee, S-H. Chang, D. Nguyen, J.P. Rose, and B-C. Wang.
Crystal structure of 2-c-methyl-d-erythritol 4-phosphate cytidyltransferase
from thermus thermophilus hb8. To be published.
- [37] Mads Gabrielsen, Charles S Bond, Irene Hallyburton, Stefan Hecht, Adelbert
Bacher, Wolfgang Eisenreich, Felix Rohdich, and William N Hunter. He-
xameric assembly of the bifunctional methylerythritol 2,4-cyclodiphosphate
synthase and protein-protein associations in the deoxy-xylulose-dependent

- pathway of isoprenoid precursor biosynthesis. *J Biol Chem*, 279(50):52753–52761, Dec 2004.
- [38] Mads Gabrielsen, Felix Rohdich, Wolfgang Eisenreich, Tobias Gräwert, Stefan Hecht, Adelbert Bacher, and William N Hunter. Biosynthesis of isoprenoids: a bifunctional ispfd enzyme from campylobacter jejuni. *Eur J Biochem*, 271(14):3028–3035, Jul 2004.
- [39] Stéphane B Richard, Jean-Luc Ferrer, Marianne E Bowman, Antonietta M Lillo, Charles N Tetzlaff, David E Cane, and Joseph P Noel. Structure and mechanism of 2-c-methyl-d-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase. an enzyme in the mevalonate-independent isoprenoid biosynthetic pathway. *J Biol Chem*, 277(10):8667–8672, Mar 2002.
- [40] Stéphane B Richard, Antonietta M Lillo, Charles N Tetzlaff, Marianne E Bowman, Joseph P Noel, and David E Cane. Kinetic analysis of escherichia coli 2-c-methyl-d-erythritol-4-phosphate cytidyltransferase, wild type and mutants, reveals roles of active site amino acids. *Biochemistry*, 43(38):12189–12197, Sep 2004.
- [41] Linda Miallau, Magnus S Alphey, Lauris E Kemp, Gordon A Leonard, Sean M McSweeney, Stefan Hecht, Adelbert Bacher, Wolfgang Eisenreich, Felix Rohdich, and William N Hunter. Biosynthesis of isoprenoids: crystal structure of 4-diphosphocytidyl-2c-methyl-d-erythritol kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(16):9173–9178, Aug 2003.
- [42] Anna K H Hirsch, Magnus S Alphey, Susan Lauw, Michael Seet, Luzi Barandun, Wolfgang Eisenreich, Felix Rohdich, William N Hunter, Adelbert Bacher, and François Diederich. Inhibitors of the kinase ispe: structure-activity relationships and co-crystal structure analysis. *Org Biomol Chem*, 6(15):2719–2730, Aug 2008.
- [43] Tanja Sgraja, Magnus S Alphey, Stephanos Ghilagaber, Rudi Marquez, Murray N Robertson, Jennifer L Hemmings, Susan Lauw, Felix Rohdich, Adelbert Bacher, Wolfgang Eisenreich, Victoria Illarionova, and William N Hunter. Characterization of aquifex aeolicus 4-diphosphocytidyl-2c-methyl-d-

- erythritol kinase - ligand recognition in a template for antimicrobial drug discovery. *FEBS J*, 275(11):2779–2794, Jun 2008.
- [44] Christine M Crane, Anna K H Hirsch, Magnus S Alphey, Tanja Sgraja, Susan Lauw, Victoria Illarionova, Felix Rohdich, Wolfgang Eisenreich, William N Hunter, Adelbert Bacher, and François Diederich. Synthesis and characterization of cytidine derivatives that inhibit the kinase ispe of the non-mevalonate pathway for isoprenoid biosynthesis. *ChemMedChem*, 3(1):91–101, Jan 2008.
- [45] P. Bork, C. Sander, and A. Valencia. Convergent evolution of similar enzymatic function on different protein folds: the hexokinase, ribokinase, and galactokinase families of sugar kinases. *Protein Sci*, 2(1):31–40, Jan 1993.
- [46] Stefan Steinbacher, Johannes Kaiser, Jurathip Wungsintaweekul, Stefan Hecht, Wolfgang Eisenreich, Stefan Gerhardt, Adelbert Bacher, and Felix Rohdich. Structure of 2c-methyl-d-erythritol-2,4-cyclodiphosphate synthase involved in mevalonate-independent biosynthesis of isoprenoids. *J Mol Biol*, 316(1):79–88, Feb 2002.
- [47] Lauris E Kemp, Charles S Bond, and William N Hunter. Structure of 2c-methyl-d-erythritol 2,4- cyclodiphosphate synthase: an essential enzyme for isoprenoid biosynthesis and target for antimicrobial drug development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(10):6591–6596, May 2002.
- [48] Nicola L Ramsden, Lori Buetow, Alice Dawson, Lauris A Kemp, Venkatsubramanian Ulaganathan, Ruth Brenk, Gerhard Klebe, and William N Hunter. A structure-based approach to ligand discovery for 2c-methyl-d-erythritol-2,4-cyclodiphosphate synthase: a target for antimicrobial therapy. *J Med Chem*, 52(8):2531–2542, Apr 2009.
- [49] Christopher Lehmann, Kap Lim, John Toedt, Wojciech Krajewski, Andrew Howard, Edward Eisenstein, and Osnat Herzberg. Structure of 2c-methyl-d-erythrol-2,4-cyclodiphosphate synthase from haemophilus influenzae: activation by conformational transition. *Proteins*, 49(1):135–138, Oct 2002.
- [50] Shuisong Ni, Howard Robinson, Gregory C Marsing, Dirksen E Busiere, and Michael A Kennedy. Structure of 2c-methyl-d-erythritol-2,4-

- cyclodiphosphate synthase from *Shewanella oneidensis* at 1.6 Å: identification of farnesyl pyrophosphate trapped in a hydrophobic cavity. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 60(Pt 11):1949–1957, Nov 2004.
- [51] Barbara M Calisto, Jordi Perez-Gil, Maria Bergua, Jordi Querol-Audi, Ignacio Fita, and Santiago Imperial. Biosynthesis of isoprenoids in plants: structure of the 2c-methyl-d-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase from *Arabidopsis thaliana*. comparison with the bacterial enzymes. *Protein Sci*, 16(9):2082–2088, Sep 2007.
- [52] Ann-Kristin Kollas, Evert C Duin, Matthias Eberl, Boran Altincicek, Martin Hintz, Armin Reichenberg, Dajana Henschker, Anke Henne, Irina Steinbrecher, Dmitry N Ostrovsky, Reiner Hedderich, Ewald Beck, Hassan Jomaa, and Jochen Wiesner. Functional characterization of gcpe, an essential enzyme of the non-mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *FEBS Lett*, 532(3):432–436, Dec 2002.
- [53] Myriam Seemann, Bernadette Tse Sum Bui, Murielle Wolff, Denis Tritsch, Narciso Campos, Albert Boronat, Andrée Marquet, and Michel Rohmer. Isoprenoid biosynthesis through the methylerythritol phosphate pathway: the (e)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate synthase (gcpe) is a [4Fe-4S] protein. *Angew Chem Int Ed Engl*, 41(22):4337–4339, Nov 2002.
- [54] Wolfgang Brandt, Marco A Dessoy, Michael Fulhorst, Wenyun Gao, Meinhard H Zenk, and Ludger A Wessjohann. A proposed mechanism for the reductive ring opening of the cyclodiphosphate mecpp, a crucial transformation in the new dxp/mep pathway to isoprenoids based on modeling studies and feeding experiments. *Chembiochem*, 5(3):311–323, Mar 2004.
- [55] Felix Rohdich, Ferdinand Zepeck, Petra Adam, Stefan Hecht, Johannes Kaiser, Ralf Laupitz, Tobias Gräwert, Sabine Amslinger, Wolfgang Eisenreich, Adelbert Bacher, and Duilio Arigoni. The deoxyxylulose phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis: studies on the mechanisms of the reactions catalyzed by ispg and isph protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(4):1586–1591, Feb 2003.

- [56] B. Altincicek, A. Kollas, M. Eberl, J. Wiesner, S. Sanderbrand, M. Hintz, E. Beck, and H. Jomaa. Lytb, a novel gene of the 2-c-methyl-d-erythritol 4-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in escherichia coli. *FEBS Lett*, 499(1-2):37–40, Jun 2001.
- [57] Murielle Wolff, Myriam Seemann, Bernadette Tse Sum Bui, Yves Frapart, Denis Tritsch, Ana Garcia Estrabot, Manuel Rodríguez-Concepción, Albert Boronat, Andrée Marquet, and Michel Rohmer. Isoprenoid biosynthesis via the methylerythritol phosphate pathway: the (e)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase (lytb/isph) from escherichia coli is a [4fe-4s] protein. *FEBS Lett*, 541(1-3):115–120, Apr 2003.
- [58] Tobias Gräwert, Johannes Kaiser, Ferdinand Zepeck, Ralf Laupitz, Stefan Hecht, Sabine Amslinger, Nicholas Schramek, Erik Schleicher, Stefan Weber, Martin Haslbeck, Johannes Buchner, Christoph Rieder, Duilio Arigoni, Adelbert Bacher, Wolfgang Eisenreich, and Felix Rohdich. Isph protein of escherichia coli: studies on iron-sulfur cluster implementation and catalysis. *J Am Chem Soc*, 126(40):12847–12855, Oct 2004.
- [59] Boran Altincicek, Evert C Duin, Armin Reichenberg, Reiner Hedderich, Ann-Kristin Kollas, Martin Hintz, Stefanie Wagner, Jochen Wiesner, Ewald Beck, and Hassan Jomaa. Lytb protein catalyzes the terminal step of the 2-c-methyl-d-erythritol-4-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis. *FEBS Lett*, 532(3):437–440, Dec 2002.
- [60] René C Röhrich, Nadine Englert, Katrin Troschke, Armin Reichenberg, Martin Hintz, Frank Seeber, Emanuela Balconi, Alessandro Aliverti, Giuliana Zanetti, Uwe Köhler, Matthias Pfeiffer, Ewald Beck, Hassan Jomaa, and Jochen Wiesner. Reconstitution of an apicoplast-localised electron transfer pathway involved in the isoprenoid biosynthesis of plasmodium falciparum. *FEBS Lett*, 579(28):6433–6438, Nov 2005.
- [61] Samiul Hasan, Sabine Daugelat, P. S Srinivasa Rao, and Mark Schreiber. Prioritizing genomic drug targets in pathogens: application to mycobacterium tuberculosis. *PLoS Comput Biol*, 2(6):e61, Jun 2006.

- [62] María B Cassera, Fabio C Gozzo, Fabio L D’Alexandri, Emilio F Merino, Hernando A del Portillo, Valnice J Peres, Igor C Almeida, Marcos N Eberlin, Gerhard Wunderlich, Jochen Wiesner, Hassan Jomaa, Emilia A Kimura, and Alejandro M Katzin. The methylerythritol phosphate pathway is functionally active in all intraerythrocytic stages of *plasmodium falciparum*. *J Biol Chem*, 279(50):51749–51759, Dec 2004.
- [63] Stuart A Ralph, Giel G van Dooren, Ross F Waller, Michael J Crawford, Martin J Fraunholz, Bernardo J Foth, Christopher J Tonkin, David S Roos, and Geoffrey I McFadden. Tropical infectious diseases: metabolic maps and functions of the *plasmodium falciparum* apicoplast. *Nat Rev Microbiol*, 2(3):203–216, Mar 2004.
- [64] Shipra Vaishnava and Boris Striepen. The cell biology of secondary endosymbiosis—how parasites build, divide and segregate the apicoplast. *Mol Microbiol*, 61(6):1380–1387, Sep 2006.
- [65] Victoria Illarionova, Johannes Kaiser, Elena Ostrozhenkova, Adelbert Bacher, Markus Fischer, Wolfgang Eisenreich, and Felix Rohdich. Nonmevalonate terpene biosynthesis enzymes as antiinfective drug targets: substrate synthesis and high-throughput screening methods. *J Org Chem*, 71(23):8824–8834, Nov 2006.
- [66] M. Okuhara, Y. Kuroda, T. Goto, M. Okamoto, H. Terano, M. Kohsaka, H. Aoki, and H. Imanaka. Studies on new phosphonic acid antibiotics. iii. isolation and characterization of fr-31564, fr-32863 and fr-33289. *J Antibiot (Tokyo)*, 33(1):24–28, Jan 1980.
- [67] Michel A Missinou, Steffen Borrmann, Andreas Schindler, Saadou Issifou, Ayola A Adegnika, Pierre-Blaise Matsiegui, Ronald Binder, Bertrand Lell, Jochen Wiesner, Thomas Baranek, Hassan Jomaa, and Peter G Kremsner. Fosmidomycin for malaria. *Lancet*, 360(9349):1941–1942, Dec 2002.
- [68] Bertrand Lell, Ronnatrai Ruangweeayut, Jochen Wiesner, Michel Anoumou Missinou, Andreas Schindler, Thomas Baranek, Martin Hintz, David Hutchinson, Hassan Jomaa, and Peter Gottfried Kremsner. Fosmidomycin,

- a novel chemotherapeutic agent for malaria. *Antimicrob Agents Chemother*, 47(2):735–738, Feb 2003.
- [69] Steffen Borrmann, Saadou Issifou, Gilbert Esser, Ayola A Adegniko, Michael Ramharter, Pierre-Blaise Matsiegui, Sunny Oyakhirome, Dénise P Mawili-Mboumba, Michel A Missinou, Jürgen F J Kun, Hassan Jomaa, and Peter G Kremsner. Fosmidomycin-clindamycin for the treatment of plasmodium falciparum malaria. *J Infect Dis*, 190(9):1534–1540, Nov 2004.
- [70] Steffen Borrmann, Ayola A Adegniko, Pierre-Blaise Matsiegui, Saadou Issifou, Andreas Schindler, Denise P Mawili-Mboumba, Thomas Baranek, Jochen Wiesner, Hassan Jomaa, and Peter G Kremsner. Fosmidomycin-clindamycin for plasmodium falciparum infections in african children. *J Infect Dis*, 189(5):901–908, Mar 2004.
- [71] Steffen Borrmann, Ingrid Lundgren, Sunny Oyakhirome, Bénido Impouma, Pierre-Blaise Matsiegui, Ayola A Adegniko, Saadou Issifou, Jürgen F J Kun, David Hutchinson, Jochen Wiesner, Hassan Jomaa, and Peter G Kremsner. Fosmidomycin plus clindamycin for treatment of pediatric patients aged 1 to 14 years with plasmodium falciparum malaria. *Antimicrob Agents Chemother*, 50(8):2713–2718, Aug 2006.
- [72] G. Chaga, D. E. Bochkariov, G. G. Jokhadze, J. Hopp, and P. Nelson. Natural poly-histidine affinity tag for purification of recombinant proteins on cobalt(ii)-carboxymethylaspartate crosslinked agarose. *J Chromatogr A*, 864(2):247–256, Dec 1999.
- [73] Xiaoli Dong, Paul Stothard, Ian J Forsythe, and David S Wishart. Plasmapper: a web server for drawing and auto-annotating plasmid maps. *Nucleic Acids Res*, 32(Web Server issue):W660–W664, Jul 2004.
- [74] A. Skerra. Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in escherichia coli. *Gene*, 151(1-2):131–135, Dec 1994.
- [75] E. Amann and J. Brosius. 'ätg vectors' for regulated high-level expression of cloned genes in escherichia coli. *Gene*, 40(2-3):183–190, 1985.

-
- [76] P. K. Smith, R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson, and D. C. Klenk. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, 150(1):76–85, Oct 1985.
- [77] U. K. Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature*, 227(5259):680–685, Aug 1970.
- [78] Z. Otwinowski and W. Minor. Processing of x-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Method Enzymol*, Volume 276: Macromolecular Crystallography:307–326, 1997.
- [79] W. Kabsch. Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *J Appl Crystallogr*, 26(6):795–800, Dec 1993.
- [80] George M Sheldrick. A short history of shelx. *Acta Crystallogr A*, 64(Pt 1):112–122, Jan 2008.
- [81] Sharp/autossharp. Global Phasing Limited, 2001-2009.
- [82] Paul Emsley and Kevin Cowtan. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 60(Pt 12 Pt 1):2126–2132, Dec 2004.
- [83] Paul Emsley, Bernhard Lohkamp, William G. Scott, and Kevin Cowtan. Features and development of coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 66:??–?? (in press), 2010.
- [84] Gerrit Langer, Serge X Cohen, Victor S Lamzin, and Anastassis Perrakis. Automated macromolecular model building for x-ray crystallography using arp/warp version 7. *Nat Protoc*, 3(7):1171–1179, 2008.
- [85] G. N. Murshudov, A. A. Vagin, and E. J. Dodson. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 53(Pt 3):240–255, May 1997.

- [86] G. N. Murshudov, A. A. Vagin, A. Lebedev, K. S. Wilson, and E. J. Dodson. Efficient anisotropic refinement of macromolecular structures using fft. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 55(Pt 1):247–255, Jan 1999.
- [87] M. D. Winn, M. N. Isupov, and G. N. Murshudov. Use of tls parameters to model anisotropic displacements in macromolecular refinement. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 57(Pt 1):122–133, Jan 2001.
- [88] Roberto A Steiner, Andrey A Lebedev, and Garib N Murshudov. Fisher’s information in maximum-likelihood macromolecular crystallographic refinement. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 59(Pt 12):2114–2124, Dec 2003.
- [89] Martyn D Winn, Garib N Murshudov, and Miroslav Z Papiz. Macromolecular tls refinement in refmac at moderate resolutions. *Method Enzymol*, 374:300–321, 2003.
- [90] Alexei A Vagin, Roberto A Steiner, Andrey A Lebedev, Liz Potterton, Stuart McNicholas, Fei Long, and Garib N Murshudov. Refmac5 dictionary: organization of prior chemical knowledge and guidelines for its use. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 60(Pt 12 Pt 1):2184–2195, Dec 2004.
- [91] Pavol Skubák, Garib N Murshudov, and Navraj S Pannu. Direct incorporation of experimental phase information in model refinement. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 60(Pt 12 Pt 1):2196–2201, Dec 2004.
- [92] M. A. Larkin, G. Blackshields, N. P. Brown, R. Chenna, P. A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I. M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J. D. Thompson, T. J. Gibson, and D. G. Higgins. Clustal w and clustal x version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21):2947–2948, Nov 2007.
- [93] Pymol 0.99rc6. DeLano Scientific LLC, 2006.
- [94] N. A. Baker, D. Sept, S. Joseph, M. J. Holst, and J. A. McCammon. Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(18):10037–10041, Aug 2001.

-
- [95] E. Krissinel and K. Henrick. Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 60(12 Part 1):2256–2268, Dec 2004.
- [96] L. Holm, S. Kääriäinen, P. Rosenström, and A. Schenkel. Searching protein structure databases with dalilite v.3. *Bioinformatics*, 24(23):2780–2781, Dec 2008.
- [97] Glide version 4.5. Schrodinger LLC, 2007.
- [98] Stephen R Comeau, David W Gatchell, Sandor Vajda, and Carlos J Camacho. Cluspro: a fully automated algorithm for protein-protein docking. *Nucleic Acids Res*, 32(Web Server issue):W96–W99, Jul 2004.
- [99] Stephen R Comeau, David W Gatchell, Sandor Vajda, and Carlos J Camacho. Cluspro: an automated docking and discrimination method for the prediction of protein complexes. *Bioinformatics*, 20(1):45–50, Jan 2004.
- [100] Dima Kozakov, Ryan Brenke, Stephen R Comeau, and Sandor Vajda. Piper: an fft-based protein docking program with pairwise potentials. *Proteins*, 65(2):392–406, Nov 2006.
- [101] Stephen R Comeau, Dima Kozakov, Ryan Brenke, Yang Shen, Dmitri Beglov, and Sandor Vajda. Cluspro: performance in capri rounds 6-11 and the new server. *Proteins*, 69(4):781–785, Dec 2007.
- [102] T.A. Jones and M. Kjeldgaard. *Essential O*. 1993.
- [103] A. Vagin and A. Teplyakov. Molrep: an automated program for molecular replacement. *J Appl Crystallogr*, 30(6):1022–1025, Dec 1997.
- [104] Ingo Reikittke, Jochen Wiesner, Rene Röhrich, Ulrike Demmer, Eberhard Warkentin, Weiya Xu, Kathrin Troschke, Martin Hintz, Joo Hwan No, Evert C Duin, Eric Oldfield, Hassan Jomaa, and Ulrich Ermler. Structure of (e)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl diphosphate reductase, the terminal enzyme of the non-mevalonate pathway. *J Am Chem Soc*, 130(51):17206–17207, Dec 2008.

-
- [105] Tobias Gräwert, Felix Rohdich, Ingrid Span, Adelbert Bacher, Wolfgang Eisenreich, Jörg Eppinger, and Michael Groll. Structure of active isph enzyme from *Escherichia coli* provides mechanistic insights into substrate reduction. *Angew Chem Int Ed Engl*, 48(31):5756–5759, 2009.
- [106] James A Imlay. Iron-sulphur clusters and the problem with oxygen. *Mol Microbiol*, 59(4):1073–1082, Feb 2006.
- [107] G. J. Tilley, R. Camba, B. K. Burgess, and F. A. Armstrong. Influence of electrochemical properties in determining the sensitivity of [4Fe-4S] clusters in proteins to oxidative damage. *Biochem J*, 360(Pt 3):717–726, Dec 2001.
- [108] Tobias Gräwert, Ingrid Span, Wolfgang Eisenreich, Felix Rohdich, Jörg Eppinger, Adelbert Bacher, and Michael Groll. Probing the reaction mechanism of isph protein by x-ray structure analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(3):1077–1081, Jan 2010.