

INAUGURAL-DISSERTATION

vorgelegt zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

im Fachbereich Biologie und Chemie der Justus-Liebig-Universität Gießen



NMR-Strukturanalyse der 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat Reduktoisomerase

angefertigt am Biochemischen Institut des Fachbereichs Humanmedizin

von

Nadine Esther Englert

Diplom-Biochemikerin

aus Heidelberg

Erstbetreuer: Prof. Dr. Alfred Pingoud, FB 08 der J.-L.-Universität Gießen

Zweitbetreuer: Prof. Dr. Ewald Beck, FB 11 der J.-L.-Universität Gießen

Gießen 2012

Die Wissenschaft fängt eigentlich erst da an interessant zu werden, wo sie aufhört.

Justus von Liebig aus „Chemische Briefe“

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VII
Zusammenfassung	X
1. Einleitung	1
1.1 Isoprenoidbiosynthese	1
1.1.1. Mevalonatweg	2
1.1.2. DOXP-Weg	3
1.1.2.1. Allgemeine Übersicht über den DOXP-Weg	3
1.1.2.2. 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat Reduktoisomerase	10
1.1.3. Verbreitung Mevalonatweg und DOXP-Weg	19
1.2 Bedeutung des DOXP-Stoffwechselweges für die Medizin	23
1.2.1. Apikomplexa	23
1.2.2. Malaria	24
1.2.3. Inhibition der Isoprenoid-Synthese durch Fosmidomycin und Fosmidomycin- Analoga	26
1.2.4. Klinische Studien mit Fosmidomycin als Malariamedikament	28
1.3 NMR Strukturaufklärung von löslichen Proteinen	30
1.3.1. Homonukleare NMR-Spektroskopie	34
1.3.2. Heteronukleare NMR-Spektroskopie	36
1.4 Zielsetzung	43
2. Material und Methoden	44
2.1 Material	44
2.1.1. Geräte	44
2.1.2. Verbrauchsmaterialien	47

2.1.3. Chemikalien	48
2.1.4. Chromatographie.....	49
2.1.5. Puffer und Lösungen.....	50
2.1.5.1. Wachstumsmedien für Bakterienkulturen.....	50
2.1.5.2. Chromatographiepuffer	51
2.1.6. Bakterienstämme	52
2.1.7. Plasmide und Konstrukte.....	52
2.2 Methoden	55
2.2.1. Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	55
2.2.1.1. Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> auf Agar-Platten	55
2.2.1.2. Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> in Minimalmedium ohne Isotopenmarkierung.....	56
2.2.1.3. Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> in Minimalmedium mit ¹⁵ N-Markierung....	56
2.2.1.4. Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> in Minimalmedium mit ¹⁵ N-, ² H-Markierung oder mit ¹⁵ N-, ² H-, ¹³ C-Markierung.....	57
2.2.1.5. Methyl-selektive Proteinmarkierung in <i>Escherichia coli</i>	57
2.2.2. Reinigung der DXR	58
2.2.2.1. Ernten und Aufschluss der <i>Escherichia coli</i> Kulturen.....	58
2.2.2.2. Schwache Anionenaustauschchromatographie (WAX)	59
2.2.2.3. Starke Anionenaustauschchromatographie (SAX).....	60
2.2.2.4. Präparative Größenausschlusschromatographie (SEC).....	61
2.2.2.5. Umpufferung von Proteinen	61
2.2.2.6. Herstellung der DXR Probe für die NMR-Messung	62
2.2.2.7. Analytische Größenausschlusschromatographie (SEC).....	63
2.2.3. Proteinbestimmungen.....	63

2.2.3.1. SDS-Gelelektrophorese	63
2.2.3.2. Proteinbestimmung nach der BCA-Methode.....	64
2.2.3.3. Proteinbestimmung nach Bradford.....	65
2.2.4. Zweidimensionale NMR-Experimente.....	65
2.2.4.1. ¹⁵ N-HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence)	65
2.2.4.2. TROSY (Transverse Relaxation Optimized Spectroscopy)	66
2.2.4.3. HMQC der methyelselektiven Probe.....	67
2.2.5. Dreidimensionale NMR-Experimente.....	69
2.2.5.1. HNCQ-TROSY	70
2.2.5.2. HN(CA)CO-TROSY	71
2.2.5.3. HNCA-TROSY.....	72
2.2.5.4. HN(CO)CA-TROSY	73
2.2.5.5. HNCACB-TROSY	74
2.2.5.6. HN(CO)CACB-TROSY	75
2.2.5.7. HNCCC(CO)NH-TOCSY	76
2.2.5.8. (H)C(CCO)NH-TROSY.....	77
2.2.5.9. (HM)CM(CB)CA und (HM)CM(CBCA)CO	79
2.2.5.10. ¹⁵ N-NOESY-TROSY.....	80
2.2.5.11. ¹³ C-NOESY-HMQC.....	82
2.2.6. Massenspektrometrie-Messungen zur Bestimmung des Deuterierungsgrades..	83
3. Ergebnisse und Diskussion	85
3.1 Optimierung der Proteinexpression	85
3.2 Proteinaufreinigung.....	87
3.3 Optimierung der Proteinaufreinigung.....	91
3.4 Deuterierungsgrad.....	97

3.5	Heteronukleare 2D-Experimente	99
3.6	Heteronukleare 3D-Experimente	102
3.7	3D- ¹ H- ¹ H- ¹⁵ N-NOESY-HSQC mit einem ¹³ C- und ¹⁵ N-Filter zur Identifizierung von Bindungsstellen.....	114
3.8	TALOS Vorhersage der 2D-Struktur der DXR	117
3.9	Fazit und Ausblick	120
Anhang A. Tabellen der chemischen Verschiebungen aller zugeordneter Heteroatome		122
Anhang B. Ausschnitte des TROSY-Spektrums mit allen zugeordneten Amidgruppen des Proteinrückgrats		134
Anhang C. Diagramme der TALOS-Berechnungen.....		139
Abbildungsverzeichnis		147
Tabellenverzeichnis		151
Literaturverzeichnis		152
Publikationsliste		164
Danksagungen		165
Eidesstattliche Erklärung		167

Abkürzungsverzeichnis

1D, 2D, 3D, 4D	eindimensional, zweidimensional, dreidimensional, vierdimensional
Abb.	<u>Ab</u> bildung
Amp	<u>A</u> mpicillin
APS	<u>A</u> mmonium <u>p</u> er <u>s</u> ulfat
AS	<u>A</u> minosäure
BCA	Bicinchoninsäure
Bis-TRIS	Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan
BMRB	<i><u>b</u>iological <u>m</u>agnetic <u>r</u>esonance <u>d</u>ata <u>b</u>ank</i>
BSA	Rinderserumalbumin
CARA	<i><u>c</u>omputer <u>a</u>ided <u>r</u>esonance <u>a</u>ssignment</i>
CDP -ME	4- <u>D</u> iphosphocytidyl-2C-methyl-D-2-phosphat
CoA	<u>C</u> oenzym <u>A</u>
CSA	<i><u>c</u>hemical <u>s</u>hift <u>a</u>nisotropy (Anisotropie der chemischen Verschiebung)</i>
CTP	<u>C</u> ytidin <u>t</u> riphosphat
DEAE	<u>D</u> iethyl <u>a</u> mino <u>e</u> thyl
DMAPP	<u>D</u> imethyl <u>a</u> llylpyrophosphat
DNA	Desoxy-Ribonukleinsäure
DOXP	<u>D</u> eoxy-d- <u>x</u> ylulose-5- <u>p</u> hosphat
DSS	2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonsäure
DXR, IspC, YaeM	<u>D</u> eoxy-D- <u>x</u> ylulose-5-phosphat <u>R</u> eduktoisomerase
DXS	<u>D</u> eoxy-D- <u>x</u> ylulose-5-phosphat <u>S</u> ynthase

Fos	<u>F</u> osmidomycin, [3-(<i>N</i> -Hydroxyformamido)propyl] phosphonsäure
FR900098	[3-(<i>N</i> -Acetyl- <i>N</i> -hydroxy-amino)-propyl]-phosphonsäure
GA3P	<u>G</u> lyceral <u>d</u> ehyd- <u>3</u> - <u>p</u> hosphat
HMBPP	1- <u>H</u> ydroxy-2- <u>m</u> ethyl-2-(<i>E</i>)- <u>b</u> utenyl-4-diphosphat
HMG-CoA	3- <u>H</u> ydroxy-3- <u>m</u> ethylglutaryl- <u>C</u> oA
HMQC	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Coherence</i> (heteronukleare Mehrquantenkoheränz)
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> (Hochdruckflüssigchromatographie)
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i> (heteronukleare Einquantenkoheränz)
IPI	IPP-DMAPP-Isomerase
IPP	<u>I</u> sopentenylpyrophosphat
IPTG	<u>I</u> sopropyl- β - <u>D</u> -1- <u>t</u> hiogalactopyranosid
IspD, YgbP	4-Diposphocytidyl-2C-methyl-erythritol Cytidyltransferase
kDa	<u>K</u> ilo <u>D</u> alton
LytB, IspH	1-Hydroxy-2-methyl-2-(<i>E</i>)-butenyl-4-diphosphat Reduktase
MEcPP	2C-Methyl- <u>D</u> -erythritol-2,4-cyclodiphosphat
MEP	2C- <u>M</u> ethyl- <u>D</u> - <u>e</u> rythritol-4- <u>p</u> hosphat
MWCO	<i>molecular weight cut-off</i> (Molekulargewichtsausschlussgröße als Porengrößenangabe für Membranen)
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> (kernmagnetische Resonanz)
NOE	<i>nuclear Overhauser effect</i> (Kern-Overhauserereffekt)
NOESY	<i>nuclear Overhauser effect spectroscopy</i>
OD	<u>o</u> ptische <u>D</u> ichte

PAGE	<u>P</u> oly <u>a</u> crylamid- <u>G</u> e <u>l</u> elektrophorese
PDB (pdb)	<u>p</u> rotein <u>d</u> ata <u>b</u> ank (Proteindatenbank)
PMK	<u>P</u> hospho <u>m</u> evalonat <u>K</u> inase
ppm	<u>p</u> arts <u>p</u> er <u>m</u> illion
Q	<u>q</u> uaternäre Ammonium-
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<u>r</u> ounds <u>p</u> er <u>m</u> inute (Umdrehungen pro Minute)
SAX	<u>s</u> trong <u>a</u> nion <u>e</u> xchange chromatography (starke Anionenaustausch- chromatographie)
SDS	<u>s</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate (Natriumdodecylsulfat)
SEC	<u>s</u> ize <u>e</u> xclusion <u>c</u> hromatography (Größenausschlußchromatographie / Gelfiltration)
TALOS	<u>t</u> orsion <u>a</u> nge <u>l</u> ikelihood <u>o</u> btained from <u>s</u> hift and sequence similarity
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
TOCSY	<u>t</u> otal <u>c</u> orrelation <u>s</u> pectroscopy
TPP	<u>T</u> hiaminpyrophosphat
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	transfer-Ribonukleinsäure
TROSY	<u>T</u> raverse <u>r</u> elaxation <u>o</u> ptimized spectroscopy
v/v	Volumen/Volumen-Verhältnis
w/v	Masse/Volumen-Verhältnis
WAX	<u>w</u> ea <u>k</u> <u>a</u> nion <u>e</u> xchange chromatography (schwache Anionenaustausch- chromatographie)
WHO	<u>W</u> orld <u>H</u> ealth <u>O</u> rganisation (Weltgesundheitsorganisation)

Zusammenfassung

Die 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat Reduktoisomerase (DXR, EC 1.1.1.267) katalysiert den zweiten Schritt des 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Synthese-Weges (DOXP-Weg) der Isoprenoidsynthese. Dieses Enzym kommt in den meisten Bakterien, Apikomplexa und in den Plastiden von Pflanzen vor, aber nicht in Menschen. Daher stellt es eine attraktive Zielstruktur für antibakterielle und antiparasitische Wirkstoffe sowie Herbizide dar.

Fosmidomycin, FR900098 und deren Analoga sind Inhibitoren der DXR und stellten sich in ersten klinischen Studien als wirksame Inhibitoren gegen bakterielle Infektionen und Malaria heraus. Bei Malaria besteht laufend Bedarf an neuen Medikamenten, da sich regelmäßig Resistenzen der Plasmodien gegen gängige Wirkstoffe ausbilden.

Die DOXP-Reduktoisomerase wird als ein sehr flexibles Enzym postuliert. Um sowohl die Flexibilität als auch die Interaktion zwischen Inhibitor und DXR zu untersuchen, wurde die DXR rekombinant in *Escherichia coli* exprimiert, aufgereinigt und anschließend mittels NMR-Experimente analysiert.

Diese Arbeit beschreibt die Optimierung der DXR-Probe für die NMR-Messungen, die partielle Zuordnung des Proteinerückgrats und der Seitenkettenatome sowie die Sekundärstrukturvorhersage mit TALOS und NMR-Bindungsstudien der DXR zum Inhibitor FR900098. Die gewonnenen Daten bieten eine Grundlage für weitere NMR-gestützte Strukturanalysen der DXR und ihrer Interaktion mit unterschiedlichen Inhibitoren.

^{15}N -, ^{13}C - und ^2H -markierte DXR-Proben wurden unter Sauerstoffausschluss und Zugabe von Mg^{2+} , NADPH und FR900098 hergestellt. Dadurch konnten 44 % der chemischen Verschiebungssignale von $^1\text{H}_\text{N}$ und $^{15}\text{N}_\text{H}$ des Proteinerückgrats zugeordnet werden. Anhand ^{13}C -Verschiebungen konnten 50 % des Proteinerückgrats der Primärstruktur zugeordnet werden.

Mit TALOS lassen sich aus den chemischen Verschiebungen Rückschlüsse auf die Sekundärstruktur der DXR ziehen. So konnten Sekundärstrukturvorhersagen für die zugeordneten Fragmente getroffen werden. Diese wurden mit publizierten (aus der pdb-Datenbank) Kristallstrukturen verglichen. Die TALOS-Daten lieferten eine große Übereinstimmung zu den Kristallstrukturdaten. Als Ausnahme wurden Abweichungen in dem Bereich der flexiblen Schleife festgestellt.

Der Vergleich mit den vorher veröffentlichten Kristallstrukturen ergab, dass die Fragmente der DXR, die zugeordnet werden konnten, hauptsächlich in den äußeren Bereichen liegen und gleichzeitig eine α -helikale Struktur aufweisen. Proteinsequenzen, die in der Tertiärstruktur eher innen zu verorten sind oder in der Kristallstruktur β -Faltblattregionen darstellten, konnten nur zu einem geringen Anteil zugeordnet werden.

Diese Arbeit liefert weitreichende Daten für weitere NMR-Analysen der DXR, für allgemeine Strategien zur NMR-Analyse von großen Proteinen (>40 kDa) sowie zur Herstellung und NMR-Messung von sauerstoffempfindlichen Proteinen.

1. Einleitung

1.1 Isoprenoidbiosynthese

Isoprenoide sind eine Naturstoffklasse, die aus einer unterschiedlichen Anzahl und Anordnung an 5-Kohlenstoffeinheiten, dem Isopren zusammen gesetzt werden. Zu den Isoprenoiden gehören über 35000 verschiedene Substanzen. Man unterteilt sie in die Gruppen der Sterole, Dolichole, Triterpene, Ubichinone, Prenyl-Gruppen an Proteinen und isopentenylierte t-RNAs [1-3]. Für die Biosynthese der Isoprenoide sind die aktivierten Isopreneinheiten notwendig. Es kommen zwei Isomere dieser aktivierten Isopreneinheiten vor, das Isopentenylpyrophosphat (IPP) und das Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP). IPP und DMAPP werden entweder über den Mevalonat-Biosyntheseweg oder über den DOXP-Weg synthetisiert.

Der Mevalonatweg wurde 1958 von Conrad Bloch und Feodor Lynen in Tieren und Hefen entdeckt, welcher lange Zeit als einzige Möglichkeit zur Isoprenoidsynthese aller Organismen galt. Der Mevalonatweg kommt als ausschließlicher Syntheseweg für IPP und DMAPP in Tieren, Pilzen, Archaeobakterien und manchen Eubakterien vor. Im Gegensatz zu Tieren, Pilzen, Archaeobakterien und manchen Eubakterien besitzen Pflanzen beide Stoffwechselwege in unterschiedlichen Kompartimenten. Die Enzyme des Mevalonatweges kommen in den Mitochondrien und dem Cytosol von Pflanzen vor.

Erst 1993 durch Rohmer *et al.* gab es die ersten Hinweise darauf, dass noch ein zweiter Biosyntheseweg existiert [4]. Dieser kommt in Pflanzen, Algen, Cyanobakterien, Protozoen der Gattung Apikomplexa und einige Eubakterien vor. Mit Ausnahme der Listerien besitzen die meisten Bakterien nur einen der beiden Stoffwechselwege. Bei Pflanzen, die beide Stoffwechselwege besitzen, sind die Enzyme des DOXP-Weges in den Plastiden lokalisiert.

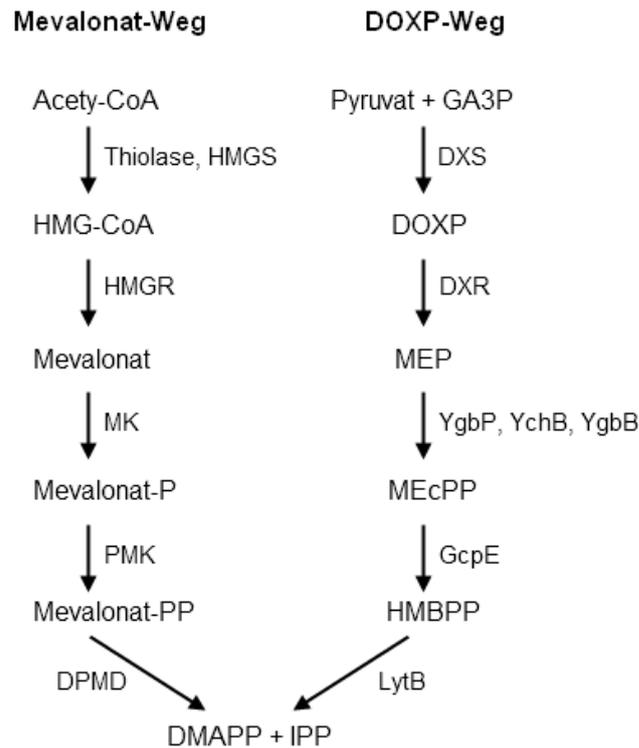


Abb. 1.1 Mevalonatweg und DOXP-Weg

Schematische Darstellung des Mevalonat-Wegs und DOXP-Wegs. Beide Stoffwechselwege liefern IPP und DMAPP über unterschiedliche Substrate und Zwischenprodukte.

1.1.1. Mevalonatweg

Der Stoffwechselweg beginnt mit der durch die Thiolase katalysierten Kondensierung zweier Acetyl-CoA zu Acetoacetyl-CoA. Im nächsten Schritt wird, katalysiert von der HMG-CoA Synthase, ein weiteres Acetyl-CoA an das Acetoacetyl-CoA kondensiert. Das entstehende Produkt ist 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA), welches im Folgenden durch die NADPH-abhängige HMG-CoA Reduktase zu (*R*)-Mevalonat reduziert wird. Danach wird in zwei durch ATP angetriebenen Schritten (*R*)-Mevalonat durch die Mevalonat Kinase und anschließend durch die Phosphomevalonat Kinase (PMK) zu (*R*)-Mevalonat-5-diphosphat phosphoryliert. Das Diphosphat wird anschließend durch die Mevalonat-diphosphat Decarboxylase zu IPP decarboxyliert. Die IPP-DMAPP-Isomerase (IPI) lagert einen Teil des IPP zu DMAPP um [5].

1.1.2. DOXP-Weg

1.1.2.1. Allgemeine Übersicht über den DOXP-Weg

Die ersten Hinweise auf den DOXP-Weg wurden in Pflanzen 1993 durch die Gruppe um Rohmer entdeckt. Sie hatten Substrate mit stabilen Isotopen markiert und die Produkte untersucht. Dabei fanden sie Evidenzen, dass diese Produkte nicht über den Mevalonatweg entstehen können [4, 6, 7]. Die Bezeichnung DOXP-Weg hat dieser Stoffwechselweg durch das charakteristische Zwischenprodukt DOXP erhalten. Alternative Namen sind Mevalonat-unabhängiger Weg, MEP-Weg, oder Rohmer-Weg. Alle beteiligten Enzyme und ihre Gene konnten identifiziert werden. Desweiteren konnten Kristallstrukturen aller beteiligten Enzyme erstellt werden.

Die Synthese von IPP und DMAPP startet beim DOXP-Weg mit dem Enzym 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat Synthase (DXS) (Gen: *dxs*). Die DXS benötigt den Kofaktor Thiaminpyrophosphat (TPP). Die Katalyse beginnt mit der Decarboxylierung von Pyruvat und anschließend erfolgt die Kondensation des resultierenden Hydroxyethyl-TPP-Intermediat und Glycerinaldehyd-3-phosphat (GA3P) zu 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat (DOXP) (siehe Abb. 1.2). Die DXS besitzt somit Ähnlichkeit zu den TPP-abhängigen Decarboxylasen und zu den Carboligasen [8]. Als Reaktionsmechanismus wird ein ungeordneter sequenzieller Mechanismus postuliert [9]. Seit 2006 gibt es zwei Kristallstrukturen der DXS (siehe pdb 2O1X und 2O1S) aus *Deinococcus radiodurans* und *Escherichia coli* [10]. Die DXS besteht aus drei Untereinheiten. Diese ähneln stark den jeweiligen Untereinheiten der Transketolase [11]. Jedoch sind ihre Domänen im Vergleich zu den Domänen der Transketolase unterschiedlich angeordnet (siehe Abb. 1.2) [10].

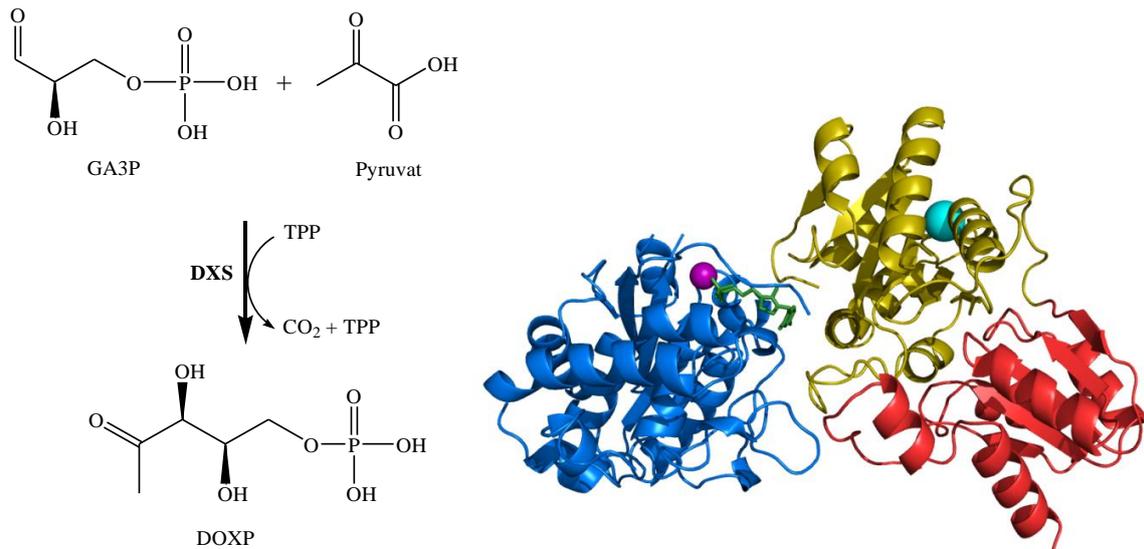


Abb. 1.2 DXS-Reaktion und ihr Kristallstrukturmodell (2O1S)

Links: Glyceraldehyd-3-phosphat (GA3P) und Pyruvat werden zu 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat (DOXP) und CO₂ umgesetzt. Die Reaktion ist abhängig vom Kofaktor Thiaminpyrophosphat (TPP).

Rechts: Monomer der DXS (pdb: 2O1S) [10]: Domäne I: blau; Domäne II: gelb; Domäne III: rot; TPP: grün; Mg²⁺: lila; K⁺: Türkis

Der zweite Schritt wird von der 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat Reduktoisomerase (DXR, IspC, YaeM) (Gen: *ispC* bzw. *yaeM*) katalysiert. Dabei wird DOXP umgelagert und zu Methylerythritol-phosphat (MEP) reduziert. Die Röntgenstrukturen und der Reaktionsmechanismus ist im Kapitel 1.1.2.2 detailliert beschrieben.

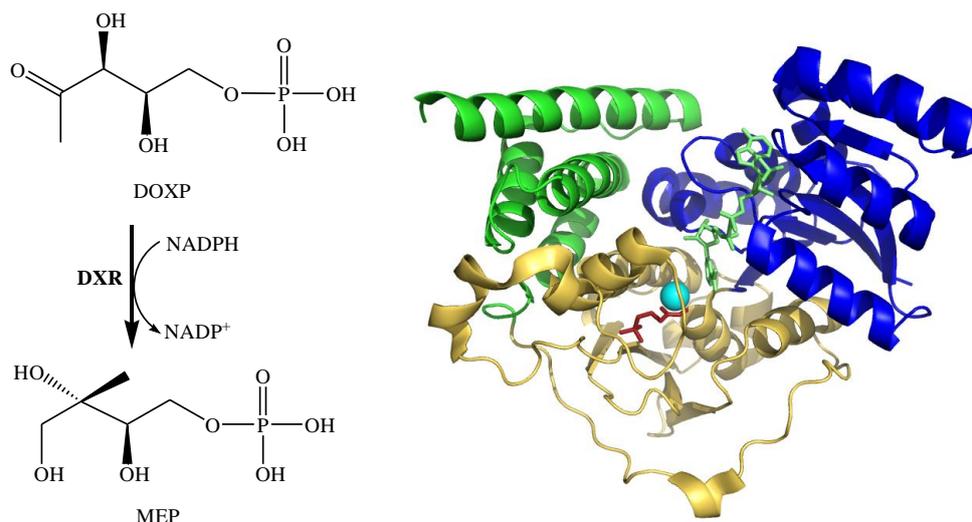


Abb. 1.3 DXR-Reaktion und ihr Kristallstrukturmodell (2EGH)

Links: 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat (DOXP) wird mit NADPH zu Methylerythritol-phosphat (MEP) reduziert.

Rechts: Monomer der DXR (pdb: 2EGH [12]): N-terminale-NADPH-Bindedomäne: blau; zentrale Domäne: gelb; C-terminale Domäne: grün; Mg²⁺: türkis; Fosmidomycin: rot; NADPH: hellgrün.

MEP reagiert mit CTP zu 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol (CDP-ME) und Pyrophosphat. Die Reaktion wird katalysiert von der 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-erythritol Cytidyltransferase (IspD, YgbP), codiert auf dem Gen *ispD* (= *ygbP*).

Es gibt mehrere Kristallstrukturen von IspD aus *Escherichia coli* [13], *Arabidopsis thaliana* [14], *Thermotoga maritima*, *Neisseria gonorrhoea* und einem bifunktionalen Enzym IspDF aus *Camphylobacter jejuni* [15].

Die Reaktion läuft als geordneter sequentieller Mechanismus ab, wobei CTP als erstes bindet. Es wird vermutet, dass für diese Bindung Mg^{2+} nötig ist [16].

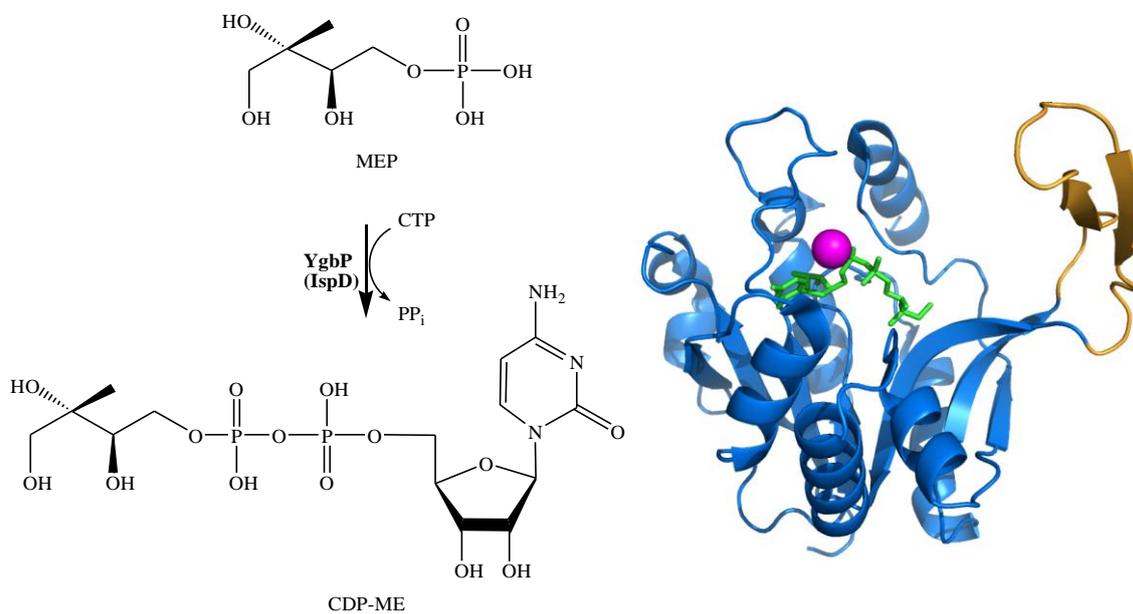


Abb. 1.4 IspD-Reaktion und ihr Kristallstrukturmodell (1INI)

Methylerythritol-phosphat (MEP) wird mit CTP zu 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol (CDP-ME) kondensiert. Kristallstrukturmodell [13]: Hauptdomäne: blau; Unterdomäne („β-Arm“): orange; Mg^{2+} : rosa; CDM: grün

Der vierte Schritt ist ATP-abhängig. Katalysiert von der 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol Kinase (IspE, YchB), codiert auf dem Gen *ispE* (= *ychB*), wird eine Phosphatgruppe des ATP auf CDP-ME übertragen und es entsteht 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-2-phosphat (CDP-MEP). Es existieren Röntgenstrukturmodelle von *Escherichia coli* und *Thermus thermophilus* IspE [17, 18].

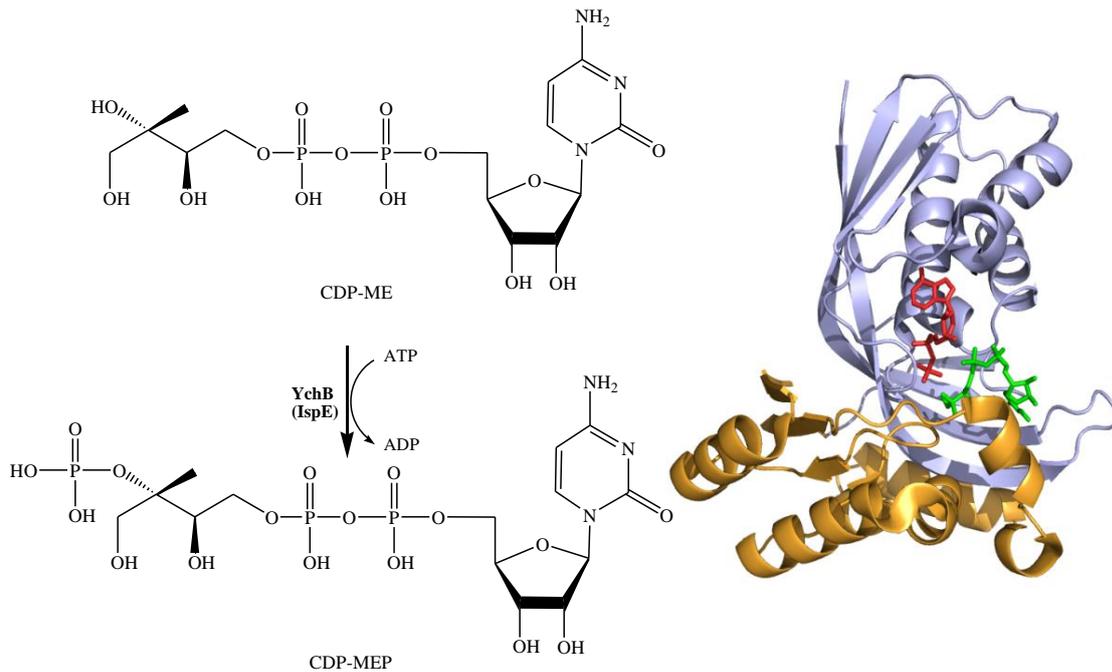


Abb. 1.5 IspE-Reaktion und ihr Kristallstrukturmodell (2V2Z)

4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol (CDP-ME) wird mit ATP zu 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-2-phosphat (CDP-MEP) phosphoryliert. Kristallstrukturmodell [19]: N-terminale Domäne: blau; C-terminale Domäne: orange; CDM: grün; ADP: rot

Die nächste Reaktion ist ein Ringschluss unter Abspaltung von CMP. Das Enzym, die 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat Synthase (IspF, YgbB; Genbezeichnungen: *ispF*, *ygbB*) benötigt für die Katalyse zwei divalente Kationen. Dabei ist Zn^{2+} permanenter Kofaktor des Proteins, während entweder Mn^{2+} oder Mg^{2+} vermutlich ans Substrat gebunden vorliegt und zusammen an das aktive Zentrum bindet. Beide Metallkationen stabilisieren die Phosphatgruppen. Durch die Abspaltung von CMP entsteht das zyklische 2C-methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat (MEcPP).

Es gibt Kristallstrukturen von IspF aus *Escherichia coli*, *Haemophilus influenza*, *Shewanella oneidensis* und *Thermus thermophilus* [20-24] und IspDF aus *Campylobacter jejuni* [15].

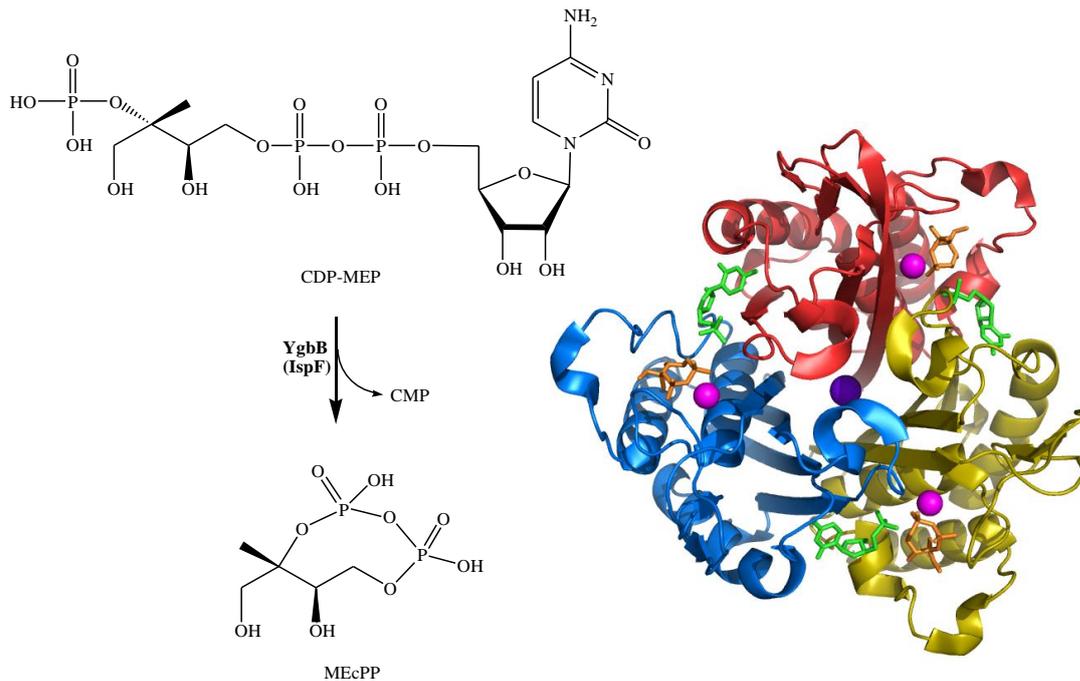


Abb. 1.6 IspF-Reaktion und ihr Kristallstrukturmodell (1H48)

CMP wird von 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-2-phosphat (CDP-MEP) abgespalten und durch Ringschluss entsteht 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat (MEcPP). Kristallstrukturmodell [20]: IspF besteht aus einem Trimer, dessen katalytisch aktive Zentren zwischen Monomer A und B, B und C, C und A liegt. Monomer A: gelb; Monomer B: blau; Monomer C: rot; Zn^{2+} : violett; Mn^{2+} : rosa; CMP: grün; MEcPP: orange;

Die 1-Hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl-4-diphosphat Synthase (GcpE, IspG) reduziert das MEcPP zu 1-Hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl-4-diphosphat (HMBPP) (siehe Abb. 1.7). Die Reduktion erfolgt über zwei Elektronenübertragungsschritte. Im ersten Schritt entsteht wahrscheinlich ein Epoxidintermediat, wobei der Ring geöffnet wird. Das Intermediat wird zu HMBPP reduziert. Der exakte Reaktionsmechanismus ist noch nicht komplett aufgeklärt [25-27].

Zwei Kristallstrukturen wurden veröffentlicht, eine aus *Thermus thermophilus* [26] und eine aus *Aquifex aeolicus* [25]. GcpE aus beiden Organismen liegt als Dimer vor und besitzt einen [4Fe-4S]-Cluster pro Monomer [25-27] (siehe Abb. 1.7).

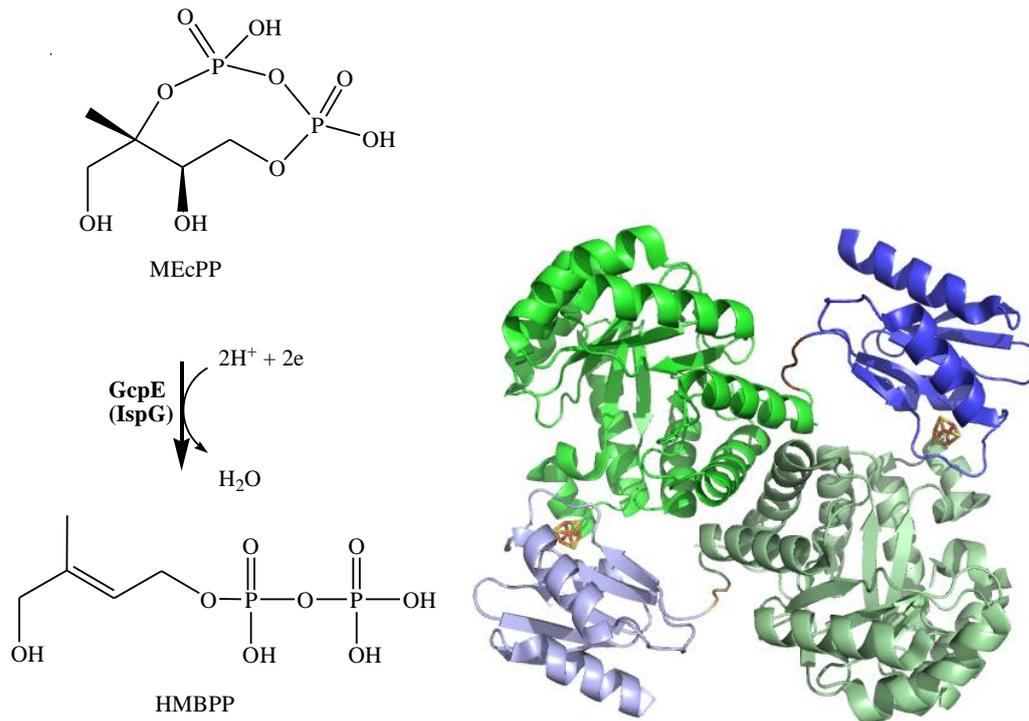


Abb. 1.7 IspG-Reaktion und ihr Kristallstrukturmodell (3NOY)

2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat (MEcPP) wird durch Übertragung von zwei Elektronen zu 1-Hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl-4-diphosphat (HMBPP) umgesetzt. Kristallstrukturmodell [25]: Monomer 1: blau; Monomer 2: grün; FeS-Cluster: gelb-rot

HMBPP wird nun weiter reduziert von der 1-Hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl-4-diphosphat Reduktase (LytB, IspH) zu IPP und DMAPP, wobei mehr IPP entsteht als DMAPP. Das Verhältnis von IPP zu DMAPP wurde als 5:1 [28] bzw. 6:1 [29] bestimmt. Diese ermittelten Werte weichen signifikant vom thermodynamischen Gleichgewicht von IPP zu DMAPP ab, welches bei 1:3 liegt.

Von LytB wurde als erstes eine Kristallstruktur des Enzyms aus dem Organismus *Aquifex aeolicus* veröffentlicht [30], gefolgt von mehreren Strukturen aus *Escherichia coli* [31]. LytB aus *Aquifex aeolicus* besteht aus einem Dimer und ist relativ flach. Jedes Monomer ist in drei einander ähnlichen Domänen unterteilt: eine „Kleeblattstruktur“ mit einer pseudo-C₃-Symmetrie. In der Mitte dieser „Kleeblattstruktur“ sitzt das Eisenschwefelcluster. Jede Domäne besteht aus β -Faltblättern, die von beiden Seiten von α -Helices flankiert werden. Die drei Domänen sehen strukturell sehr ähnlich aus, obwohl keine erkennbare Sequenzhomologie vorhanden ist. Das Eisenschwefelcluster wird komplexiert von drei konservierten Cysteinen, im *Aquifex aeolicus* Protein von Cys13, Cys96 und Cys193 und im *Escherichia coli* Enzym von Cys12, Cys96 und Cys197.

Das *Escherichia coli* LytB konnte nur in Anwesenheit eines anionischen Liganden kristallisiert werden, während das *Aquifex aeolicus* LytB ohne einen spezifischen Liganden kristallisiert wurde. Beim Vergleich beider Strukturmodelle fällt auf, dass das Apo-Enzym eine weiter geöffnete Struktur besitzt als das LytB im Komplex. Das aktive Zentrum des Apo-Enzyms ist somit mehr durch Solvent zugänglich, als die geschlosseneren Struktur des Komplexes [31].

Das Pyrophosphat wird vermutlich in das polare Umfeld der Aminosäuren His41, His74, His124, Ser225 (=Ser221), Ser269 (=Ser265), Thr168 (=Thr166 oder 167), Asp227 (=Asp223) und Glu166 (=Glu165) eingebettet. His42 (=His41) und His124 (=His124) sind hochkonservierte Aminosäuren [30]. (Nummerierung von *Escherichia coli*, in Klammern Nummerierung von *Aquifex aeolicus*.)

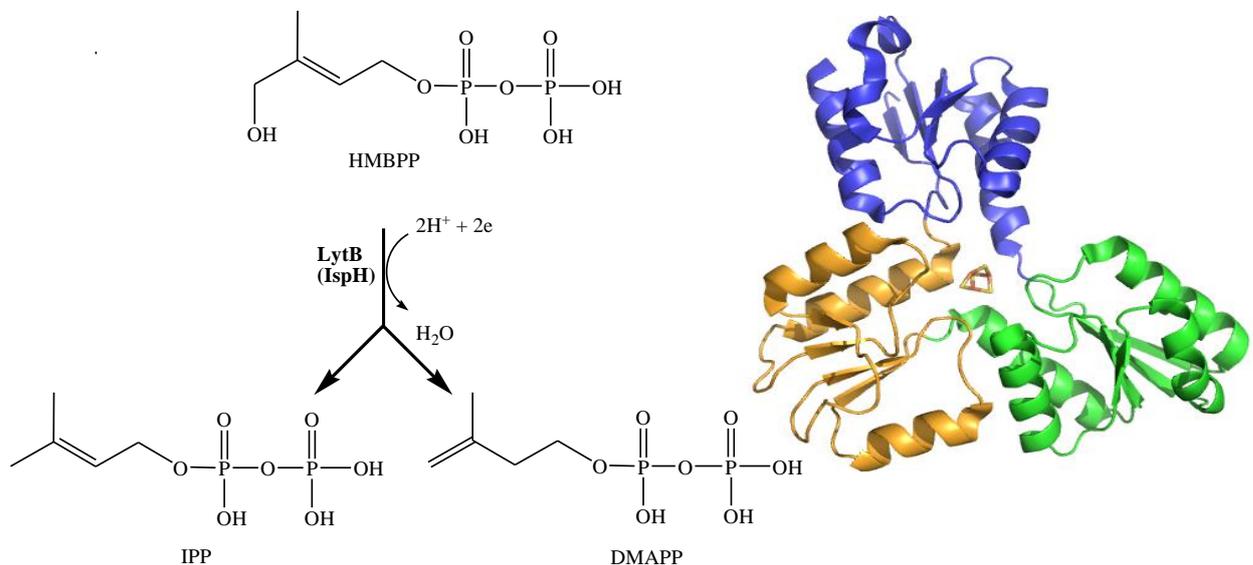


Abb. 1.8 IspH-Reaktion und ihr Kristallstrukturmodell (3DNF)

1-Hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphat (HMBPP) wird durch Übertragung von zwei Elektronen zu Isopentenylpyrophosphat (IPP) und Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) umgesetzt. Kristallstrukturmodell [30]: Domäne 1: blau; Domäne 2: grün; Domäne 3: gelb; FeS-Cluster: gelb-rot

Die Reaktionen, die von GcpE und LytB katalysiert werden, benötigen jeweils zwei Elektronen [32]. In Eubakterien dienen vermutlich Flavodoxin und Flavodoxin Reduktase als Elektronendonoren für GcpE und vielleicht auch für LytB [33]. In Pflanzenchloroplasten und Grünalgen sind die Elektronendonoren noch nicht bekannt. Bei *Plasmodium falciparum* bilden Ferredoxin und Ferredoxin-NADP⁺ Reduktase Komplexe mit LytB und übertragen Elektronen auf das LytB [28]. Bei *Thermosynechocystis elongatus* wurde die gleiche Übertragung auf GcpE beobachtet [34].

Obwohl bei diesem Stoffwechselweg im Gegensatz zum Mevalonatweg bereits IPP und DMAPP synthetisiert werden, haben manche Organismen zusätzlich noch ein bis zwei IPP-DMAPP-Isomerasen (IDI-I und IDI-II). IDI-I benötigt divalente Kationen als Kofaktoren. IDI-I von *Escherichia coli* ist der IDI-I des Menschen sehr ähnlich [35-38], während IDI-II nur bei Eubakterien und Archaeobakterien vorkommt. IDI-II benötigt divalente Kationen, FMN und NADPH [39, 40].

1.1.2.2. 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat Reduktoisomerase

Klassifizierung

Die DXR, Nomenklaturname EC 1.1.1.267, systematischer Name 2-C-Methyl-D-xylulose-5-phosphat:NADP⁺ Oxidoreduktase, gehört zu den Dehydrogenasen der Klasse B, da sie das pro-S Hydrid an Position 4 des NADPH-Nikotinamidringes überträgt, während das pro-R aus der katalytischen Tasche herausragt [41-43].

Reaktion

Die DXR katalysiert die Reduktion und Umlagerung von DOXP zu MEP. Dies ist der zweite Schritt in der Isoprenoidbiosynthese über den DOXP-Weg. Bedeutung hat die DXR dadurch gewonnen, dass sie durch das Antibiotikum Fosmidomycin inhibiert werden kann und somit eine Zielstruktur zur klinischen Anwendung, wie der Malariabekämpfung, darstellt.

Für die katalysierte Reaktion gibt es drei verschiedene postulierte Mechanismen (siehe Abb. 1.10). Im ersten Schritt entsteht bei allen Mechanismen das Übergangsprodukt 2C-Methyl-D-erythrose-4-phosphat (2C-MEP), welches dann in einem zweiten Schritt zu MEP reduziert wird. Um das Intermediat zu bilden, muss die Bindung zwischen C3 und C4 gespalten werden und eine neue Bindung zwischen C1 und C3 hergestellt werden (siehe Abb. 1.9). Das erste Modell wäre eine sigmatrope Umlagerung, die zweite eine Retroaldol-Aldol-Reaktion und die dritte ein Hydridshift Mechanismus (siehe Abb. 1.10). Der Hydridshift Mechanismus kann nach neuesten Erkenntnissen ausgeschlossen werden [41].

Sowohl für die sigmatrope Umlagerung als auch die Retroaldol-Aldol-Reaktion gibt es gleichwertige Evidenzen. Auch die neuesten NMR-Experimente von Eisenreich *et al.* konnten dies nicht abschließend klären [44].

Bei dem DXR-Mechanismus handelt sich um eine geordnete Reaktion, da NADPH vor dem Substrat bindet. Das divalente Kation befindet sich dabei entweder bereits im aktiven Zentrum oder wird an das Substrat gebunden in das aktive Zentrum eingebracht.

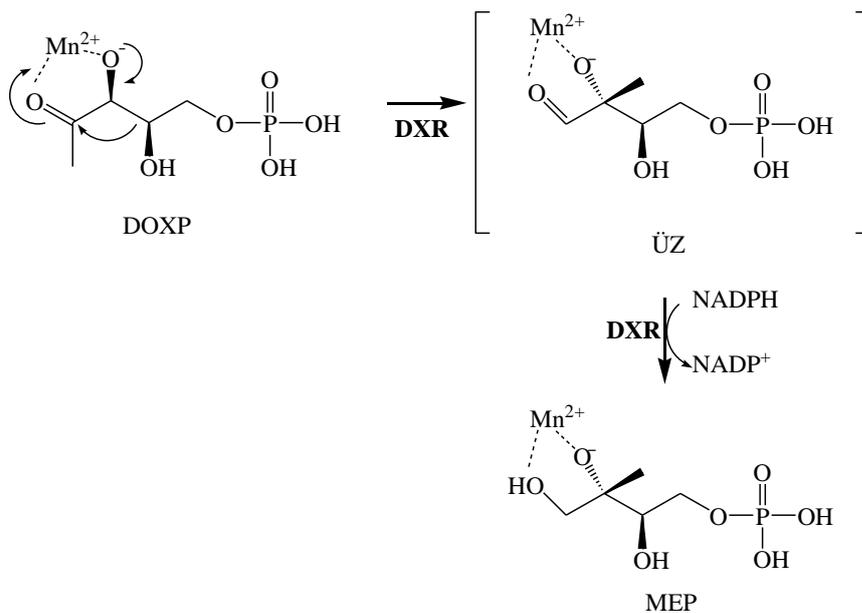


Abb. 1.9 Mechanismus der Synthese von MEP aus DOXP

DOXP wird zu 2C-Methyl-d-erythrose-4-phosphat (ÜZ, 2-CMEP) umgelagert und anschließend mit NADPH zu MEP reduziert.

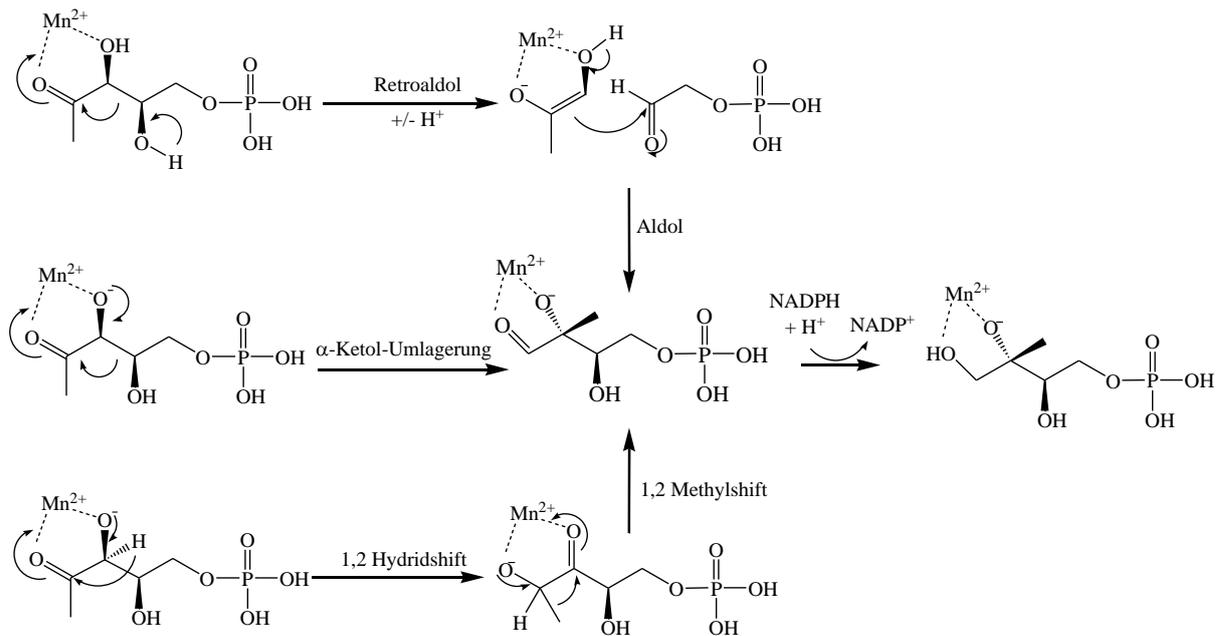


Abb. 1.10 Postulierte Mechanismen zur Bildung des Intermediates 2C-methyl-D-erythrose 4-phosphat und des Produktes MEP

Die Reaktionsmechanismen sind mit Pfeilen dargestellt. Bei dem Retroaldol-Mechanismus (oben) wird zuerst am C4 oxidiert, was zu einer Spaltung der kovalente Bindung zwischen C3 und C4 führt. Dadurch entstehen zwei Intermediate, das (Z)-prop-1-ene-1,2-diol und Aldehydphosphat, welche in einer Aldolreaktion zu dem 2-CMEP-Intermediat werden indem das C2 des Enol mit dem C1 des Aldehyds verknüpft wird. Die α -Ketol-Umlagerung (Mitte) beginnt mit einer Deprotonierung der Hydroxylgruppe am C₃ zu einem Aldehyd. Durch die Spaltung der Bindung zwischen C3 und C4, kann das C4 am C2 angreifen. Dadurch wandert die 1-Hydroxy-2-ethylphosphat-Gruppe zum C2 und es entsteht das 2-CMEP-Intermediat. Bei dem dritten Mechanismus (unten) handelt es sich um einen 1,2 Hydridshift gefolgt von einem 1,2 Methylshift zu dem 2-CMEP-Intermediat. Dieses Intermediat wird am C1 durch NADPH reduziert und es entsteht MEP.

Abb. modifiziert nach [41]

Strukturen

Es gibt bereits zahlreiche Kristallstrukturen der DXR. Das Enzym wurde rekombinant in *Escherichia coli* mit den *ispC*-Genen folgender Organismen hergestellt: *Escherichia coli* [12, 45-49], *Mycobacterium tuberculosis* [50-53], *Zymomonas mobilis* [54], *Yersinia pestis* (pdb 3IIE), *Thermotoga maritima* [55] und *Plasmodium falciparum* [56]. Zurzeit sind mehr als 25 Strukturen veröffentlicht, davon liegen die meisten als Komplex mit Fosmidomycin vor. Die erste veröffentlichte Struktur ist das Apoenzym von *Escherichia coli* (pdb 1K5H) [46]. Das Enzym ist ein Homodimer mit drei distinkten Domänen: eine N-terminale NADPH bindende Domäne, eine zentrale Domäne und eine C-terminale helikale Domäne (siehe Abb. 1.3 und Abb. 1.11).

Die N-terminale Region und die C-terminale Domäne besitzen große Ähnlichkeit mit den jeweiligen Domänen anderer NADPH-abhängigen Oxidoreduktasen. Die zentrale Domäne der DXR ist jedoch bisher einmalig unter den NADPH-abhängigen Oxidoreduktasen. Alle drei Domänen bilden zusammen ein V-förmiges Gesamtmolekül.

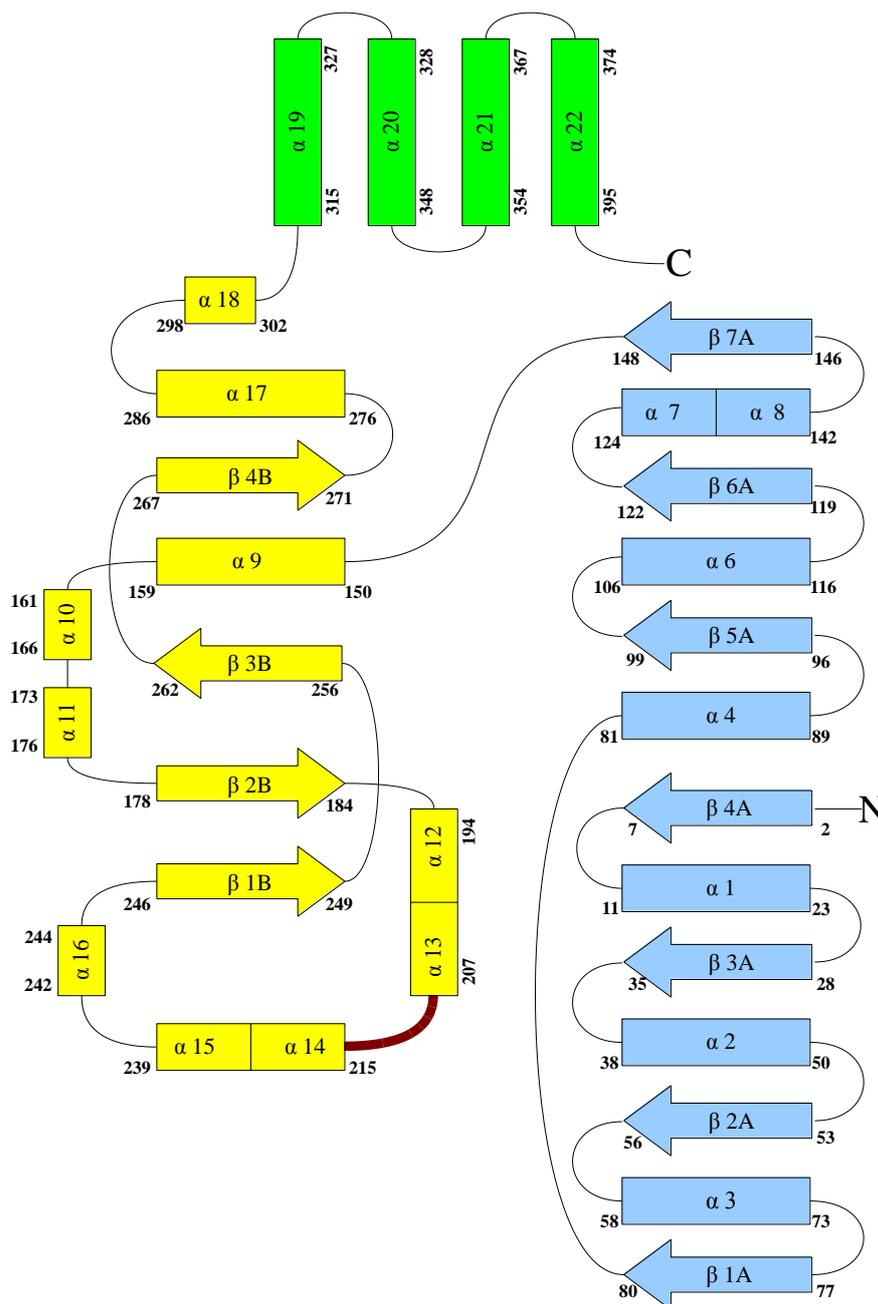


Abb. 1.11 Schematische Darstellung des Aufbaus der DXR aus *Escherichia coli*

Die Beschriftung der β -Faltblätter und α -Helices sind den *Escherichia coli* pdb Struktur 1Q0L entnommen [45]. In blau ist die N-terminale Rossmann-Fold NADPH Bindestelle dargestellt, in Gelb die zentrale Domäne, mit der flexiblen Schleife des aktiven Zentrums in rot und die C-terminale Region mit eine 4-Helix-Bündel in grün.

Die N-terminale Region ist die NADPH-Bindestelle, geht vom Met1 bis zum Asp150 und besteht aus sieben parallelen β -Faltblättern. Von beiden Seiten werden diese von einem zusätzlichen α/β -Motiv flankiert werden. Damit gehört die N-terminale Region zur Superfamilie der Rossmann-Faltung [46].

Die C-terminale Domäne von Tyr312 bis Ser398 besteht aus einem Bündel von vier Helices und ist mit der zentralen Domäne über einen Linker verknüpft, der die ganze zentrale Domäne umspannt [46, 47].

Die mittlere zentrale Domäne von Leu160 bis Gln270 besteht aus vier Helices und einer viersträngigen β -Faltblattstruktur mit parallelen sowie antiparallelen β -Faltblättern. Diese werden nur von einer Seite mit Helices und Schleifen flankiert [45]. Die zentrale Domäne enthält die meisten funktionellen Gruppen, die für Substratbindung und Umsatz in das Produkt verantwortlich sind [46]. Die hochkonservierten Aminosäuren Asp150, Glu152, Glu231 und Glu234 sind an die Bindung des divalenten Kations beteiligt [47]. Weitere hochkonservierte Aminosäuren sind Ser186, Ser222 und Lys228 [57].

Das ganze Enzym zeichnet sich durch eine sehr hohe Flexibilität aus. Die DXR bildet eine V-Form, wobei die mittlere Domäne die Spitze des V's enthält, welches sich wie ein Gelenk weiter öffnen oder schließen kann [46]. Eine weitere sehr wichtige flexible Region ist die Schleife zwischen α -13 und α -14, die sich vermutlich bei Bindung von Substrat oder Inhibitor auf das aktive Zentrum legt. Allerdings zeichnet sich diese Schleife durch einen sehr hohen B-Faktor von 100 aus. Lediglich in der Apostruktur 1K5H ist eine auswertbare Dichte für das Monomer A vorhanden [46].

Die Struktur 1JVS, in der NADPH und ein Sulfat-Ion kokristallisiert haben, zeigt eine geschlossenere Konformation der Schleife. Dennoch ist dieser Bereich vermutlich noch sehr flexibel. Der B-Faktor zwischen His209 und Met214 von 105 ist viel höher, als der durchschnittliche B-Faktor aller Reste, der ca. 40 beträgt. Das Sulfat-Ion wird über eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem His209 verbunden [48]. Die Gruppe um Steinbacher *et al.* veröffentlichte drei DXR-Strukturen aus *Escherichia coli*: das Apoenzym (pdb 1ONN), DXR nur mit Mn^{2+} (pdb 1ONO) und DXR mit Mn^{2+} und Fosmidomycin (pdb 1ONP). Im Apoenzym ragt der C-Terminus eines angrenzenden Monomers in die NADPH-Bindestelle. Die flexible Schleife des aktiven Zentrums konnte wegen fehlender Dichte nicht dargestellt werden. Auch in der Struktur als Komplex mit Mn^{2+} fehlt der Abschnitt Arg208 bis Gly215. Lediglich in

der Struktur 1ONP, in der zusätzlich Fosmidomycin gebunden ist, war es möglich eine Dichte für die Schleife zu berechnen. Dies deutet ebenfalls auf die Flexibilität des Enzyms hin [47].

Als eine weitere *Escherichia coli* DXR Struktur wurde die DXR im Komplex mit NADPH und Fosmidomycin (pdb 1Q0L) bzw. mit NADPH und DOXP (pdb 1Q0Q) kristallisiert. Im Vergleich zur Struktur mit NADPH (1JVS) und zur Struktur mit Fosmidomycin ohne NADPH (1ONP) führt die Bindung von Fosmidomycin in Anwesenheit von NADPH zu einer geschlossenen Konformation. Diese Konformation entsteht aufgrund einer induzierten Passform (*induced fit*), bei der zuerst NADPH binden muss um eine anschließende Substrat- oder Inhibitor-Bindung zu ermöglichen. Diese geschlossene Konformation wurde auch im Kristall von DXR mit NADPH und Substrat gefunden. Sie zeichnet sich dadurch aus, dass bei einer Übereinanderlagerung der NADPH bindenden Domänen, der Strukturen 1JVS und 1Q0L, die mittlere und die C-terminale Domäne jeweils um $12,5^\circ$ von der anderen Struktur abweichen. Zusätzlich hat sich auch die Ala206-Arg216-Schleife verschoben. Gly185 scheint sich wie ein Drehgelenk zu verhalten. Ser186 bildet in der komplett geschlossenen Konformation eine Wasserstoffbrücke zu His209, die in den vorherigen Kristallstrukturen nicht vorhanden ist. In der geschlossenen Konformation hat sich der Winkel φ des Gly185 um 35° im Vergleich zur 1JVS gedreht [45].

Zuletzt wurde auch eine Struktur des quaternären Komplexes aus DXR mit Mg^{2+} , Fosmidomycin und NADPH (2EGH) veröffentlicht, die jedoch kaum Erkenntnisse im Vergleich zum ternären Komplex 1Q0L zeigt. Interessanterweise liegen die C-terminalen und N-terminalen Domänen noch näher beieinander als im ternären Komplex [12].

Die *Zymomonas*-Strukturen ähneln sehr denen aus *Escherichia coli* sehr. Die *Zymomonas* DXR besteht ebenfalls aus einem Dimer mit drei Untereinheiten. Die Aminosäurereste, die mit dem Adenin-Ring des NADPH interagieren, sind bei dem *Zymomonas mobilis* Enzym andere als bei dem *Escherichia coli* Enzym [54].

Die Kristallisationsbedingungen bei denen die DXR kristallisiert, waren bisher stets saure Milieus (pH 5,1 - 5,9). Dieser Bereich liegt weit abseits des katalytisch aktiven Bereichs der DXR. Daher kann es sein, dass der Protonierungsgrad im Kristall von dem des funktionellen Enzyms abweicht. Eine Untersuchung der Metallaffinität der *Mycobacterium* DXR zeigte, dass die Mn^{2+} -Affinität bei niedrigerem pH-Wert sinkt. Vermutlich durch eine Änderung des Protonierungsgrades der Carboxyl-Gruppen [41].

Erste NMR-Messungen an der DXR wurden kurz vor der ersten Kristallstruktur veröffentlicht. Dabei wurden die Methionine des Proteins durch stabile Isotope markiert. Durch Austausch des Mg^{2+} durch Mn^{2+} konnten drei Methionine innerhalb des aktiven Zentrums durch Verbreiterung des Signals (*Peakbroadening*) identifiziert werden [58].

Mutationsstudien

Um die Rolle einzelner Aminosäurereste bei der Katalyse festzustellen, wurden zahlreiche Mutanten von verschiedenen Arbeitsgruppen hergestellt und enzymkinetisch analysiert. Verglichen wurden die kritischen Parameter $K_M(\text{NADPH})$, $K_M(\text{DOXP})$ und k_{cat} (siehe Tabelle 1.1).

Tabelle 1.1 Katalytische Eigenschaften der Wildtyp-DXR sowie verschiedener Mutanten, erweitert und modifiziert nach [59]

Enzym	K_M DOXP [μM]	K_M NADPH [μM]	k_{cat}	Literatur
E. coli DXR			[$10^2 \times \text{min}^{-1}$]	
Wildtyp	250	7,4	5900	[57]
G014D	<i>inclusion bodies</i>	<i>inclusion bodies</i>	<i>inclusion bodies</i>	[57]
E231K	270	18	14	[57]
H153Q	880	7,0	590	[57]
H209Q	1900	18	8,6	[57]
H257Q	4800	160	4,5	[57]
S. spec. DXR			[sec^{-1}]	
Wildtyp	170 ± 30	$3,5 \pm 0,3$	17	[60]
W204F	420 ± 60	$3,5 \pm 1,3$	10	[60]
W204L	2900 ± 400	24 ± 1	0,26	[60]
W204V	5000 ± 500	N/A	0,54	[60]
W204A	12000 ± 2000	N/A	0,16	[60]
Wildtyp	210 ± 30	$3,5 \pm 0,3$	17	[61]
D152N	1500 ± 200	8 ± 2	0,41	[61]

Enzym	K_M DOXP [μM]	K_M NADPH [μM]	k_{cat}	Literatur
S153A	1700 \pm 300	8,8 \pm 1,7	0,019	[61]
S153N	240 \pm 40	5,5 \pm 0,8	0,13	[61]
S153T	1800 \pm 300	17 \pm 3	0,81	[61]
E154D	250 \pm 20	5,1 \pm 0,8	0,047	[61]
H155A	94 \pm 7	2,5 \pm 0,3	4,7	[61]
M206A	5300 \pm 900	18 \pm 5	1,6	[61]

Die E231K Mutante zeigt eine relativ kleine Veränderung im K_M der beiden Substrate, allerdings einen 400-fach verringerten k_{cat} . Diese Verringerung wird vermutlich dadurch verursacht, dass Glu231 in der Kristallstruktur als Ligand für das divalente Kation fungiert und der Austausch von Glutamat durch Lysin die Ligandenstruktur destabilisiert. Dadurch ist keine Oktaeder-Koordination möglich was vermutlich zu einer geringeren katalytischen Aktivität führt [47].

Bisher wurden drei verschiedene His-Glu-Mutanten von der *Escherichia coli* DXR hergestellt: H153Q, H209Q und H257Q. Die H257Q-Mutante zeigt im Vergleich zum Wildtyp die stärksten Veränderungen ihrer kritischen Parameter. Für DOXP und NADPH wurden signifikant erhöhte K_M -Werte und ein 1300-fach verringertes k_{cat} festgestellt [57]. Die Erhöhung des K_M für NADPH ist überraschend, da NADPH in der Kristallstruktur einen relativ großen Abstand zu His257 besitzen soll [47]. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde postuliert, dass His257 und Trp212 eine stabilisierende Interaktion mit dem Nikotinamidring von NADPH eingehen. Diese Interaktion könnte essentiell für die Aktivität des Enzyms sein [47].

Der H153Q-Austausch führt zu einer 3,5-fachen Erhöhung des $K_M(\text{DOXP})$ aber zu keiner Veränderung des $K_M(\text{NADPH})$ und zu einer Verringerung des k_{cat} um ein Zehntel im Vergleich zum Wildtyp. Dieses Histidin spielt vermutlich eine strukturelle Rolle, da es nicht in direktem Kontakt zum Substrat ist, aber in Nachbarschaft zu konservierten Aspartat- und Glutamat-Gruppen liegt [48]. In den Kristallstrukturen ist His209 nahe der Bindungsstelle der Phosphatgruppe des Substrates lokalisiert und interagiert vermutlich über Wasserstoffbrücken mit der DOXP-Phosphatgruppe. Daher unterstützt das His209 möglicherweise die Positionierung des Substrates für die optimale Katalyse [45, 62]. Eine

Mutation an der Position des His209 führt zu einer Erhöhung des $K_M(\text{DOXP})$ um das 8-fache, einer minimalen Erhöhung des $K_M(\text{NADPH})$ und zu einer Verringerung des k_{cat} um das 700-fache. Veränderungen in der Wasserstoffbrückenbindung zur Phosphatgruppe des DOXP haben eine starke negative Auswirkung auf die Katalysegeschwindigkeit [57].

Von *Synechocystis* sp. PCC6803 wurden verschiedene Mutationen am Trp204 der DXR (entspricht dem Trp212 bei der *Escherichia coli* DXR) eingeführt [60, 61]. Aufgrund der Kristallstrukturen wird postuliert, dass dieses Tryptophan, welches Teil der flexiblen Schleife ist, mit der Methylgruppe des Methylerythrose-Intermediats interagiert [47]. Der Austausch durch Phenylalanin ergab nur eine geringe Änderung des $K_M(\text{DOXP})$ -Wertes. Dagegen führte der Austausch von Tryptophan durch Leucin, Valin oder Alanin zu einer Steigerung des $K_M(\text{DOXP})$ um das 17-, 29- bzw. 70-fache. Dies weist daraufhin, dass ein aromatischer Ring als Seitenkette an dieser Stelle essentiell für den Umsatz von DOXP ist. Die k_{cat} -Werte der Mutanten mit den aliphatischen Seitenketten sind deutlich niedriger. Der stärkste Effekt ist mit einer Verringerung von k_{cat} um das 1000-fache bei W204A zu sehen [60].

Der Bereich von Asp150 bis His153 besteht aus hochkonservierten Aminosäuren [46, 57, 61]. In den Kristallstrukturen koordinieren Asp150, Glu152 und Glu231 (*Escherichia coli* Nummerierung) das Mn^{2+} [12, 45, 47]. Bei *Synechocystis* ist die Nummerierung entsprechend Asp152, Glu154 und Glu223. Der Austausch dieser Aminosäuren durch Alanin, welches kein Metallion komplexieren kann, führte zu einem inaktiven Enzym und zeigte damit ihre Notwendigkeit für die Mn^{2+} -Komplexierung. Das negativ geladene Carboxylkation ist an diesen drei Positionen essentiell für die Katalyse [61].

Das Ser151 (*Escherichia coli*) ist ebenfalls hochkonserviert und bildet in den Kristallstrukturen eine Amid-Brücke mit der *N*-formyl-Gruppe des Fosmidomycin, bzw. eine NH-Brücke mit dem C2-Carbonyl-Sauerstoff von DOXP [45]. Durch Einführung einer Mutation wurde die Aktivität um das 200 bis 9000-fache herabgesetzt. Daraus konnte geschlossen werden, dass Ser151 essentiell für die Bindung und Positionierung des Substrates im aktiven Zentrum ist [61].

Trp212 und Met214 der flexiblen Schleife schirmen vermutlich das aktive Zentrum und das Substrat vor dem Solvent ab [45]. Die Mutation von Met214 (Met206 bei *Synechocystis*) konnte diese Vermutung untermauern, da der K_M stark ansteigt, aber der k_{cat} nicht so stark vom Wildtyp abweicht [61].

1.1.3. Verbreitung Mevalonatweg und DOXP-Weg

Zahlreiche Arten wurden auf die Existenz der Gene beider Isoprenoidstoffwechselwege untersucht. Vor allem Organismen mit komplett sequenzierten Genomen geben darüber Aufschluss.

Alle bekannten Genome der Archaeobakterien enthalten Gene, ortholog zu *hmgs*, *hmgr*, *mk* und *idi-II*. Vergleichbare Gene zu *pmk*, *dpmd* und *idi-I* wurden aber nicht gefunden [7]. Da *Archaea* Isoprenoide synthetisieren [63], muss angenommen werden, dass Enzyme exprimiert werden, welche die fehlenden Funktionen ausführen [7].

Die meisten der komplett sequenzierten Eubakterien besitzen ausschließlich die Gene für den DOXP-Weg, wobei es Ausnahmen gibt. Die Spirochaeten *Borrelia burgdorferi* und Gram-positive Cocci, wie z.B. *Staphylococcus aureus*, besitzen den vollständigen Satz an Genen des Mevalonatweges [7, 64]. Ein Sonderfall der Gram-positiven Cocci bilden die Listerien. Die Gattung der Listerien besitzt den vollständigen Gensatz für den Mevalonatweg, zeigen aber eine abweichende Ausstattung an Genen des DOXP-Weges. Der pathogene Organismus *Listeria monocytogenes* besitzt den kompletten Satz an Genen des DOXP-Weges, während der apathogenen Art *Listeria innocua* die Gene für *ispG* und *ispH* fehlen. Die vorhandenen Gene beider Stoffwechselwege sind funktional aktiv [65, 66].

Bei den Streptomyceten gibt es sowohl Arten, die ausschließlich den vollständigen Satz an Genen des DOXP-Weges besitzen, wie *Streptomyces coelicolor* und *Streptomyces avermilitis*, als auch *Streptomyces*-Arten, die nur die Enzyme des Mevalonatweges synthetisieren [2, 64]. Ein Großteil der stets parasitär lebenden Mykoplasmen (*Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Ureaplasma urealyticum*) besitzen keinen der beiden Isoprenoidstoffwechselwege. Ausnahme bildet hier *Mycoplasma penetrans* welches die Gene für den DOXP-Weg enthält. Auch bei dem obligatorisch intrazellulär lebenden Parasiten *Rickettsia prowazekii* fehlen die Enzyme der beiden Stoffwechselwege. Es ist noch nicht bekannt, ob diese Organismen die benötigten Isoprenoide bzw. Terpenoide von ihrem Wirt beziehen oder keine Terpene benötigen [7].

Die Verteilung der beiden Stoffwechselwege ist aber nicht immer eindeutig. So besitzt *Vibrio cholerae* den vollen Satz der Gene des DOXP-Weges und ein Gen, welches Ähnlichkeit mit dem *hmgr* Gen des Mevalonatweges besitzt. Das Archaeobakterium *Pyrococcus hirokoshii* besitzt die Gene des Mevalonatweges, die allen Archaeen typisch sind und eventuell ein

orthologes Gen zu *ispD*. Inwieweit diese Gene auch eine funktionale Rolle spielen ist noch unbekannt. Eventuell stammen diese Gene aus lateralem Gentransfer [7, 64].

Für die Verteilung der Isomerasen ist keine bestimmte Regel erkennbar. Einige der Eubakterien mit dem vollen Satz an Genen für den DOXP-Weg besitzen dennoch entweder das Gen *idi-I* oder *idi-II*. Die Isomerase ist vermutlich nicht essentiell für die Organismen, die den DOXP-Weg besitzen, da LytB die Synthese sowohl von IPP als auch DMAPP katalysiert. Demzufolge können *idill*-Deletetionsmutanten von *Escherichia coli* auf Minimalmedien wachsen [7, 67].

Tabelle 1.2 Verteilung des DOXP- und des Mevalonatweges in den Organismengruppen der Archaea und Prokaryonten, modifiziert nach [7].

Organismen	DOXP-Weg							Mevalonatweg						
	dxs	ispC	ispD	ispE	ispF	ispG	ispH	hmgs	hmgr	mk	pmk	dpmd	Idi-I	Idi-II
Archaea														
Crenarchaeota														
<i>Aeropyrum pernix</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+
Euryarchaeota														
<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+
Prokaryonten														
Aquificales														
<i>Aquifex aeolicus</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Chlamydien														
<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Cyanobacteria														
<i>Synechocystis</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
Deinokokken														
<i>Deinococcus radiodurans</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
Aktinobakterien														
<i>Streptomyces coelicor</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	?	?

Organismen	DOXP-Weg							Mevalonatweg						
	dxs	ispC	ispD	ispE	ispF	ispG	ispH	hmgs	hmgr	mk	pmk	dpmd	Idi-I	Idi-II
Firmicutes														
<i>Bacillus subtilis</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+
<i>Mycoplasma genitalium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	?	+
<i>Listeria innocua</i>	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	?	+
Proteobakterien														
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-
Spirochaeten														
<i>Treponema pallidum</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Borrelia burgdorferi</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+
Thermotogales														
<i>Thermotoga maritima</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-

Bei den Eukaryonten ist im Gegensatz zu den Prokaryonten die Verteilung der Stoffwechselwege innerhalb eines Reiches einheitlich. Alle bisher komplett sequenzierten Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*) und Tiere (*Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Danio rerio*, *Drosophila melanogaster*, *Anopheles gambiae*, *Caenorhabditis elegans*) besitzen ausschließlich den kompletten Gensatz des Mevalonatweges und keine Gene des DOXP-Weges [7]. Manche Protozoengenome, z.B. von *Leishmania major* und *Trypanosoma cruzi* besitzen Gene, die ortholog zu den Genen des Mevalonatweges sind [68, 69]. Zusätzlich wurden mögliche Orthologe zu den Genen des DOXP-Weges entdeckt [70]. Die Organismen des Stammes der Apikomplexa (Sporentierchen) besitzen alle Gene des DOXP-Weges und keine Gene des Mevalonatweges. Dies wurde zuerst bei dem komplett sequenzierten Organismus *Plasmodium falciparum* entdeckt [71, 72]. In den teilsequenzierten Organismen *Plasmodium vivax*, *Eimeria tenella* und *Toxoplasma gondii* wurden Gene des DOXP-Weges entdeckt, aber bisher keine der Gene

des Mevalonatweges [73-77]. *Cryptosporidium parvum* besitzt keinen Apikoplasten und keine Gene für die Isoprenoidbiosynthese [75].

Alle bisher komplett sequenzierten Pflanzen (*Arabidopsis thaliana*, *Lycopersicon esculentum*, *Mentha piperita*) tragen die kompletten Gensätze beider Stoffwechselwege. Die Enzyme des Mevalonatweges kommen im Cytosol vor und die Enzyme des DOXP-Weges sind in den Plastiden lokalisiert [1]. In Grünalgen fehlt der Mevalonatweg im Cytosol und lediglich der DOXP-Weg in den Plastiden ist vorhanden [78].

Tabelle 1.3 Verteilung des DOXP- und des Mevalonatweges in den Organismengruppen der Eukaryonten, modifiziert nach [7].

ORGANISMEN	DOXP-Weg							Mevalonatweg						
	dxs	ispC	ispD	ispE	ispF	ispG	ispH	hmgs	hmgr	mk	pmk	dpmd	Idi-I	Idi-II
Eukaryonten														
Tiere														
<i>Homo sapiens</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
Pflanzen														
<i>Arabidopsis thaliana</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Hefen														
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
Apikomplexa														
<i>Plasmodium falciparum</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-

Diese Verteilung der Isoprenoidstoffwechselwege ergibt einen guten Ansatz für die Suche und Entwicklung von Medikamenten gegen alle Bakterien und Parasiten, die ausschließlich den DOXP-Weg besitzen, wie z.B. *Plasmodium falciparum* und *Mycobacterium tuberculosis*.

1.2 Bedeutung des DOXP-Stoffwechselweges für die Medizin

Menschen und Tiere synthetisieren die benötigten Isoprenoide über den Mevalonat-Stoffwechselweg. Daher beeinflussen Inhibitoren des DOXP-Weges nicht die menschliche und tierische Isoprenoidbiosynthese. Mit Inhibitoren des DOXP-Weges könnte man alle Organismen schädigen, deren Enzyme des DOXP-Weges essentiell für das Überleben sind. Dazu gehören fast alle pathogene gram-negative Prokaryonten, wie *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens* und Chlamydien, sowie das gram-positive Bakterium *Mycobacterium tuberculosis*. Bei den Eukaryonten trifft das auf die Gruppe der Apikomplexa zu [7] (siehe Tabelle 1.2 und Tabelle 1.3).

Durch verschiedene Experimente mit Deletionsmutanten wurde festgestellt, dass der DOXP-Weg essentiell für *Escherichia coli* ist. Daher wird vermutet, dass dies auch auf alle Bakterien und Eukaryonten zutrifft, die lediglich den DOXP-Weg besitzen. Inhibitoren eines oder mehrerer Enzyme des DOXP-Weges könnten als Medikamente gegen pathogene Bakterien, die ihre Isoprenoide ausschließlich über den DOXP-Weg synthetisieren, und Apikomplexa eingesetzt werden [72, 79]. Nach geeigneten Inhibitoren wird vor allem für *Plasmodium falciparum* und *Mycobacterium tuberculosis* intensiv gesucht [80-82].

1.2.1. Apikomplexa

Der Stamm der Apikomplexa umfasst Arten, die parasitär in Tieren und/oder Menschen leben. *Plasmodium* gehört neben *Toxoplasma*, *Eimeria*, *Babesia* und *Theileria* zu den Apikomplexa [80].

Der Name des Stammes kommt von einem Organell der Organismen, dem Apikoplasten. Der Apikoplast ähnelt den Plastiden von Pflanzen. In diesem laufen die Biosynthese der Isoprenoide und die Fettsäuresynthese ab. Der Apikoplast besitzt ein eigenes Genom. Dabei handelt es sich um ein zirkuläres bakterienähnliches Genom, welches fast ausschließlich für Replikationsproteine codiert. Die Gene für die Fettsäuresynthese und für die Isoprenoidsynthese sind im Zellkern codiert.

Die Proteine besitzen eine spezifische Transportersequenz damit die Proteine vom Cytosol in den Apikoplasten transportiert werden können. Der Stamm der Apikomplexa ist phylogenetisch am nächsten mit dem Unterstamm der Dinoflagellaten, die zu dem Stamm Dinozoa gehören, verwandt [83].

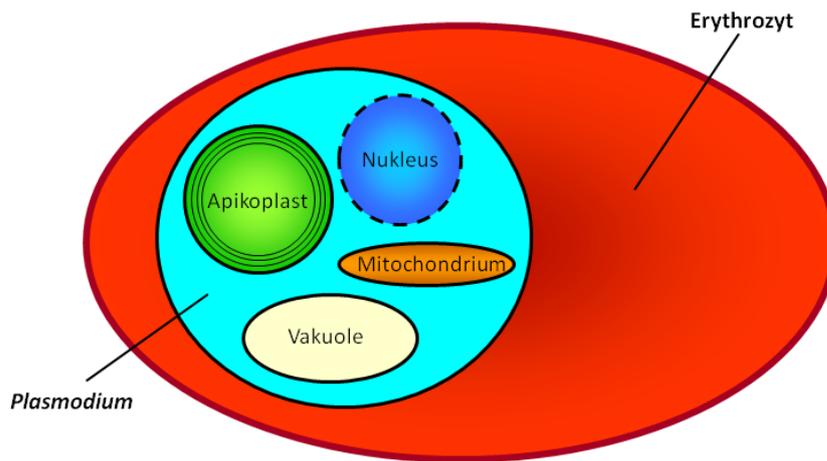


Abb. 1.12 Schema eines Erythrozyten (rot), der mit *Plasmodium* (hellblau) infiziert ist.

Im *Plasmodium* sind die Organellen verschiedenfarbig dargestellt und beschriftet. Im Apikoplasten (grün) findet die Isoprenoidsynthese über den DOXP-Weg statt. Der Apikoplast (grün) besitzt vier Membranen.

Abb. freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Ingo Rekitke.

1.2.2. Malaria

Malaria ist eine weitverbreitete Krankheit, sie ist in 109 Ländern in Mittel- und Südamerika, Afrika und Asien endemisch. Eine Malariaerkrankung ist gekennzeichnet durch Fieber, Schüttelfrost, Übelkeit und Erbrechen. Sie wird verursacht durch eine Protozoen-Infektion der Gattung *Plasmodium*, Ordnung *Haemosporida*. Plasmodien werden von den weiblichen Mücken der Gattung *Anopheles* während einer Blutmahlzeit übertragen. Die für den Menschen pathogenen Stämme sind *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium vivax* und *Plasmodium ovale* [84]. Neben diesen gibt es auch nicht humanpathogene Stämme, die bei Mäusen oder Vögeln Malaria übertragen.

Ursprünglich kam Malaria auch in Südeuropa vor, durch Trockenlegung von Sumpf- und Feuchtgebieten und durch Einsatz von Insektiziden wurden die Brutgebiete der *Anopheles* Mücke verdrängt und Malaria in den 1950ern in Europa weitestgehend ausgerottet [85].

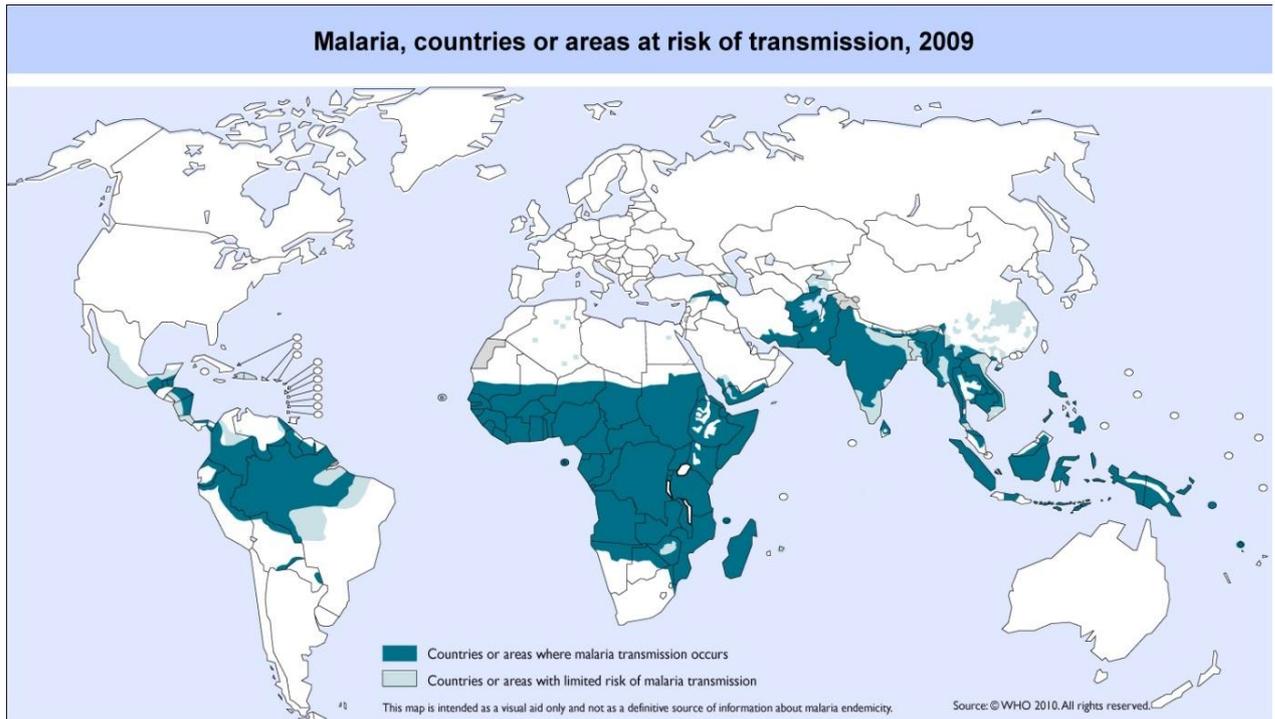


Abb. 1.13 Verbreitungsgebiete von Malaria nach WHO 2009

in dunkelblau: Gebiete mit hohem Infektionsrisiko; in hellblau: Gebiete mit einem geringen Infektionsrisiko; in weiß: Gebiete mit keinem Infektionsrisiko

Quelle: http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_Malaria_ITHRiskMap.JPG

Malaria gehört mit HIV/AIDS und Tuberkulose zu den am meisten verbreiteten und tödlichsten Krankheiten weltweit. Die tödlich verlaufende Malariaform wird hauptsächlich von *Plasmodium falciparum* übertragen, während eine Infektion mit einer der anderen Plasmodien-Stämme harmloser verlaufen [86].

Es gibt jährlich ca. 230 bis 250 Millionen klinische Fälle (Zeitraum 2000 bis 2009) und geschätzte eine Million Malaria-Tote jedes Jahr. Die meisten Todesopfer weltweit sind Kinder unter fünf Jahren, aber auch Schwangere sind besonders gefährdet sowie Erwachsene ohne erworbene Teilimmunität [87-89].

Bisherige Bemühungen Malaria weltweit auszurotten schlugen fehl. Gründe hierfür liegen in der entwickelten Resistenz der *Anopheles*-Mücke gegen das Insektizid DDT. Ebenso wirkt sich die unzureichende Behandlung der Bevölkerung mit Antimalariamedikamenten und -prophylaxen aus, die auf die Armut der am stärksten betroffenen Länder zurückzuführen ist. Weitere Gründe sind in der permanenten Entwicklung von Resistenzen der Plasmodien gegenüber den gängigen Antimalariamedikamenten zu finden [84, 88-90].

1.2.3. Inhibition der Isoprenoid-Synthese durch Fosmidomycin und Fosmidomycin-Analoga

Fosmidomycin wurde in den 1970er Jahren von der japanischen Firma Fujisawa aus *Streptomyces lavendulae* als natürliches Antibiotikum isoliert. Erste klinische Versuche zeigten Erfolge bei der Behandlung von Harnwegsinfektionen mit Fosmidomycin [91, 92]. Fosmidomycin und FR90098 hemmen auch das Wachstum von *Plasmodium falciparum* und einigen gram-negativen klinisch relevanten Bakterien, wie *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae* und *Serratia marcescens* [72, 79]. Anfangs blieb ungeklärt welche Zielstruktur durch Fosmidomycin gehemmt wird [93]. Da weitere Untersuchungen zeigten, dass Fosmidomycin nicht in der Lage ist alle Bakterien im Wachstum zu hemmen, wurde untersucht welche Zielstruktur oder welcher Stoffwechselweg den Organismen gemeinsam ist. Es stellte sich heraus, dass Fosmidomycin nur auf Bakterien eine Wirkung hat, die den DOXP-Weg besitzen [94]. Außerdem zeigten Pflanzen, die mit Fosmidomycin behandelt wurden, eine Chlorose, d.h. Verlust des grünen Blattfarbstoffs, welche zu einem Absterben der Pflanze führt. Diese Beobachtung konnte durch Inhibition der Synthese der Isoprenoid-Seitenkette des Chlorophyll-Moleküls erklärt werden [95]. Der endgültige Beweis, dass Fosmidomycin den DOXP-Weg hemmt, konnte schließlich durch *in vitro*-Versuche mit rekombinanten Enzymen erbracht werden. Es zeigte sich, dass die DOXP-Reduktoisomerase durch Fosmidomycin gehemmt wird [94, 95]. Fosmidomycin besitzt eine strukturelle Ähnlichkeit zu dem 2C-Methyl-D-erythrose-4-phosphat-Intermediat. Die Hydroxamylsäure-Seitenkette bildet mit dem Metallion eine Chelatstruktur und die Phosphono-Gruppe bindet in der Tasche des Enzyms anstelle der Phosphatgruppe des DOXP [47, 96].

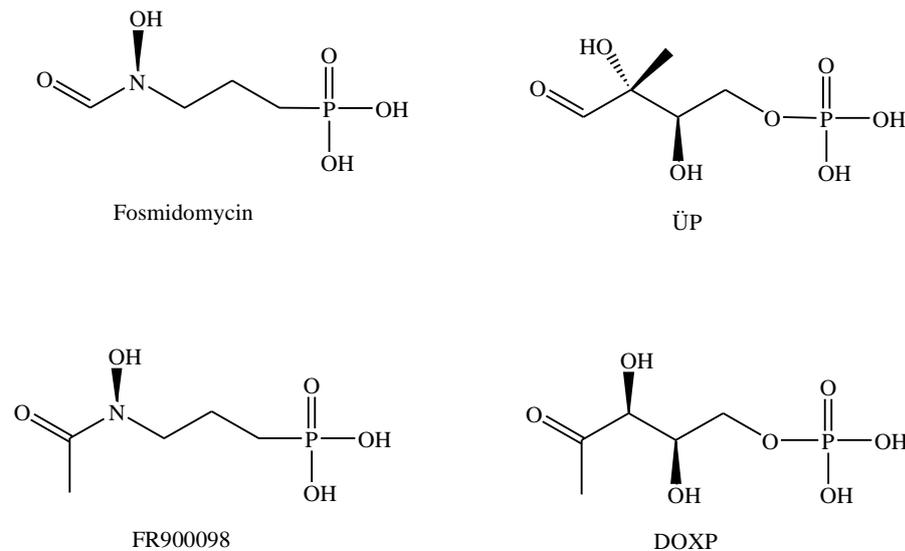


Abb. 1.14 Strukturelle Ähnlichkeit von Fosmidomycin zu 2C-Methyl-D-erythrose-4-phosphat (ÜP) und von FR900098 zu DOXP

Die Inhibition durch Fosmidomycin konnte *in vitro* am rekombinant hergestellten DXR von u.a. *Plasmodium falciparum* [72], *Escherichia coli*, *Mycobacterium tuberculosis*, gezeigt werden. Kinetisch bindet Fosmidomycin zunächst mit geringer Affinität an das Enzym, löst aber eine Konformationsänderung des Enzyms aus. Diese Konformationsänderung bewirkt eine starke Affinitätssteigerung, die zu einer quasi-irreversiblen Bindung von Fosmidomycin an die DXR führt [45, 97]. Die Bindung erfolgt ähnlich der Bindung des Substrats DOXP [47, 96]. Desweiteren hemmt Fosmidomycin das Wachstum von *Plasmodium falciparum in vitro* und senkt die Parasitämie von *Plasmodium vinckei* in Mäusen [72]. Fosmidomycin besitzt eine sehr geringe Toxizität, der LD₅₀-Wert in der Ratte beträgt 12 g pro kg Körpergewicht. Zusätzlich wirkt es auch gegen bekannte multiresistente Parasitenstämme [72].

Von den zahlreichen Fosmidomycin-Derivaten, die aus Streptomyceten isoliert oder chemisch synthetisiert wurden, zeigten nur wenige eine höhere Antimalaria-Aktivität als Fosmidomycin. FR900098 zeigte *in vitro* und in *Plasmodium vinckei* infizierten Mäusen eine zwei- bis dreifach höhere Antimalaria-Aktivität [72]. Bei FR900098 handelt es sich um ein N-acetyl-Derivat des Fosmidomycin, welches aus *Streptomyces rubellomurinus* isoliert wurde [92].

Das Dichlorphenyl-Derivat des Fosmidomycin hat eine 12-fach höhere Aktivität in der *Plasmodium falciparum in vitro*-Kultur als Fosmidomycin [98, 99]. Da Fosmidomycin und FR900098 hydrophile Substanzen sind, ist die Aufnahme im Darm gering [93, 100].

Daher wurden Pro-Pharmaka (*Prodrugs*) entwickelt um die Bioverfügbarkeit zu erhöhen. Die Phosphoarylester-, Phosphodiarylester- und Acyloxyalkylester-Derivate von FR900098 zeigten eine höhere Bioverfügbarkeit und eine höhere Antimalaria-Aktivität im Mausmodell. Diese Ester maskieren die Phosphonatgruppe des FR900098 und passieren besser das Darmepithel. Anschließend wird die biolabile Esterbindung wieder gespalten und FR900098 wird freigesetzt [101, 102].

Toxoplasma gondii und *Eimeria tenella* werden durch Fosmidomycin in Zellkultur nur sehr wenig im Wachstum gehemmt. Vermutlich liegt das daran, dass Fosmidomycin von den Wirtszellen dieser Parasiten nicht gut aufgenommen wird [75, 80].

Die Enzyme des DOXP-Weges sind wahrscheinlich alle essentiell für *Mycobacterium tuberculosis*. Gezeigt wurde es für die DOXP-Reduktoisomerase, für IspD und IspF [103-105]. Daher würden sich Inhibitoren der DOXP-Reduktoisomerase als mögliche Tuberkulosemedikamente eignen.

In *in vitro*-Enzymassays wird *Mycobacterium tuberculosis* DOXP-Reduktoisomerase durch Fosmidomycin inhibiert. Der IC₅₀-Wert beträgt 80 bzw. 300 nM [51, 106]. Allerdings wird das *Mycobacterium* Wachstum in *in vitro*-Zellkulturexperimenten nicht gehemmt. Dies liegt vermutlich daran, dass das hydrophile Fosmidomycin nicht die dicke und lipophile Zellwand der Mykobakterien passieren kann [103, 106]. Daher wird nach neuen DOXP-Reduktoisomerase-Inhibitoren gesucht, die lipophiler sind als Fosmidomycin und FR900098. Ein weiterer Ansatz sind lipophile Fosmidomycin-Analoga bzw. Substanzen, die die Zellwand angreifen und für Fosmidomycin durchlässiger machen [82]. Diese könnten als Kombinationspräparate eingesetzt werden [81, 103, 107].

1.2.4. Klinische Studien mit Fosmidomycin als Malariamedikament

Da Fosmidomycin das Parasitenwachstum sowohl *in vitro* als auch in Studien mit Mäusen senkt, wurde daraufhin eine Machbarkeitsstudie am Menschen durchgeführt. Dazu wurden je zehn Patienten in Gabun und Thailand mit akuter unkomplizierter Malaria mit Fosmidomycin behandelt. Alle Patienten waren mit Plasmodien der Art *Plasmodium falciparum* infiziert. Den Patienten wurde über einen Zeitraum von sieben Tagen jeweils dreimal täglich eine Dosis von 1200 mg oral verabreicht [108]. In beiden Studien waren die

Patienten nach ca. 48 h parasitenfrei. In Gabun waren die Patienten nach 24 h und in Thailand nach 47 h fieberfrei. Die Heilungsrate am Tag 14 betrug mehr als 80%. Am Tag 28 waren zwei Patienten in Gabun und acht Patienten in Thailand rezidiv [108]. Daher eignet sich Fosmidomycin nicht als Monotherapie.

Verschiedene gängige Antimalariamittel wurden in Kombination mit Fosmidomycin *in vitro* getestet [109]. Kein zusätzlicher Effekt wurde bei einer Kombination von Fosmidomycin mit Chloroquin, Mefloquin, Halofantrine, Lumefantrine, Artemisinin, Atovaquone, Proguanil, Rifampicin bzw. Ciprofloxacin gefunden. Additiv wirkten Chinin, Doxycyclin bzw. Azithromycin. Clindamycin bzw. Lincomycin zeigten hingegen einen synergistischen Effekt. Daher wurde Clindamycin ausgewählt um im Mausmodell und in klinischen Studien in Kombination mit Fosmidomycin weiter untersucht zu werden [109]. Clindamycin wird hauptsächlich gegen bakterielle Infektionen mit gram-positiven und anaeroben Bakterien eingesetzt und wirkt gegen Malaria nur sehr langsam aber effektiv. Daher kann es nur bei unkomplizierter Malaria als Monotherapie eingesetzt werden [110].

In *Plasmodium vinckei* infizierten Mäusen wirkte das Kombinationspräparat aus Fosmidomycin und Clindamycin, sowohl bei anfänglicher geringer Parasitämie von weniger als 1%, als auch bei hoher Parasitämie von über 20% sehr effektiv [109]. Es wurden bereits mehrere klinische Studien mit Fosmidomycin-Clindamycin-Kombinationspräparaten im Vergleich zu Fosmidomycin und Clindamycin als Monotherapeutika durchgeführt. Alle Studien konnten die synergistische Wirkung bestätigen. Die Parasitämie wurde im Vergleich zur Clindamycin-Monotherapie mit dem Kombinationspräparat schneller gesenkt. Die Rückfallquote des Kombinationspräparates war im Gegensatz zu einer Monotherapie mit Fosmidomycin geringer bzw. gar nicht vorhanden [111-115].

Die gute Kombinationsmöglichkeit von Fosmidomycin mit Clindamycin liegt darin begründet, dass Fosmidomycin in der Anfangsphase der Behandlung sehr gut und schnell wirkt und Clindamycin zwar eine Latenzzeit hat, aber danach effektiv gegen *Plasmodium falciparum* wirkt [80, 116].

1.3 NMR Strukturaufklärung von löslichen Proteinen

Die NMR-Spektroskopie ist neben der Röntgenkristallographie eine Methode zur Aufklärung von Proteinstrukturen. In der NMR werden die Proteine meist in Lösung untersucht, während zur Aufklärung mittels Röntgenstrahlen Proteinkristalle benötigt werden. Daher können mittels Röntgenstrukturanalyse nur starre Zustände betrachtet werden, während durch NMR auch Proteinbewegung und damit Konformationsänderungen des Proteins gemessen werden können. Sollte sich ein Protein nicht zur Kristallisation bringen lassen, so ist die NMR bisher die einzige Alternative zur Strukturbestimmung.

Andererseits ist die NMR durch die Proteingröße limitiert. Je größer das Protein umso schwieriger ist die NMR Analyse. Bei Proteinen größer als 60 kDa ist eine komplette Strukturaufklärung derzeit technisch oft nicht möglich [117].

Zur Strukturaufklärung mittels NMR ist es notwendig, dass zuerst Informationen über die Primärstruktur ermittelt werden. Aufbauend auf den Primärstrukturdaten kann ein Modell der Sekundärstruktur und Tertiärstruktur aufgestellt werden. Die Primärstrukturdaten umfassen die Zuordnung der Resonanzlinien in den Spektren zu den spezifischen Atomen im Protein. Es werden sogenannte Spinsysteme aufgestellt. Alle Resonanzfrequenzen, die mit den Spins eines Aminosäurerestes assoziiert sind, werden aufgenommen. Dazu gehören die Frequenzen vom H_N , N_H , H_α , C_α , CO. Zuerst werden Spinsystempaare gebildet, bestehend aus einem Aminosäurerest und dessen Vorgängeraminosäurerest. Aus diesen Paaren werden längere Fragmente ermittelt. Jeder Aminosäurerest, mit Ausnahme des N-terminalen Endes, hat einen Vorgänger. Die Resonanzfrequenzen, bzw. die daraus resultierende chemische Verschiebung, werden vom Aminosäuretyp und der chemischen Umgebung, in der sich der Aminosäurerest befindet, beeinflusst. Daher können die Spinsysteme in Gruppen zusammengefasst werden, welchem Aminosäuretyp sie am ehesten entsprechen [117].

Je mehr Informationen sich aus dem Spektrum ergeben, desto genauere Aussagen kann man über jeden Spin machen. Im Idealfall kann man jedes Signal einem bestimmten Atom in der Primärsequenz zuordnen. Häufig ist es nicht möglich eine lückenlose Kette aufzustellen. Durch Signalüberlagerung oder dem Fehlen eines Protonsignals in der Amidgruppe (z.B. beim Prolin) wird die Kette unterbrochen. Dadurch kann entweder kein Vorgänger gefunden

werden oder es kommen mehrere Spins als mögliche Vorgänger infrage. Somit erhält man eine größere Anzahl Proteinrückgrat-Fragmente unterschiedlicher Länge. Können mehr als 90 % der Amidgruppen zugeordnet werden, ist eine Strukturaufklärung mit hoher Wahrscheinlichkeit möglich. Je weniger zugeordnet werden konnten, desto schwieriger wird die Strukturaufklärung [117].

Bei Peptiden und sehr kleinen Proteinen (kleiner als 10 kDa) reicht es oftmals aus nur die Protonenfrequenzen aufzunehmen, um die gesamte Zuordnung zu erreichen. Bei allen Proteinen größer als 10 kDa wird es notwendig die Resonanzfrequenzen vieler Spins eines Aminosäurerestes aufzunehmen. Die Frequenzsätze werden unterteilt in die Gruppen der Atome, die zum Proteinrückgrat gehören und in die Atome, die zu den Seitenketten gehören. Das Proteinrückgrat ist dabei das zentrale Element, welches zugeordnet werden muss.

Die gemessenen Resonanzfrequenzen sind abhängig von dem äußeren Magnetfeld und von spezifischen Geräteeinstellungen. Da es bei jeder Messung Unterschiede gibt, entstehen kleine Verschiebungen in den gemessenen Signalen. Auf Grund dessen wird jede Resonanzfrequenz mit einem Signal einer Referenzprobe in Bezug gesetzt. Alle Resonanzfrequenzen werden in eine dimensionslose Skala: $\delta = \frac{\nu - \nu_0}{\nu_0} 10^6$ konvertiert. Diese Skala hat den Namen chemische Verschiebung erhalten und wird per Konvention in ppm (parts per million) angegeben [117].

Die chemischen Verschiebungen von ^1H , ^{13}C und ^{15}N haben in Proteinen bestimmte Charakteristika. Die Amidprotonen besitzen eine chemische Verschiebung im Bereich um 8 ppm, H_α im Bereich um 4 ppm und Methylprotonen im Bereich um 1 ppm. Ein ähnlicher Trend ist bei den α -Kohlenstoffen und den β -Kohlenstoffen zu finden. Diese Unterschiede resultieren hauptsächlich aus der Elektronegativität der benachbarten Atome. Daher hat das Amidproton eine große chemische Verschiebung, da der Amid-Stickstoff die Elektronen mehr zu sich zieht. Dabei wirkt die Elektronegativität des Amid-Stickstoffs als induktiver Effekt über mehrere Bindungen hinweg. Dieser nimmt mit der Entfernung ab. So ist die chemische Verschiebung vom H_α und C_α größer als von den Methylprotonen und -kohlenstoffen, da diese weiter entfernt vom elektronegativen Stickstoff sind. Bei Arginin, beispielsweise, sieht die Verteilung der chemischen Verschiebung bei Protonen und Kohlenstoffen wie folgt aus: $\alpha > \delta > \beta > \gamma$.

Eine positive Ladung, wie beim Lysin, beeinflusst die chemische Verschiebung genauso wie die Elektronegativität, da sie auch die Elektronen des Nachbaratoms zu sich zieht und die Abschirmung des Kerns des Nachbaratoms herabsetzt. Eine negative Ladung hat den gegenteiligen Effekt, da es die Abschirmung vergrößert und die Verschiebung daher kleiner wird. Aromatische Verbindungen und Carboxylgruppen haben zusätzlich einen Ringstromeffekt. Dieser hat ebenfalls Einfluss auf die chemische Verschiebung.

Die chemische Verschiebung eines Atoms wird nicht nur durch die kovalent gebundenen Nachbaratome beeinflusst, sondern durch alle Atome in räumlicher Umgebung. Durch die Tertiärstruktur der Proteine ergibt sich eine große Diversität in der chemischen Verschiebung von ansonsten gleichen Atomen. Daher haben beispielsweise nicht alle Methylprotonen im Alanin eine chemische Verschiebung von 1,39 ppm, sondern besitzen je nach individueller Umgebung leichte Verschiebungen in diesem Bereich. Die Diversität der chemischen Verschiebung resultiert aus der Summe der verschiedenen Effekte. Dazu gehören die elektronegativen Effekte, elektrostatische Effekte und der Ringstromeffekt.

Die chemische Verschiebung der Kohlenstoffe (ca. 70 ppm) ist über einen größeren Bereich verteilt, als die chemische Verschiebung der Protonen (ca. 9 ppm). Dennoch kann es häufiger passieren, dass zwei oder mehr Spins eine identische chemische Verschiebung besitzen. In diesen Fällen spricht man von degenerierten chemischen Verschiebungen oder degenerierten Signalen. Ebenfalls kann eine Degenerierung durch die Mittelung der Spinumgebung hervorgerufen werden. Durch die Umgebung ist der Austausch zwischen den Gruppen schneller und die Spins relaxieren schneller von ihrem angeregten Zustand, was zu schwächeren Signalen führt. Als gutes Beispiel dient die schnelle Rotation der Methylgruppen von Alanin, Valin, Isoleucin und Leucin, wodurch für die Protonen unscharfe Signale entstehen.

Die Zuordnung der Resonanzfrequenzen (chemischen Verschiebung) von jedem Atom, bedeutet in der Protein-NMR eine große Herausforderung. Während des Zuordnungsprozesses werden die Resonanzsignale, die zu derselben Aminosäure (demselben Spinsystem) gehören, über eine größere Anzahl an NMR-Experimenten gesammelt. Dabei ist das erste Ziel möglichst vielen Spinsystemen einen Aminosäuretyp (*residue type*) zuzuordnen. Sollte eine bestimmte Aminosäure nur einmal im Protein vorkommen, dann führt die Bestimmung des Aminosäuretypes direkt zur Zuordnung aller

gemessenen Resonanzfrequenzen zu den Atomen dieser Aminosäure. Die Unterscheidung der verschiedenen Aminosäurereste voneinander hängt von den Resonanzen und der Aufspaltung in die chemischen Verschiebungen zusammen. Die Reste können klarer durch die Kohlenstoff-Verschiebung unterschieden werden als durch die Proton-Verschiebung, da die Kohlenstoffverschiebung sich über einen größeren Bereich erstreckt als die Protonenverschiebung. Beispielsweise überlappen die Bereiche der α -Kohlenstoff-Verschiebungen von Tryptophan, Tyrosin und Valin nicht mit ihren β -Kohlenstoff-Verschiebungen. Im Gegensatz dazu überlappen die Bereiche der chemischen Verschiebungen ihrer α -Protonen mit den Bereichen der β -Protonen. Daher sind die chemischen Verschiebungen der Kohlenstoffe generell besser geeignet für Vorhersagen des Atomtyps in einem Spinsystem.

Trotz der Aufspaltung der Bereiche der chemischen Verschiebung durch die individuelle Umgebung jedes Atoms im Protein sind zahlreiche Überlappungen der Signale in den Spektren möglich. Selbst ein Polypeptid mit einer kleinen Größe von 50 Resten wird ein komplexes NMR-Spektrum mit vielen überlappenden Signalen ergeben. Eine Lösung für dieses Problem besteht in der Erhöhung der Dimensionalität der Spektren. Zwei-, Drei- und Vier-Dimensionale Spektren (siehe 1.3.2, 2.2.4 und 2.2.5) werden inzwischen routinemäßig aufgenommen. Mit diesen Methoden ist es möglich gut aufgelöste Spektren von Proteinen im Größenbereich von 30 bis 50 kDa durchzuführen.

Für Proteine die noch größer sind, werden zusätzliche Methoden notwendig, wie die Durchführung von TROSY-Experimenten statt HSQC, das Messen bei möglichst hohen Temperaturen, sowie die Deuterierung der aliphatischen Kohlenstoffe. Eine weitere Möglichkeit bietet die selektive Isotopen-Markierung bestimmter Aminosäuren oder Aminosäurereste statt einer gleichmäßigen Markierung aller Aminosäuren im Protein [117, 118].

Tabelle 1.4 NMR-Methode in Abhängigkeit der Proteingröße, nach [117]

M_r [kDa]	Methode	Isotopen-Markierung	gemessene Spins	Dimensionen
< 10	Homonuklear	keine	¹ H	2D
10 – 15	¹⁵ N-Homonuklear	¹⁵ N	¹ H, ¹⁵ N	3D, 4D
15 – 30	Heteronuklear	¹⁵ N und ¹³ C	¹ H, ¹³ C, ¹⁵ N	3D, 4D
30 – 60	Heteronuklear + ² H	¹⁵ N, ¹³ C und ² H (CH zu CD)	¹ H, ¹³ C, ¹⁵ N	3D, 4D
60 – 100	Heteronuklear + ² H	¹⁵ N, ¹³ C und ² H (CH zu CD)	¹ H, ¹³ C, ¹⁵ N	3D, 4D

1.3.1. Homonukleare NMR-Spektroskopie

Homonukleare Methoden sind die einfachsten Verfahren in Bezug auf die Herstellung der Probe, Durchführung und Programmierung der Messungen und Auswertung der Spektren. Den Namen erhält die Methode dadurch, dass nur eine Atomsorte gemessen wird, beispielsweise Wasserstoff [117].

Bei heteronuklearen Methoden wird die Magnetisierung auf verschiedene Atomsorten übertragen. Sowohl homonukleare als auch heteronukleare Methoden sind durch die Proteingröße limitiert. Diese Limitierung beruht auf einer umso schnelleren Spin-Spin Relaxationsrate je größer das Protein ist. Ist die Relaxationsrate erhöht, führt dies zu einer Reduzierung der Sensitivität der Mehrdimensionalen NMR-Methoden und es kommt zu mehr Überlagerungen von Resonanzlinien, was Signalüberlappungen und Signaldegenerierung nach sich zieht [117].

Für homonukleare Methoden benötigt man unmarkierte Proben, bzw. ¹⁵N-markierte Proben, die einfach und relativ kostengünstig herzustellen sind. Mit unmarkierten Proteinen sind 2D Experimente möglich, mit ¹⁵N-markierten Proben auch 3D und 4D Experimente. Allerdings ist es mit diesen Methoden oft nicht möglich Proteine zu untersuchen, die größer als 7 bis 10 kDa sind. Für die Primärstruktur, auch als sequentielle Zuordnung bezeichnet, werden COSY- und TOCSY-Experimente durchgeführt. Bei dem COSY-Experiment wird die Kopplung der Spins ausgenutzt. Wenn die Signale zweier Protonen koppeln dann entsteht zwischen ihnen ein Kreuzsignal. Die maximale Entfernung der koppelnden Atome sind zwei bis drei Bindungen entfernt. Dabei ist die Intensität des Kreuzsignals antiproportional abhängig von

der Entfernung zwischen den koppelnden Systemen. Die Signale werden als chemische Verschiebungen in zweidimensionalen Spektren dargestellt. Die gemessenen chemischen Verschiebungen der Spinsysteme werden mit statistischen chemischen Verschiebungen (BMRB-Datenbank) der Aminosäuren verglichen [119]. Die BMRB-Datenbank (*Biological Magnetic Resonance Data Bank*) enthält für jede Aminosäure eines Proteins ein charakteristisches Verschiebungsmuster [119]. Dieses kann verwendet werden um die Spinsysteme den wahrscheinlichsten Aminosäuretypen zuzuordnen. Danach werden dipolar koppelnde Protonen benachbarter Aminosäurereste untersucht. Diese werden als NOESY Experimente (Nuklearer Overhauser Spektroskopie) bezeichnet. In den NOESY-Spektren ist die Intensität des Kreuzpeaks antiproportional zur Interprotonendistanz ($I \approx 1/d^6$). Es werden Abstände bis zu 5 Å im Spektrum abgebildet. Für die Resonanzzuordnung werden aufgrund ihrer besseren Auflösung meistens die NOEs der Amidprotonen und/oder der $H\alpha$ untersucht.

β -Faltblätter und α -Helices zeigen distinkte NOE-Signalmuster. In β -Faltblättern ist das stärkste Kreuzsignal zwischen dem Amidproton und dem $H\alpha$ der Vorgängeraminosäure charakteristisch. Die Amidprotonen einer Vorgängeraminosäure ergeben ein schwächeres Signal, als ein räumlich näheres Proton. Im Falle einer α -Helix sind die NOE-Signale zweier Amidgruppen benachbarter Aminosäuren sehr stark, da die Entfernung der beiden Protonen mit 2,8 Å sehr gering ist. Das Kreuzsignal zwischen $H\alpha$ und dem Amidproton der nachfolgenden Aminosäure ist hingegen etwas schwächer. Zusätzlich sind die NOE-Signale zwischen den Amidprotonen über mehrere Bindungen messbar, da auch die Amidprotonen der Aminosäuren $i+2$ und $i+3$ einen Abstand zwischen 4 und 5 Å aufweisen.

Einige interresiduale NOEs bilden die H_N - und $H\alpha$ -Protonensignale ab. Unter geeigneten Bedingungen kann man auf der Basis von H_N - und $H\alpha$ -NOEs auch sequentiell zuordnen. Diese sequentielle Konnektivität kann durch fehlende Amidsignale unterbrochen werden. Signalverbreiterung, die Anwesenheit eines Prolinrestes oder degenerierte chemische Verschiebungen können Ursachen für dieses Fehlen sein. In einigen Fällen ist es dennoch möglich auf der Basis von aliphatischen Protonen die sequentiellen Konnektivitäten zu bestimmen. Beispielsweise mit $H\alpha$ und $H\beta$, oder im Fall von Prolin, dem δ -Proton.

Mit einer ^{15}N -markierten Proteinprobe kann man dreidimensionale TOCSY-Experimente durchführen. Dies ist sinnvoll, da die zweidimensionalen TOCSY-Spektren sehr viel Signalüberlappung besitzen während durch die Einführung der Stickstoffdimension eine

höhere Auflösung erzielt werden kann. Durch die verbesserte Auflösung ist es möglich auch etwas größere Proteine bis etwa 15 kDa zuzuordnen (siehe Tabelle 1.4). Zusätzlich erlaubt die Einführung von ^{15}N auch Relaxationsstudien, um die Dynamik im Proteinrückgrat zu bestimmen. TOCSY-Experimente bilden nur Informationen über Protonen-Konnektivitäten innerhalb eines Restes oder eines Spinsystems ab. Für eine sequentielle Zuordnung ist es notwendig auch interresiduale Konnektivitäten abzubilden. Daher muss zusätzlich ein NOESY durchgeführt werden, um die sequentielle Zuordnung zu vervollständigen. Es werden jedoch meist heteronukleare NOESY-Experimente durchgeführt um sowohl die Protonen als auch ^{15}N - oder ^{13}C -Dimension zu bekommen.

1.3.2. Heteronukleare NMR-Spektroskopie

Bei heteronuklearen Tripelresonanz Experimenten werden die Signale von ^1H , ^{15}N und ^{13}C aufgenommen. Dies bringt zahlreiche Vorteile gegenüber homonuklearen Methoden mit sich, die das Analysieren größerer Proteine ermöglichen. Bei heteronuklearen Methoden wird die skalare Kopplung zwischen ^1H , ^{15}N und ^{13}C zweier benachbarter Spinsysteme über die Peptidbindung gemessen. Dies erlaubt eine sequentielle Zuordnung der Atome im Proteinrückgrat. Da dieser Zuordnungsprozess ausschließlich auf der chemischen Bindung zwischen den Atomen beruht und von der Struktur des Proteins unabhängig ist erlaubt es eine eindeutige Zuordnung von *interresidualen* Konnektivitäten. Treten degenerierte chemische Verschiebungen auf werden die *interresidualen* Konnektivitäten unterbrochen.

Ein weiterer Vorteil der Tripelresonanz Experimente besteht darin, dass sie einen schnelleren Magnetisierungstransfer zwischen den Spins ermöglichen. Dies macht sie empfindlicher bei Messungen von größeren Proteinen, die eine verkürzte Spin-Spin-Relaxationszeit aufweisen. Das Messen zusätzlicher NMR-aktiver Kerne, wie ^{15}N und ^{13}C erlaubt das Auftrennen der Resonanzsignale auf zusätzliche chemische Verschiebungsbereiche (siehe Abb. 1.15). Dies erhöht die Auflösung der Experimente [117].

Auch Tripelresonanz Experimente haben ihre Grenzen bezüglich der Größe der Proteine, vor allem wenn keine Deuterierung durchgeführt wird (siehe Tabelle 1.4). Das liegt vor allem an der schnellen Spin-Spin Relaxation von großen Proteinen. Die Deuterierung der Proteine beruht auf dem Austausch der aliphatischen und aromatischen Protonen (^1H) durch

Deuteronen (^2H). Dieser Austausch verlangsamt die Spin-Spin Relaxationszeit, da Deuteronen eine kleinere Gyromagnetische Rotation besitzen als Protonen.

Bei homonuklearen Methoden koppeln nur Spins gleicher Atomart. Heteronukleare Methoden bieten den Vorteil, dass direkt benachbarte Heteroatome miteinander koppeln und man somit beispielsweise in einer Amidgruppe ein Amidproton mit seinem Amidstickstoff in Korrelation bringen kann. Die chemischen Verschiebungen von heteronuklearen Spins sind über ein größeres Spektrum verteilt als Protonen, so dass sie weniger überlappen. Die Kopplung zwischen dem Amidstickstoff zu dem Carbonyl-Kohlenstoff verbessert stark die sequentielle Zuordnung. Es ist möglich Informationen über die Bindung und die Orientierung eines Spins zu seinem benachbarten Heteroatom zu bekommen, so dass Strukturvorhersagen möglich werden. Die Relaxationseigenschaften sind einfacher zu interpretieren, daher eignen sie sich besser für Dynamikstudien an Proteinen. Der Nachteil heteronuklearer Experimente ist, dass die Signale signifikant schwächer sind als die Protonensignale. Bei einer Anreicherung von 100 % an ^{13}C und ^{15}N im Protein, ist die Empfindlichkeit für ^{13}C 32-mal und bei ^{15}N sogar 300-mal geringer als bei Protonen. Daher sind die meisten heteronuklearen Experimente so aufgebaut, dass die starke Spinpolarisierung des Protons auf den heteronuklearen Spin übertragen wird. Durch die Rückübertragung der Magnetisierung auf das Proton zur Detektion wird die Sensitivität noch weiter erhöht.

Es gibt drei verschiedene zweidimensionale heteronukleare Experimente: das HMQC, das HSQC und das TROSY. Bei dem HMQC wird zuerst das Proton mit einem Puls angeregt, welches seine transverse Magnetisierung an den Stickstoff weitergibt. Nachfolgend wird ein zweiter Puls auf den Stickstoff abgegeben, der die Magnetisierung an das Proton überträgt. Im ersten Schritt werden die Stickstoffsignale gemessen und bei dem zweiten Puls die Protonensignale. Das HSQC ist dem HMQC sehr ähnlich. Es wird ein Puls auf das Proton abgegeben, aber die Magnetisierung des Protons ist longitudinal und die des Stickstoffs ist transversal. Mit dem zweiten Puls des HSQC werden Protonen und Stickstoffatom gleichzeitig angeregt. Das HMQC und das HSQC unterscheiden sich in ihren Relaxationsraten und in der Anwesenheit aufgelöster Kopplungen. Dieses hat Auswirkung auf die Auflösung der Spektren. Das HSQC ist bei Proteinen besser aufgelöst als das HMQC-Spektrum, da die Linien schärfer sind [117].

Bei allen zweidimensionalen Experimenten geht während der Übertragungszeit der Magnetisierung zwischen Proton und Heteroatom Magnetisierung verloren. Dieser Magnetisierungsverlust ist proportional zur Größe des Proteins. Für kleine Proteine um 10 kDa fällt dieser Verlust nicht ins Gewicht, bei großen Proteinen hat er starke Auswirkungen. Während bei einem 10 kDa großen Protein der Signalverlust nur ca. 7 % beträgt liegt er bei einem 50 kDa großen Protein bei ca. 36 % [117].

Eine relativ neue Methode ist das TROSY. Sie ermöglicht die Aufnahme von Spektren großer Proteine mit weniger Magnetisierungsverlust als HMQC und HSQC. Es kann angewendet werden auf zweidimensionale Proton-Stickstoff-Experimente und Proton-Kohlenstoff-Experimente, kann aber genauso wie COSY, TOCSY, HMQC oder HSQC zu dreidimensionalen Experimenten erweitert werden. Bei dieser Methode wird die Relaxationsinterferenz genutzt. Die TROSY-Methode nutzt die Interferenz zwischen der dipolaren Kopplung und der Anisotropie der chemischen Verschiebung (CSA) während der Relaxation koppelnder heteronuklearer Spins. Das Ergebnis sind scharfe Resonanzlinien. Die Fluktuation des magnetischen Feldes wird aus der Summe des CSA des relaxierenden Spins zusammen mit dem Magnetfeld, welches von dem koppelnden Spin erzeugt wird, gebildet. Diese können sich, je nach Spin-Status des koppelnden Spins, entweder auslöschen oder verstärken. Ist eine destruktive Interferenz zwischen der Protonrelaxation und der Heteroatomrelaxation vorhanden, so wird das oszillierende Feld klein. Die Relaxationsrate des Spins wird kleiner, was zu einer Verlängerung der Spin-Spin-Relaxationszeit führt und zu schärferen Resonanzlinien für das Duplett. Im Gegenteil dazu wird die zweite Komponente des Dupletts eine vergrößerte Feldfluktuation erfahren, was zu einer verkürzten Spin-Spin-Relaxationszeit führt. Die CSA ist abhängig vom äußeren Magnetfeld. Daher benötigen TROSY-Experimente hohe Magnetfeldstärken. Der Beitrag der Stickstoff-CSA zur Relaxation des Stickstoff-Spins ist identisch zum Feld der dipolaren Kopplung bei einer Spektrometerfrequenz von 1100 MHz. Eine signifikante Erhöhung der Signalschärfe wird erst ab einer Spektrometerfrequenz von 700 MHz erreicht [117].

Bei einem TROSY-Experiment werden vier Signale von jedem Spin erzeugt, die unterschiedliche Signalschärfen aufweisen, drei der Signale werden sehr breit und unscharf und ein Signal wird stärker und erfährt keine Verbreiterung. Da dieses Signal aufgezeichnet wird, beträgt die Sensitivität eines TROSY-Experiments nur ein Viertel eines HSQC-

Experiments. Dennoch ist es für große Proteine von Vorteil statt eines HSQC ein TROSY aufzunehmen, da der geringeren Sensitivität ein höheres Signal-zu-Rausch-Verhältnis gegenüber steht und die Signale schärfer sind. Daher ist die Auflösung des TROSY besser. Vereinfacht dargestellt, kann man ein TROSY als HSQC mit verbesserter Auflösung bezeichnen. Verwendet man zusätzlich TROSY basierte heteronukleare Experimente, anstatt HSQC basierter, können auch Proteine bis zu 100 kDa zugeordnet werden [120].

Die zuverlässigsten Methoden zur Resonanzzuordnung basieren auf Tripel-Resonanzexperimenten mit ^{15}N , ^{13}C und ^1H Spins. In Bezug auf die Zuordnung des Proteinrückgrats kann die relativ große skalare Kopplung zwischen Kohlenstoff und Stickstoff über die Peptidbindung ausgenutzt werden. Die Zuordnung der Spins des Proteinrückgrats erfolgt indem die chemische Verschiebung der Amidgruppe (N_H und H_N) mit dem *interresidualen* und den *intraresidualen* Hauptkettenatom korreliert wird (siehe Abb. 1.15). Dieses mit der Amidgruppe korrelierendes Atom wird als Partneratom bezeichnet (*matching atom*). In einem HNCA-Experiment beispielsweise, korreliert die Amidgruppe mit dem C_α der eigenen Aminosäure und mit dem C_α der Vorgängeraminosäure. In HNCA-Experimenten ist das C_α -Atom das Partneratom. Die chemische Verschiebung des Partneratoms wird verwendet um herauszufinden welche Amidgruppen mit Vorgängeraminosäureresten der Polypeptidkette assoziiert sind. Diese Zuordnung beruht darauf, dass die interresiduale C_α -Verschiebung einer Aminosäure identisch ist mit der *interresidualen* C_α -Verschiebung der Vorgängeraminosäure (siehe Kapitel 2.2.5.3 Abb. 2.10). Dieser Zuordnungsprozess wird solange wiederholt bis alle sequentiellen Konnektivitäten zwischen den Aminosäuren ermittelt werden konnten.

Dieser Prozess kann zu einer kompletten sequentiellen Zuordnung des Spin-Systems führen, wenn alle Partneratome individuelle chemische Verschiebungen besitzen. Sofern sich diese im Protein kein einziges Mal wiederholen und auch alle *intraresidualen* Verschiebungen als Signal vorhanden sind. Ist dies nicht der Fall ist eine eindeutige Zuordnung nicht möglich, da für eine Aminosäure mehrere mögliche Vorgänger existieren und nicht ermittelt werden kann welches Signal zum Vorgänger gehört. Je größer das Protein ist umso größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass ähnliche Proteinsequenzen auftreten und mit ihnen Dopplungen in den Signalen.

Diese Dopplungen können verringert werden indem weitere Partneratome hinzugezogen werden, wie das Carbonyl-Kohlenstoff und das β -Kohlenstoff (siehe Abb. 1.15).

In der Praxis ist es meist auch mit der parallelen Verwendung aller Methoden nicht möglich das gesamte Spin-System eindeutig zuzuordnen. Dadurch erhält man Segmente unterschiedlicher Länge. Diese Segmente müssen der richtigen Stelle in der Primärsequenz zugeordnet werden, daher ist es zusätzlich von Bedeutung über die chemische Verschiebung den Aminosäuretyp zu bestimmen. Zur Bestimmung des Aminosäuretyps ist die chemische Verschiebung der Kohlenstoffe unerlässlich. Im Fall der Seitenketten wird die große skalare Kopplung zwischen den Kohlenstoffen ausgenutzt und TOCSY-Experimente durchgeführt.

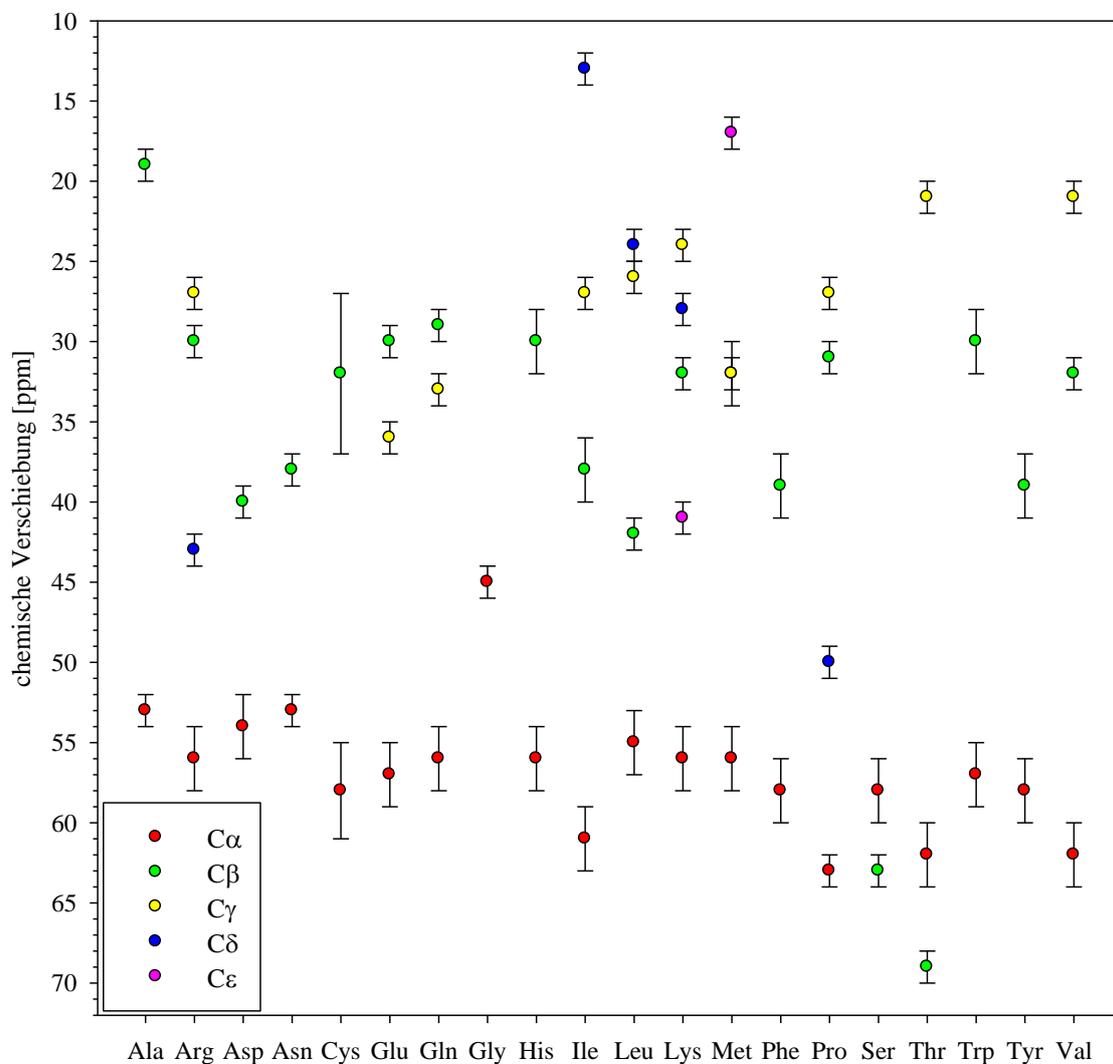


Abb. 1.15 Durchschnittliche Verteilung der chemischen ^{13}C -Verschiebungen der Aminosäuren

Die farbigen Kreise markieren den Mittelwert der chemischen ^{13}C -Verschiebung der aliphatischen Aminosäurereste und die Linien zeigen die jeweilige Standardabweichung im Bereich $\pm 3\sigma$. Die Mittelwerte und die zugehörigen Standardabweichungen wurden der BioMagResBank (Stand 21.03.2012) entnommen [119].

Je mehr Fragmente man besitzt, die sich nicht zuzuordnen lassen, umso mehr Experimente sollten durchgeführt werden. Die Tabelle 1.5 zeigt die am häufigsten gewählten Experimente [117]. Zusätzlich werden ebenfalls NOESY-Experimente durchgeführt, um die Zuordnung zu vervollständigen und Strukturaussagen treffen zu können. Mit einer ^{15}N markierten Probe kann ein dreidimensionales NOESY durchgeführt werden, während mit einer unmarkierten Probe nur ein zweidimensionales NOESY möglich ist. Ein dreidimensionales NOESY kann zu einem vierdimensionalen NOESY erweitert werden. Bei dem drei- und vierdimensionalen NOESY erhält man die $^1\text{H}_\text{N}$ -Verschiebungen und die $^{15}\text{N}_\text{H}$ -Verschiebungen eines Amids, was die Zuordnungsmöglichkeiten der Kreuzsignale verbessert. Bei einem vierdimensionalen kann zusätzlich noch die ^{13}C -Verschiebung gemessen werden. Man bekommt so Daten zu allen drei Heteroatomen.

Tabelle 1.5 3D Experimente zur Zuordnung der Hauptkette und der Seitenketten, nach [117]

Experiment	Korrelierende Atome
	Hauptketten Kohlenstoffverschiebung
HNCO	CO _i -1 mit NH
HN(CA)CO	CO mit NH
HNCA	C _{αi} und C _{αi} -1 mit NH
HN(CO)CA	C _{αi} -1 mit NH
HNCACB	C _{αi} , C _{αi} -1, C _{βi} , C _{βi} -1 mit NH
CBCANH	C _{αi} , C _{αi} -1, C _{βi} , C _{βi} -1 mit NH
HN(CO)CACB	C _{αi} -1, C _{βi} -1 mit NH
	Hauptketten Protonenverschiebung
HN(CA)HA	H _{αi} , H _{αi} -1 mit NH
HN(COCA)HA	H _{αi} -1 mit NH
HAHB(CO)NH	H _{αi} -1, H _{βi} -1 mit NH
HAHBNH	H _{αi} , H _{αi} -1, H _{βi} , H _{βi} -1 mit NH
HCACO	H _α , C _α , CO

Experiment	Korrelierende Atome
	Seitenkettenverschiebungen
HCCH TOCSY	Alle Protonen mit $H\alpha$ und $C\alpha$
C-C TOCSY	Alle C_i-1 mit NH
H-H TOCSY	Alle H_i-1 mit NH

Das Molekulargewicht des Proteins und das Magnetfeld des Spektrometers haben einen Einfluss auf die Relaxationszeiten der Protonen und der Heteroatome. Werden die Relaxationszeiten bei großen Proteinen kürzer, so werden die Signale breiter oder löschen sich aus. Relaxieren die Atome schneller, ist es schwieriger die Magnetisierung vom Proton auf das Heteroatom zu übertragen und umgekehrt. Meist ist es von Vorteil, wenn das äußere Magnetfeld stärker ist, da die Relaxationszeiten länger gehalten werden kann. Eine Ausnahme ist dabei die Messung des Carbonyl-Kohlenstoffes, bei dem die Relaxationszeit bei einer Frequenz von 900 MHz sehr verkürzt wird. Daher wird ein Experiment bei dem das Carbonyl-Kohlenstoff gemessen wird eher auf einem 700 MHz-Spektrometer durchgeführt [117].

Die Temperatur hat ebenfalls einen Einfluss auf die Relaxationszeit. Eine Erhöhung der Temperatur führt zu einer niedrigeren Relaxationszeit, durch eine ebenfalls niedrigere Rotationskorrelationszeit. Dies beruht auf zwei Effekten, zum einen ist die Rotationskorrelationszeit umgekehrt proportional zur Temperatur und zum zweiten wird die Viskosität von Wasser herabgesetzt. Erhöht man die Temperatur beispielsweise um 10°C , so sinkt die Relaxationszeit T_2 um 24 %.

1.4 Zielsetzung

Die Enzyme des DOXP-Weges sind für die Bekämpfung der pathogenen Organismen von klinischer Bedeutung, da eine Inhibition des DOXP-Weges Menschen und Tiere nicht in der Isoprenoidsynthese beeinträchtigt. Die DXR ist bereits als Zielenzym für Fosmidomycin und dessen Derivate bekannt. Zahlreiche Kristallstrukturen der DXR, als Apo-Enzym und als Komplex mit verschiedenen Substraten wurden bereits veröffentlicht. Die Kristallstrukturen lassen vermuten, dass es sich bei der DXR um ein sehr bewegliches Enzym handelt, welches in verschiedenen Konformationen vorkommen kann. Auch sind manche Bereiche, wie z.B. der Bereich der flexiblen Schleife nicht in allen Kristallstrukturen gelöst. Das aktive Zentrum erscheint möglicherweise in den bisher veröffentlichten Modellen größer, als es tatsächlich sein könnte.

Daher soll die DXR-Struktur mittels NMR-Strukturanalyse ermittelt werden, da diese die Kristallstrukturanalyse in idealer Weise ergänzt. Die Enzyme können hierbei in flüssiger Umgebung gemessen und müssen nicht kristallisiert werden. Somit können im Idealfall Übergangszustände beobachtet werden.

Der Nachteil der NMR-Strukturanalyse besteht in ihrer Limitierung bei der Analyse großer Proteine. Die Strukturen von Proteinen, die größer als 30 kDa sind, können häufig nicht oder nur durch hohen Aufwand aufgeklärt werden. Die Größe des DXR-Dimers beträgt 86 kDa und gehört damit für die NMR-Analyse zu den großen Proteinen. Die Strategie bei großen Proteinen liegt in der Messung der chemischen Verschiebung mehrerer Isotopen. Daher soll ein isotopenmarkiertes DXR-Protein für die Messung dieser hetero nuklearen mehrdimensionalen NMR-Spektren hergestellt werden.

Ziel dieser Arbeit ist, die DXR in *Escherichia coli* mit den Isotopen ^2H , ^{15}N , ^{13}C herzustellen. Desweiteren soll die DXR so stabilisiert werden, dass über mehrere Wochen eine Vielzahl an NMR-Messungen durchgeführt werden können. Um erste Seitenketteninformationen zu bekommen und um eine bessere Zuordnung zu gewährleisten soll das Protein zudem mit selektiv markierten Aminosäuren hergestellt werden. Die aus den Messungen erhaltenen NMR-Spektren werden anschließend analysiert und zugeordnet. Zusätzlich sollen die erhaltenen Strukturinformationen mit den bereits bekannten Kristallstrukturen verglichen werden, um ein möglichst vollständiges Bild des DXR-Dimers zu erhalten.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1. Geräte

Inkubatoren

SM 30 control	Edmund Bühler GmbH	Hechingen
TH 30	Edmund Bühler GmbH	Hechingen

Spektrophotometer

Hitachi U2000	Jouan GmbH	Unterhaching
Nicolet Evolution 100	Thermo Fisher Scientific GmbH	Dreieich
SpectraMax 340pc	Molecular Devices	München

Zentrifugen

Capsule HF-120	Tomy Seiko	Tokio
EBA 35	Hettich GmbH & Co.KG	Tuttlingen
Rotina 46 R	Hettich GmbH & Co.KG	Tuttlingen
Biofuge pico	Heraeus GmbH	Hanau
Avanti J-25	Beckmann Instruments	Summerset

Zentrifugenrotoren

JA-10, JA-25.50	Beckmann Instruments	Summerset
-----------------	----------------------	-----------

Gelelektrophorese-Einheit

Mini-Protean 3	Bio-Rad Laboratories GmbH	München
PowerPac 200	Bio-Rad Laboratories GmbH	München
Slab Gel Dryer	Savant	Holbrook, USA
Duomax 1030	Heidolph Instruments	Schwabach

HPLC- und FPLC-Anlagen

Waters Pump 626	Waters GmbH	Eschborn
Diodenarray-Detektor PDA 996	Waters GmbH	Eschborn
Fluoreszenz-Detektor 474	Waters GmbH	Eschborn
9125 Valve	Rheodyne	Alsbach-Hähnlein
P-6000	Pharmacia	Freiburg
Gradient Programmer GP-250	Pharmacia	Freiburg

Sonstige Pumpen

P-500	Pharmacia	Freiburg
Schlauchpumpe Minipuls 3	Abimed Gilson	Langenfeld

Vortex

Reax1	Heidolph Instruments	Schwabach
VV3	VWR GmbH	Darmstadt

Ultraschall-Aufschluss

Sonoplus HD 2200	Bandelin	Berlin
Sonoplus UW 2200	Bandelin	Berlin
Sonotrode VS70T	Bandelin	Berlin
Sonorex Digitec DT 514	Bandelin	Berlin

Wasserbad

Typ 1003	GFL mbH	Burgwedel
----------	---------	-----------

pH-Meter

pH 422	WTW	Weilheim
Elektrode Inlab 412/170	Mettler Toledo	Gießen

Waagen

3716 MP	Sartorius AG	Göttingen
PG5002-S Delta Range	Mettler Toledo	Gießen
BP221 D	Sartorius AG	Göttingen

Heizblöcke

Thermomixer compact	Eppendorf	Hamburg
---------------------	-----------	---------

steriles Arbeiten

Sterilbank 76102	Thermo Electron	Dreieich
Varioklav Dampfsterilisator	H+P Labortechnik GmbH	Hackermoos

anaerobes Arbeiten

Coy-Glovebox	Toeppfer Lab Systems	Göppingen
Sauerstoff-/Wasserstoffmessgerät	Toeppfer Lab Systems	Göppingen
Palladium-Katalysatoren	Toeppfer Lab Systems	Göppingen

Wasseraufbereitung

MilliQ _{plus}	Millipore GmbH	Schwalbach/Ts.
------------------------	----------------	----------------

Pipettierhilfen

Pipetman 10, 20, 200, 1000 μ L	Abimed Gilson	Langenfeld
Multipette Plus	Eppendorf	Hamburg
Pipetboy Plus	Integra Biosciences	Fernwald

Software

Millenium32 Software	Waters GmbH	Eschborn
CARA: siehe [121]		
TALOS: siehe [122]		

2.1.2. Verbrauchsmaterialien

Einwegspritzen:	Injekt 10, 20, 50 mL	B. Braun
pH-Papier:	pH-Fix 0-14	Roth
Filtriereinheiten:	Millex GP 0,22 μ m	Millipore
	Amicon Ultra-4 10kDa, 30kDa	Millipore
Parafilm M		Pechiny Plastic Packaging
Handschuhe:	Nitra-Tex M	Ansell
ReagiergefäÙe:	200 μ L; 1,5 mL; 2,0 mL	Sarstedt
Zentrifugenröhrchen:	15 mL; 50 mL	TPP
GlasgefäÙe:		Schott Duran
		Fischer Scientific
Pipettenspitzen:	10 μ L, 100 μ L, 1000 μ L	Gilson
Microtiterplatten:	EIA/RIA Plate, 96-well	Costar
Chromatographie-		von verschiedenen Firmen:
-Zubehö:	Kapillaren	Upchurch Scientific
	Verbindungsstücke	Techlab GmbH
	Lampen	MedChrom GmbH
	sonstiges Zubehö	Duratec Analysentchnik

anaerobes Arbeiten: Reagenzgläser mit Gewinde		Glasgerätebau Ochs GmbH
	Butyl-Gummi-Septen	Glasgerätebau Ochs GmbH
NMR – Gefäße:	J.-Young-Röhrchen	Rototec Spintec
	Constricted Ø 5 mm x 9 cm	Rototec Spintec

2.1.3. Chemikalien

Alle gängigen Chemikalien werden von Sigma-Aldrich, Fluka, Roth und Merck bezogen und werden nicht einzeln benannt. Spezielle Chemikalien / Mischungen, die zur Kultivierung und zur Isotopenmarkierung verwendet wurden sind im Folgenden aufgelistet.

Agar-Agar	Standard grade	Gerbu
Vollmedium Bakterienkulturen	Standard 1	Roth
Vollmedium markiert: ^2H , ^{15}N	Silantes OD2 DN	Euriso-Top
Vollmedium markiert: ^2H , ^{13}C , ^{15}N	Silantes OD2 CDN	Euriso-Top
Deuteriumoxid (99,85% D)	D_2O ($^2\text{H}_2\text{O}$)	Euriso-Top
Vitamine für M9	Difco Yeast Nitrogen Base	BD
Natriumhydrogenphosphat	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	Fluka
Kaliumdihydrogenphosphat	KH_2PO_4	Fluka
Natriumchlorid	NaCl	Roth
Ammoniumchlorid	NH_4Cl	Fluka
Ammoniumchlorid (^{15}N , 98%)	$^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$	Euriso-Top
Magnesiumchlorid wasserfrei	MgCl_2	Fluka
Calciumchlorid	CaCl_2	Fluka
D – Glukose	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	Sigma
D – Glukose ($\text{U-}^{13}\text{C}_6$, 99%)	$^{13}\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	Euriso-Top
D – Glukose ($\text{U-}^{13}\text{C}_6$, 99%, 1,2,3,4,5,6,6,-D7, 97-98%)	$^{13}\text{C}_6^2\text{H}_7\text{O}_6\text{H}_5$	Euriso-Top
α -Keto-Natriumbutyrat ($\text{U-}^{13}\text{C}_4$, 98%; 3,3-D ₂ , 98%)		Euriso-Top

α -Ketoiso-Natriumvalerat (U-¹³C₅, 98%; 3-D₁, 98%) Euriso-Top

Antibiotika	Ampicillin	Gerbu
	Tetrazyklin	Gerbu
	Kanamycin	Gerbu

Proteinmarker Merck / Roth

β -Nicotinamid Adenin- Dinukleotid 2-Phosphat	NADPH
Fosmidomycin	bereitgestellt von Dr. Armin Reichenberg
FR900098	bereitgestellt von Dr. Armin Reichenberg

2.1.4. Chromatographie

vorgepackte Sephadex G-25 Säulen

PD-10	GE-Healthcare	München
NAP-5	GE-Healthcare	München
NAP-10	GE-Healthcare	München
HiPrep 26/10	GE-Healthcare	München

vorgepackte Superdex Säulen

Superdex 75 10/300 GL	GE-Healthcare	München
Superdex 200 10/300 GL	GE-Healthcare	München

vorgepackte Zorbax Bioseries Säule:

GF-450	Agilent Technologies	Böblingen
Vorsäule für GF-450	Agilent Technologies	Böblingen

Glaskörper und Anschlüsse

XK 26/40	GE-Healthcare	München
----------	---------------	---------

TAC 15/250	YMC Europe	Dinslaken
TAC 25/250	YMC Europe	Dinslaken
TAC 25/500	YMC Europe	Dinslaken
TAC 50/250	YMC Europe	Dinslaken
ECO 25/750	YMC Europe	Dinslaken

stationäre Phasen für die Chromatographie

<u>WAX</u> : DEAE Sepharose FF	GE-Healthcare	München
<u>SAX</u> : Source 15Q	GE-Healthcare	München
<u>SEC</u> : Superdex 200 pg	GE-Healthcare	München

2.1.5. Puffer und Lösungen

2.1.5.1. Wachstumsmedien für Bakterienkulturen

Zusammensetzung der 5x M9 – Stocklösung / L H₂O:

Natriumhydrogenphosphat	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	43,8 g
Kaliumdihydrogenphosphat	KH ₂ PO ₄	15,0 g
Natriumchlorid	NaCl	2,5 g
Ammoniumchlorid	NH ₄ Cl	5,0 g

M9 – Minimalmedium: ad 1 L H₂O:

5x M9 – Stocklösung		200 mL
Magnesiumchlorid	MgCl ₂	2 mM
Calciumchlorid	CaCl ₂	0,1 mM
D – Glukose	C ₆ H ₁₂ O ₆	0,1 bis 0,4 %
Vitaminlösung 10x		100 mL

Silantes Medium

Silantes DN = Vollmedium angereichert mit ^2H und ^{15}N

Silantes CDN = Vollmedium angereichert mit ^{13}C , ^2H und ^{15}N

Antibiotika Stocklösungen: eingesetzte Menge: Endkonzentration im Medium:

Ampicillin: 50 mg/mL MilliQ-H₂O 3,0 µL/mL 0,15 mg / mL

Tetrazyklin: 5 mg/mL 96% Ethanol 2,0 µL/mL 0,01 mg / mL

Kanamycin: 25 mg/mL MilliQ-H₂O 1,2 µL/mL 0,03 mg / mL

IPTG Stocklösung**Endkonzentration im Medium**

1 M = 238,3 mg / mL MilliQ-H₂O

1 mM

2.1.5.2. Chromatographiepuffer**Zellaufschlusspuffer**

30 mM Bis-Tris, pH 7,0

5 mM MgCl₂

50 mM NaCl

0,5 mM NADPH

0,5 mM FR900098 oder Fosmidomycin

WAX Puffer A

30 mM Bis-Tris, pH 7,0

5 mM MgCl₂

WAX Puffer B

30 mM Bis-Tris, pH 7,0

5 mM MgCl₂

1 M NaCl

SAX Puffer A

30 mM Bis-Tris, pH 7,5

5 mM MgCl₂

SAX Puffer B	30 mM Bis-Tris, pH 7,5 5 mM MgCl ₂ 1 M NaCl
SEC Puffer	30 mM Bis-Tris, pH 7,0 150 mM NaCl 5 mM MgCl ₂
Endpuffer für die NMR-Messung:	20 mM Bis-Tris, pH 7,0 5 mM MgCl ₂ 20 mM NaCl 2,5 mM NADPH 2,5 mM FR900098 10 % D ₂ O

2.1.6. Bakterienstämme

Stamm	Genotyp
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blu	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI^qZΔM15 Tn10</i> (Tet ^r)]

2.1.7. Plasmide und Konstrukte

Plasmid	Ursprungsplasmid
pQE60-EcDXR	pQE60 (Qiagen)
pRep4	pRep4 (Qiagen)

Das Expressionsplasmid wurde ohne Affinitätstag hergestellt. Die codierende Sequenz für den Affinitätstag wurde an den *Bam*HI und *Hind*III Restriktionsstellen herausgeschnitten und der pQE60-Vektor religiert (siehe Abb. 2.2) [123]. Daher besitzt das exprimierte Protein die zusätzliche N-terminale Aminosäuresequenz MGSS. Das Plasmid liegt in *Escherichia coli* XL1Blue-Zellen transformiert vor (siehe Abb. 2.2). Zusätzlich ist in diesen Zellen ein pRep4-Plasmid transformiert, das das *lacI*-Gen exprimiert (siehe Abb. 2.1). Die transformierten Zellen wurden dankenswerterweise von Dr. Silke Sanderbrand und Dr. Jochen Wiesner als bereits transformierte und auf Minimalmedium adaptierte Zellen zur Verfügung gestellt [46, 123].

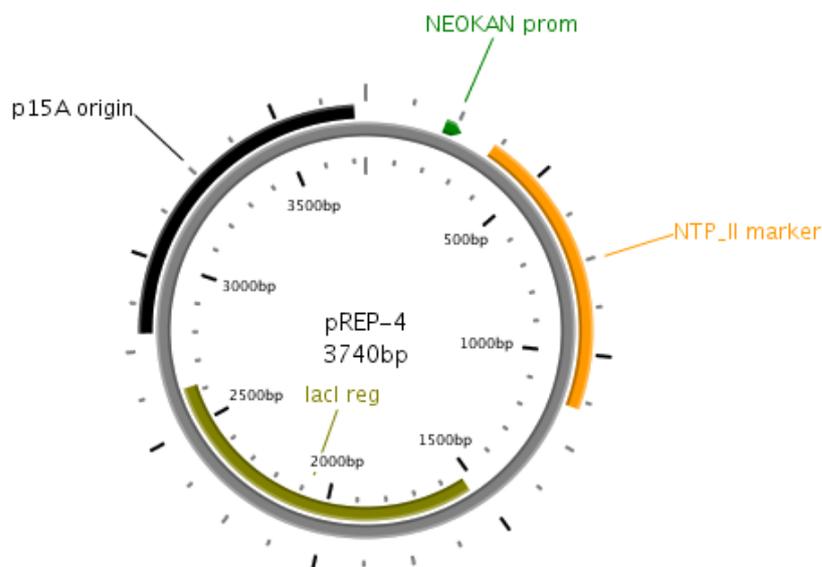


Abb. 2.1 pREP-4 Plasmidkarte mit *lacI*-Gen zur Herstellung ausreichender Mengen des Lac Repressor [123]

In schwarz ist der Origin markiert und das Kanamycinresistenzgen (NTP_II Marker) ist orangefarbig und der zugehörige Promotor (neokan prom) grün, der Lac-Repressor (*lacI reg*) ist in grün markiert.

Abb. erstellt mit PlasMapper [124]

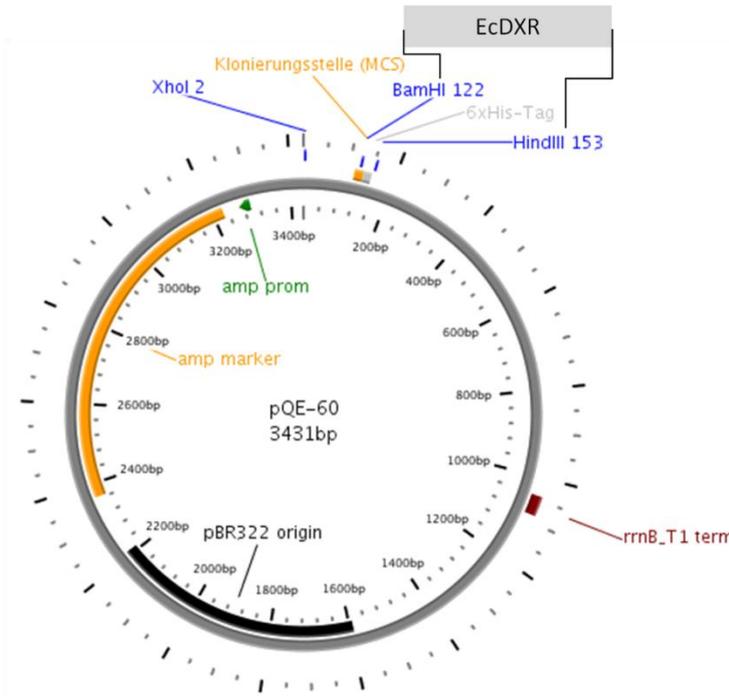


Abb. 2.2 pQE-60 Vektorkarte mit Klonierungsstelle (MCS) und Schnittstellen für *Escherichia coli* DXR [123]

Die Klonierungsstelle (MCS) ist in orange dargestellt, es wurden die Schnittstellen (in blau) BamHI und HindIII verwendet um die dxr (EcDXR) hinein zu klonieren; durch die Verwendung der Schnittstelle *HindIII* wurde der His-Tag herausgeschnitten. In schwarz ist der Origin markiert und Das Ampicillinresistenzgen (amp Marker) ist orangefarbig und der zugehörige Promotor (amp prom) grün markiert.

Abb. erstellt mit PlasMapper [124]

2.2 Methoden

2.2.1. Kultivierung von *Escherichia coli*

Die Kultivierung von *Escherichia coli* zur Herstellung von rekombinanter DXR erfolgt in M9-Minimalmedium (siehe 2.1.5.1). Zur Herstellung von DXR ohne Isotopenmarkierung wird eine kommerzielle M9-Minimalmedium-Mischung von GIFCO verwendet mit Reinstwasser (MilliQ) angesetzt und autoklaviert. Anschließend wird das Minimalmedium mit Vitaminen und 0,4 % Glucose versetzt. Für die Anreicherung von Isotopen werden die Salze für das Minimalmedium einzeln eingewogen. Die Zusammensetzung entspricht dem M9-Medium-Protokoll (siehe 2.1.5.1). Um eine ^{15}N -Anreicherung der Proteine, speziell der DXR in *Escherichia coli* zu erreichen wird ^{15}N -markiertes Ammoniumchlorid verwendet (siehe 2.1.3). Nach dem Autoklavieren des Minimalmediums werden ebenfalls 0,4 % sterile Glucose und Vitamine zugesetzt.

Für die Herstellung von ^{15}N - und ^2H -markierten Proteinen wird das M9-Minimalmedium mit ^{15}N -Ammoniumchlorid als ^{15}N -Quelle und mit Deuteriumoxid (siehe 2.1.3) anstelle von Reinstwasser (MilliQ) angesetzt und 10 % Silantes-DN hinzugefügt. Das Medium wird sterilfiltriert. Da die Bakterien nicht in der Lage sind ohne vorherige Anpassung in 100 % D_2O -haltigem Medium zu wachsen, werden sie zur Adaptation an ^2H in Silantes Medium vorkultiviert. Das Silantes-DN-Medium enthält ^2H - und ^{15}N -markierte Aminosäuren und D_2O . Bei dem ^2H - und ^{15}N -markierten Ansatz wird das M9-Medium mit 0,4 % unmarkierter Glukose versetzt. Bei dem ^2H -, ^{13}C -, ^{15}N -markierten Ansatz wird dem Minimalmedium 0,1 % U- ^{13}C -markierte Glukose zugesetzt. Der ^2H -, ^{13}C -, ^{15}N -markierte Ansatz wird mit Deuteriumoxid (siehe 2.1.3) anstelle von Reinstwasser (MilliQ) angesetzt und 10 % Silantes-CDN.

2.2.1.1. Kultivierung von *Escherichia coli* auf Agar-Platten

Die Agar-Platten werden hergestellt mit Standard-I-Medium, Minimalmedium oder Silantes-Medium, je nachdem für welche Isotopenmarkierung sie verwendet werden, 2 % (w/v) Agar-Agar und Antibiotika. Die mit DXR-überexprimierenden *Escherichia coli* angeimpften Platten

werden bei 37 °C im Brutschrank über Nacht inkubiert, im Falle von Minimalmedium-Platten oder Silantes-Platten bis zu 48 h.

2.2.1.2. Kultivierung von *Escherichia coli* in Minimalmedium ohne Isotopenmarkierung

Es wird eine Standard-I-Platte hergestellt und mit den Zellen aus 2.1.7 ausgestrichen (siehe 2.2.1.1). Die Platte wird über Nacht bei 37 °C kultiviert. Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C, werden 50 mL Standard-1-Medium, welches mit Antibiotika versetzt wurde (siehe 2.1.5.1) in 250 mL Schikanekolben mit einer Kolonie angeimpft.

Diese Vorkultur 12 h bei 37 °C im Schüttelinkubator (Bühler) bei 180 U/min geschüttelt. Acht 1000 mL Schikanekolben werden mit je 200 mL Minimalmedium befüllt. Dieses Minimalmedium wird je 1:1000 mit der Vorkultur angeimpft, Antibiotika zugegeben und für 12 h bei 37 °C und 180 U/min inkubiert. Nach 12 h wird die OD gemessen und die Kulturen 1:2 mit Minimalmedium verdünnt und es wird frisches Ampicillin zugesetzt.

Nach weiteren 6 h bei 37 °C und 160 U/min Inkubation werden die Kulturen mit 400 µL 1 M IPTG induziert und die Temperatur auf 32 °C gesenkt. Nach 12 h werden die Zellen geerntet.

2.2.1.3. Kultivierung von *Escherichia coli* in Minimalmedium mit ¹⁵N-Markierung

Es wird eine Standard-I-Platte hergestellt und ausgestrichen. Die Platte wird über Nacht bei 37 °C kultiviert. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C, werden 40 mL Standard-I-Medium in einem mit einer Kolonie angeimpft und diese Vorkultur 12 h bei 37°C bei 180 U/min inkubiert. Acht 1000 mL Schikanekolben werden mit je 200 mL Minimalmedium (mit ¹⁵N-Ammoniumchlorid) befüllt. Diese Hauptkulturen werden mit je 200 µL Vorkultur angeimpft. Die weitere Kultivierung erfolgt genauso, wie die Kultivierung für unmarkiertes Protein (siehe 2.2.1.2).

2.2.1.4. Kultivierung von *Escherichia coli* in Minimalmedium mit ^{15}N -, ^2H -Markierung oder mit ^{15}N -, ^2H -, ^{13}C -Markierung

Zur Kultivierung wird statt einer Standard-1-Platte, eine Silantes-DN-Platte (bzw. Silantes-CDN-Platte) hergestellt (siehe 2.2.1.1).

In vier 250 mL Schikanekolben werden je 45 mL Silantes-DN für eine ^2H - und ^{15}N - Proteinmarkierung bzw. Silantes-CDN für eine ^2H -, ^{13}C -, ^{15}N -Proteinmarkierung gegeben. Jeder Kolben wird mit Antibiotika versetzt (siehe 2.1.5.1) und mit je einer Kolonie angeimpft. Diese Vorkultur wurde 12 h bei 37°C bei 180 U/min inkubiert. Acht Mal je 180 mL Hauptkultur aus Minimalmedium werden mit 20 mL Vorkultur angeimpft.

Nach 12 h Wachstum bei 37°C und 160 U/min werden die 200 mL Kulturen 1:2 mit frischem Hauptkulturmedium verdünnt und neues Ampicillin zugegeben.

Nach weiteren 6 h Inkubation bei 37°C werden die Kulturen mit $400\ \mu\text{L}$ 1 M IPTG-Lösung pro Kolben induziert und bei 32°C für weitere 12 h inkubiert. Danach können die Zellen geerntet werden.

2.2.1.5. Methyl-selektive Proteinmarkierung in *Escherichia coli*

Die Kultivierung erfolgt genauso, wie bei ^{13}C -, ^{15}N -, ^2H -markierten Proteinen bis 1 h vor Induktion. Eine Stunde vor Induktion werden selektiv markierte Ketosäuren zu den Kulturen gegeben: $70\ \text{mg/L}$ $[\text{3,3-}^2\text{H}]\text{-}^{13}\text{C}\alpha\text{-Ketobutyrat}$ und $120\ \text{mg/L}$ $[\text{3-}^2\text{H}]\text{-}^{13}\text{C}\alpha\text{-Ketoisovalerat}$.

Die Ketosäuren dienen als Vorläufer für die Aminosäuren Valin, Leucin und Isoleucin. Jeweils die endständigen ^{13}C -Methylgruppen sind hierbei protoniert statt deuteriert. Bei Valin handelt es sich um C_{γ_1} und C_{γ_2} und bei Leucin handelt es sich um C_{δ_1} und C_{δ_2} . Bei Isoleucin ist lediglich C_δ markiert (siehe Abb. 2.3). Für die Synthese von Valin und Leucin wird die Ketosäure $[\text{3-}^2\text{H}]\text{-}^{13}\text{C}\alpha\text{-Ketoisovalerat}$ eingesetzt und Isoleucin wird von *Escherichia coli* aus $[\text{3,3-}^2\text{H}]\text{-}^{13}\text{C}\alpha\text{-Ketobutyrat}$ synthetisiert (siehe Abb. 2.3).

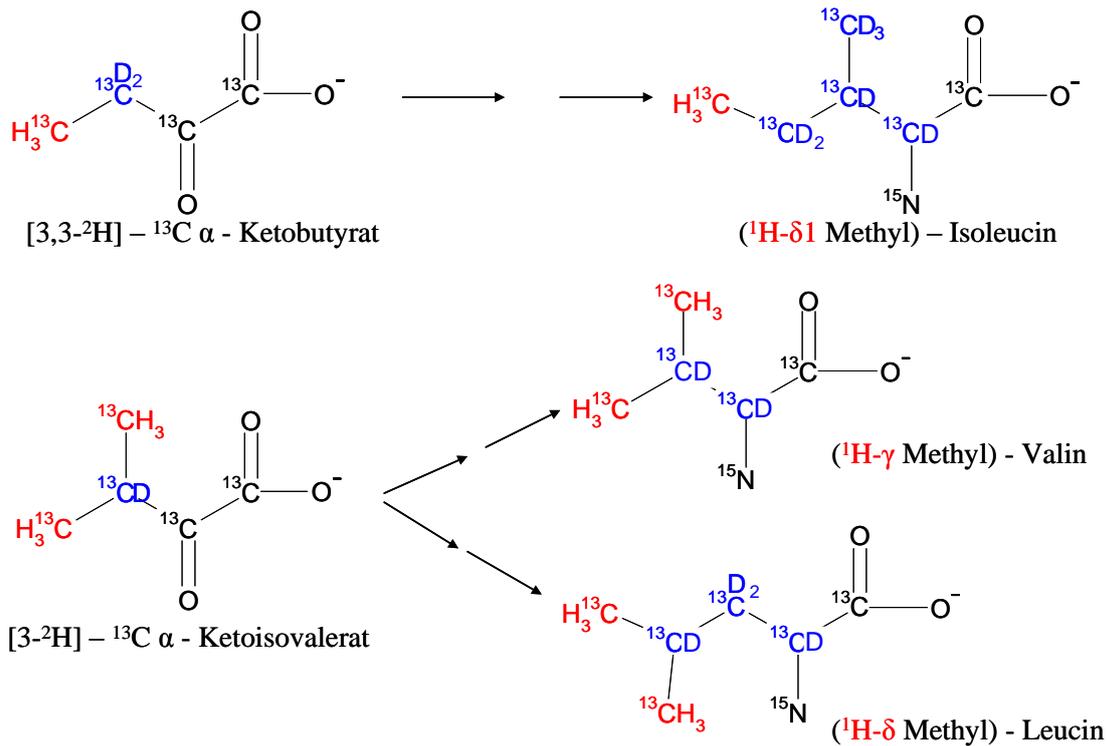


Abb. 2.3 Strukturen von $[3,3-^2\text{H}] - ^{13}\text{C}$ α -Ketobutyrat, $[3-^2\text{H}] - ^{13}\text{C}$ α -Ketoisovalerat, $(^1\text{H}-\delta 1\text{-Methyl})$ -Isoleucin, $(^1\text{H}-\text{Methyl})$ -Leucin und $(^1\text{H}-\gamma\text{-Methyl})$ -Valin.

Deuterierte Carbonylkohlenstoffe in blau, unmarkierte endständige Methylgruppen in rot. Aus $[3,3-^2\text{H}] - ^{13}\text{C}$ α -Ketobutyrat wird von *Escherichia coli* $(^1\text{H}-\delta 1\text{-Methyl})$ -Isoleucin synthetisiert und aus $[3-^2\text{H}] - ^{13}\text{C}$ α -Ketoisovalerat $(^1\text{H}-\text{Methyl})$ -Leucin und $(^1\text{H}-\gamma\text{-Methyl})$ -Valin

2.2.2. Reinigung der DXR

2.2.2.1. Ernten und Aufschluss der *Escherichia coli* Kulturen

Die 3,2 L Kulturen werden durch 30 min Zentrifugation im JA-10-Rotor bei 17700 g, 4 °C geerntet. Die Zellpellets werden gewogen und ohne Pufferzusatz in die sauerstofffreie Glovebox (95% Stickstoff und 5% Wasserstoff) geschleust. In der Glovebox werden sie in Aufschlusspuffer resuspendiert (siehe 2.1.5.2). Pro 1 g Zellpellet werden 10 mL Puffer verwendet.

Die Zellen werden mittels Ultraschall bei 60 % Amplitude mit einer Sonotrode VS70T aufgeschlossen. Der Aufschluss erfolgt in einer 150 mL Glasrosette auf Eis für 3 x 10 min, mit je einer Pause von 5 min. Die Suspension wird 25 bis 30 min im JA-25.50-Rotor bei 75000 g und

4 °C zentrifugiert um Zellfragmente und unaufgeschlossenen Zellen zu sedimentieren. Im Überstand sind die löslichen Proteine enthalten. Der Überstand wird abgenommen und durch einen 0,22 µm Filter filtriert.

2.2.2.2. Schwache Anionenaustauschchromatographie (WAX)

Ein schwacher Anionenaustauscher eignet sich als erste Reinigungsstufe. Eine 50x40 mm DEAE-Sepharose-FF-Säule wurde mit 400 mL (= 5 Säulenvolumen) WAX Puffer A äquilibriert bei einer Flussrate von 10 mL/min. Das Filtrat wird mit einer Flussrate von 10 mL/min auf die Säule aufgetragen. Anschließend wird die Säule mit 200 mL WAX Puffer A (2-3 Säulenvolumen) gewaschen. Die Elution erfolgt mit einem linearen Gradienten von 0-0,3 M NaCl (13-14 Säulenvolumen) in 54 min bei einer Flussrate von 20 mL/min, von 0,3-1 M NaCl in 6 min (1,5 Säulenvolumen) bei einer Flussrate von 20 mL/min und mit 1 M NaCl 5 min (1 Säulenvolumen) mit 20 mL/min. Die Säule wurde mit WAX Puffer A 10 min (2-3 Säulenvolumen) reäquilibriert bei einer Flussrate von 20 mL/min (siehe Tabelle 2.1). Direkt nach der Elution wird zu den Hauptproteinfraktionen 0,3 mM NADPH und 0,3 mM Inhibitor (Fosmidomycin oder FR900098) hinzugegeben.

Tabelle 2.1 Gradient der DEAE-Anionenaustauschchromatographie

Zeit [min]	Flussgeschwindigkeit [mL/min]	Puffer B [%]	NaCl Konzentration [M]
0 – 20	10	0	0
20 – 74	20	0 - 30	0 - 0,3
74 – 80	20	30 - 100	0,3 - 1
80 – 85	20	100	1
85 – 95	20	0	0

Die Hauptfraktionen der DEAE-Reinigung werden über ein SDS-Gel identifiziert und zu einer Probe vereinigt (siehe 2.2.3.1). Diese Probe wird über Amicon-Ultra-Konzentratoren mit einem Größenausschluss von 30 kDa konzentriert (30 min nach je 5 min Pause) und über eine Sephadex G-25 Hi/Prep 26/10 Desalting Säule in SAX A Puffer (pH 7,5) umgepuffert (siehe 2.2.2.5).

2.2.2.3. Starke Anionenaustauschchromatographie (SAX)

Eine 15x80 mm Source-15Q wurde mit 75 mL (5 Säulenvolumen) SAX Puffer A äquilibriert bei einer Flussrate von 5 mL/min. Die Proteinprobe wird mit einer Flussrate von 5 mL/min auf die Säule aufgetragen. Anschließend wird die Säule mit 50 mL SAX Puffer A (3-4 Säulenvolumen) gewaschen. Die Elution erfolgt mit einem linearen Gradienten von 0-0,3 M NaCl (14 Säulenvolumen) in 40 min bei einer Flussrate von 5 mL/min, von 0,3-1 M NaCl in 5 min (1-2 Säulenvolumen) bei einer Flussrate von 5 mL/min und mit 1 M NaCl 5 min (1-2 Säulenvolumen) mit 5 mL/min. Die Säule wurde mit SAX Puffer A 10 min (3-4 Säulenvolumen) reäquilibriert bei einer Flussrate von 5 mL/min (siehe Tabelle 2.2).

Tabelle 2.2 Gradient der Source 15Q-Anionenaustauschchromatographie

Zeit [min]	Flussgeschwindigkeit [mL/min]	Puffer B [%]	NaCl Konzentration [M]
0 – 10	5	0	0
10 – 50	5	0 - 30	0 - 0,3
50 – 55	5	30 - 100	0,3 - 1
55 – 60	5	100	1
60 – 70	5	0	0

0,5 mM NADPH und 0,5 mM FR900098 werden zu den Fraktionen gegeben. Die Hauptfraktionen der Source-15Q-Reinigung werden über ein SDS-Gel identifiziert und zu einer Probe vereinigt (siehe 2.2.3.1). Diese Probe wird ebenfalls konzentriert (siehe 2.2.2.2).

2.2.2.4. Präparative Größenausschlusschromatographie (SEC)

Für die präparative Größenausschlusschromatographie wird eine 25x700 mm Superdex 200 Säule verwendet. Die Säule wird mit 800 mL SEC-Puffer (2-3 Säulenvolumen) bei 1 mL/min über Nacht äquilibriert. Die Probe wird mit einer Spritze über ein Rheodyne-Ventil und eine 2 mL Probenschleife aufgetragen. Die Elution erfolgt mit 360 mL SEC-Puffer bei einer Flussrate von 1 mL/min. Zu den Fraktionen wird unmittelbar nach der Elution 0,5 mM NADPH und 0,5 mM FR900098 hinzugegeben. Die Hauptfraktionen an DXR werden mittels SDS-PAGE ermittelt (siehe 2.2.3.1) und vereinigt.

2.2.2.5. Umpufferung von Proteinen

Zur Entsalzung oder Überführung der Probe in andere Pufferbedingungen werden Desalting Säulen von GE-Healthcare eingesetzt. Je nach Probenvolumen und Proteinkonzentration werden verschiedenen Größen eingesetzt. Dazu gehören NAP-5, NAP-10, PD10 und „HiPrep 26/10 Desalting“ Säulen. NAP-5, NAP-10, PD10 werden ohne Pumpe betrieben und ohne Detektion. Durch festgelegte Auftrags- und Elutionsvolumina kann die Entsalzung bzw. die Umpufferung gewährleistet werden. Die „HiPrep 26/10 Desalting“ Säulen können für Probenvolumina bis 15 mL verwendet werden mittels einer Pumpe betrieben werden. Es wird eine P-6000 verwendet und über die Detektoren der Waters das Elutionsvolumen verfolgt und dementsprechend fraktioniert.

Die HiPrep 26/10 Desalting-Säulen wurden für die Umpufferung nach der WAX verwendet. Die vereinigte Hauptfraktionen mussten in den SAX-Puffer mit pH 7,5 ohne NaCl (siehe 2.1.5.2) umgepuffert werden. Je nach Größe der Fraktion wurden bis zu 10 mal je 12 mL auf eine mit Aufschlusspuffer äquilibrierte Desalting-Säule mittels P-6000 aufgetragen und mit Aufschlusspuffer mittels P-6000 eluiert. Es wurde eine Flussgeschwindigkeit von 5-10 mL/min gewählt.

Für die Umpufferung in den „Endpuffer“ (siehe 2.1.5.2) wurde hauptsächlich eine NAP-10 Säule gewählt auf der die vereinigten Hauptfraktionen von der SAX-Elution nach einer Konzentrierung in Amicon Ultra Einheiten in den „Endpuffer“ umgepuffert wurden. Bei größeren Proteinmengen wurde eine PD-10 gewählt und bei geringeren Proteinmengen eine NAP-5.

2.2.2.6. Herstellung der DXR Probe für die NMR-Messung

Die DXR-Probe wird konzentriert (siehe 2.2.2.2), über PD-10 oder NAP-10 in Endpuffer umgepuffert (siehe 2.2.2.5) und falls notwendig nochmals konzentriert um eine Endkonzentration an Protein von 40 mg/mL zu erreichen. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte über einen BCA- oder Bradford-Assay.

Jeweils 550 μ L Probe werden in ein 5x9 mm *constricted* NMR-Glasröhrchen (Rototec Spintec) überführt mit einem Deckel verschlossen und aus der Anaerobenbox ausgeschleust.

Direkt nach Ausschleusen wird das Röhrchen an seiner speziellen Verengung mit einem Sauerstoff-Gasbrenner zugeschmolzen (siehe Abb. 2.4). So kann eine dauerhafte Sauerstofffreiheit der DXR-Probe während der Lagerung bei 4°C und während der NMR-Messungen gewährleistet werden.

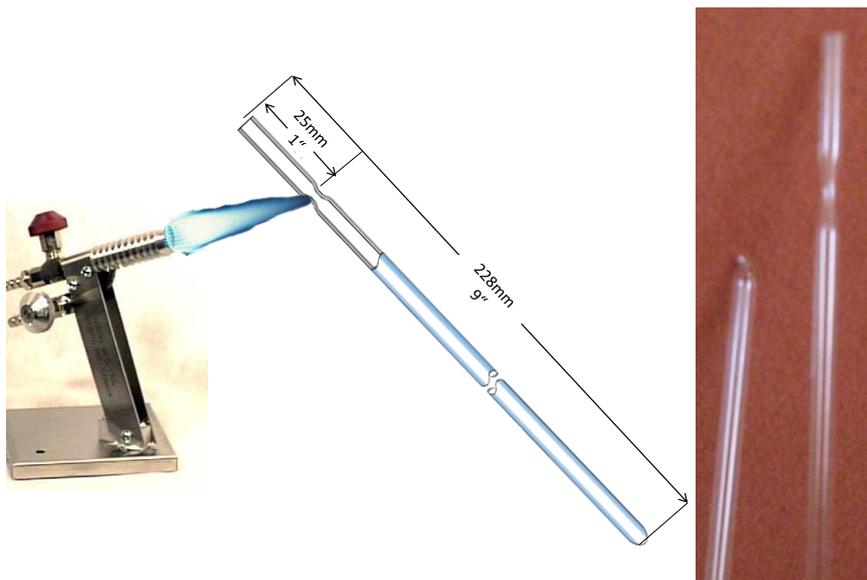


Abb. 2.4 Verschließen der NMR-Röhrchen

Die 5x9 mm „constricted“ NMR-Röhrchen werden an der Verengung mit einem Sauerstoff-Gasbrenner zugeschmolzen. Rechts sind ein zugeschmolzenes und ein offenes NMR-Röhrchen zu sehen.

2.2.2.7. Analytische Größenausschlusschromatographie (SEC)

Die analytische SEC dient zur Bestimmung des Molekulargewichtes des nativen Proteins und zur Überprüfung der Stabilität der DXR bei Langzeitlagerung. Die Trennung erfolgt über eine 10/300 Superdex 200 Säule von GE-Healthcare oder über eine Zorbax Bioseries GF-450 Säule. Zur Bestimmung des Molekulargewichtes wird zuerst ein Lauf mit Aceton durchgeführt und in einem zweiten Lauf Standardproteine aus dem LMW und HMW Standard von GE-Healthcare aufgetragen und eluiert. In einem dritten Lauf wird die DXR aufgetragen und eluiert. Das Molekulargewicht wird anschließend nach Herstellerangabe berechnet.

Zur Überprüfung der Stabilität des Proteins wird alle paar Tage, später alle paar Wochen eine Probe über die Zorbax SEC-Säule getrennt. Dazu wurde 15 µL einer Probe mit etwa 25 mg/mL aufgetragen. Die analytische SEC wurde isokratisch durchgeführt. Anhand des Chromatogramms ist es möglich Proteinaggregation und -degradierung zu detektieren. Mit dieser Methode werden verschiedene Pufferbedingungen und die Lagerung bei verschiedenen Temperaturen (-20 °C, 4 °C, Raumtemperatur, 37 °C) mit und ohne Sauerstoff verglichen.

2.2.3. Proteinbestimmungen

2.2.3.1. SDS-Gelelektrophorese

Die SDS-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von denaturierten Proteinen nach dem jeweiligen Molekulargewicht. Sie ist eine gute Methode um die Reinigungsschritte der DXR zu verfolgen und nach den chromatographischen Schritten die Fraktionen mit dem größten Anteil an DXR, bzw. den geringsten Anteil an Fremdprotein zu bestimmen. Für die DXR mit einem Molekulargewicht von ca. 40 kDa, wurden 12 %-Gele verwendet. Die SDS-Gelelektrophorese wird nach Laemmli durchgeführt [125]. Die Gele (Zusammensetzung siehe Tabelle 2.3) werden zwischen Glasplatten in einer BioRad-Apparatur gegossen (siehe Kapitel 2.1.1).

Tabelle 2.3 Zusammensetzung der SDS-Gele

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

Die Proben werden mit RotiLoad-Probenpuffer (Firma Roth) versetzt und anschließend bei 70 °C für 10 min im Wasserbad bzw. Thermoblock denaturiert. 10 µL Probe und 2,5 µL des Protein Markers werden aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 180 V über 80 min in Elektrophoresekammern der Firma BioRad (siehe Kapitel 2.1.1). Nach der Elektrophorese wird das Gel aus den Glasplatten gelöst und in einer Coomassie-Lösung 30 min gefärbt. Damit nur die Proteine angefärbt sind wird das Gel anschließend in Entfärber so lange geschüttelt, bis eine optimale Färbung entstanden ist. Die Coomassie-Färbelösung besteht aus 0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R 250, 50 % (v/v) Ethanol und 10 % (v/v) Essigsäure. Die Entfärbelösung besteht aus 10 % (v/v) Ethanol und 10 % (v/v) Essigsäure.

2.2.3.2. Proteinbestimmung nach der BCA-Methode

Der verwendete BCA-Assay [126] auf CuSO_4 -Basis wird von Pierce als Kit bezogen. Die Proteinbestimmung wird laut Herstellerangabe durchgeführt. Dazu wird von den Proteinfraktionen, bzw. Proteinproben 10 µL in eine 96-well Platte (siehe Kapitel 2.1.2) pipetiert und mit 150 µL BCA-Reagenz versetzt. Als Standard werden die BSA-Lösungen von 50 µg/mL bis 1500 µg/mL der Firma OZ Biosciences verwendet. Zusätzlich wird noch ein Leerwert mit Wasser und ein Pufferwert bestimmt. Nach der Inkubationszeit wird die Platte in dem ELISA-Reader (siehe Kapitel 2.1.1) bei einer Wellenlänge von $\lambda = 562$ nm vermessen. Da NADPH in der Proteinprobe den Assay stört und zu zu hohen Werten führt, muss bei allen NADPH-enhaltenden Proteinproben die unter 2.2.3.3 aufgeführte Bradford-Methode verwendet werden.

2.2.3.3. Proteinbestimmung nach Bradford

Der Bradford-Assay auf der Basis von Coomassie Brilliant Blau G-250 wird als Fertiglösung von der Firma OZ-Biosciences (Marseille) bezogen und der Test leicht modifiziert nach der Herstellerangabe durchgeführt [127]. Als Standardprotein werden sieben voreingestellte BSA-Konzentrationen aus dem Kit verwendet. Dazu wird von den Proteinfractionen, bzw. Proteinproben 10 μL in eine 96-well Platte (siehe Kapitel 2.1.2) pipetiert und mit 150 μL BCA-Reagenz versetzt. Zusätzlich wird noch ein Leerwert mit Wasser und ein Pufferwert bestimmt. Nach der Inkubationszeit wird die Platte in dem ELISA-Reader (siehe Kapitel 2.1.1) bei einer Wellenlänge von $\lambda = 595 \text{ nm}$ vermessen.

2.2.4. Zweidimensionale NMR-Experimente

Zur Strukturaufklärung eines Proteins sind NMR-Experimente notwendig, die eine Zuordnung des Peptid-Rückgrates und die Zuordnung der Seitenketten erlauben. Zum Proteinerückgrat werden folgende Atome gezählt: H_N , N, C_α , C_β , H_α , H_β und C' (C' steht für die Carbonyl-Kohlenstoffatome). Alle anderen Kohlenstoffatome und Wasserstoffatome zählen zu den Seitenketten.

2.2.4.1. ^{15}N -HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence)

Bei einem HSQC werden ^{15}N und ^1H der Amid-Gruppen angeregt und die chemische Verschiebung gemessen. Daher benötigt man für die Aufnahme eines HSQC mindestens eine ^{15}N -markierte Probe. Bei großen Proteinen (>20 kDa) kann es zu einer Überlagerung der vielen ^1H -Signale kommen. Dann empfiehlt sich zusätzlich eine Deuterierung der Probe. Die Deuterierung führt auch zu einem besseren Signal- zu Rausch-Verhältnis, da das Wasser-signal besser unterdrückt werden kann. Die Magnetisierung wird mittels J -Kopplung vom Proton auf den kovalent gebundenen ^{15}N -Kern übertragen. Die chemische Verschiebung des Stickstoff wird gemessen und die Magnetisierung wird zurückübertragen auf das Proton, woraufhin die chemische Verschiebung des Protons ebenfalls gemessen wird. Die ^1H -Verschiebung wird von 4,70 ppm bis 12,70 ppm und die ^{15}N -Verschiebung von 100,01 ppm bis 133,99 ppm aufgenommen. Die Darstellung der Signale erfolgt als zweidimensionales

Spektrum mit einer ^{15}N -Achse und einer ^1H -Achse. Jeder Peak besteht aus der Verknüpfung des ^{15}N -Signals mit dem ^1H -Signal einer Amidgruppe. Hauptsächlich sind die Proteinrückgratsignale zu sehen, aber auch Seitenketten-Amidgruppen von Tryptophan, Asparagin und Glutamin werden im Spektrum abgebildet (Trp- $\text{N}_\epsilon\text{-H}_\epsilon$; Asn/Gln $\text{N}_\delta\text{-H}_{\delta 2}$). Die Seitenketten von Lysin und Arginin geben meist keine Signale, da sie zu schnell mit dem Puffer austauschen. Bei niedrigen pH-Werten sind rückgefaltete Signale zu sehen [117].

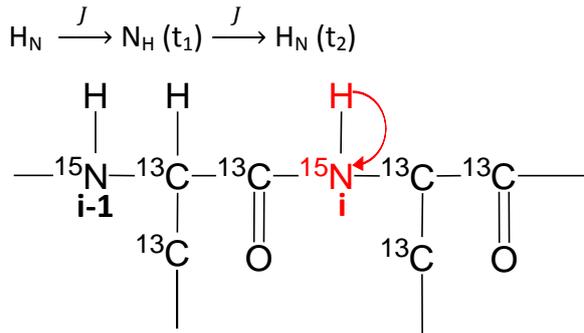


Abb. 2.5 Magnetisierungstransfer HSQC

Oben: Magnetisierungstransfer und Zeitpunkt der Frequenzmessung (t_1 bis t_2)

Unten: Schema zweier benachbarter Aminosäuren in einem Protein zur Darstellung des Magnetisierungstransfers im Molekül; rote Pfeile: die Magnetisierung wird über die skalare Kopplung übertragen; Atome in rot: die chemische Verschiebung dieser Atome wird gemessen

2.2.4.2. TROSY (Transverse Relaxation Optimized Spectroscopy)

Bei einem TROSY werden alle Amid-Gruppen angeregt und die chemische Verschiebung gemessen und in einem zweidimensionalen Spektrum angezeigt. Für die Aufnahme eines TROSY-Experiments wird mindestens eine ^{15}N -markierte Proteinprobe benötigt. Bei großen Proteinen, wie der DXR, kann eine zusätzliche Deuterierung notwendig sein. Bei einem HSQC tritt bei großen Proteinen trotz Deuterierung eine Peakverbreiterung auf, die zu überlappenden Signalen führen kann. In einem TROSY werden schärfere Peaks erzeugt indem die Relaxationseffekte ausbalanciert werden. Es gibt einen Peak für jede Stickstoffverschiebung und der dazugehörigen Protonenverschiebung. Die Magnetisierung wird mittels J -Kopplung vom Proton auf den kovalent gebundenen ^{15}N -Kern übertragen. Die chemische Verschiebung des Stickstoff wird gemessen und die Magnetisierung wird zurückübertragen auf das Proton, woraufhin die chemische Verschiebung des Protons ebenfalls gemessen wird. Die ^1H -Verschiebung wird von 4,66 ppm bis 11,33 ppm und die

^{15}N -Verschiebung von 100,60 ppm bis 132,35 ppm aufgenommen. Die Darstellung der Signale erfolgt als zweidimensionales Spektrum mit einer ^{15}N -Achse und einer ^1H -Achse. Jeder Peak besteht aus der Verknüpfung des ^{15}N -Signals mit dem ^1H -Signal einer Amidgruppe. Hauptsächlich sind die Proteinerückgratsignale zu sehen, aber auch Seitenketten-Amidgruppen von Tryptophan, Asparagin und Glutamin werden im Spektrum abgebildet (Trp- $\text{N}_\epsilon\text{-H}_\epsilon$; Asn/Gln $\text{N}_\delta\text{-H}_{\delta 2}$). Die Seitenketten von Lysin und Arginin sind meist nicht zu sehen, da sie zu schnell mit dem Puffer austauschen. Bei niedrigen pH-Werten sind rückgefaltete Signale zu sehen. Da Prolin keine Amidgruppe, sondern eine Iminogruppe besitzt, wird es in dem TROSY nicht angeregt. Für jede Aminosäure der Primärstruktur der DXR ist ein Einzelpeak zu erwarten. Daher wären für die DXR 383 Peaks zu erwarten gewesen, abzüglich des ersten Methionins und der 18 Proline. Die 2D TROSY Experimente wurden mit einer Verstärkung der Sensitivität durch die Verwendung von einer Echo-/Antiecho-Gradientenselektion durchgeführt. Durch die Verwendung des TROSY und der Gradientenselektion können auch große Proteine (>50 kDa) dargestellt werden [128-131].

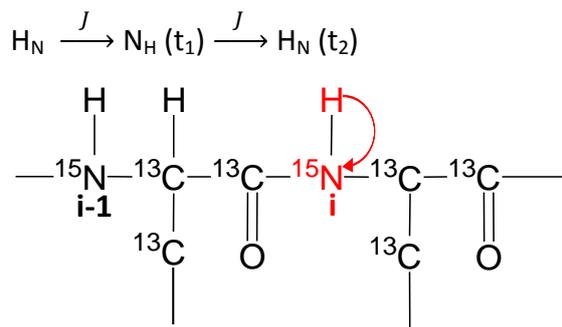


Abb. 2.6 Magnetisierungstransfer TROSY

Oben: Magnetisierungstransfer und Zeitpunkt der Frequenzmessung (t_1 bis t_2)

Unten: Schema zweier benachbarter Aminosäuren in einem Protein zur Darstellung des Magnetisierungstransfers im Molekül; rote Pfeile: die Magnetisierung wird über die skalare Kopplung übertragen; Atome in rot: die chemische Verschiebung dieser Atome wird gemessen

2.2.4.3. HMQC der methylselektiven Probe

Bei dem HMQC handelt es sich um die ^{13}C -Variante des HSQC Experiment. Daher braucht man eine zumindest ^{13}C -markierte Probe. Es sollte keine Deuterierung oder eine partielle Deuterierung vorliegen. Eine ^{15}N -Markierung ist im Prinzip nicht notwendig, wurde in der Herstellung der methylselektiv-markierten Probe aber ebenfalls eingesetzt, damit

verschiedene Experimente mit derselben Probe durchführbar sind. Dieses wird für die DXR für die Analyse der ^1H -markierten Methylgruppen von Val, Leu und Ile eingesetzt [132, 133]. Alle anderen Kohlenstoffe sind an Deuterium gebunden. Alle deuterierten Gruppen werden nicht angeregt. Nur die ^1H -markierten Methylgruppen können angeregt werden und die Magnetisierung übertragen. Bei kleinen Proteinen könnte man auch eine nicht-deuterierte Probe einsetzen, aber da die DXR groß ist, wären die Signalüberlagerungen zu groß. Zuerst wird ^1H angeregt, die Magnetisierung auf das daran gebundene ^{13}C übertragen und die chemische Verschiebung des ^{13}C gemessen. Danach wird die Magnetisierung vom angeregten ^{13}C wieder auf das ^1H übertragen und auch hier die chemische Verschiebung gemessen. Es können die ^1H markierten Methylgruppen von Val, Leu und Ile gemessen werden, sowie deren $^{13}\text{C}\alpha$. Die ^1H -Verschiebung wird von -1,38 ppm bis 4,60 ppm und die ^{13}C -Verschiebung von 8,71 ppm bis 29,67 ppm aufgenommen.

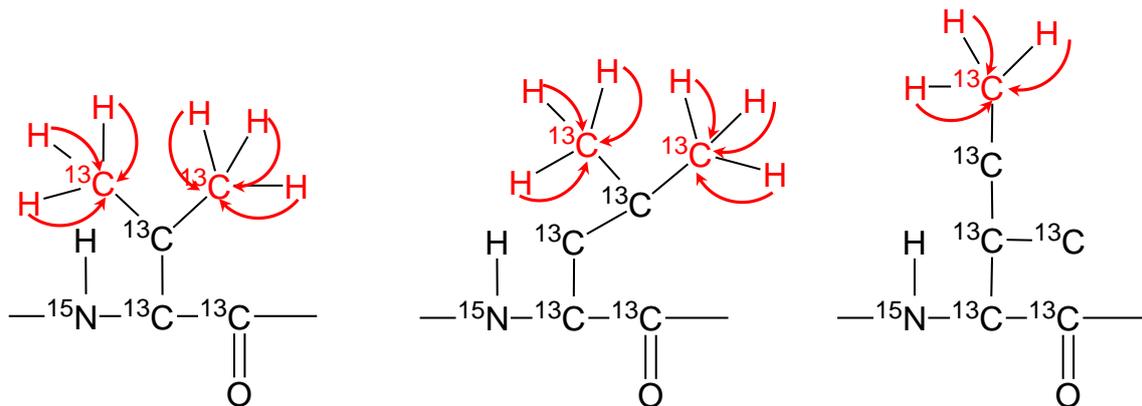
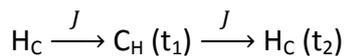


Abb. 2.7 Magnetisierungstransfer HMQC

Oben: Magnetisierungstransfer und Zeitpunkt der Frequenzmessung (t_1 bis t_2)

Unten: Schema zweier benachbarter Aminosäuren in einem Protein zur Darstellung des Magnetisierungstransfers im Molekül; rote Pfeile: die Magnetisierung wird über die skalare Kopplung übertragen; Atome in rot: die chemische Verschiebung dieser Atome wird gemessen

2.2.5. Dreidimensionale NMR-Experimente

Neben dem zweidimensionalen TROSY-Experiment werden eine Reihe dreidimensionaler Experimente durchgeführt. Manche der Experimente liefern die ^{13}C -Signale sowohl des „eigenen“ Restes (*intraresidue Peak*) als auch die ^{13}C -Signale der Vorgängeramino­säure (*interresidue Peak*). Damit ist gemeint, dass die ^{13}C -Atome des Amids als auch die ^{13}C -Atome des Vorgängeramids mit den NH-Verschiebungen korreliert vorliegen, so dass für ein Amid zwei $\text{C}\alpha$ -Verschiebungssignale gemessen werden. Betrachtet man eine Amid A, so kann man Amid B identifizieren indem man die „*interresidue*“ chemische Verschiebung des C-Atoms A mit der chemischen Verschiebung der „*intraresidue*“ Verschiebung des C-Atoms der Aminosäure B vergleicht. Sind die chemischen Verschiebungen identisch, ist das Amid B der Nachbar des Amid A (siehe beispielsweise Abb. 2.12) Dies führt man solange durch bis alle sequentiellen Konnektivitäten gefunden werden. Im Idealfall kann das ganze Spinsystem in dem Protein auf diese Weise zugeordnet werden.

In der Praxis sind aber meist nicht alle Signale lückenlos vorhanden und manche Signale nicht eindeutig zuzuordnen. Um dem entgegenzuwirken werden meist Experiment-Paare durchgeführt. Beispielhaft dafür ist die Kombination eines HNCA und eines HNcoCA, da im HN(CO)CA lediglich ein Signal des Nachbar- $\text{C}\alpha$ zeigt und somit eine Verwechslung ausgeschlossen ist.

Wie bei den meisten Experimenten wird bei HNCO- und HNCA-Experimenten zuerst das Amid angeregt. Nehmen wir als Beispiel das HNCA. Bei diesem Experiment wird das H_N -Atom angeregt und die Magnetisierung auf das N übertragen. Anschließend wird die Magnetisierung weiter zum CA übertragen und die Frequenz aufgenommen. Die Magnetisierung wird auf das Amid zurückübertragen sowie die Frequenz des N_H und dann die des H_N aufgenommen. Solche Experimente nennt man *out and back*. Die meisten dreidimensionalen Experimente werden nach dieser *out and back* Methode aufgenommen. Dagegen wird die Magnetisierung beim HGCG(CBCACO)NH, das von einem H_C ausgeht nur in eine Richtung übertragen. Die Magnetisierung wird vom H_C ausgehend zum Amid übertragen und die Magnetisierung wird nicht zurückübertragen.

Falls notwendig wurden die Bruker Standard Pulssequenzen für die 3D-Experimente mit einer ^2H -Entkopplung durchgeführt [129, 131, 134, 135]. In den Abbildungen (Abb. 2.8 bis Abb. 2.14) des Magnetisierungstransfers wird für eine bessere Übersichtlichkeit die

Rückübertragung nicht im Aminosäureschema dargestellt, sondern nur eine Richtung des Magnetisierungstransfers. Für die 3D-Experimente benötigt man eine ^{15}N -, ^{13}C -markierte Proteinprobe und im Falle der DXR auch eine Deuterierung, da die DXR zu den großen Proteinen zählt.

2.2.5.1. HNC0-TROSY

Das HNC0 ist eines der einfachsten dreidimensionalen Experimente. Es korreliert die Amid-Gruppe mit dem CO-Atom (CO = Carbonyl-Kohlenstoff) der Vorgängeramidgruppe (*interresidue Peak*) [136-138]. Die ^1H -Verschiebung wird von 4,66 ppm bis 11,33 ppm, die ^{15}N -Verschiebung von 100,68 ppm bis 132,35 ppm und die ^{13}C -Verschiebung von 170,99 ppm bis 182,25 ppm aufgenommen.

Die Magnetisierung wird vom $^1\text{H}_\text{N}$ auf das $^{15}\text{N}_\text{H}$ übertragen und anschließend auf das $^{13}\text{C}'$. Die chemische Verschiebung der ^{13}C wird gemessen und die Magnetisierung auf das Amid zurückübertragen. Erst nach der Rückübertragung wird die chemische Verschiebung des $^{15}\text{N}_\text{H}$ aufgenommen und anschließend von $^1\text{H}_\text{N}$.

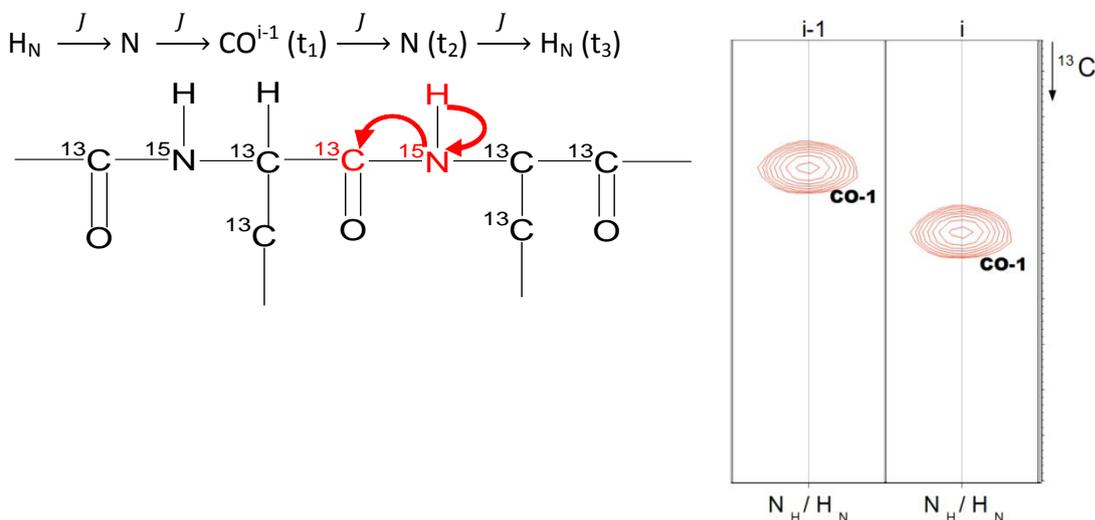


Abb. 2.8 Magnetisierungstransfer HNC0

Oben: Magnetisierungstransfer und Zeitpunkt der Frequenzmessung (t_1 bis t_3)

Mitte: Schema zweier benachbarter Aminosäuren in einem Protein zur Darstellung des Magnetisierungstransfers im Molekül; rote Pfeile: die Magnetisierung wird über die skalare Kopplung übertragen; Atome in rot: die chemische Verschiebung dieser Atome wird gemessen

Rechts: Schema einer Spektrumsquerschnittsebene (*Stripscope*) zweier benachbarter Aminosäuren

2.2.5.2. HN(CA)CO-TROSY

Das HN(CA)CO eignet sich als Partnerexperiment zum HNCO, denn es gibt die Information zu dem Vorgänger-CO und dem eigenen Amid-CO (*intraresidue Peak*), während das HNCO einen Peak für das Vorgänger-CO (*interresidue Peak*) zeigt. Die ^1H -Verschiebung wird von 4,67 ppm bis 11,34 ppm, die ^{15}N -Verschiebung von 100,69 ppm bis 132,35 ppm und die ^{13}C -Verschiebung von 171,12 ppm bis 182,12 ppm aufgenommen.

Die Magnetisierung wird vom $^1\text{H}_\text{N}$ auf das $^{15}\text{N}_\text{H}$ übertragen und anschließend auf das $^{13}\text{C}_\alpha$ dessen Verschiebung nicht gemessen wird und von dort auf das $^{13}\text{C}'$. Die chemische Verschiebung der $^{13}\text{C}'$ wird gemessen und die Magnetisierung auf das Amid zurückübertragen. Erst nach der Rückübertragung wird die chemische Verschiebung des $^{15}\text{N}_\text{H}$ aufgenommen und zuletzt von $^1\text{H}_\text{N}$.

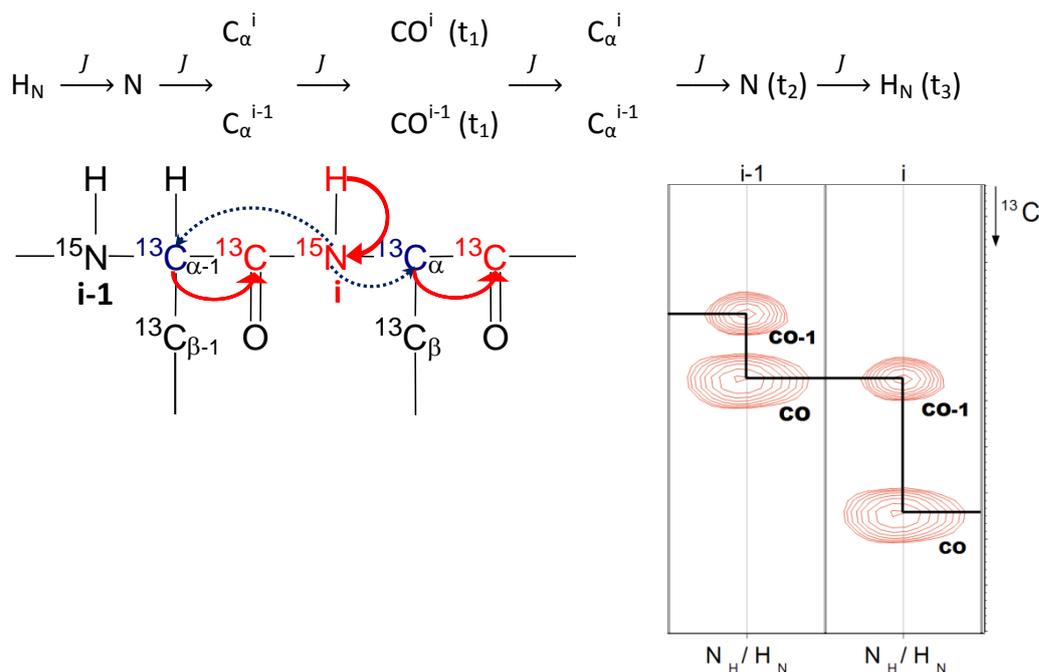


Abb. 2.9 Magnetisierungstransfer HNCA(CO)

Oben: Magnetisierungstransfer und Zeitpunkt der Frequenzmessung (t_1 bis t_3)

Mitte: Schema zweier benachbarter Aminosäuren in einem Protein zur Darstellung des Magnetisierungstransfers im Molekül; rote Pfeile: die Magnetisierung wird über die skalare Kopplung übertragen; Atome in rot: die chemische Verschiebung dieser Atome wird gemessen; Pfeile und Atome in blau: Magnetisierung wird übertragen, aber die chemische Verschiebung dieser Atome nicht gemessen

Rechts: Schema einer Spektrumsquerschnittsebene (*Stripscope*) zweier benachbarter Aminosäuren; die Linie zeigt die Konnektivität zwischen den AS, das Signal des CO der AS_{i-1} hat ein korrespondierendes CO-1 Signal der AS_i

2.2.5.3. HNCA-TROSY

Das HNCA Experiment korreliert die Amid-Gruppe mit der chemischen Verschiebung des $C\alpha$ der eigenen (i) und dem $C\alpha$ der Vorgänger-Amid-Gruppe (i-1). Die 1H -Verschiebung wird von 4,67 ppm bis 11,33 ppm, die ^{15}N -Verschiebung von 100,66 ppm bis 132,33 ppm und die ^{13}C -Verschiebung von 42,05 ppm bis 69,94 ppm aufgenommen.

Die Magnetisierung wird vom 1H_N auf das $^{15}N_H$ übertragen und anschließend auf das $^{13}C\alpha$. Die chemische Verschiebung der $^{13}C\alpha$ wird gemessen und die Magnetisierung auf das Amid zurückübertragen. Erst nach der Rückübertragung wird die chemische Verschiebung des $^{15}N_H$ aufgenommen und zuletzt von 1H_N .

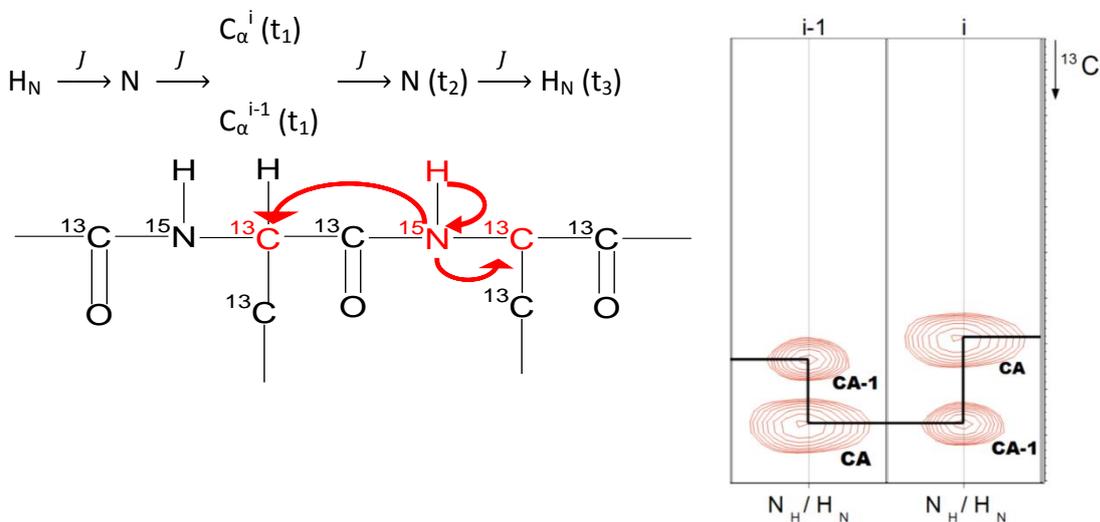


Abb. 2.10 Magnetisierungstransfer HNCA

Oben: Magnetisierungstransfer und Zeitpunkt der Frequenzmessung (t_1 bis t_3)

Mitte: Schema zweier benachbarter Aminosäuren in einem Protein zur Darstellung des Magnetisierungstransfers im Molekül; rote Pfeile: die Magnetisierung wird über die skalare Kopplung übertragen; Atome in rot: die chemische Verschiebung dieser Atome wird gemessen;

Rechts: Schema einer Spektrenquerschnittsebene (*Stripscope*) zweier benachbarter Aminosäuren; die Linie zeigt die Konnektivität zwischen den AS, das Signal des $C\alpha$ (CA) der AS_{i-1} hat ein korrespondierendes CA-1 (CA-1) Signal der AS_i

2.2.5.4. HN(CO)CA-TROSY

Das HN(CO)CA Experiment eignet sich sehr gut als Partnerexperiment zum HNCA, da es nur das C_α des Vorgängers mit der Amidgruppe korreliert. Sind in einem HNCA die beiden Signale für C_α gleich intensiv, kann man durch dieses Experiment zwischen den „intraresidue“- und „interresidue“-Signale des HNCA unterscheiden. Die ^1H -Verschiebung wird von 4,67 ppm bis 11,33 ppm, die ^{15}N -Verschiebung von 100,70 ppm bis 132,36 ppm und die ^{13}C -Verschiebung von 42,17 ppm bis 70,06 ppm aufgenommen.

Die Magnetisierung wird vom $^1\text{H}_\text{N}$ auf das $^{15}\text{N}_\text{H}$ übertragen und über das $^{13}\text{C}'$, dessen chemische Verschiebung nicht gemessen wird, auf das $^{13}\text{C}_\alpha$. Die chemische Verschiebung der $^{13}\text{C}_\alpha$ wird gemessen und die Magnetisierung auf das Amid zurückübertragen. Erst nach der Rückübertragung wird die chemische Verschiebung des $^{15}\text{N}_\text{H}$ aufgenommen und zuletzt von $^1\text{H}_\text{N}$.

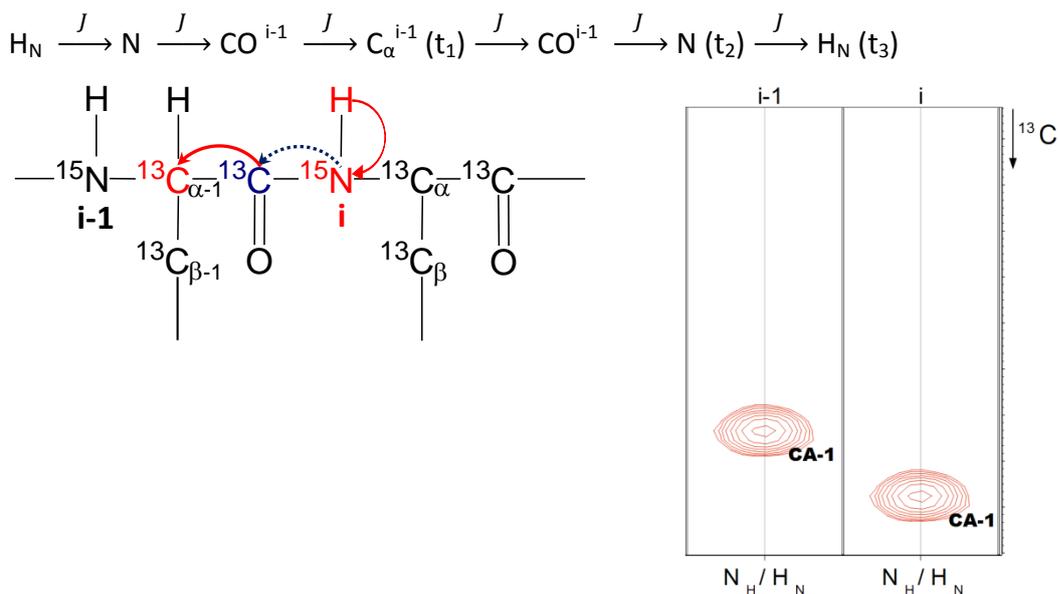


Abb. 2.11 Magnetisierungstransfer HN(CO)CA

Oben: Magnetisierungstransfer und Zeitpunkt der Frequenzmessung (t_1 bis t_3)

Mitte: Schema zweier benachbarter Aminosäuren in einem Protein zur Darstellung des Magnetisierungstransfers im Molekül; rote Pfeile: die Magnetisierung wird über die skalare Kopplung übertragen; Atome in rot: die chemische Verschiebung dieser Atome wird gemessen; Pfeile und Atome in blau: Magnetisierung wird übertragen, aber die chemische Verschiebung dieser Atome nicht gemessen

Rechts: Schema einer Spektrumsquerschnittsebene (*Stripscope*) zweier benachbarter Aminosäuren;

2.2.5.5. HNCACB-TROSY

Beim HNCACB kann man neben den C_α der Amidgruppe und des Vorgängers auch deren Peaks für die C_β detektieren. Die ^1H -Verschiebung wird von 4,66 ppm bis 11,33 ppm, die ^{15}N -Verschiebung von 100,70 ppm bis 132,37 ppm und die ^{13}C -Verschiebung von 12,74 ppm bis 72,50 ppm aufgenommen.

Die Magnetisierung wird vom $^1\text{H}_\text{N}$ auf das $^{15}\text{N}_\text{H}$ übertragen, dann auf das $^{13}\text{C}_\alpha$ und das $^{13}\text{C}_\beta$. Die chemische Verschiebung des $^{13}\text{C}_\alpha$ und $^{13}\text{C}_\beta$ wird gemessen und die Magnetisierung auf das Amid zurückübertragen. Erst nach der Rückübertragung wird die chemische Verschiebung des $^{15}\text{N}_\text{H}$ aufgenommen und zuletzt von $^1\text{H}_\text{N}$.

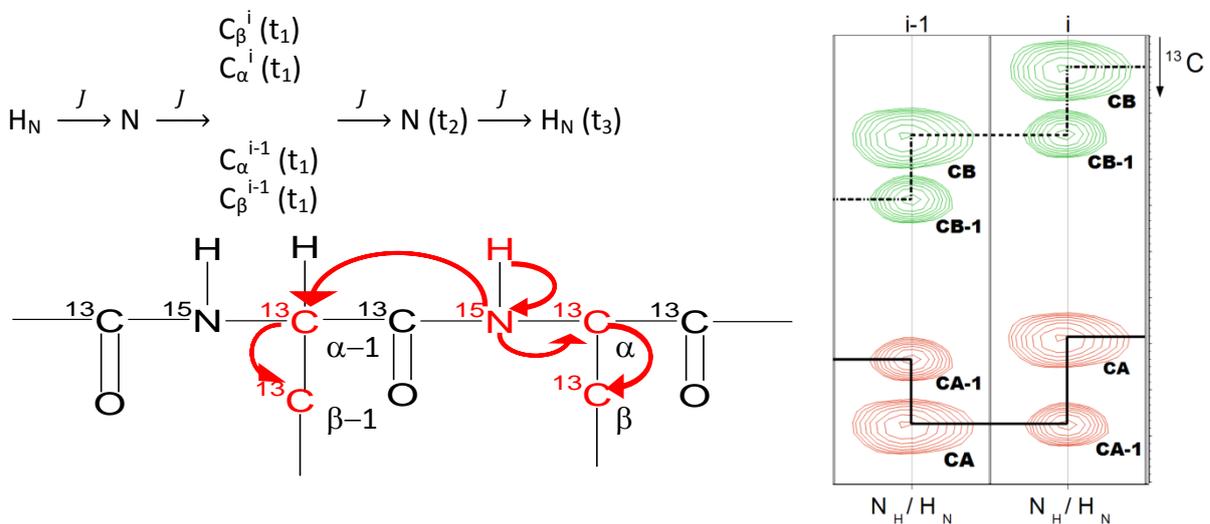


Abb. 2.12 Magnetisierungstransfer HNCACB

Oben: Magnetisierungstransfer und Zeitpunkt der Frequenzmessung (t_1 bis t_3)

Mitte: Schema zweier benachbarter Aminosäuren in einem Protein zur Darstellung des Magnetisierungstransfers im Molekül; rote Pfeile: die Magnetisierung wird über die skalare Kopplung übertragen; Atome in rot: die chemische Verschiebung dieser Atome wird gemessen;

Rechts: Schema einer 2D-Spektrumsquerschnittsebene (*Stripscope*) zweier benachbarter Aminosäuren; die Linie zeigt die Konnektivität zwischen den AS, beispielsweise das Signal des C_α (CA) der AS_{i-1} hat ein korrespondierendes C_α -1- (CA-1)-Signal der AS_i; Die Konnektivität von CA ist durch die durchgezogene Linie dargestellt und von CB durch die gepunktete; Signale in rot C_α , Signale in grün C_β (C_β bekommt im HNCACB ein umgekehrtes Vorzeichen), daher sind C_α und C_β gut zu unterscheiden

2.2.5.6. HN(CO)CACB-TROSY

Mit Hilfe des HN(CO)CACB kann man die Peaks der eigenen Gruppe von der Vorgängergruppe unterscheiden, da man in diesem Experiment nur die Vorgänger-Signale detektiert. Die ^1H -Verschiebung wird von 4,68 ppm bis 11,29 ppm, die ^{15}N -Verschiebung von 100,55 ppm bis 132,05 ppm und die ^{13}C -Verschiebung von 10,69 ppm bis 74,47 ppm aufgenommen.

Die Magnetisierung wird vom $^1\text{H}_\text{N}$ auf das $^{15}\text{N}_\text{H}$ übertragen, über das $^{13}\text{C}'$, dessen chemische Verschiebung nicht gemessen wird auf das $^{13}\text{C}_\alpha$ und das $^{13}\text{C}_\beta$. Die chemische Verschiebung des $^{13}\text{C}_\alpha$ und $^{13}\text{C}_\beta$ wird gemessen und die Magnetisierung auf das Amid zurückübertragen. Erst nach der Rückübertragung wird die chemische Verschiebung des $^{15}\text{N}_\text{H}$ aufgenommen und zuletzt von $^1\text{H}_\text{N}$.

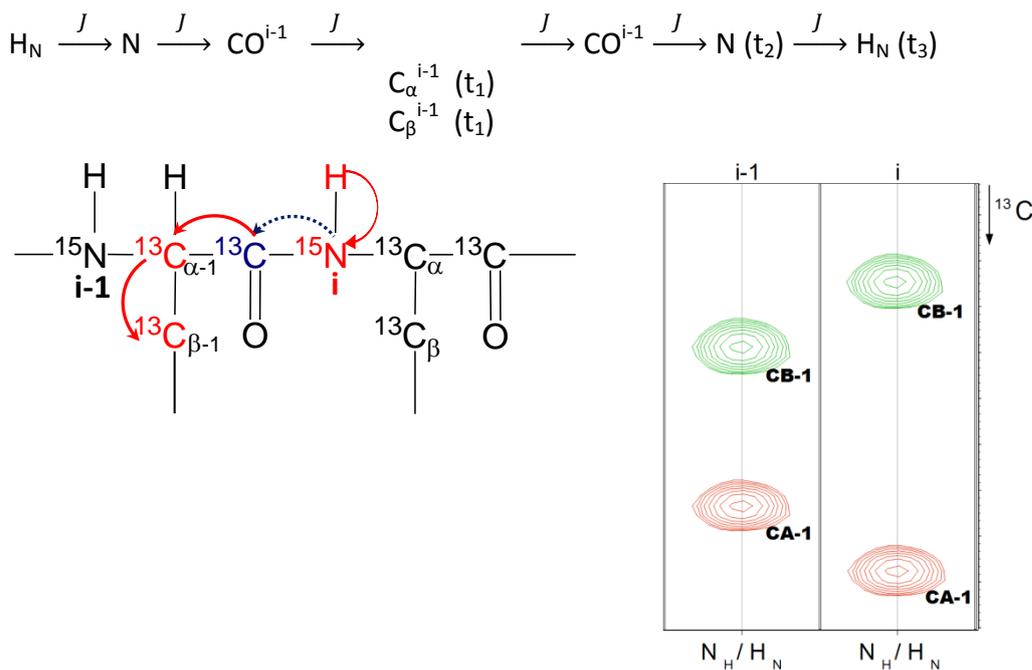


Abb. 2.13 Magnetisierungstransfer HN(CO)CACB

Oben: Magnetisierungstransfer und Zeitpunkt der Frequenzmessung (t_1 bis t_3)

Mitte: Schema zweier benachbarter Aminosäuren in einem Protein zur Darstellung des Magnetisierungstransfers im Molekül; rote Pfeile: die Magnetisierung wird über die skalare Kopplung übertragen; Atome in rot: die chemische Verschiebung dieser Atome wird gemessen; Pfeile und Atome in blau: Magnetisierung wird übertragen, aber die chemische Verschiebung dieser Atome nicht gemessen

Rechts: Schema einer 2D-Spektrumsquerschnittsebene (*Stripscope*) zweier benachbarter Aminosäuren; Signale in rot C_α , Signale in grün C_β (C_β bekommt im HN(CO)CACB ein umgekehrtes Vorzeichen), daher sind C_α und C_β gut zu unterscheiden

2.2.5.7. HNCCC(CO)NH-TOCSY

Für eine partielle Seitenkettenzuordnung wird ein 3D-(HNCAC)C(C)-CANH-TOCSY Experiment durchgeführt [139]. Dieses Experiment dient dazu einerseits Seitenkettenverschiebungen aufzunehmen und andererseits die Zuordnung des Proteinerückgrates zu erleichtern indem der Aminosäuretyp eindeutiger bestimmt werden kann. Es wird eine ^{15}N -, ^{13}C -markierte und deuterierte DXR-Probe eingesetzt. Die ^1H -Verschiebung wird von 4,68 ppm bis 11,34 ppm, die ^{15}N -Verschiebung von 100,73 ppm bis 132,39 ppm und die ^{13}C -Verschiebung von 9,83 ppm bis 73,30 ppm aufgenommen. Die Magnetisierung wird vom $^1\text{H}_\text{N}$ auf das $^{15}\text{N}_\text{H}$ übertragen, dann auf über das $^{13}\text{C}_\alpha$ auf $^{13}\text{C}_\beta$, C_γ , C_δ und das $^{13}\text{C}_\epsilon$. Die chemische Verschiebung der aliphatischen ^{13}C wird gemessen und die Magnetisierung auf das Amid zurückübertragen. Erst nach der Rückübertragung wird die chemische Verschiebung des $^{15}\text{N}_\text{H}$ aufgenommen und zuletzt vom $^1\text{H}_\text{N}$.

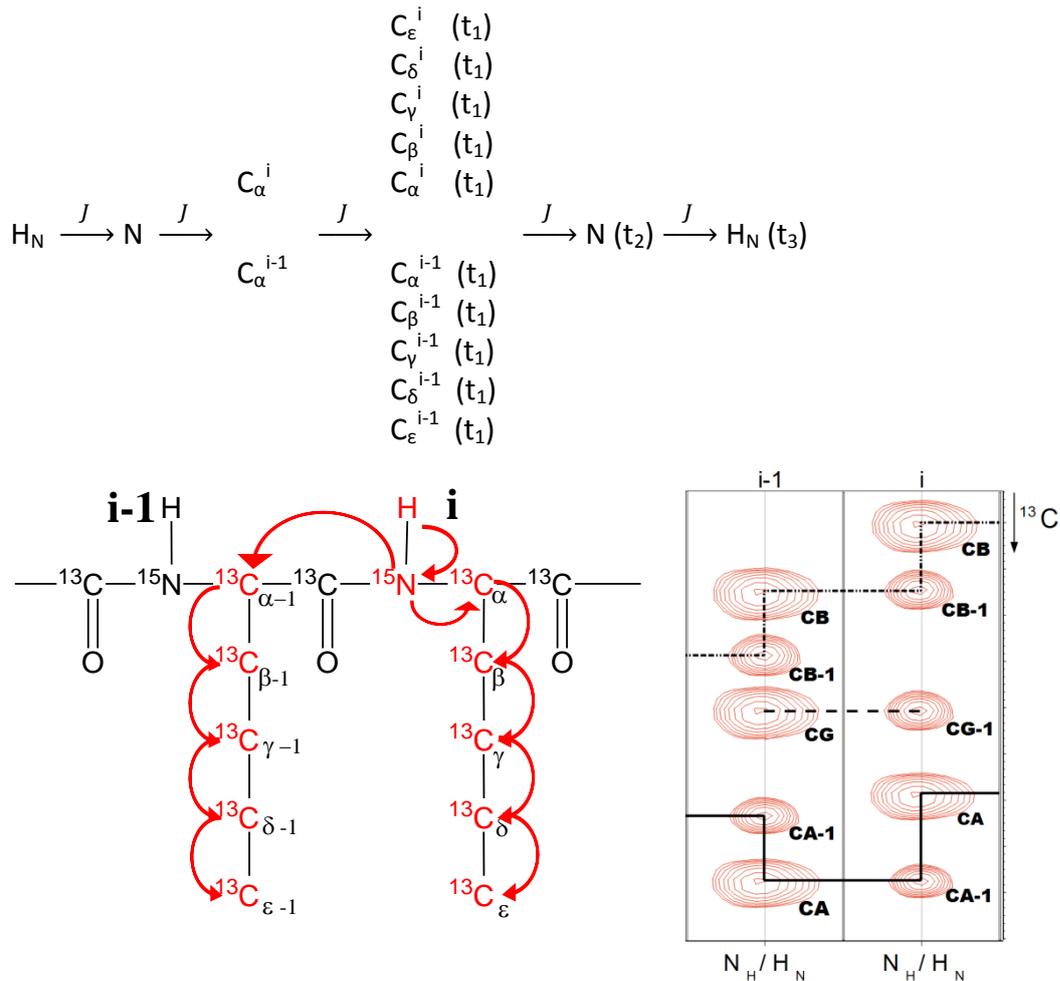


Abb. 2.14 Magnetisierungstransfer HNCC(CO)NH-TOCSY

Oben: Magnetisierungstransfer und Zeitpunkt der Frequenzmessung (t_1 bis t_3)

Mitte: Schema zweier benachbarter Aminosäuren in einem Protein zur Darstellung des Magnetisierungstransfers im Molekül; rote Pfeile: die Magnetisierung wird über die skalare Kopplung übertragen; Atome in rot: die chemische Verschiebung dieser Atome wird gemessen;

Rechts: Schema einer 2D-Spektrumsquerschnittsebene (*Stripscope*) zweier benachbarter Aminosäure; die Linie zeigt die Konnektivität zwischen den AS, beispielsweise das Signal des C_α (CA) der AS_{i-1} hat ein korrespondierendes C_α -1- (CA-1)-Signal der AS_i ; Die Konnektivität von CA ist durch die durchgezogene Linie dargestellt, von CB durch die gepunktete und von CG durch die gestrichelte;

2.2.5.8. (H)C(CCO)NH-TROSY

Dieses Experiment wird nicht als „out and back“-Experiment durchgeführt, die chemische Verschiebung wird direkt nach der Anregung aufgenommen. Im Normalfall wird eine ^{15}N - und ^{13}C -markierte Proteinprobe ohne Deuterierung verwendet. Dann würde die Magnetisierung bei allen ^1H anfangen, die an ein ^{13}C gebunden sind. Bei der DXR und anderen

Proteinen dieser Größe würde das zu Signalüberlappungen führen. Daher wird eine DXR-Probe verwendet, deren Val, Leu und Ile endständig ^1H markiert sind und alle andere ^{13}C deuteriert vorliegen. Bei diesem Experiment beginnt der Magnetisierungstransfer bei den endständigen Methylgruppen der selektiv markierten Aminosäuren Val, Leu und Ile. Man erhält die chemischen Verschiebungen der Methylprotonen, Methylkohlenstoffe, der C_α -Kohlenstoffe, der Vorgängeraminosäure sofern es sich dabei um Val, Leu oder Ile handelt und die TROSY Amidverschiebungen [140-144]. Die ^1H -Verschiebung wird von 5,18 ppm bis 13,19 ppm, die ^{15}N -Verschiebung von 97,42 ppm bis 128,76 ppm und die ^{13}C -Verschiebung von 10,08 ppm bis 31,14 ppm aufgenommen. Die Magnetisierung wird vom $^1\text{H}_\text{C}$ auf das $^{13}\text{C}_\text{ali}$ übertragen, dann auf $^{15}\text{N}_\text{H}$ und $^1\text{H}_\text{N}$. Die chemische Verschiebung der aliphatischen ^{13}C wird gemessen und die Magnetisierung auf das Amid übertragen. Die chemische Verschiebung des $^{15}\text{N}_\text{H}$ wird aufgenommen und von $^1\text{H}_\text{N}$.

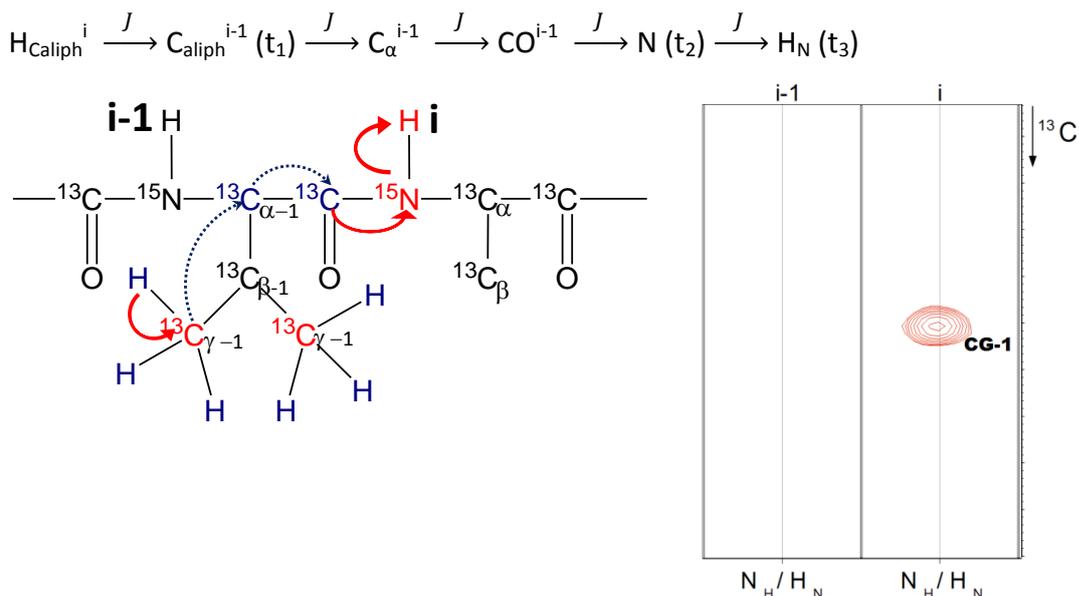


Abb. 2.15 Magnetisierungstransfer (H)C(CCO)NH.

Oben: Magnetisierungstransfer und Zeitpunkt der Frequenzmessung (t_1 bis t_3)

Mitte: Schema zweier benachbarter Aminosäuren in einem Protein zur Darstellung des Magnetisierungstransfers im Molekül; rote Pfeile: die Magnetisierung wird über die skalare Kopplung übertragen; Atome in rot: die chemische Verschiebung dieser Atome wird gemessen; Pfeile und Atome in blau: Magnetisierung wird übertragen, aber die chemische Verschiebung dieser Atome nicht gemessen, (H)C ist im Fall von Val: $\text{H}_\gamma\text{C}_\gamma$; von Leu und Ile: $\text{H}_\delta\text{C}_\delta$

Rechts: Schema einer 2D-Spektrumsquerschnittsebene (Stripscope) zweier benachbarter Aminosäuren; es entsteht nur ein Signal bei dem Nachfolger eines Leu, Ile oder Val

2.2.5.9. (HM)CM(CB)CA und (HM)CM(CBCA)CO

Für die partielle Zuordnung der Seitenketten werden 3D-HM(CB)CA_{Val}⁻, 3D-HM(CB)CA_{Leu,Ile}⁻, 3D-HM(CBCA)CO_{Val}⁻, 3D-HM(CBCA)CO_{Leu,Ile}-Experimente an der methyelsektiv markierten Probe durchgeführt [133]. Dazu wird ein CBCANH Parameterset entsprechend modifiziert. Bei den Experimenten werden zuerst die endständigen Methylprotonen von Val oder Leu und Ile angeregt. Bei dem (HM)CM(CB)CA wird die Magnetisierung über die skalare Kopplung auf die Methylkohlenstoffe übertragen und über das C_β auf das C_α übertragen. Man erhält Peaks, sowohl für C_α als auch für C_{α-1}, sofern C_α und/oder C_{α-1} an Val, Leucin oder Isoleucin-Seitenketten gebunden sind. Die ¹H-Verschiebung wird von -2,34 ppm bis 4,65 ppm, die ¹³C-Verschiebung von 41,54 ppm bis 66,44 ppm und von 9,24 ppm bis 73,99 ppm aufgenommen.

HMCM(CB)CA:

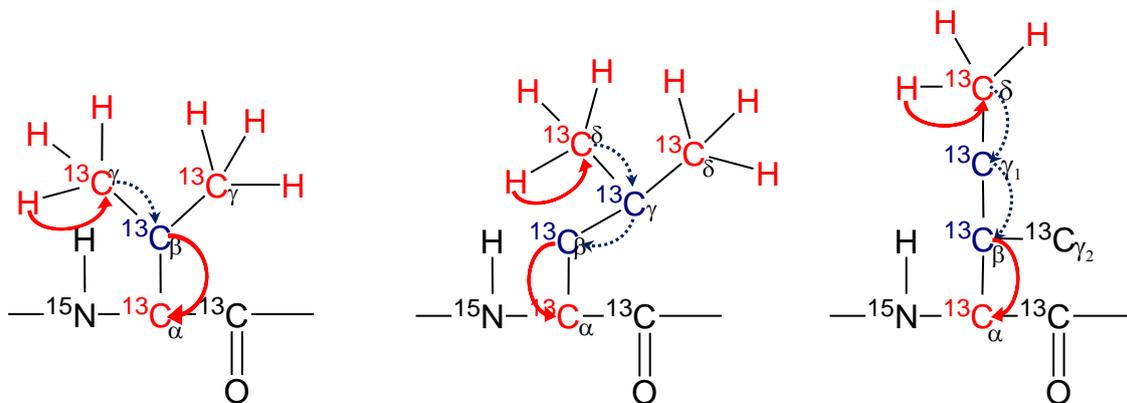
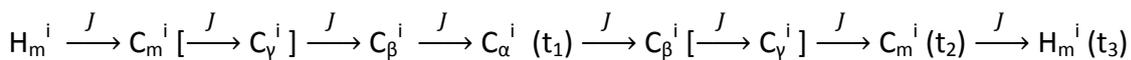


Abb. 2.16 Magnetisierungstransfer HMCM(CB)CA

Oben: Magnetisierungstransfer und Zeitpunkt der Frequenzmessung (t_1 bis t_3)

Mitte: Schema zweier benachbarter Aminosäuren in einem Protein zur Darstellung des Magnetisierungstransfers im Molekül; rote Pfeile: die Magnetisierung wird über die skalare Kopplung übertragen; Atome in rot: die chemische Verschiebung dieser Atome wird gemessen; Pfeile und Atome in blau: Magnetisierung wird übertragen, aber die chemische Verschiebung dieser Atome nicht gemessen, HM und CM sind im Fall von Val: H_γC_γ; von Leu und Ile: H_δC_δ

Eine 2D-Spektrumsquerschnittsebene (*Stripscope*) kann mit CARA für dieses Spektrum nicht dargestellt werden, da die HN-Ebene fehlt

Beim (HM)CM(CBCA)CO wird die Magnetisierung über die skalare Kopplung auf die Methylkohlenstoffe übertragen und über das C β und über das C α auf das C' übertragen. Man erhält Peaks, sowohl für C' $_i$ als auch für C' $_{i-1}$, sofern C' $_i$ und/oder C' $_{i-1}$ an Val, Leucin oder Isoleucin-Seitenketten gebunden sind. Die ^1H -Verschiebung wird von -1,63 ppm bis 10,84 ppm und von 4,66 ppm bis 12,67 ppm aufgenommen und die ^{15}N -Verschiebung wird von 100,85 ppm bis 132,19 ppm aufgenommen.

HMCM(CBCA)CO:

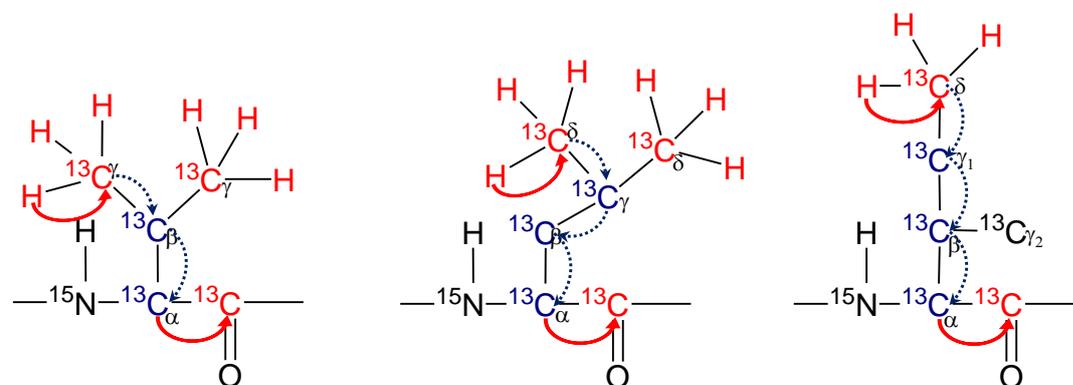
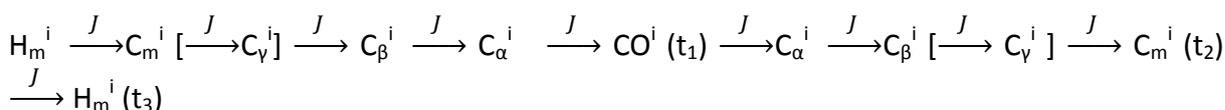


Abb. 2.17 Magnetisierungstransfer HMCM(CBCA)CO

Oben: Magnetisierungstransfer und Zeitpunkt der Frequenzmessung (t_1 bis t_3)

Mitte: Schema zweier benachbarter Aminosäuren in einem Protein zur Darstellung des Magnetisierungstransfers im Molekül; rote Pfeile: die Magnetisierung wird über die skalare Kopplung übertragen; Atome in rot: die chemische Verschiebung dieser Atome wird gemessen; Pfeile und Atome in blau: Magnetisierung wird übertragen, aber die chemische Verschiebung dieser Atome nicht gemessen, HM und CM sind im Fall von Val: $\text{H}_\gamma\text{C}_\gamma$; von Leu und Ile: $\text{H}_\delta\text{C}_\delta$

Eine 2D-Spektrumsquerschnittsebene (*Stripscope*) kann mit CARA für dieses Spektrum nicht dargestellt werden, da die HN-Ebene fehlt

2.2.5.10. ^{15}N -NOESY-TROSY

Durch den Kern-Overhauser-Effekt (engl.: Nuclear Overhauser Effect NOE) koppeln räumlich nahe (bis ca. 5 Å) Kerne miteinander. In diesem Experiment werden zuerst die Protonen angeregt und die chemischen Verschiebungen gemessen. Nach der Entwicklungszeit des Protonenpulses läuft der Magnetisierungstransfer über *NOE*-Dipolkopplung zu räumlich

benachbarten Protonen. Anschließend erfolgt ein neuer Puls, der die skalare Kopplung der Amidgruppe wie bei einem TROSY anregt, so dass nur kovalent gebundene Kerne angeregt werden und nicht mehr räumlich benachbarte Kerne. Die chemischen Verschiebungen von N_H und H werden gemessen. Das Experiment ist beschreibbar als eine Verknüpfung eines 2D-NOESY mit einem 2D-TROSY. Da nur die endständigen Methylgruppen von Val, Leu und Ile protoniert vorliegen, wird nur die Magnetisierung von diesen und einigen zusätzlich unspezifisch protonierten Methylgruppen an die Amidgruppen der eigenen Aminosäure und Nachbarminosäuren übertragen. Zusätzlich wird die Magnetisierung von Amidproton zu Nachbaramidprotonen übertragen, so dass bis zu drei Amidprotonen vorwärts und rückwärts abgebildet sein können. Dadurch lässt sich die Zuordnung im Spinsystem überprüfen. Die 1H -Verschiebung wird von -2,29 ppm bis 4,70 ppm, die ^{13}C -Verschiebung von 6,75 ppm bis 71,25 ppm und von 161,54 ppm bis 186,35 ppm aufgenommen.

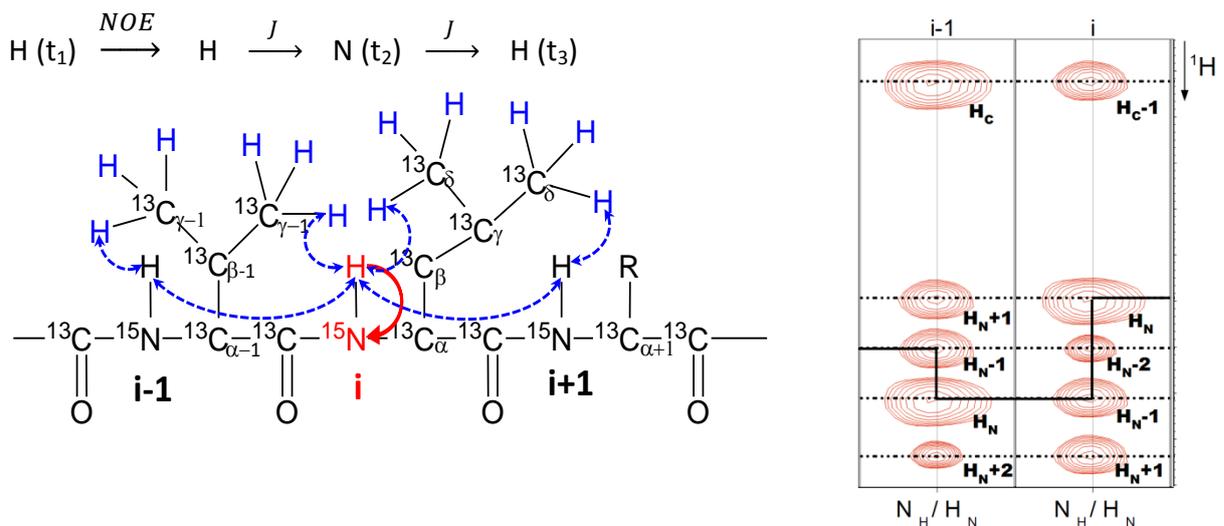


Abb. 2.18 Magnetisierungstransfer ^{15}N -NOESY-TROSY

Oben: Magnetisierungstransfer und Zeitpunkt der Frequenzmessung (t_1 bis t_3)

Mitte: Schema dreier benachbarter Aminosäuren in einem Protein zur Darstellung des Magnetisierungstransfers im Molekül, blau: NOE, rot: J-Kopplung, 1H -markierte Methylgruppen werden angeregt und die Magnetisierung auf die Amidgruppen übertragen

Rechts: Schema einer 2D-Spektroskopieebene (*Stripscope*) zweier benachbarter Aminosäuren; die Linie zeigt die Konnektivität zwischen den AS, beispielsweise das Signal des H_N und H_C der AS_{i-1} hat ein korrespondierendes H_{N-1} -Signal, bzw. H_{C-1} der AS_i ; Die Konnektivität zwischen den Signalen und den Signalen des Vorgängers in durchgezogener Linie, andere Konnektivitäten über größere Bereiche oder zum Nachfolger in gepunkteten Linien

2.2.5.11. ^{13}C -NOESY-HMQC

Bei dem ^{13}C -NOESY-HMQC Experiment werden die Protonen angeregt und dann die Magnetisierung über *NOE* zu benachbarten Protonen übertragen. Anschließend folgt eine HMQC-Sequenz, in der die Magnetisierung über die skalare Kopplung vom Methylproton auf das Heteroatom (C_{aliph}) übertragen wird. Es handelt sich bei diesem Experiment um eine Verknüpfung eines 2D-NOESY mit einem 2D-HMQC [132]. Aufgrund der Größe des Proteins wird das Experiment nicht mit einer voll- ^1H -markierten Probe durchgeführt, sondern an der methyelselektiv markierten Probe, so dass nur Val, Leu und Ile endständig ^1H -markiert vorliegen. Die ^1H -Verschiebung wird von -1,38 ppm bis 4,60 ppm und von -1,60 ppm bis 10,85 ppm aufgenommen und die ^{13}C -Verschiebung wird von 8,71 ppm bis 29,67 ppm aufgenommen.

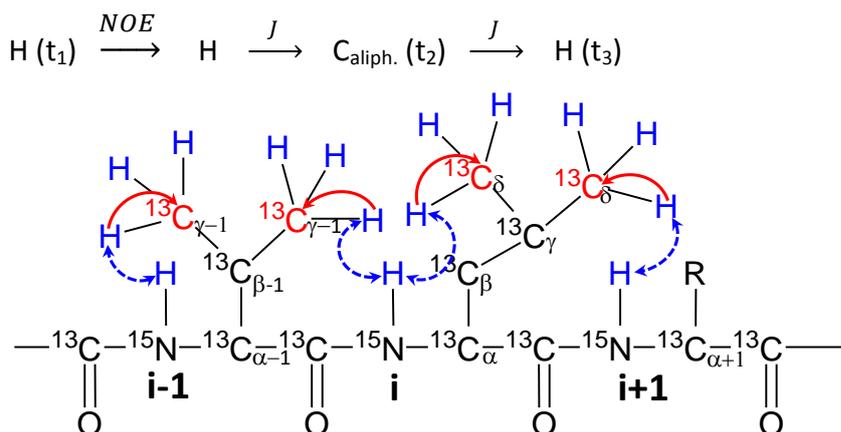


Abb. 2.19 Magnetisierungstransfer NOESY- ^{13}C -HMQC.

Oben: Magnetisierungstransfer und Zeitpunkt der Frequenzmessung (t_1 bis t_3)

Mitte: Schema dreier benachbarter Aminosäuren in einem Protein zur Darstellung des Magnetisierungstransfers im Molekül, blau: *NOE*, rot: *J*-Kopplung, ^1H -markierte Methylgruppen werden angeregt und die Magnetisierung auf die Amidgruppen übertragen

Eine 2D-Spektrumsquerschnittsebene (*Stripscope*) kann mit CARRA für dieses Spektrum nicht dargestellt werden, da die HN-Ebene fehlt

2.2.6. Massenspektrometrie-Messungen zur Bestimmung des Deuterierungsgrades

Die Massenspektrometrie wird zur Bestimmung des Deuterierungsgrades der ^2H -markierten Proteinproben verwendet, sowie zur Bestimmung der realen Masse der DXR im Vergleich zur theoretischen Masse aus Protparam [145]. Zur Bestimmung der Gesamtmasse der DXR und des Deuterierungsgrades der isotopenmarkierten DXR werden zwei Massenspektrometriemethoden verwendet: MALDI und ESI [146, 147].

Die Proben für MALDI wurden auf 1 μM mit 0,1 % Ameisensäure und 50 % Acetonitril verdünnt. Die Proben für ESI werden über eine RP-Chromatographie entsalzt und in 50 % Methanol 50 % Wasser eluiert. Die Probe wird mit 0,1 % Ameisensäure angesäuert.

Bei der Kultivierung von *Escherichia coli* in deuteriertem Minimalmedium wird bei der Proteinsynthese Deuterium eingebaut. Während der Aufreinigung wurde undeutertes Wasser für die Puffer verwendet. Dies führt dazu, dass einige Substituenten im Protein das Deuterium (^2H) mit der wässrigen protiumhaltigen (^1H) Umgebung austauschen. Es gibt auch Substituenten, bei denen kein H/H-Austausch mit dem Medium stattfindet. Bei der Berechnung des Deuterierungsgrades werden nur die Substituenten berücksichtigt, die nicht mit der wässrigen Lösung austauschen. Zu den Gruppen des Proteins, die nicht austauschen, gehören alle Substituenten, die kovalent an Kohlenstoff gebunden sind. Dazu gehören alle Kohlenstoffe in den Seitenketten und im $\text{C}\alpha$ des Proteinrückgrades. Daher liegen alle an Kohlenstoff kovalent gebundenen Atome in der Form vor, in der sie bei der Biosynthese eingebaut wurden. Alle Deuteriumatome bleiben gebunden. Aber auch alle Protiumatome, die sich in Spuren in den gelösten Salzen des Minimalmediums, in den Vitaminen und in undeuterierter Glukose befinden, bleiben ebenfalls gebunden und tauschen nicht aus.

Die terminal in den Seitenketten an Sauerstoff, Stickstoff und Schwefel gebundenen Deuteriumatome der Aminosäuren Aspartat, Glutamat, Asparagin, Glutamin, Serin, Lysin und Cystein werden sehr schnell gegen ^1H ausgetauscht. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist kinetisch nicht mehr messbar. Sie liegen daher nach der Aufreinigung als $^1\text{H}/^2\text{H}$ und nicht als ^2H vor. Daher werden bei der Bestimmung des Deuteriumgehaltes alle Protonen abgezogen, die im ständigen Austausch mit dem Puffer stehen.

Die Amidgruppen des Proteinrückgrades tauschen in moderater Geschwindigkeit aus, die auch kinetisch verfolgt werden kann. Kovalent an Kohlenstoff gebundenes Deuterium lässt sich nahezu überhaupt nicht von Wasserstoff verdrängen [148, 149].

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Optimierung der Proteinexpression

Die Kultivierung von XL1-Blue *Escherichia coli* Zellen in Minimalmedium und deuteriertem Minimalmedium stellt eine große Herausforderung dar. Die Bakterien müssen erst an Minimalmedium und deuteriertes Medium adaptiert werden. Zur Adaptation wurden verschiedene Kultivierungsbedingungen getestet. Am geeignetsten waren Kultivierungsbedingungen bei 37 °C über mehrere Tage mit regelmäßiger Zugabe von frischem Medium. Anfangs schien ein Protokoll ideal, bei dem die *Escherichia coli* Zellen fünf Tage jeweils bis zu einer OD₆₀₀ von 5 kultiviert wurden. Es zeigte sich jedoch, dass unter diesen Bedingungen die Möglichkeit des Plasmidverlustes bei weiterbestehender Antibiotikaresistenz bestand. Dies zeigte sich in den Experimenten zum Proteinexpressionsvergleich.

Die Kultivierung über fünf Tage ergab zwar eine hohe Zellmasse, aber eine im Verhältnis niedrige Proteinausbeute. Die geringere DXR-Expression bei einer Kultivierung über fünf Tage zeigen die Spalten 8 bis 10 des SDS-Gels (siehe Abb. 3.1).

Es wurden verschiedene Kultivierungsbedingungen getestet (siehe Abb. 3.1). Als Kontrolle diente die Kultivierungsbedingung ohne Induktion (Abb. 3.1 Nr.2).

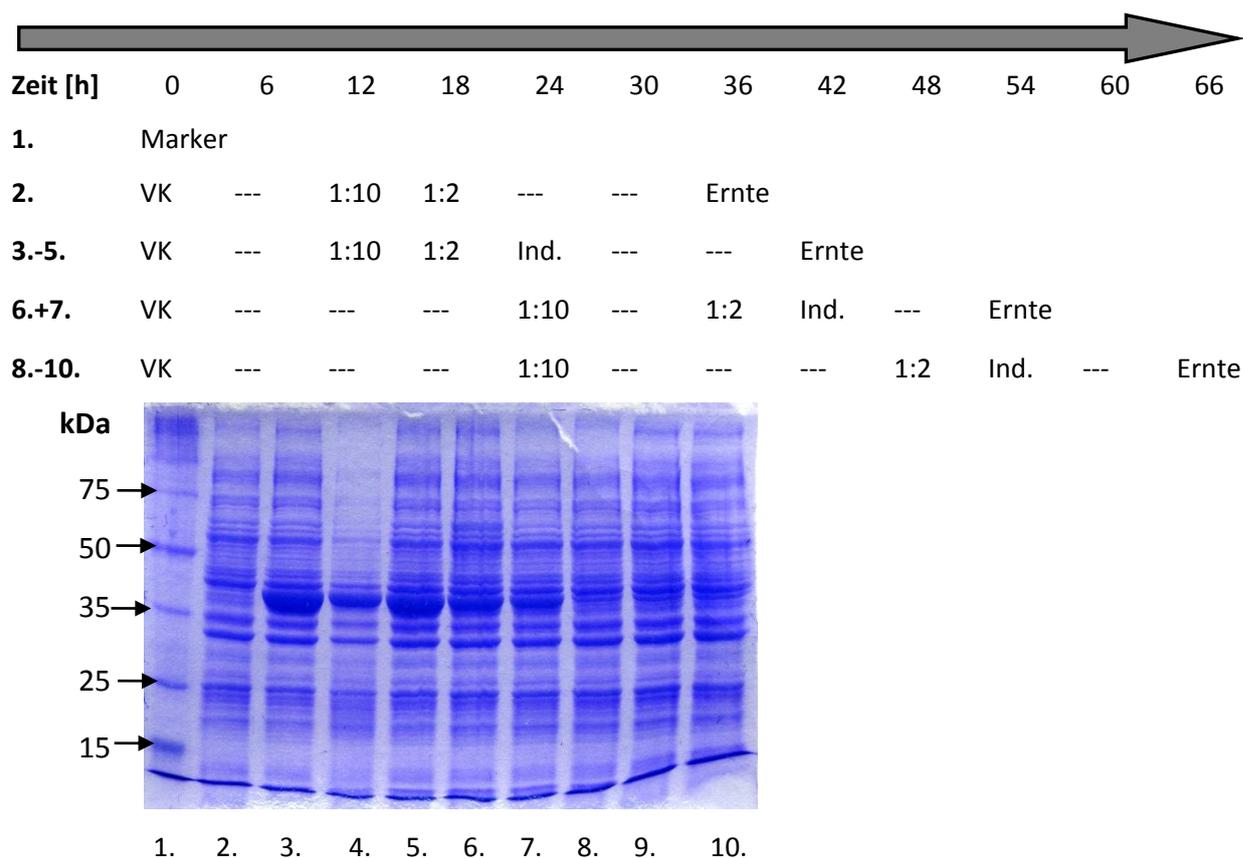


Abb. 3.1 Optimierung der Proteinexpression

Zeitdauer der Bakterienkultivierung wurde variiert, sowie der Zeitpunkt der Verdünnung der Kultur und der Induktion. Oben ist die Zeitachse dargestellt, in der Mitte die Bedingungen, die für jede Probe gewählt wurden und unten ist das Gel abgebildet. Bei dem Gel wurden jeweils etwa die gleiche Menge Zellpellet verwendet. Aus dem Gel geht hervor, dass die Expression in den Banden bei 40 kDa bei Bedingung 3-5 am stärksten ist, gefolgt von Bedingung 6+7. Bedingung 8-10 exprimiert offensichtlich nur noch so stark wie die nicht-induzierte Kontrolle in Bedingung 2.

Vergleicht man auf der Höhe von 40 kDa die Banden 6+7 und 8-10 in Abb. 3.1 mit den Banden 3-5 derselben Abb. erkennt man eine Korrelation zwischen der Kultivierungsdauer vor einer Induktion und einer Verringerung der Expression der DXR nach Induktion. Je länger die Bakterien vor der Induktion kultiviert werden, desto weniger Expression wurde nach Induktion erreicht. Nach Induktion darf die Kultivierungsdauer bis zu 12 h betragen (siehe Bedingungen 3-5). Offensichtlich darf das Bakterienwachstum vor Induktion nicht die volle Sättigung erreichen, bevor frisches Medium und Antibiotikum zugegeben wird.

Bei den deuterierten Kulturbedingungen hat es sich als effektiv erwiesen, Silantes-Vollmedium als Vorkulturbedingung zu wählen und dem deuterierten Minimalmedium 10 % Silantesmedium zuzusetzen. In reinem Silantesmedium war es nicht möglich, die von Hersteller angegebene höhere Dichte ($OD_{600}=1$ bis $OD_{600}=3$) zu erreichen. In 100 % Silantes

OD2-Medium wurden selbst bei längerer Kultivierungsdauer lediglich Dichten von $OD_{600}=0,2$ bis $OD_{600}=0,5$ erreicht. Daher wurde das Protokoll aus einer Mischung aus M9-Minimalmedium und Silantes gewählt (siehe auch Methodenteil Kapitel: 2.1.5.1).

Das Protokoll zur DXR-Expression wurde an die Bedingung angepasst, die im Gel in Abb. 3.1, die stärkste Proteinexpression zeigte (siehe Abb. 3.1 Bedingungen 3-5). Die Vorkultur wurde nach 12 h im Verhältnis 1:10 und weitere 6 h später 1:2 in Minimalmedium verdünnt. Die Induktion mit IPTG erfolgte nach insgesamt 24 h Bakterienwachstum (siehe Abb. 3.1 Bedingungen 3-5). Zwölf Stunden nach Induktion wurden die Zellen geerntet. Mit dieser Bedingung wurde eine vergleichbare Zelldichte und Proteinexpression bei mehreren Kultivierungsdurchläufen erreicht.

3.2 Proteinaufreinigung

Nach der Kultivierung der Zellen (siehe Kapitel 2.2.1 und 3.1) wurden die Zellen zentrifugiert, der Kulturmediumüberstand verworfen und die Zellen gewogen (siehe Kapitel 2.2.2.1). Die Zellfeuchtmasse betrug für die deuterierten Proben zwischen 8 und 11 g. Bei den nicht deuterierten Proben konnten 15 bis 20 g erreicht werden. Entsprechend der ermittelten Feuchtmasse wurden die Zellen mit 90 bis 110 mL Aufschlusspuffer (siehe Kapitel 2.1.5.2) resuspendiert. Nach Aufschluss und Filtration (siehe Kapitel 2.2.2.1) wurde das Filtrat mittels einer P-6000 Pumpe von Pharmacia auf die DEAE-Säule gepumpt (siehe Kapitel 2.2.2.1 und 2.2.2.2).

Die Elution von DXR erfolgte bei einer NaCl-Konzentration von 150 bis 200 mM NaCl (siehe Abb. 3.2: 32.-38. min). Bei der zweiten Stufe von 300 mM NaCl bis 1 M eluierten die Nukleinsäuren (siehe Abb. 3.2: 63.-70. min). Durch die Gelelektrophorese wurden die Fraktionen identifiziert, in denen DXR enthalten war (Bande bei ca. 40 kDa), die berechnete Masse beträgt 43,4 kDa pro Monomer. Die Elutionsfraktionen, die DXR enthalten, zeigen schon eine große Reinheit. Signifikante Verunreinigungsbanden in den DXR-haltigen Fraktionen finden sich bei 35, 45, 50 und 75 kDa (siehe Abb. 3.2). Durch die Vereinigung von Fraktionen 17 bis 19 konnten die Verunreinigungen bei 35, 50 und 75 kDa fast vollständig und bei 45 kDa teilweise entfernt werden (siehe Abb. 3.2).

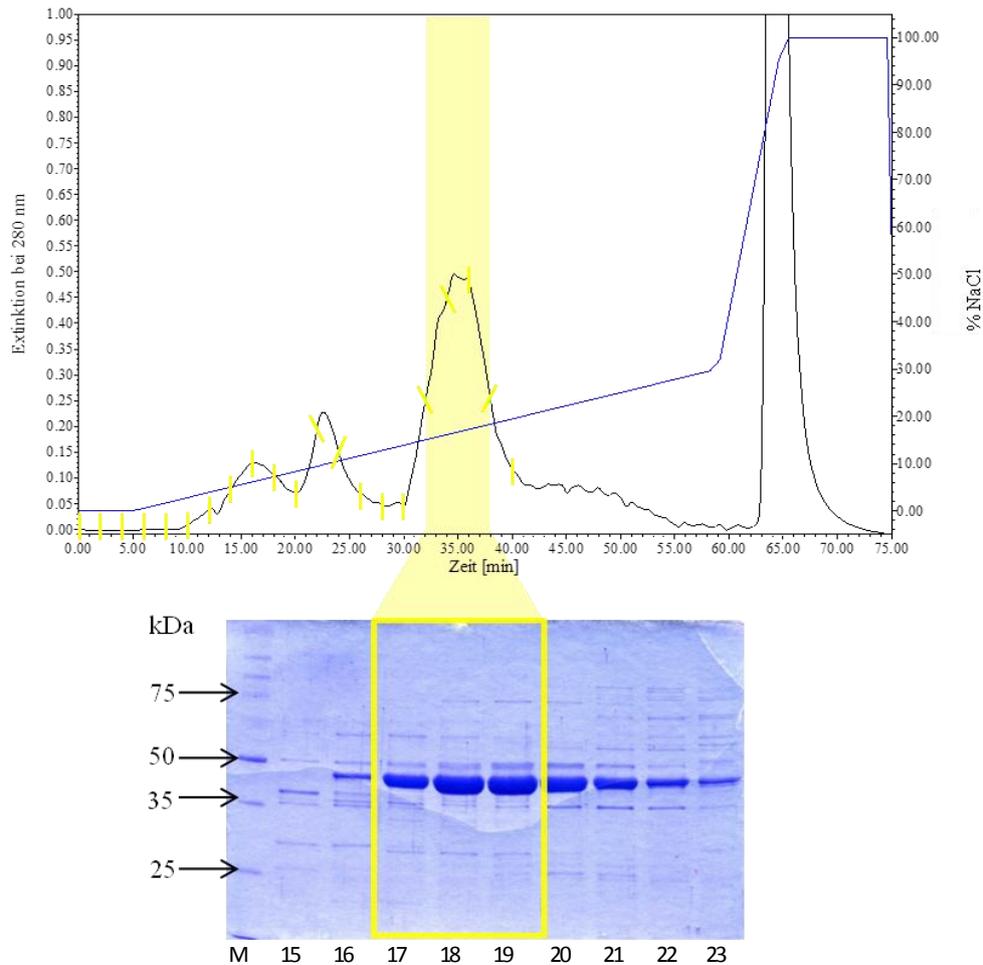


Abb. 3.2 Aufreinigung der DXR: Chromatographie über eine DEAE-Matrix

Oben: Chromatogramm bei 280 nm (schwarze Linie), NaCl-Gradient (blaue Linie), Fraktionen alle zwei Minuten (gelbe Schnittpunkte des Chromatogramms), vereinigte Fraktionen (17-19) im Chromatogramm gelb hinterlegt

Unten: Analyse der Fraktionen über SDS-PAGE, vereinigte Fraktionen (17-19) im Gel gelb umrandet

Die vereinigten Fraktionen wurden mit NADPH und FR900098 versetzt und nach einem Konzentrierungsschritt über Entsalzungssäulen umgepuffert. Anschließend wurde die Probe auf die Source 15Q aufgetragen (siehe Kapitel 2.2.2.3).

Die Elution von DXR erfolgte bei einer NaCl-Konzentration von ca. 200 mM NaCl. Bei ca. 300 mM eluiert eine Fraktion mit hohem Anteil an NADPH und dem Proteingel zu urteilen einen geringeren Proteinanteil enthält als die übrigen Fraktionen. Basierend auf der Analyse per SDS-Gelelektrophorese wurden die Fraktionen 2 bis 5 mit der besten Reinheit an DXR identifiziert und vereint (siehe Abb. 3.3). Es konnten weitere Proteine entfernt werden, bei 25, 30, zwischen 50 und 100 kDa (siehe Abb. 3.3).

Ebenso konnte die in der DEAE-Chromatographie mit der DXR laufende Bande bei 45 kDa fast vollständig eliminiert werden (siehe Abb. 3.3).

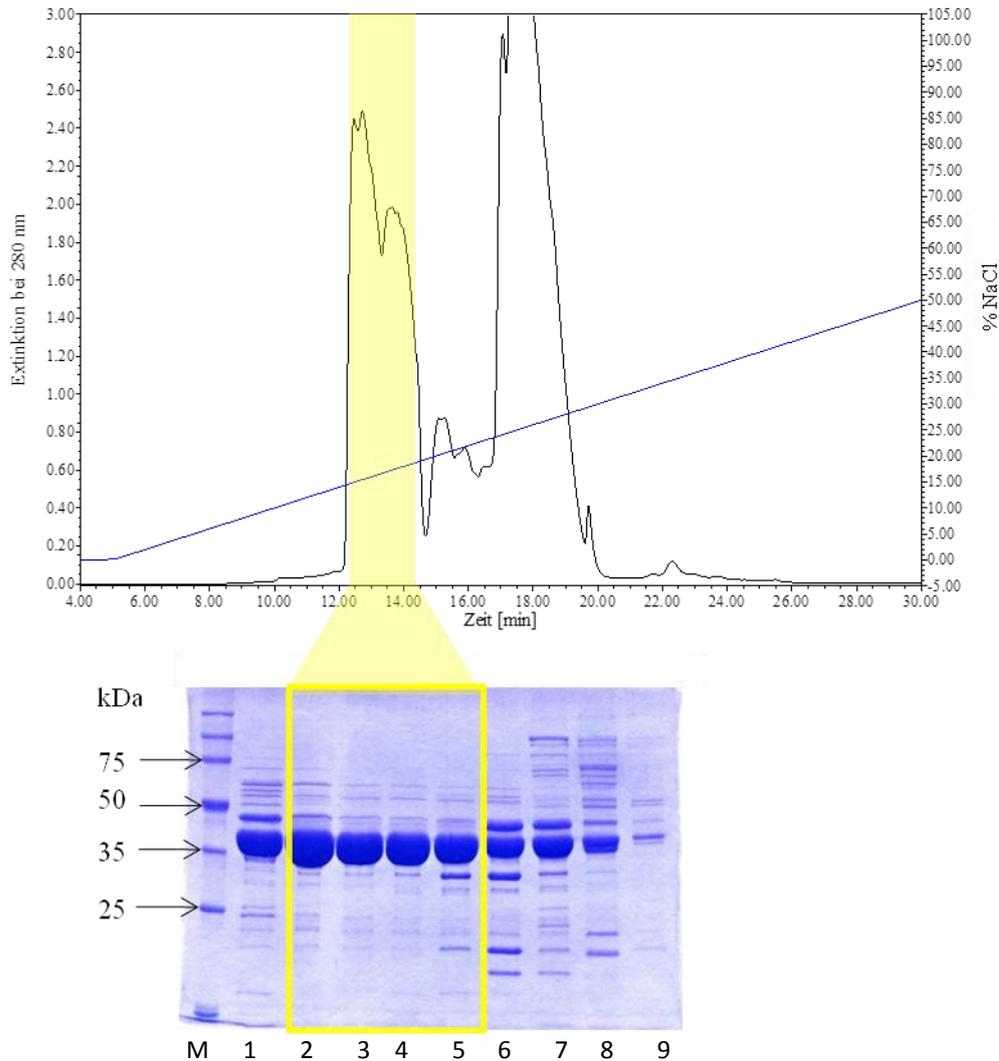


Abb. 3.3 Aufreinigung der DXR: Chromatographie über eine Source 15Q-Matrix

Oben: Chromatogramm bei 280 nm (schwarze Linie), NaCl-Gradient (blaue Linie), Fraktionen nach *Peak*-Verlauf, vereinigte Fraktionen (2-5) im Chromatogramm gelb hinterlegt

Unten: Analyse der Fraktionen über SDS-PAGE, vereinigte Fraktionen (2-5) im Gel gelb umrandet

Um Aggregatbildung der DXR zu verhindern, wurde nach jedem Chromatographieschritt NADPH und Inhibitor (Fosmidomycin oder FR900098) zur Stabilisierung zugegeben. Alle Puffer enthielten zudem $MgCl_2$. Die Ergebnisse bezüglich der Stabilität sind in Kapitel 3.3 beschrieben. Die DXR-Probe reagiert sehr empfindlich bei der Konzentrierung, da eine schnelle Aggregatbildung möglich ist. Wird der Konzentrierungsschritt ohne die Agentien durchgeführt, wird die Probe viskos, weil sich Aggregate bilden und sich vermutlich an den

Membranen der Konzentrierungsröhrchen anlagern, wodurch die Membranporen zugesetzt werden. Dadurch verläuft die Konzentrierung immer langsamer, d.h. für die Konzentrierung einer Probe von 4 mL auf 0,5 mL werden ca. 30 min benötigt. Sind NADPH und Inhibitor der Probe zugesetzt, stellt sich die Aufkonzentrierung der Probe anders dar. Bei ähnlicher Ausgangskonzentration des Proteins ist eine Reduktion von 4 mL auf 0,5 mL Probenvolumen innerhalb von 3 bis 10 min möglich. Das heißt, dass die Bildung von Aggregaten weitestgehend unterdrückt wird. Ausgehend von dem Gesamtvolumen der vereinigten Fraktionen von ca. 15 mL erfolgte eine Aufkonzentrierung auf ein Endvolumen von 3 mL. Damit wurden dann zwei SEC-Läufe mit je 1,5 mL Ausgangsvolumen durchgeführt.

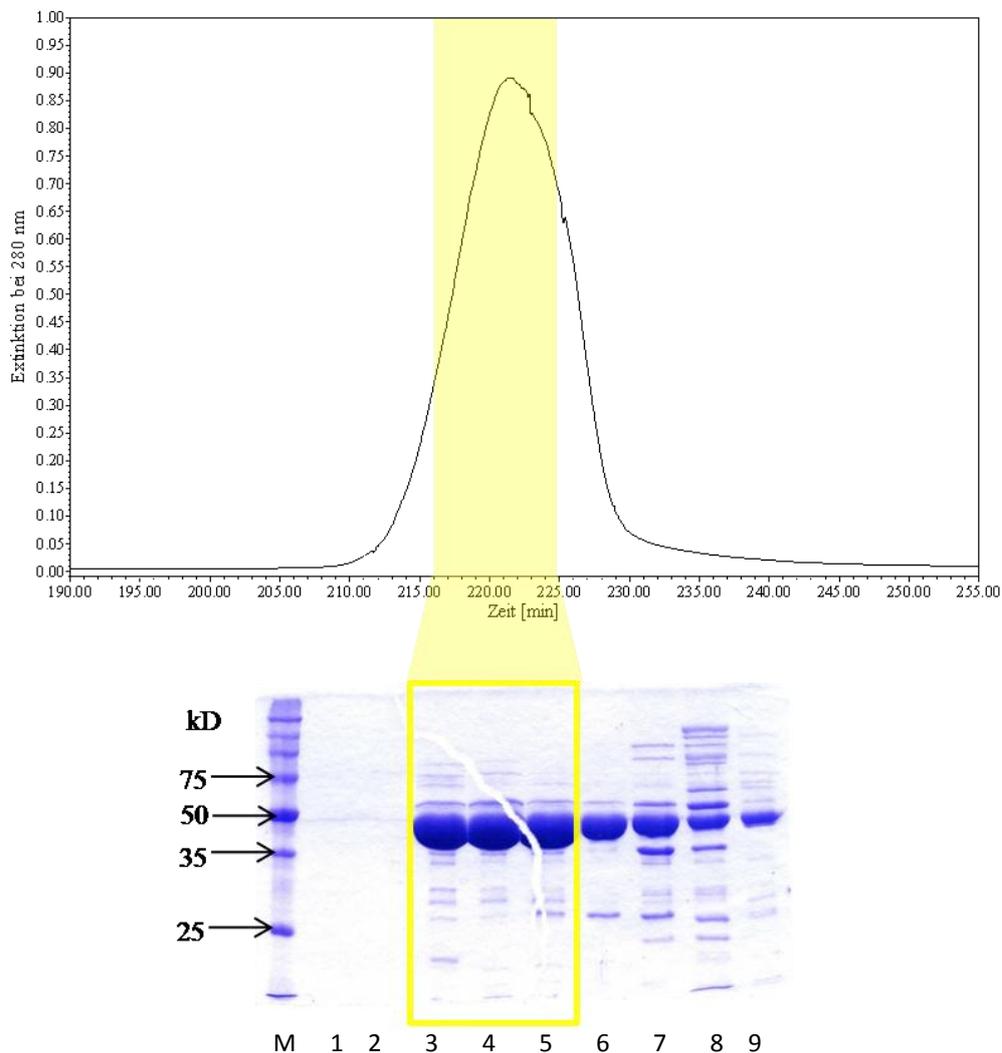


Abb. 3.4 Aufreinigung der DXR: Chromatographie über eine Superdex200-Matrix

Oben: Chromatogramm bei 280 nm (schwarze Linie), Elution nach Proteingröße, Fraktionen nach *Peak*-Verlauf, vereinigte Fraktionen (3-5) im Chromatogramm gelb hinterlegt

Unten: Analyse der Fraktionen über SDS-PAGE, vereinigte Fraktionen (3-5) im Gel gelb umrandet

Die Gelfiltration über eine Superdex200 Matrix trennt weitere Fremdproteine von der DXR ab und homogenisiert die Probe. Vor allem durch Fraktionen 7 und 8 werden zahlreiche Verunreinigungen abgetrennt (siehe Abb. 3.4). Trotz der Zugabe von NADPH und FR900098 sowie der schonenden Behandlung während der Aufkonzentrierung entstanden DXR-Aggregate. Auf dem abgebildeten Chromatogramm sind diese nicht zu sehen, und auch auf dem Gel in den Spuren 1 und 2 lassen es sich nicht erkennen, da die Proteinkonzentration in diesen Fraktionen zu gering war. Die Notwendigkeit der abschließenden Gelfiltration zeigte sich an einer DXR-Probe bei der keine Gelfiltration vor den NMR-Messungen durchgeführt wurde. Diese Probe ergab schlechter aufgelöste Spektren. Die Fraktionen 3 bis 5 von Gelfiltration 1 und 2 wurden vereinigt und FR900098 und NADPH zugesetzt (siehe Abb. 3.4). Das Volumen der vereinigten Fraktionen wurde von ca. 20 mL auf 1 mL konzentriert und über eine PD10 Säule in den Endpuffer umgepuffert (siehe Kapitel 2.1.5.2, 2.2.2.5 und 2.2.2.6). Falls die Endprobe nicht bereits eine Konzentration von ca. 1 mM (ca. 40 mg/mL) Proteinkonzentration enthielt, wurde sie über Zentrifugation in Amicon-Konzentratoren auf diese Konzentration eingeengt (siehe Kapitel 2.2.2.6).

Für die NMR-Messungen wurden je 550 bis 600 μ L Probe für ein Röhrchen mit 3 mm Durchmesser benötigt. Daher ergab eine Aufreinigung 2 bis maximal 3 Proben für die NMR-Bestimmung. Die NMR-Röhrchen wurden durch ein eigens entwickeltes Verfahren zugeschmolzen, um die Sauerstofffreiheit der DXR-Probe über mehrere Monate zu gewährleisten (siehe Kapitel 2.2.2.6). Alle vorher getesteten Verfahren, wie z.B. die Verwendung von J-Young-Röhrchen, zum Verhindern der Sauerstoffdiffusion in die Probe erwiesen sich lediglich für ein paar Tage als geeignet, nicht jedoch für den Zeitraum von mehreren Wochen bis zu Monaten.

3.3 Optimierung der Proteinaufreinigung

Die erste Proteinaufreinigung mit einem ^{15}N markierten Enzym wurde nach einem Protokoll von Sanderbrand *et al.* durchgeführt [123]. Die Aufreinigung wurde laut Protokoll bei pH 8,0 durchgeführt. Das HSQC-Spektrum dieser Probe ergab eine sehr geringe Auflösung, da keine einzelnen Signale zu erkennen sind, sondern nur eine geringe Anzahl sehr breiter Signale

(siehe Abb. 3.5A). Desweiteren erstreckten sich die Signale nicht über den ganzen Bereich der chemischen Verschiebungen, sondern waren fast ausschließlich auf den Bereich der Asn- und Gln-Seitenkettensignalbereich beschränkt. Dadurch war eine Optimierung der Aufreinigungs- und Probenbedingungen notwendig.

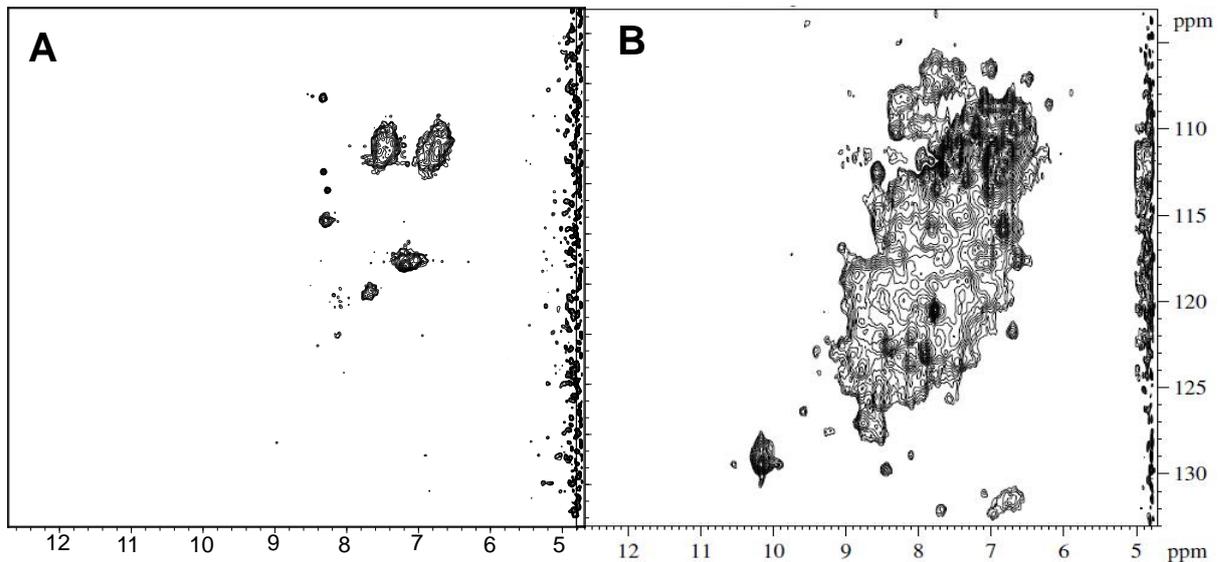


Abb. 3.5 Optimierung der Aufreinigung der DOXP-Reduktoisomerase für die NMR-Experimente.

Hier abgebildet sind 2D HSQC-Spektren (A und B). Alle Proben enthalten 10 % D₂O.

A: 1,0 mM DXR-Konzentration, ¹⁵N markiert, in 20 mM Tris/HCl, 20 mM NaCl, pH 8,0; HSQC aufgenommen bei 293 K.

B: 0,4 mM DXR-Konzentration, ¹⁵N markiert, in 20 mM Bis-Tris/HCl, 20 mM NaCl, pH 7,0; HSQC aufgenommen bei 293 K.

In einem Folgeexperiment wurden pH-Bedingungen von pH 6,0 bis pH 8,5 in 0,5er Schritten getestet. Unter den pH-Bedingungen pH 6,0 und 8,5 fiel das Protein aus, und eine chromatographische Analyse war nicht möglich. Da auch bei einem pH-Wert von 6,5 eine Präzipitation über Nacht optisch beobachtet wurde, erübrigte sich eine chromatographische Analyse. Mit den Proben der pH-Werte 7,0, 7,5 und 8,0 wurde eine Stabilitätsanalyse über mehrere Tage durchgeführt. Anschließend wurden die Proben mittels analytischer Gelfiltration analysiert. Die Chromatographie ergab eine schnellere Aggregation bei pH 8,0. Da sich Aggregation negativ auf die NMR-Analyse auswirkt, ist sowohl ein pH-Wert von 7,0 als auch 7,5 stabil. Daher wurde ein pH-Wert von 7,0 als neue Probenbedingung gewählt.

Eine neue DXR-Probe wurde unter der pH-Bedingung von 7,0 hergestellt und ein HSQC-Spektrum aufgenommen. Zusätzlich wurde eine geringere Proteinkonzentration angestrebt, um Aggregationsprozesse zu unterdrücken bzw. zu verlangsamen. Tatsächlich konnte so ein deutlich besseres Spektrum aufgenommen werden (siehe Abb. 3.5B). Die Signale erstreckten sich über den gesamten Bereich der H_{N-} , N_{H-} -Verschiebungen. Allerdings gab es noch zu viel Signalverbreiterung und -überlappung, so dass keine Einzelsignale aufgelöst waren. Für die ersten HSQC-Experimente wurde stets eine undeuterierte ^{15}N -markierte DXR-Proben eingesetzt. Diese ^{15}N -markierten Proben ohne Deuterierung waren nicht geeignet um TROSY-Spektren aufzunehmen. Eine TROSY-Messung über 4 h ergab kein Spektrum. TROSY-Spektren sind für eine Strukturanalyse größerer Proteine notwendig, da auf diese Weise eine bessere Auflösung möglich ist als durch eine HSQC-Messung [118, 120]. Mit einer ^{15}N -, ^2H -markierten DXR-Probe war die Aufnahme eines TROSY-Spektrums möglich, und es wurde eine bessere Auflösung als bei einem HSQC erreicht (siehe Abb. 3.6A).

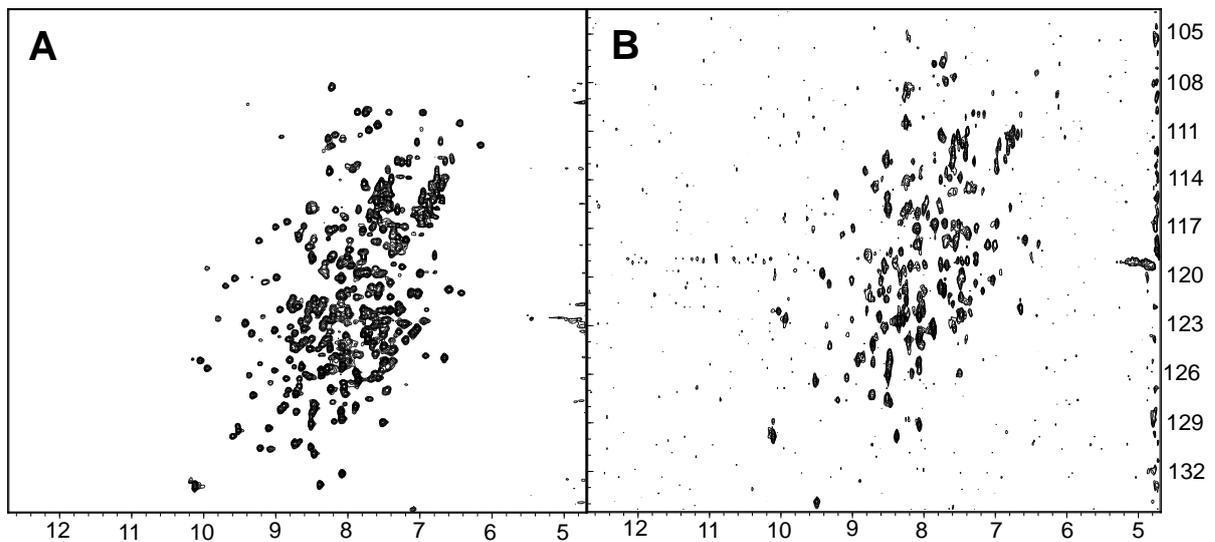


Abb. 3.6 Optimierung der Aufreinigung der DOXP-Reduktoisomerase für die NMR-Experimente.

Hier abgebildet sind 2D TROSY-Spektren (A und B). Alle Proben enthalten 10 % D_2O .

A: 0,4 mM DXR-Konzentration, ^{15}N - und ^2H -markiert, in 20 mM Bis-Tris/HCl, 20 mM NaCl, pH 7,0; TROSY aufgenommen bei 310 K.

B: 0,3 mM DXR-Konzentration, ^{15}N und ^2H markiert, in 20 mM Bis-Tris/HCl, 20 mM NaCl, pH 7,0, sauerstofffrei aufgereinigt; TROSY aufgenommen bei 293 K.

Die bessere Auflösung zeigte sich in einer geringeren Signalüberlappung, so dass einige Signale bereits aufgelöst waren. Um die Signalintensität zu verbessern wurde eine Versuchsreihe über 293 bis 310 K durchgeführt. Eine höhere Temperatur von 310 K verbesserte die Auflösung, aber die Probe hielt dieser nur für die Dauer einer Messung von ca. 8 h stand. Bei längeren Messungen zeigte sich eine progressive Verbreiterung der Signale mit einhergehender Präzipitation der DXR. Das Protein wurde in weiteren Versuchen auf Stabilität unter verschiedenen Bedingungen untersucht. Verschiedenen Proteinproben aus der gleichen Aufreinigung wurden verschiedene Zusätze beigefügt. Diese wurden unter 37 °C, das entspricht etwa 310 K im Spektrometer, für mehrere Tage bis Wochen inkubiert. Die Bildung von Aggregaten wurde mittels analytischer Gelfiltration analysiert. Dabei wurde optisch festgestellt, dass die Präzipitation in den Proben ohne Zusätze mit der Zeit zunimmt. Dies legte die Vermutung nahe, dass eine immer stärkere Aggregation der Präzipitation vorausgeht. Die Aggregationsneigung wurde durch analytische Gelfiltration untersucht. Auf den Chromatogrammen verschiedener Gelfiltrations-Läufe konnte die Stabilität der DXR-Probe und die Aggregationsneigung gezeigt werden. Die durchgeführten Gelfiltrations-Läufe bestätigten die Vermutung, dass der Präzipitation eine Aggregation vorausgeht. In der Abb. 3.7 sind die Aggregate kaum zu sehen, allerdings die daraus resultierende Präzipitation und die Abnahme der Proteinmenge bis zur Degradation bei der in hellgrün dargestellten Chromatogrammlinie.

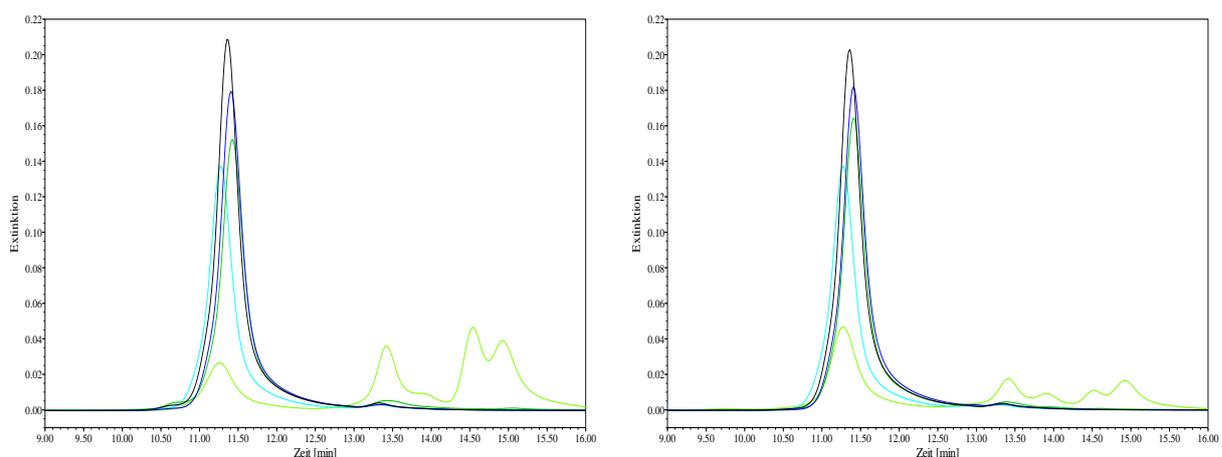


Abb. 3.7 Optimierung der Aufreinigung der DOXP-Reduktoisomerase für die NMR-Experimente.

Links ohne Zusätze, Rechts mit TCEP. Schwarz: direkt nach Aufreinigung; Dunkelblau: 2 d ohne Sauerstoff 37 °C, hellblau: 12 d ohne Sauerstoff 37 °C, dunkelgrün: 2 d mit Sauerstoff 37 °C, hellgrün: 12 d mit Sauerstoff 37 °C

Die analytische Gelfiltration der Proben ergab, dass neben der Aggregation kein Abbau an der DXR stattfindet. Ausnahmen sind die Proben unter Sauerstoffeinfluss, da dort nach einem Zeitraum von zwölf Tagen Protein-Degradation zu beobachten ist. Durch die chromatographisch ermittelte Aggregation konnte die schlechte Auflösung der NMR-Spektren erklärt werden. Die Stabilitätsuntersuchungen und die chromatographische Analyse der Proben ergaben eine unerwartet ausgeprägte Sauerstoffempfindlichkeit der DXR (siehe Abb. 3.7). Eine mögliche Erklärung könnten die solventexponierten Methionin- und Cystein-Reste der DXR sein [59]. Die Zugabe von reduzierenden Agentien alleine waren nicht ausreichend, um die Aggregation im gewünschten Maß zu unterdrücken (siehe Abb. 3.7). Daher wurden die Proteinreinigung, -lagerung und -messungen unter sauerstofffreien Bedingungen durchgeführt.

Mit dieser neuen Methode wurden die DXR-Proben für TROSY-Messungen mit ^2H -, ^{15}N -Markierung (siehe Abb. 3.6A) und mit ^2H -, ^{15}N - und ^{13}C -Markierung (siehe Abb. 3.6B) hergestellt. Die Auflösung der Spektren war höher und die Langzeitstabilität der Probe wurde verbessert, da die gleiche DXR-Probe für mehrere NMR-Experimente verwendet werden konnte und eine gleichbleibende Qualität über mehrere Monate behielt. Bei 3D-Experimenten war durch die anaerobe Behandlung eine gute Auflösung gegeben, allerdings war das Signal/Rausch-Verhältnis zu schlecht (siehe Abb. 3.7). Dies deutet darauf hin, dass die Proteinkonzentration von 0,3 mM zu gering war. Eine Erhöhung der Proteinkonzentration in Folgeexperimenten zeigte einen starken Anstieg der Proteinaggregation. Eine partielle Präzipitation der Probe konnte schon vor den NMR-Messungen festgestellt werden. Aus diesem Grund wurden weitere Bedingungen gesucht, die zu einer höheren Stabilität des Dimer-Zustandes der DXR beitragen konnten. Aus den publizierten Kristallstrukturanalysen ging die Vermutung hervor, dass die DXR ein Protein mit sehr flexiblen Bereichen ist, insbesondere, der Loop im Bereich H209 bis M214 ist hochflexibel. Die Kristallstrukturen des DXR-Apoenzym und der DXR im Komplex mit einem Metallion zeigen eine nach außen offene Konformation, wobei nur in einem der veröffentlichten Apostrukturen der Loop dargestellt werden konnte. Sobald Mg^{2+} , NADPH und Substrat (bzw. Inhibitor) in der DXR-Struktur gebunden vorlagen, konnte der Loop dieser geschlossenen Konformation dargestellt werden [46, 48].

Dies legte die Vermutung nahe, dass die verschiedenen Konformationen auch eine unterschiedliche Stabilität der DXR-Probe nach sich ziehen könnten. Daher wurden weitere Stabilitätsuntersuchungen des DXR-Mg²⁺-NADPH-Inhibitor-Komplexes im Vergleich zum DXR-Mg²⁺-Komplex durchgeführt.

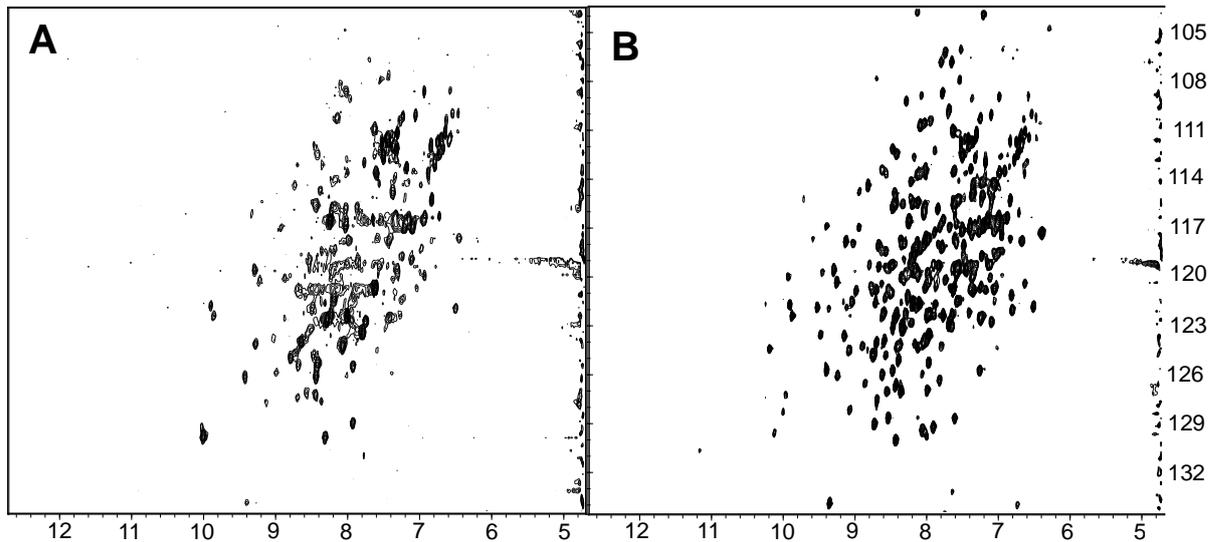


Abb. 3.8 Optimierung der Aufreinigung der DOXP-Reduktoisomerase für die NMR-Experimente.

Hier abgebildet sind 2D-TROSY-Spektren (A und B). Alle Proben enthalten 10 % D₂O.

A: 0,5 mM DXR-Konzentration, ¹⁵N, ²H und ¹³C markiert, 20 mM Bis-Tris/HCl, 20 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, pH 7,0, sauerstofffrei aufgereinigt; TROSY aufgenommen bei 293 K.

B: 0,5 mM DXR-Konzentration, ¹⁵N, ²H und ¹³C markiert, 20 mM Bis-Tris/HCl, 20 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 2,5 mM NADPH, 2,5 mM Fosmidomycin, pH 7,0, sauerstofffrei aufgereinigt; TROSY aufgenommen bei 293 K.

Das Verhalten der Probe beim Konzentrieren in Ultrafiltrationseinheiten sowie die Spektren aus Abb. 3.8A und Abb. 3.8B bestätigten die Vermutung, dass mit Mg²⁺ als einzigem Zusatz die Präzipitation nicht so effektiv unterdrückt werden konnte wie mit zusätzlichem NADPH und Fosmidomycin bzw. FR900098. Die Proteinkonzentration konnte durch diese Zusätze auf 1 mM und die Messtemperatur auf 310 K erhöht werden. Dadurch konnte sowohl die Auflösung als auch die Signalstärke verbessert sowie die Haltbarkeit der Probe auf einen Zeitraum von mehreren Monaten verlängert werden.

3.4 Deuterierungsgrad

Der Deuterierungsgrad der verschiedenen Isotopen-markierten Proben wurde bestimmt, indem die Molekülmasse der isotopenmarkierten Proben mit der Masse des DXR bei natürlich vorkommender Isotopenverteilung verrechnet wurde.

Die massenspektrometrische Analyse konnte zeigen, dass die DXR sehr einheitlich deuteriert wurde (siehe Abb. 3.9 und Abb. 3.10). Die Spektren enthalten sehr scharfe Peaks mit wenigen Spitzen. Eine inhomogene Deuterierung hätte sich in einer Peakverbreiterung gezeigt und in einer Verteilung über mehrere Spitzen. In Abb. 3.9 und Abb. 3.10 zeigen sich klare Spitzen bei 48204 Da bzw. bei 48278, 48155 und 47949 Da. Dies bedeutet, dass sich der größte Anteil an DXR einen sehr homogenen Deuterierungsgrad besitzt.

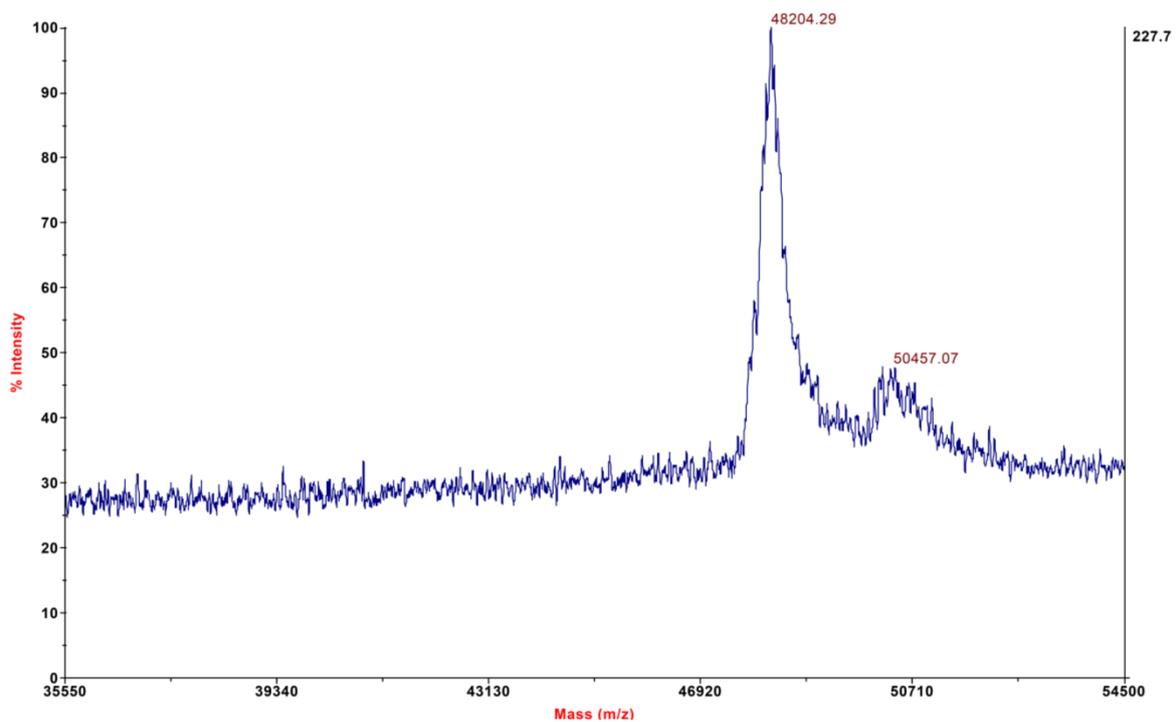


Abb. 3.9 Massenspektrum der ^{15}N , ^{13}C und ^2H markierten Proben

Durch das Massenspektrum sieht man, ob die Isotopenmarkierung einheitlich über die DXR-Moleküle erfolgt ist. Bei der Dreifach-markierten Probe sind zwei Maxima zu sehen: bei 48204,29 Da und ein sehr kleines Maximum bei 50457,07 Da.

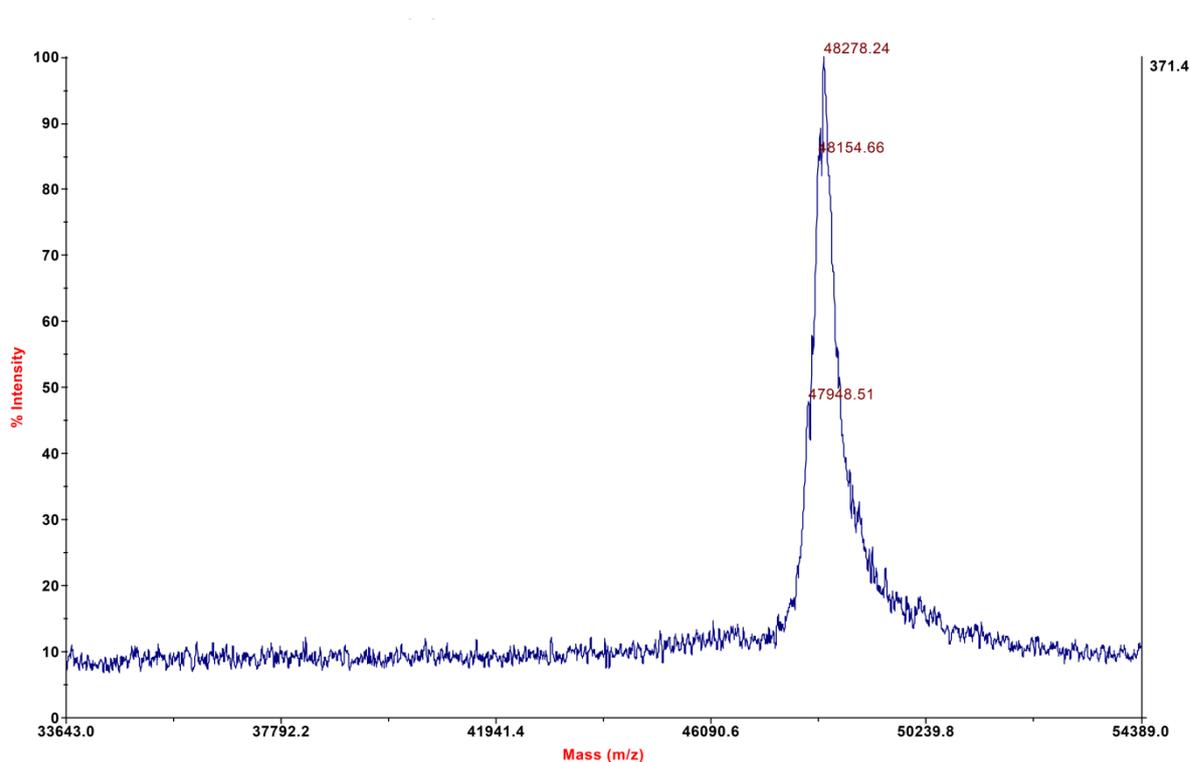


Abb. 3.10 Massenspektrum der ^{15}N , ^{13}C und ^2H markierten Proben mit Ile, Leu, Val endständigen Methylgruppen selektiv ^1H -markiert

Durch das Massenspektrum sieht man, ob die Isotopenmarkierung einheitlich über die DXR-Moleküle erfolgt ist. Bei der methyl-selektiv-markierten Probe sind drei sehr nah beieinanderliegende Maxima zu sehen: bei 47948,5 Da, 48154,66 Da und 48278,24 Da.

Tabelle 3.1 Deuterierungsgrad

Proteinprobe	berechnete Masse [Da]	gemessene Massen [Da]	Deuterierungsgrad [%]
^{15}N , ^{13}C , ^2H DXR	48370,3	48204,3	93
Methyl selektiv markierte DXR	47875,2	48278,2	117
		48154,7	115
		47948,5	104

Aus den massenspektrometrischen Daten wurde ein Deuterierungsgrad von 93 % für die dreifach (^{15}N -, ^{13}C -, ^2H -)-markierte DXR ermittelt (siehe Tabelle 3.1). Bei der methyl-selektiv-markierten DXR ergibt sich ein Deuterierungsgrad aller nicht selektiv protonierten Methylgruppen von über 100 % (siehe Tabelle 3.1). Die 1D-NMR-Spektren der beiden Proben (nicht gezeigt) geben Anlass zur Vermutung, dass der errechnete Deuterierungsgrad für beide Proben zu hoch ist, da ein deutliches Signal im Bereich der Methylgruppen zu sehen

ist. Auch in den 2D-Spektren der methylselektiven Probe sind Signale im $H\alpha$ - und $H\beta$ -Bereich zu erkennen, die bei einer tatsächlichen vollständigen Deuterierung nicht erscheinen dürften. Eine mögliche Ursache für den zu hohen Deuterierungsgrad der methyl-selektiven Probe könnte darin begründet sein, dass die Aminosäuren Ile, Leu und Val von *Escherichia coli* nicht komplett aus den Ketosäuren synthetisiert wurden und daher auch zum Teil deuteriert vorliegen. Eine andere Möglichkeit, die sowohl die methyl-selektive als auch die dreifach markierte Probe betrifft, wäre, dass nicht alle Amide des Proteinrückgrats während der Aufreinigung und der Lagerung zu Wasserstoff zurücktauschen, wie es normalerweise in Proteinen der Fall ist. Tugarinov *et al.* haben dieses Phänomen bei der Malat Synthase G (MSG) beobachtet. In einem Versuch wurde komplett 1H -markierte MSG (81,4 kDa) in 100% deuterierten Puffer überführt und über einen Zeitraum von ca. zwei Monaten in regelmäßigen Abständen Spektren aufgenommen. Dabei haben sie festgestellt, dass nach einer Woche noch 120 Amide 1H -markiert waren und nach 6 Wochen immer noch ca. 70 [150].

Diese Vermutung wurde im Falle der DXR dadurch untermauert, dass im 1H - 1H -NOESY-Trosy Spektrum einige Methyl- 1H -Signale nicht zu einer korrelierenden Amidgruppe zugeordnet werden konnten (siehe Abb. 3.15). Auch fehlen bei der Zuordnung gerade die Aminosäuren, die im Proteininneren zu verorten sind (siehe Abb. 3.15). Dies kann unter anderem daran liegen, dass von den 383 erwarteten Peaks im 2D-TROSY manche deuteriert vorliegen und daher kein Signal erzeugten (siehe Abb. 3.18, Abb. 3.19 und Abb. B.1 bis Abb. B.5). Eine weitere Beobachtung war, dass TROSY-Signale, die mit starken eindeutigen Signalen im 3D-Spektrum korrelierten, dennoch nicht zugeordnet werden konnten, da keine übereinstimmenden CO_{i-1} , $C\alpha_{i-1}$ und $C\beta_{i-1}$ ermittelt werden konnten.

3.5 Heteronukleare 2D-Experimente

Nach der Optimierung der DXR-Probe wurde mit der gleichen Probencharge ein 2D-TROSY aufgenommen sowie folgende 3D-Experimente durchgeführt: HNCA, HN(CO)CA, HNCACB, HN(CO)CACB, HNCO und HN(CA)CO. Die meisten Experimente wurden direkt als 3D-

Experimente aufgenommen, aus denen 2D-Spektren als Schnittflächen dargestellt und die als verknüpfte 2D-Spektren analysiert wurden.

Das 2D-TROSY wurde mit den optimierten Aufreinigungsbedingungen, die in den Kapitel 2.2.2 und 3.3 beschrieben sind, durchgeführt. Die Messung erfolgte bei 310 K in einem 800 MHz Spektrometer. Das daraus resultierende Spektrum ist in Abb. 3.11 dargestellt. Jedes Signal entspricht den chemischen Verschiebungen eines N_H in der vertikalen Dimension und der dazugehörigen chemischen Verschiebung des H_N in der horizontalen Dimension. Man kann jedes Signal auch als chemisches Verschiebungspaar des Amids im Proteinerückgrat verstehen. Im Bereich 109 ppm bis 114 ppm auf der N-Achse und 6,5 ppm bis 7,7 ppm auf der 1H -Achse befinden sich die Seitenkettenverschiebungen von Asn und Gln. Diese Seitenkettenverschiebungen wurden nicht berücksichtigt. Das TROSY ist das Basisexperiment für die Zuordnung des Proteinerückgrats (siehe Abb. 3.11).

Zur Analyse der Experimente wurde das Programm CARA (*Computer Aided Resonance Assignment*) verwendet. Jedes der Signale, mit Ausnahme des Seitenkettenbereiches, wurde gepickt. Das bedeutet, dass das Signal als ein relevantes Signal manuell markiert wurde und die zugehörigen chemischen Verschiebungen in eine Liste der chemischen Verschiebungen zunächst unbekannter Aminosäuren aufgenommen wurden.

Es konnten 272 Signale im TROSY gepickt werden (siehe Kapitel 3.6 und Tabelle 3.2). CARA ist in der Lage, die Informationen aus verschiedenen 2D- und 3D-Experimenten miteinander zu verknüpfen. Um die Signale den Aminosäuren aus der DXR-Primärsequenz zuordnen zu können, müssen zusätzlich noch 3D-Experimente aufgenommen werden, bei denen eine TROSY-Ebene mit einer Kohlenstoffdimension verknüpft wird. Die Kohlenstoffverschiebungen lassen sich dann in CARA zu den gepickten Amidverschiebungen zuordnen.

Bei NMR-Experimenten mit der gleichen Proteincharge kann besser gewährleistet werden, dass die resultierenden Spektren kompatibel sind, d.h., dass für eine Aminosäure die gleichen chemischen Verschiebungen ermittelt werden können und die Spektren deckungsgleich sind.

Zusätzlich wurde eine methyl-selektiv-markierte DXR-Probe hergestellt. Als erstes wurde ebenfalls ein 2D-TROSY aufgenommen, um die chemischen Verschiebungen mit der vorherigen Probe zu vergleichen. Das TROSY-Spektrum wurde so angepasst, dass es deckungsgleich mit dem ersten TROSY ist. Von der methyl-selektiv-markierten Probe wurde

in CARRA aus einem 3D- ^{15}N -NOESY-TROSY eine 2D-Schnittfläche erstellt, die einem 2D- $^1\text{H}/^1\text{H}$ -NOESY entspricht. Auf die gleiche Weise wurde aus einem 3D- ^{13}C -NOESY-HMQC eine Schnittfläche erstellt, die einem 2D- $^1\text{H}/^1\text{H}$ -NOESY entspricht. Auch ein 2D-HMQC und mehrere 3D-HMQC-basierende Spektren wurden mit der methyelselektiven Probe durchgeführt.

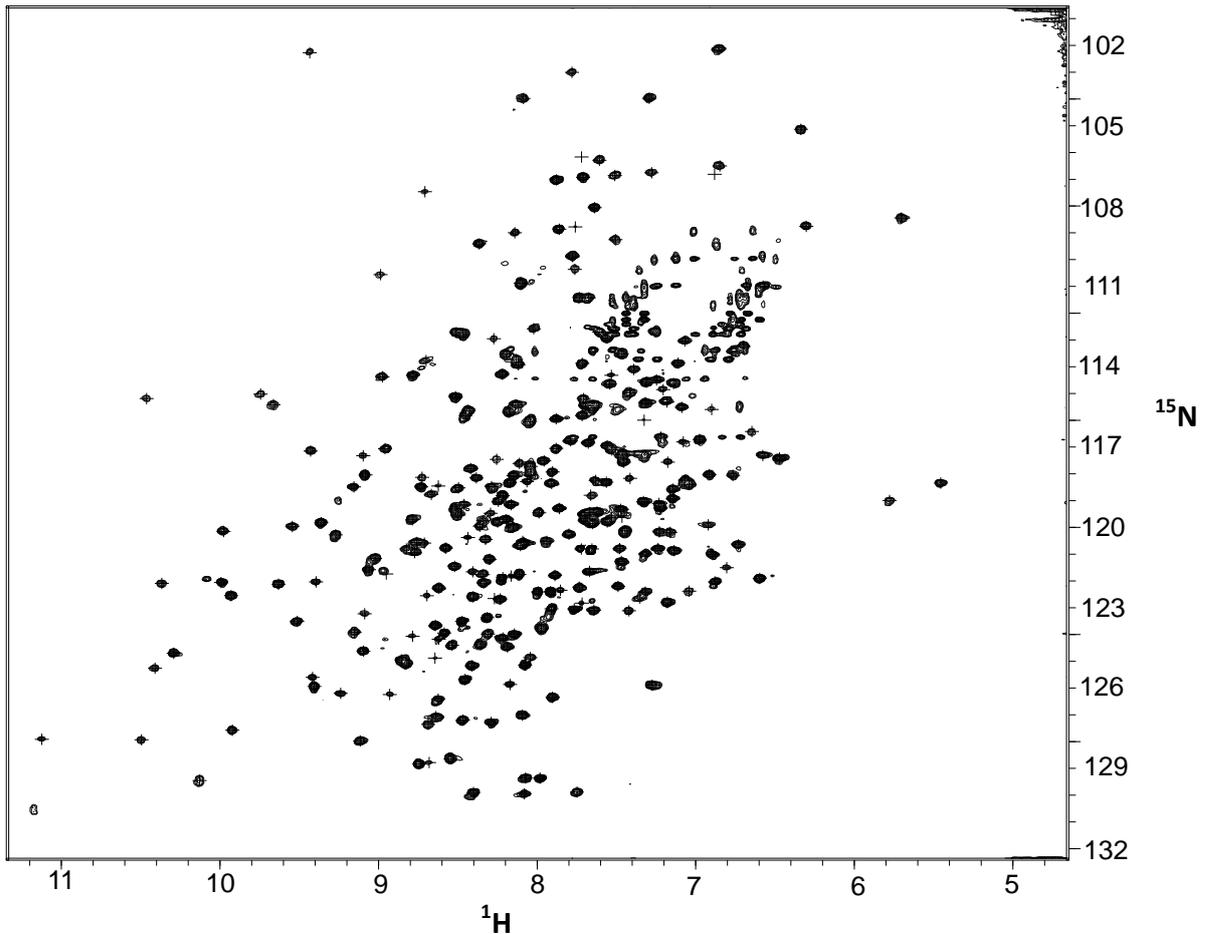


Abb. 3.11 optimiertes ^{15}N , 1H-TROSY der DOXP-Reduktoisomerase

Probe: 1.0 mM ^{15}N -, ^2H -, ^{13}C -DXR in 20 mM Bis-Tris/HCl, 20 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 2,5 mM NADPH, 2,5 mM FR900098, pH 7,0, 10 % D_2O , aufgereinigt, gemessen und gelagert unter sauerstofffreien Bedingungen; Mess-temperatur: 310 K

3.6 Heteronukleare 3D-Experimente

Es wurden zahlreiche weitere 3D-Experimente durchgeführt (siehe Tabelle 3.2). Diese Experimente ergänzen die Amidverschiebungen mit den Kohlenstoffverschiebungen. Zusätzlich lassen sich Konnektivitäten herstellen, da in den resultierenden Spektren nicht nur die Kohlenstoffverschiebungen der Aminosäuren, sondern auch die chemischen Verschiebungen der jeweiligen Vorgängeraminosäure enthalten sind (siehe Kapitel 2.2.5).

In Tabelle 3.2 ist die Anzahl an Heteroatomen aufgelistet, die zugeordnet werden konnten. Die Tabelle enthält die absoluten Zahlen der Heteroatome, die in dem jeweiligen Experiment gepickt (n_{gemessen}) und zugeordnet ($n_{\text{zugeordnet}}$) werden konnten. Zusätzlich wurden prozentuale Werte errechnet, um zu bestimmen, wie viele Heteroatome gemessen und zugeordnet werden konnten im Verhältnis zur Gesamtzahl an theoretisch für die DXR bestimmbaren Heteroatome (% total). Auch das Verhältnis von zugeordneten zu gemessenen Signalen wurde bestimmt ($\% n_{\text{zugeordnet}} / n_{\text{gemessen}}$). In der Tabelle 3.2 sind alle gepickten Signale im 2D-TROSY und in den TROSY- bzw. TOCSY- basierten 3D-Experimente ausgezählt worden. Die Signale der NOESY-Experimente wurden nicht ausgezählt.

Tabelle 3.2 Anzahl der Peaks, die im jeweiligen Experiment gepickt werden konnten

Experiment	Atom	n_{Total}	n_{gemessen}	Total [%]	$n_{\text{nicht zugeordnet}}$	$n_{\text{zugeordnet}}$	Total [%]	$\frac{n_{\text{zugeordnet}}}{n_{\text{gemessen}}}$ [%]
TROSY	HN	383	272	71	97	175	46	64
TROSY	N	383	272	71	97	175	46	64
HNCA	$C\alpha_i$	383	267	70	89	178	46	67
HNCACB	$C\alpha_i$	383	267	70	95	172	45	64
HNCCCCNH	$C\alpha_i$	383	79	21	18	61	16	77
HNCACB	$C\beta_i$	360	244	68	83	161	45	66
HNCCCCNH	$C\beta_i$	360	134	37	38	96	27	72
HN(CO)CA	$C\alpha_{i-1}$	383	258	67	88	170	44	66
HN(CO)CACB	$C\alpha_{i-1}$	383	240	63	80	160	42	67
HNCA	$C\alpha_{i-1}$	383	237	62	78	159	42	67

Experiment	Atom	n _{Total}	n _{gemessen}	Total [%]	n _{nicht zugeordnet}	n _{zugeordnet}	Total [%]	$\frac{n_{zugeordnet}}{n_{gemessen}}$ [%]
HNCACB	$C\alpha_{i-1}$	383	211	55	72	139	36	66
HNCCCCNH	$C\alpha_{i-1}$	383	19	5	4	15	4	79
HN(CO)CACB	$C\beta_{i-1}$	360	221	61	71	150	42	68
HNCCCCNH	$C\beta_{i-1}$	360	78	22	17	61	17	78
HNCACB	$C\beta_{i-1}$	360	162	45	46	116	32	72
HN(CA)CO	CO_i	383	210	55	51	149	39	71
HNCO	CO_{i-1}	383	266	69	93	173	45	65
HN(CA)CO	CO_{i-1}	383	147	38	38	109	28	74
HNCCCCNH	Cal_i	411	71	17	20	51	12	72
HNCCCCNH	Cal_{i-1}	411	30	7	7	23	6	77

Im 2D-TROSY wurden alle Peaks aus dem ppm-Bereich des Proteinerückgrades gepickt und alle Signale im ppm-Bereich der Seitenketten nicht berücksichtigt (siehe Kapitel 3.5). Insgesamt wurden 272 Signale von 383 erwarteten Signalen gepickt, was 71 % entspricht. Die Gesamtzahl von 383 erwarteten Signalen ergibt sich aus den 402 Gesamtaminoacidsäuren der Primärsequenz abzüglich des ersten Met und der 18 Pro (siehe Kapitel 2.2.4.2). Von den 272 Signalen konnten mit Hilfe aller 3D-Experimente insgesamt 175 Signale des TROSY eindeutig zugeordnet werden. In Relation zu der Gesamtanzahl an erwarteten Signalen von 383 entsprechen die 175 zugeordneten Signale 46 % und in Relation zu den gepickten 272 Signalen entsprechen die 175 zugeordneten Signale 64 %.

Das zentrale 3D-Experiment war das HNCACB, welches eine Vielzahl an Information in einem Spektrum abbildet (siehe Abb. 3.12). Man erhält $C\alpha_i$ - und $C\alpha_{i-1}$ -Signale sowie in umgekehrter Phase $C\beta_i$ und $C\beta_{i-1}$. Dass $C\beta_i$ und $C\beta_{i-1}$ in umgekehrter Phase zu $C\alpha_i$ und $C\alpha_{i-1}$ aufgenommen werden verhindert eine Verwechslung von $C\alpha$ und $C\beta$, welche vor allem bei Thr und Ser auftreten kann (siehe Abb. 3.12T67).

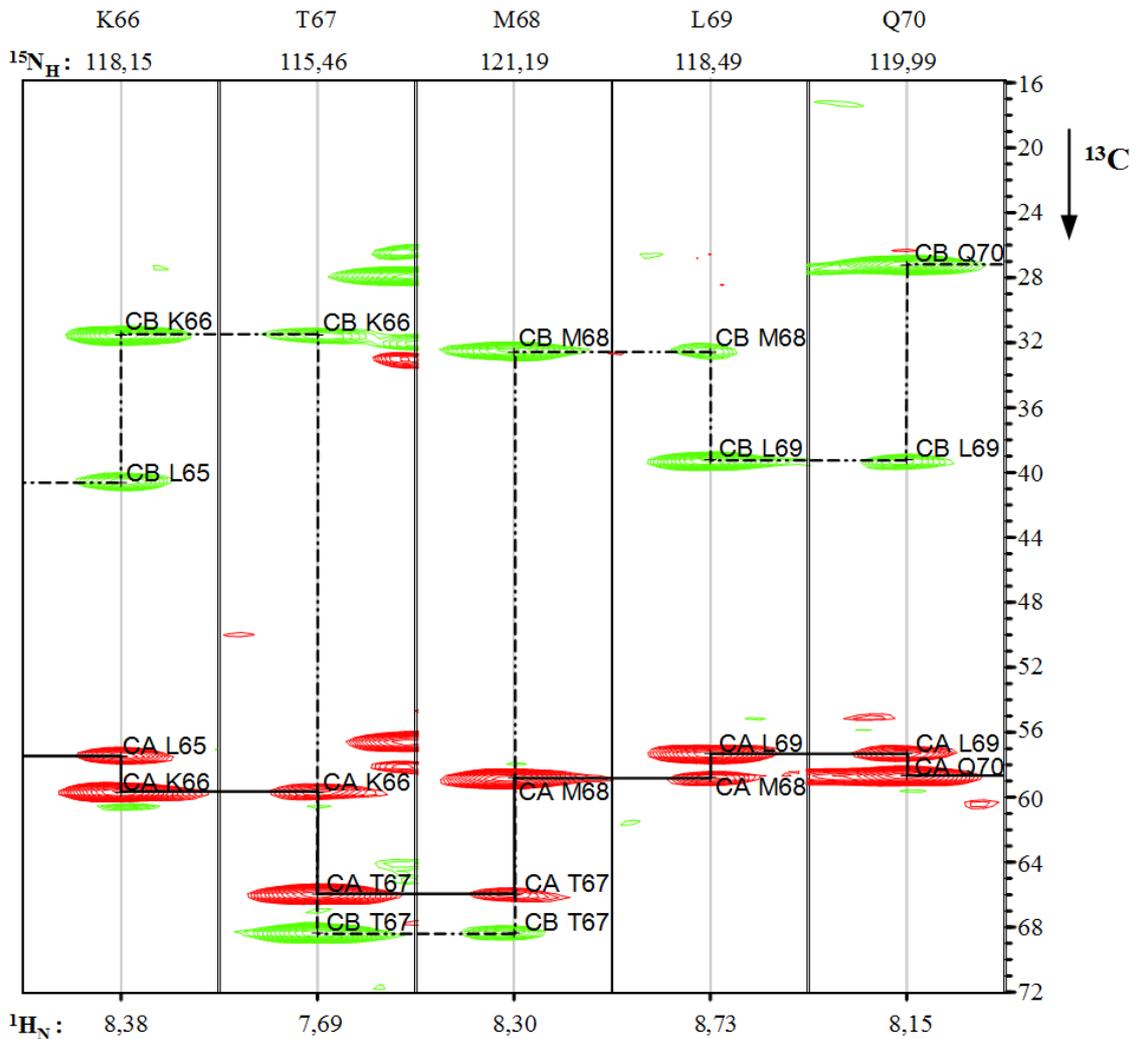


Abb. 3.12 ein HNCACB-Fragment zur Darstellung der Konnektivität im *Stripscope*

Zugeordnetes HNCACB-Fragment Thr67 (T67) bis Gln71 (Q71). Oben sind die jeweiligen AS-Bezeichnungen und die Nummern aus der Primärsequenz angegeben. Darunter wird die chemische Verschiebung dieser AS des $^{15}\text{N}_\text{H}$ angezeigt. Unter dem Spektrum sind die chemischen Verschiebungen der $^1\text{H}_\text{N}$ -Signale der jeweiligen AS angegeben. Auf der Y-Achse ist die chemische Verschiebung des $^{13}\text{C}_\text{all}$ angegeben. Die Signale $\text{C}\alpha_i$ zu dem jeweiligen $\text{C}\alpha_{i-1}$ sind durch schwarze Linien miteinander verbunden um die Konnektivität darzustellen. Die Konnektivitäten der $\text{C}\beta$ sind durch gestrichelte Linien dargestellt. Die Signale sind mit dem Kürzel für das Heteroatom, dem sie entsprechen, und mit der Aminosäure aus der Primärstruktur der DXR bezeichnet. Jedes $\text{C}\alpha_i$ - und jedes $\text{C}\beta_i$ -Signal hat ein korrespondierendes $\text{C}\alpha_{i-1}$, bzw. $\text{C}\beta_{i-1}$ bei der Vorgängeraminosäure des Fragments.

Alle weiteren Experimente wurden als Ergänzung zum HNCACB durchgeführt (siehe Abb. 3.13). Das HNCA hat den Vorteil, dass die Peaks eine schärfere Auflösung haben als bei dem HNCACB. Der Nachteil ist, dass die Wahrscheinlichkeit, dass mehrere Peaks eine identische chemische Verschiebung besitzen, umso höher wird, je größer das Protein ist.

Bei dem HNCA-Spektrum der DXR gab es einige Signale, auf die das zutraf. Vor allem Glycine waren betroffen, weshalb sie nicht zugeordnet werden konnten.

Das HNCOCA und das HNCOCACB dienen der besseren Unterscheidung von $C\alpha_i$ und $C\beta_i$ von $C\alpha_{i-1}$ und $C\beta_{i-1}$, da bei diesen Experimenten nur die Nachbaraminosäure angezeigt wird ($C\alpha_{i-1}$ bzw. $C\alpha_{i-1}$ und $C\beta_{i-1}$). Fehler konnten korrigiert werden, indem $C\alpha_{i-1}$ und/oder $C\beta_{i-1}$ im HNCACB ein stärkeres Signal zeigten als $C\alpha_i$ und $C\beta_i$. Durch diese beiden Experimente ist es weiterhin möglich, aufeinanderliegende $C\alpha_i$ und $C\alpha_{i-1}$, sowie aufeinanderliegende $C\beta_i$ und $C\beta_{i-1}$ zu erkennen. In Abb. 3.13 werden genau diese Fälle dargestellt.

In Abb. 3.13A ist nur ein $C\beta$ zu erkennen. Daraus kann nicht geschlossen werden, dass die Signale übereinander liegen, da das $C\beta_{i-1}$ auch fehlen könnte, was die Anzahl von 221 gepickten von 360 erwarteten Signale (61 %) verdeutlicht. Ähnlich liegt der Fall bei $C\alpha$ (siehe Abb. 3.13B). Da im abgebildeten HNCACB nur ein Signal für $C\alpha$ sichtbar ist, könnte das Signal fehlen oder $C\alpha_i$ und $C\alpha_{i-1}$ die gleiche chemische Verschiebung besitzen. Das HN(CO)CACB und HNCOCA zeigen nur die chemischen Verschiebungen der inter-residualen Aminosäurereste; $C\alpha_{i-1}$ und $C\beta_{i-1}$ bei dem HN(CO)CACB und $C\alpha_{i-1}$ bei dem HN(CO)CA. Aus diesen beiden Spektren ist ersichtlich, dass tatsächlich zusätzlich zu dem $C\alpha_i$ auch ein $C\alpha_{i-1}$ Signal existiert mit fast identischer chemischer Verschiebung. Tabelle 3.2 zeigt, dass durch das HNCOCA mit 258 $C\alpha_{i-1}$ ca. 10 % mehr $C\alpha_{i-1}$ gefunden wurden als durch das HNCA und 18 % mehr als bei dem HNCACB eindeutig gepickt werden konnten. Da das HN(CO)CACB einen längeren Magnetisierungstransfer hat, stimmt die Anzahl der gefundenen $C\alpha_{i-1}$ in etwa mit der in dem HNCA gefundenen überein. Dieser Effekt schlägt sich auch auf die Anzahl der zugeordneten $C\alpha_{i-1}$ nieder. Es sind 18 % mehr zugeordnete $C\alpha_{i-1}$ im HN(CO)CA Spektrum dargestellt als im HNCACB. Bei den ersten Versuchen mit der DXR wurden nur HNCACB und HNCA gemessen. Die Zuordnung lag unter 30 % der Aminosäuren (HN- und N-Verschiebung), während sie nach Aufnahme aller in Tabelle 3.2 aufgelisteten Spektren auf über 40 % gestiegen ist.

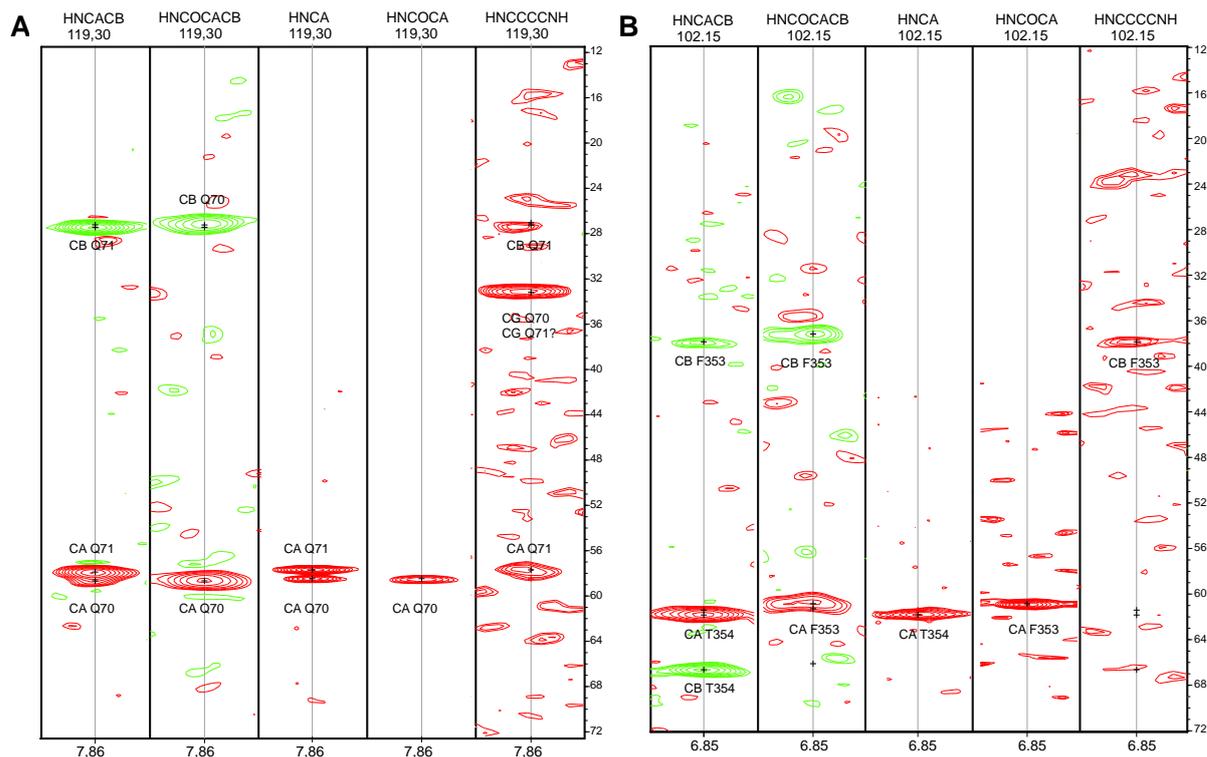


Abb. 3.13 Zwei Beispiele für je eine Aminosäure und der jeweiligen Vorgängeraminosäure

Diese Beispiele zeigen, wie sich die verschiedenen durchgeführten Experimente ergänzen. Oben sind die jeweilige AS-Bezeichnung und die Nummern aus der Primärsequenz angegeben. Darunter ist die chemische Verschiebung dieser AS des $^{15}\text{N}_\text{H}$ angegeben. Unter dem Spektrum ist die chemische Verschiebung der jeweiligen AS des $^{13}\text{C}_\text{ali}$ angegeben. HNCACB, HNCOCACB, HNCA, HNCOCA und HNCCCCNH (von links nach rechts) Experimente sind gezeigt für Gln71 (Q71) (A) und Thr354 (T354) (B).

Bei der Zuordnung wurde festgestellt, dass bestimmte Aminosäuren, vor allem Leu, Ile, Ser, Thr und Val, häufig schwächere Signale als andere Aminosäuretypen besitzen. Es konnten auch prozentual weniger dieser Aminosäuren zugeordnet werden als andere Aminosäuretypen. Um die Zuordnung zu verbessern wurden DXR-Proben hergestellt, bei denen die Aminosäuren Leu, Ile und Val an den endständigen Methylgruppen protoniert vorlagen. Mit diesen Proben wurden die 3D-TROSY-Experimente $\text{HM}(\text{CB})\text{CA}_{\text{Val}}$, $\text{HM}(\text{CB})\text{CA}_{\text{Leu,Ile}}$, $\text{HM}(\text{CBCA})\text{CO}_{\text{Val}}$, $\text{HM}(\text{CBCA})\text{CO}_{\text{Leu,Ile}}$, $\text{C}(\text{CCO})\text{NH}$, $\text{NOESY-}^{15}\text{N-TROSY}$ und $\text{NOESY-}^{13}\text{C-HMQC}$ durchgeführt. Mit der $^{15}\text{N-}$, $^2\text{H-}$, $^{13}\text{C-DXR}$ -Probe wurde ein vor kurzem entwickeltes TOCSY-Experiment (HNCCCCNH-TOCSY) durchgeführt (siehe Tabelle 3.2 und Abb. 3.13). Dieses TOCSY wurde zur Zuordnung von Seitenketten entwickelt [139]. Die erhaltenen Spektren dieser Experimente eigneten sich vor allem um bereits zugordnete Val-, Leu- und Ile-Reste zu verifizieren. Das HNCCCCNH-TOCSY erlaubte zudem die Identifizierung von

Methionin-Resten und verbesserte die Unterscheidungsmöglichkeit zwischen Ser und Thr. Die Spektren ergaben die chemischen Verschiebungen einiger Seitenkettenkohlenstoffe und damit deren Zuordnung (siehe Tabelle A.2).

Das NOESY-¹⁵N-TROSY-Experiment erzeugt starke Kreuzsignale mit Konnektivitäten zwischen Amidprotonen, die in der Primärsequenz bis zu drei Aminosäuren voneinander entfernt liegen (siehe Abb. 3.14). Diese Konnektivitäten bilden sich auch über nicht zugeordnete Aminosäurereste wie Prolin hinweg, so dass längere Fragmente erhalten werden konnten, die nur durch eine Aminosäure unterbrochen waren (siehe Abb. 3.14).

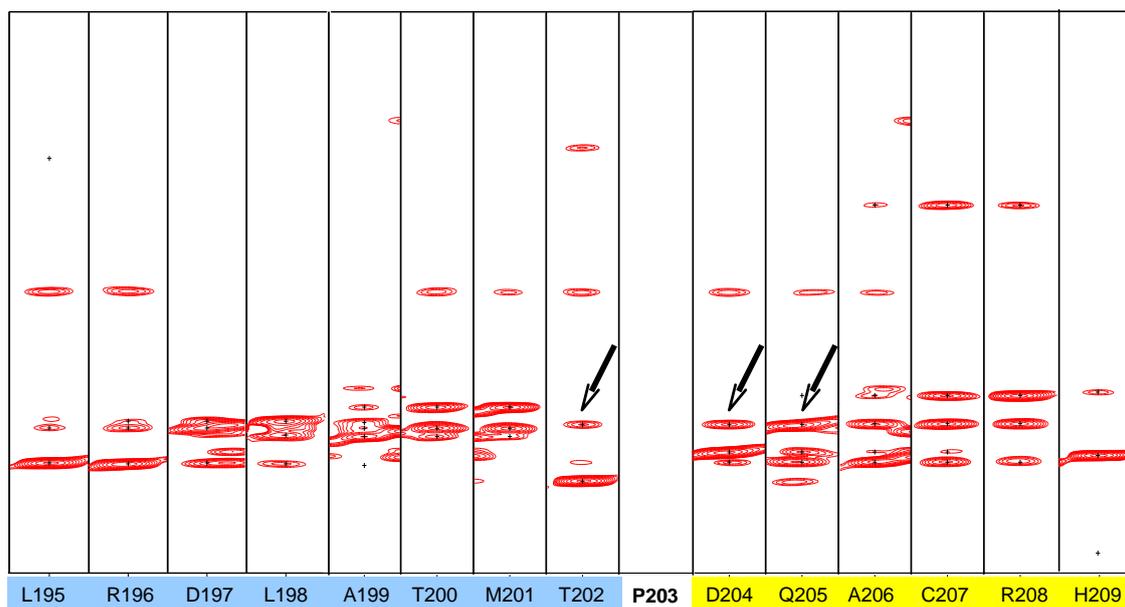


Abb. 3.14 NOESY-¹⁵N-TROSY-Fragment

Dieser Ausschnitt zeigt längere Konnektivitäten auch über Aminosäuren hinweg, die nicht zugeordnet werden konnten, wie z.B. Pro203 (P203). Das NOESY-¹⁵N-TROSY zeigt Signale für das Amid sowie für mehrere Vorgänger und Nachfolger (bis $^1\text{H}_{i-3}$ und $^1\text{H}_{i+3}$). Blau hinterlegt ist das Fragment von L195 bis T202, in farblos das P203, welches im NOESY-¹⁵N-TROSY kein Signal gibt und das Fragment D204 bis H209 gelb hinterlegt. Die Pfeile markieren das $^1\text{H}_\text{N}$ von Q205, welches bei T202 das $^1\text{H}_{i+3}$ darstellt. Dadurch sieht man die Verknüpfung der beiden Fragmente, ohne ein Spektrum spezifisch für das Pro aufnehmen zu müssen.

Zudem kann man durch die selektive Markierung der endständigen Methylgruppen von Leu, Ile und Val einige Seitenketten-Protonensignale zuordnen (siehe Abb. 3.15). Man kann auch eine Abschätzung über den Anteil an ^1H treffen, der an andere aliphatische Kohlenstoffe gebunden ist und statt ^2H eingebaut wurde. In Abb. 3.15 ist ersichtlich, dass hauptsächlich die ^1H der endständigen Methylgruppen der selektiv-markierten Aminosäuren Signale ergaben. Aber auch Ala(H β)-, Met(H ϵ)- und Cys(H γ)-Signale wurden gemessen (siehe Abb. 3.15).

der 2D-Ebene des NOESY- ^{13}C -HMQC Signale zeigen, aber nicht zu einer Amidverschiebung zugeordnet werden konnten. Daraus ergibt sich, dass weitere Bedingungen nötig sind, die ein TROSY mit mehr Amid-Signalen ergeben würden. Ein möglicher Ansatz wäre, eine Probe mit partieller Deuterierung zu verwenden (siehe Kapitel 3.4 sowie Kapitel 3.9) oder ein 4D- ^{15}N -TROSY-NOESY- ^{13}C -HMQC aufzunehmen, bei der die Methylgruppenverschiebung zu der Amidgruppe direkt korreliert wird [151, 152].

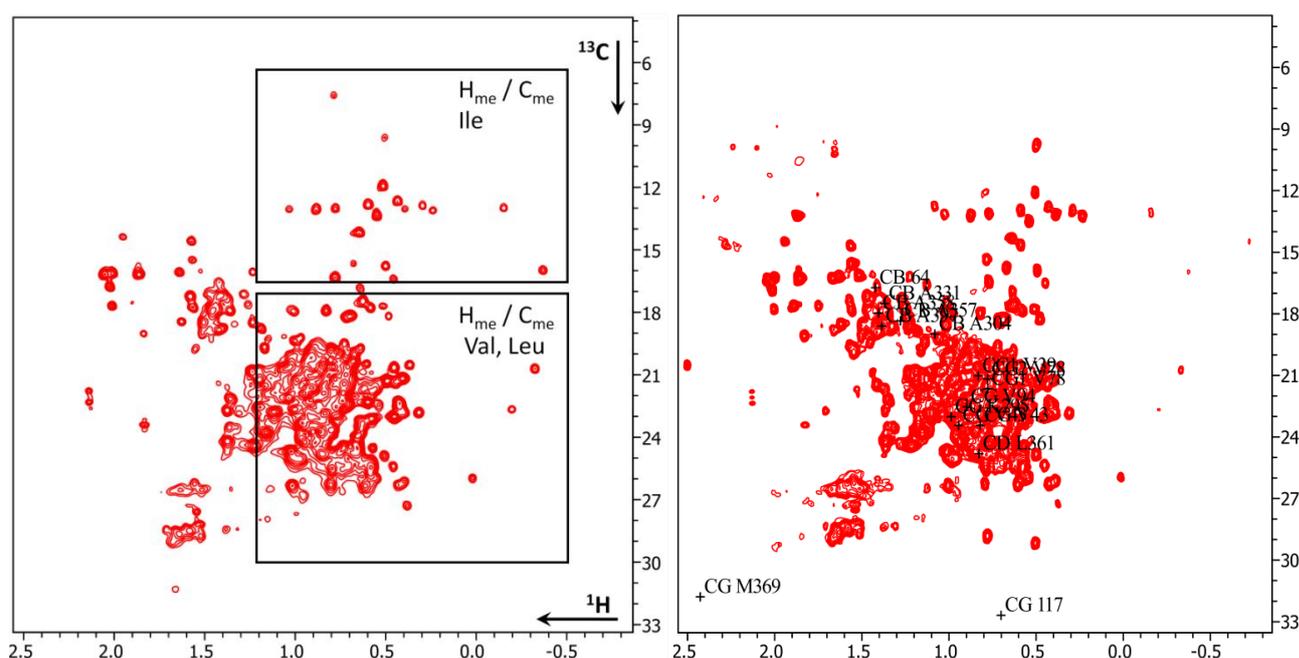


Tabelle 3.3 Anzahl der jeweiligen AS der DXR und der Anzahl an zugeordneten AS

Aminosäure	Gesamt	Zugeordnet	Aminosäure	Gesamt	Zugeordnet
ALA	49	22	LYS	15	10
ASN	15	6	HIS	8	2
ASP	22	10	PHE	11	5
ARG	21	12	PRO	18	0
GLY	23	12	VAL	31	11
GLU	21	12	THR	21	10
GLN	24	14	SER	27	10
CYS	8	4	TYR	6	1
ILE	16	3	MET	20	10
LEU	43	20	TRP	3	1

Aus der Zuordnung konnte eine größere Anzahl an chemischen Verschiebungen für $C\alpha$, $C\beta$ und CO ermittelt werden als für 1H_N und $^{15}N_H$. So konnten die chemischen Verschiebungen für ca. 50 % der $C\alpha$ -, $C\beta$ - und CO-Atome bestimmt werden. Es konnten 236 Aminosäuren zu 22 Peptidfragmenten mit einer Länge von 2 bis 17 Aminosäureresten verbunden werden (siehe Abb. 3.17). Von den 236 Aminosäuren konnten 61 nicht eindeutig zu einem Abschnitt der Primärsequenz zugeordnet werden, da die CARA-gestützte Kompatibilitätsberechnung eine zu ähnliche oder gleiche Wahrscheinlichkeit für verschiedene Abschnitte der Primärsequenz ergab. So blieben neben 36 gepickten Einzelaminosäureresten, denen kein Nachbar zugeordnet werden konnte, 61 gepickte Aminosäurereste übrig, die zu Fragmenten unterschiedlicher Länge verbunden werden konnten. Diese nicht zu der Primärsequenz der DXR zugeordneten Peptidfragmente umfassen ein Penta-, zwei Tetra-, sechs Tri- und 15 Di-peptide.

10	20	30	40	50
MGGSMKQLTI	LGSTGSIGCS	TLDVVRHNPE	HFRVVALVAG	KNVTRMVEQC
60	70	80	90	100
LEFSPRYAVM	DDEAS AKLLK	TMLQQQGSRT	EVL SGQQAAC	DMAALEDVDQ
110	120	130	140	150
VMAA IVGAAG	LLPTLAAIRA	GKT ILLANKE	SLVTC GRL FM	DAVK QSKAQL
160	170	180	190	200
LPVDSEHNAI	FQSLPQPIQH	NLGYADLEQN	GVVSILLTGS	GGP FRET PLR
210	220	230	240	250
DLATMTPDQA	CRHPNWSMGR	KISVDSATMM	NKGL EY IEAR	WLF NASASQM
260	270	280	290	300
EVL IHPQSVI	HSMVRYQDGS	VLAQLGEPDM	RTPIAHTMAW	PNRVN SGVKP
310	320	330	340	350
LDFCKLSALT	FAAPDYDRYP	CLKL MEAFE	QGQA ATTALN	AANEITVAAF
360	370	380	390	400
LAQQIRFTDI	AALNLSVLEK	MDMRE PQCVD	DVLSVDANAR	EVARKEVMRL
410				
AS				

Abb. 3.17 Primärsequenz der *Escherichia coli* DXR

Die zugeordneten AS sind in Fettschrift markiert zur Darstellung der Länge und Position der zur Primärsequenz zugeordneten Fragmente.

In dem TROSY-Spektrum sind alle zugeordneten $^1\text{H}_\text{N}/^{15}\text{N}_\text{H}$ -Signale mit der Aminosäurebezeichnung aus der Primärsequenz beschriftet (siehe Abb. 3.18, Abb. 3.19 und Abb. B.1 bis Abb. B.5). Die zuvor gepickten, aber nicht zugeordneten Signale sind in diesen Abbildungen unmarkiert. In Abb. 3.18 ist das gesamte TROSY-Spektrum abgebildet, und in den folgenden Abbildungen wird jeweils ein Ausschnitt aus dem Spektrum dargestellt. Vor allem die meisten Glycine liegen geclustert im oberen Bereich des Spektrums vor (102 bis 111 ppm). Alle weiteren Aminosäuren sind über einen größeren Bereich der chemischen Verschiebungen verteilt.

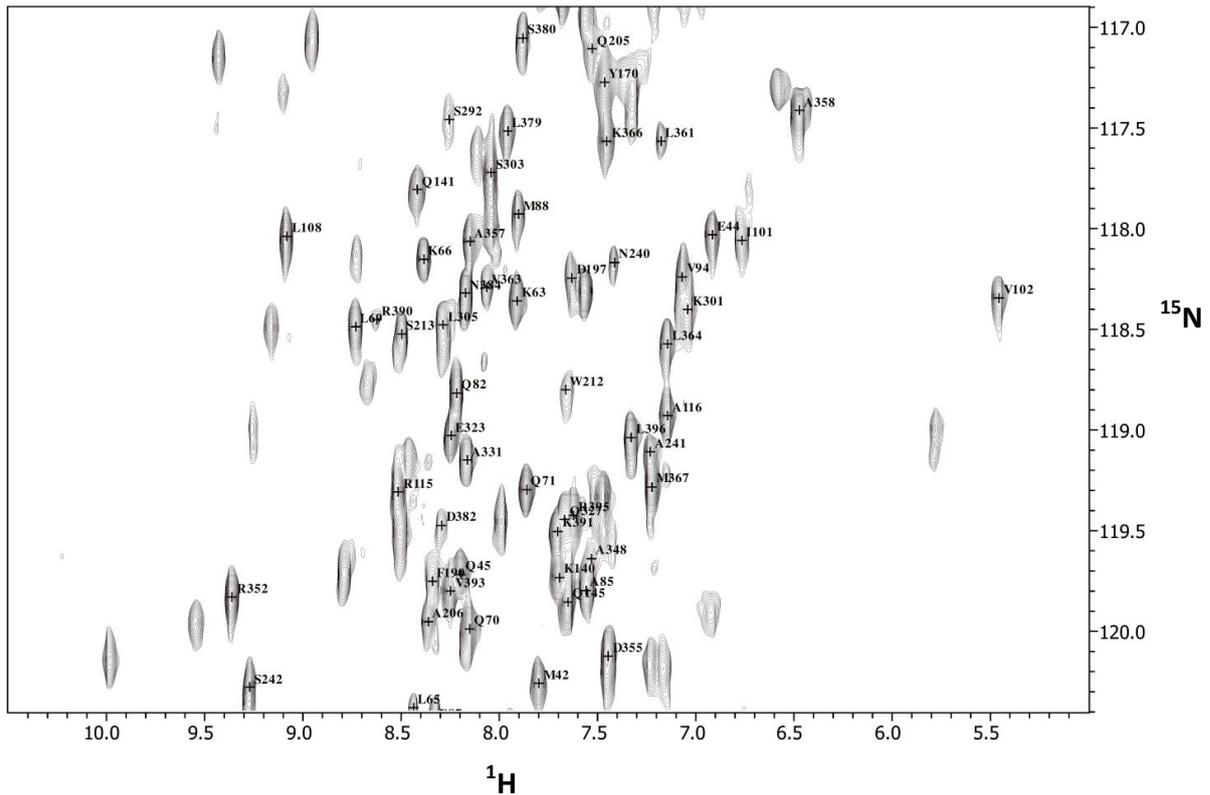


Abb. 3.19 TOSY-Spektrum Ausschnitt von 116,9 ppm bis 120,4 ppm

Alle markierten Signale konnten zugeordnet werden. Die nichtmarkierten Signale wurden nicht zugeordnet oder gehören zu Seitenkettenverschiebungen. Zugeordnete AS sind mit der AS-Bezeichnung aus der DXR-Primärsequenz beschriftet

Vergleicht man die von der NMR-Analyse erhaltenen Daten mit den Daten aus den Röntgenanalysen, dann liegen die zugeordneten Aminosäuren hauptsächlich in den postulierten α -helikalen Bereichen (siehe Abb. 3.20). Die zugeordneten Aminosäuren befinden sich zudem hauptsächlich in den dem Lösungsmittel zugewandten äußeren Bereichen. Die inneren, vom Lösungsmittel abgeschirmten Bereiche waren nur eingeschränkt zuzuordnen (siehe Abb. 3.20).

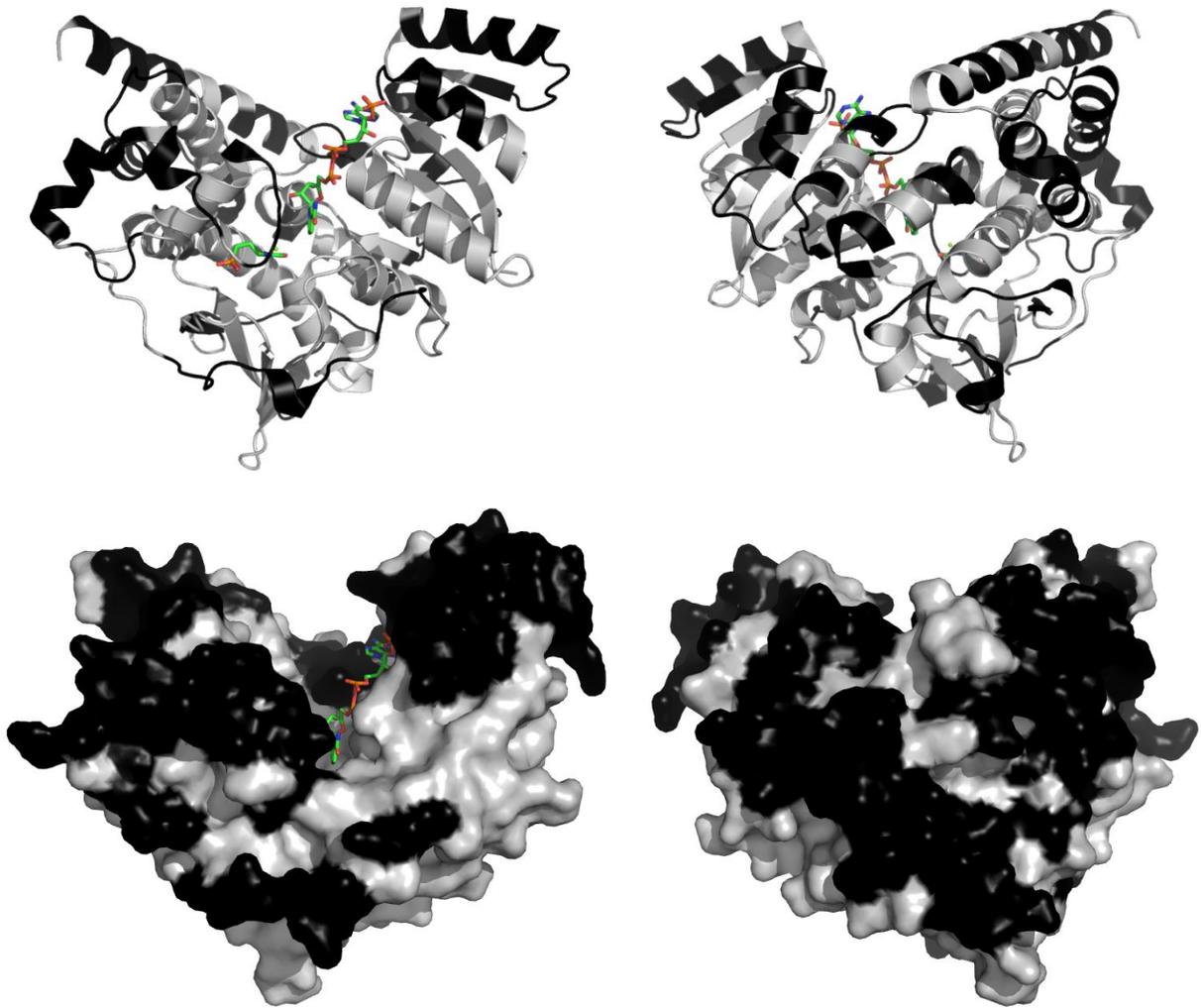


Abb. 3.20 Kristallstrukturmodell 2EGH

NADPH und Fosmidomycin farbig markiert, schwarz: zugeordnete Aminosäuren, hellgrau: nicht zugeordnete Bereiche, oben: Kristallstrukturmodell; unten: Oberflächenstruktur der DXR

Vor allem bei der Oberflächenstruktur erkennt man, dass die mehr im Inneren liegenden Bereiche anteilig weniger zugeordnet werden konnten als die dem Solvenz zugewandten Bereiche

3.7 3D- ^1H - ^1H - ^{15}N -NOESY-HSQC mit einem ^{13}C - und ^{15}N -Filter zur Identifizierung von Bindungsstellen

Mit einem gefilterten 3D- ^1H - ^1H - ^{15}N -NOESY-HSQC ist es möglich, Kreuzsignale zwischen der DXR und ihren Liganden NADPH und Fosmidomycin zu messen. In Abb. 3.21 sind die relevanten *Stripplots* mit den Kreuzsignalen zwischen NADPH und der DXR dargestellt. In

Abb. 3.22 sind die Amidsignale des Proteinerückgrats abgebildet und die Kreuzsignale zu NADPH rot markiert. Die Nummern in Tabelle 3.4 entsprechen den Nummer in dem TROSY in Abb. 3.22. In Tabelle 3.4 sind zudem die chemischen Verschiebungen der DXR-Amidsignale angegeben, die Kreuzsignale zu den NADPH-Protonen ausbilden. Arg208, Trp212 und Cys207, welche Teil der flexiblen Schleife sind, zeigen *NOE*-Kreuzsignale zu den Protonen des Nicotinamidringes von NADPH. Durch die gewonnenen Daten aus der Kristallisation wurde postuliert, dass diese Schleife sehr flexibel ist und sich bei der Bindung von NADPH und Fosmidomycin wie ein Deckel über das aktive Zentrum legt. Außerdem geht es eine Bindung zu NADPH und Fosmidomycin ein. Jedoch konnten keine Kreuzsignale der Amidgruppen zu Fosmidomycin gemessen werden. Vermutlich findet ein Austausch der Protonen zwischen dem Inhibitor und dem Protein statt, so dass die Bindung mit geringerer Affinität erfolgt. *NOE*-Kreuzsignale konnten vermutlich auch zu folgenden Aminosäuren gemessen werden: Thr76, Leu65, Ala85, Thr67, Cys86, Lys143, Gln350 und Met322. Diese Aminosäuren konnten aber nicht eindeutig den Kreuzsignalen zugeordnet werden.

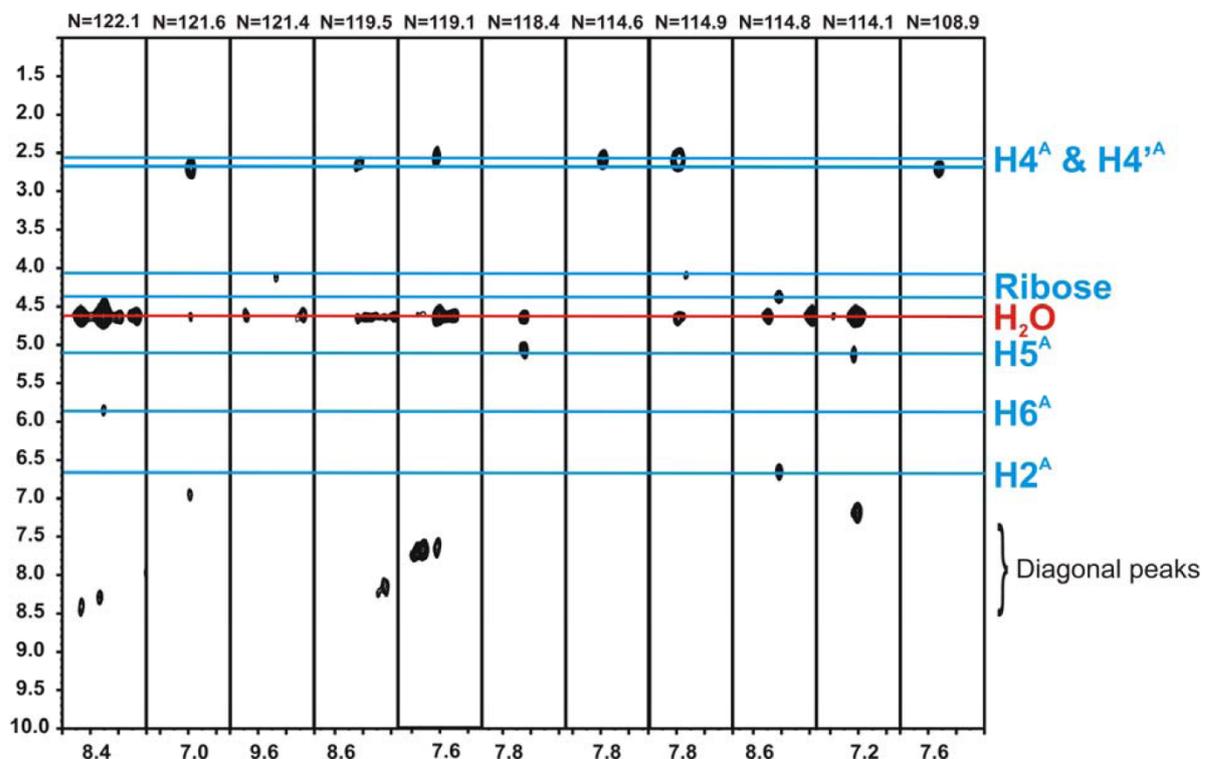


Abb. 3.21 NOESY „strips“ in $^1\text{H}/^1\text{H}$ Dimension

Die Kreuzsignale zwischen NADPH und DXR sind beschriftet, ebenso die Wassersignale, die nicht zu berücksichtigen sind. Im Bereich 7,0 bis 8,5 ppm liegen die Diagonalsignale. Die chemische Verschiebung des NH ist oben angegeben.

Tabelle 3.4 chemische Verschiebung der NADPH-Protonen, für die Kreuzsignale zu Amidgruppen der DXR gemessen wurden

Signalnummer	¹ H DXR [ppm]	¹⁵ N DXR [ppm]	DXR Zuordnung	¹ H NADP [ppm]
1	8.31	122.10	Thr 76	5.85 (H6 ^A)
2	6.98	121.64	Arg 208	2.68 (H4' ^A)
3	9.47	121.36	nicht zugeordnet	4.11 (Ribose)
4	8.43	119.50	Leu 65	2.63 (H4' ^A)
5	7.62	119.10	Ala 85	2.55 (H4 ^A)
6	7.64	118.41	Trp 212	5.05 (H5 ^A)
7	7.76	114.60	Thr 67 oder Cys86	2.55 (H4 ^A)
8	7.72	114.89	Lys 143 oder Thr67	4.09 (Ribose)
9	8.41	114.75	Gln 350 *	4.35 (Ribose),
	8.41	114.75	Gln 350 *	6.66 (H2 ^A)
10	7.23	114.05	Met 322 *	5.10 (H5 ^A)
11	7.51	108.85	Cys 207	2.71 (H4' ^A)
* Zuordnung unsicher, versuchsweise zugeordnet				

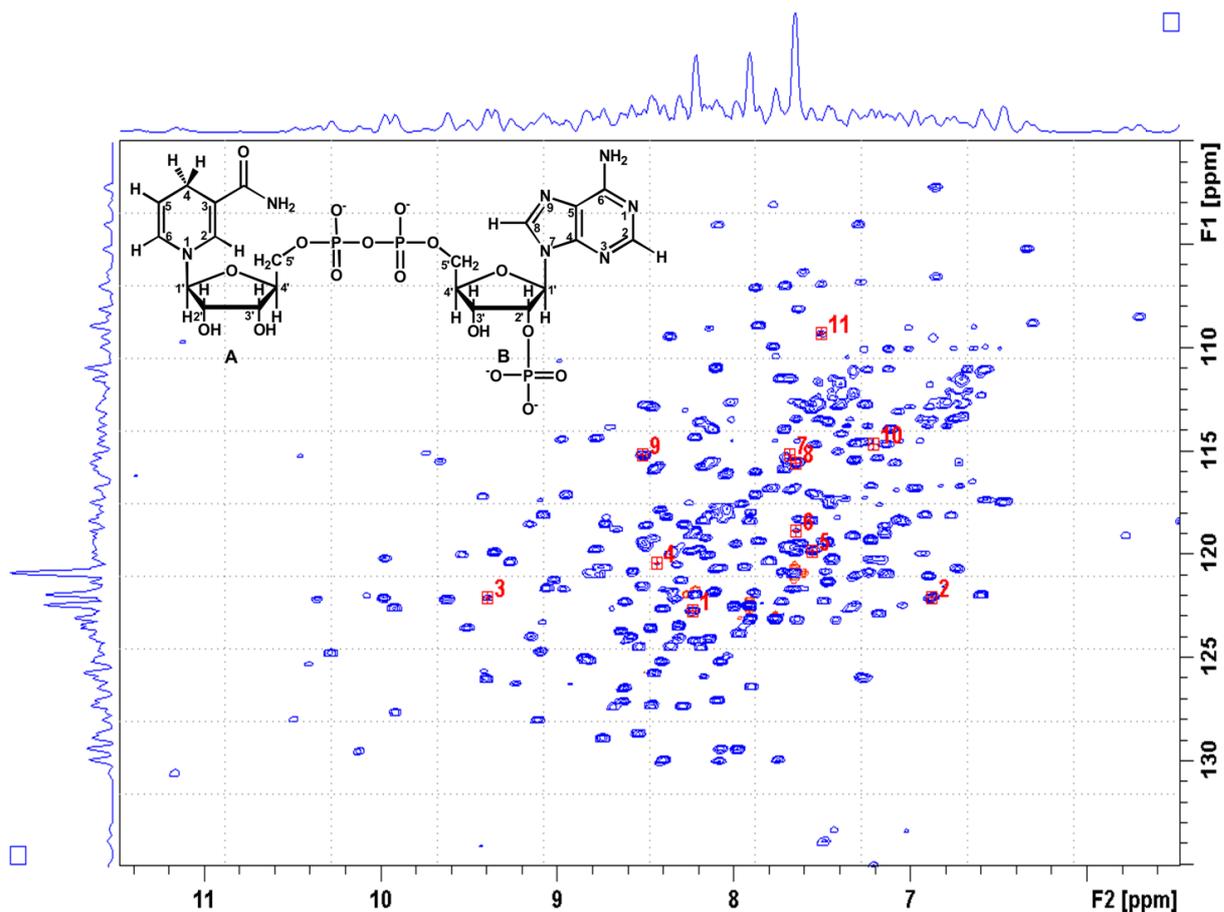


Abb. 3.22 $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ TROSY der DXR, Struktur von NADPH oben links dargestellt

In dem TROSY sind alle Signale rot markiert und von 1 bis 11 nummeriert, die ein Kreuzsignal zu NADPH ausbilden; über die chemische Verschiebung der Signale 1 bis 11 kann die jeweilige AS zugeordnet werden. Bei NADPH entsprechen die Bezeichnungen der einzelnen Atome in Tabelle 3.4 der Beschriftung im Schema: Nicotinamidring und Ribose (A), Adeninring und Ribosephosphat (B)

3.8 TALOS Vorhersage der 2D-Struktur der DXR

TALOS ist eine Software, die aus den chemischen Verschiebungen der $\text{H}\alpha$ -, $\text{C}\alpha$ -, CO -, $\text{C}\beta$ - und N-Atome die zugehörigen Winkel der Sekundärstruktur berechnet. Dies geschieht auf der Grundlage vergleichender Daten von Proteinen, für die sowohl eine Kristallstruktur als auch eine NMR-Struktur vorliegen. So konnten Cornilescu *et al.* eine Korrelation der chemischen Verschiebung der $\text{H}\alpha$ -, $\text{C}\alpha$ -, CO -, $\text{C}\beta$ - und N- Atome zu den Winkeln der Atome innerhalb des Proteinrückgrades ermitteln. Aus dieser Korrelation wurde ein mathematisches Modell entwickelt, um aus den gemessenen chemischen Verschiebungen die Winkel zu berechnen und eine Sekundärstrukturvorhersage zu treffen [122]. Im Falle der DXR können die

chemischen Verschiebungen von H α -Atomen nicht berücksichtigt werden, da das Protein am C α deuteriert vorlag. Aus den chemischen Verschiebungen können weiterhin die Torsionswinkel φ und ψ ermittelt werden. Bei $\varphi \approx -140^\circ$ und $\psi \approx 130^\circ$ ist ein antiparalleles β -Faltblatt wahrscheinlich, bei $\varphi \approx -120^\circ$ und $\psi \approx 110^\circ$ ein paralleles β -Faltblatt und bei $\varphi \approx -60^\circ$ und $\psi \approx -30^\circ$ eine α -Helix [122, 153]. In TALOS ist auch eine Ramachandran-Auftragung eingebettet, mit welcher die Qualität der Strukturbestimmung überprüft wird [122].

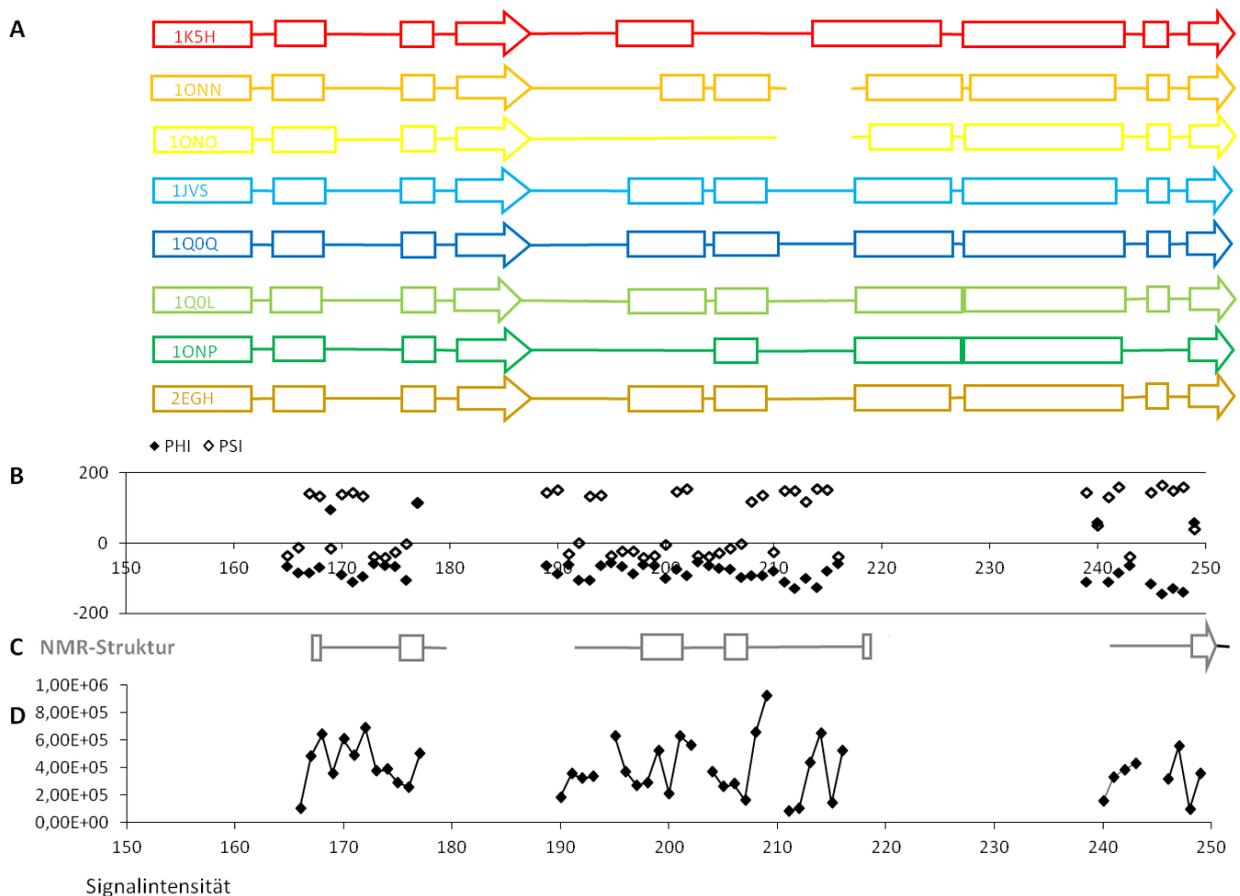


Abb. 3.23 Ausschnitt aus der TALOS-Berechnung als Diagramm; DXR-Fragment AS 150 bis AS 250.

- (A) Sekundärstrukturmodelle der Röntgenanalyse *Escherichia coli* DXR, Apostrukturen (rot und orange) und Strukturen mit zusätzlich Mg²⁺ oder Mn²⁺ im Komplex in Gelb, DXR im Komplex mit entweder Fos oder NADPH, aber nicht beiden zusammen in Blautönen, DXR in einem tertiären Komplex mit zwei Kofaktoren in Grüntönen und die DXR als quaternärer Komplex mit Fos, Mg²⁺ und NADPH in braun
- (B) Phi- und Psi-Werte aus TALOS-Berechnung als Diagramm
- (C) TALOS-Sekundärstrukturvorhersage als Sekundärstrukturschema
- (D) Signalintensitäten der TROSY-Signale

In Abb. 3.23A ist die *Escherichia coli* DXR-Sekundärstruktur des Abschnittes von AS 150 bis AS 250 aus und in Abb. 3.23C die zugeordneten Fragmente aus den NMR-Spektren mit den aus TALOS berechneten Sekundärstrukturmodellen dargestellt. Der Bereich umfasst einen wichtigen Teil des aktiven Zentrums und die flexible Schleife. Die Abbildung enthält auch das Diagramm der berechneten Torsionswinkel der Aminosäuren und ein Diagramm der relativen Intensität des TROSY-Signals der Aminosäuren. Die TALOS-Berechnung wurde für alle zugeordneten Fragmente der DXR durchgeführt (siehe Anhang). Die mit TALOS berechneten Sekundärstrukturvorhersagen der DXR stimmen sehr gut mit den Sekundärstrukturmodellen der Kristallstrukturen überein. Die Kristallstrukturanalysen gaben alle sehr ähnliche Konformationen für das gesamte Protein an. Nur in den Bereichen des aktiven Zentrums um den Bereich der flexiblen Schleife herum und die Schleife selbst (Cys207 bis Gly215) ergaben unterschiedliche Sekundärstrukturmodelle (siehe Abb. 3.23A). In zwei Kristallstrukturen (1ONN und 1ONO) war die Schleife nicht darstellbar. In 1K5H wurde postuliert, dass ein Teil der Schleife eine α -helikale Struktur einnimmt. In den anderen Kristallstrukturen und in der NMR-Sekundärstrukturvorhersage liegt eine ungeordnete Schleifenkonformation vor. In dem Bereich von His166 bis Arg216 stimmt die TALOS-Vorhersage am besten mit den Strukturen 1JVS, 1Q0Q, 1Q0L und 2EGH überein (siehe Abb. 3.23).

Vergleicht man die Sekundärstrukturvorhersagen aller Fragmente mit den bekannten *Escherichia coli* DXR-Kristallstrukturen, so entspricht die TALOS-Vorhersage am ehesten 2EGH (siehe Anhang). Für die 2EGH-Struktur wurde ebenfalls ein Enzym verwendet, welches als Komplex mit Mg^{2+} , NADPH und einem Inhibitor vorlag. Daher sollte die NMR-Struktur des Komplexes auch am ehesten der Kristallstruktur 2EGH entsprechen.

Die Signalintensitäten wurden berechnet um festzustellen, ob die Signale an den Fragmentenden schwächer sind als in der Mitte des Fragments. Der Vergleich ergab keinen Zusammenhang der Signalintensität und der Position im Fragment (siehe Abb. 3.23D und Abb. C.1 bis Abb. C.8). Die Ursache dafür könnte in einem unzureichenden $^1H/^2H$ -Austausch begründet sein. Für diese Hypothese spricht, dass kinetische Untersuchungen der DXR gezeigt haben, dass die DXR einen sehr kompakten Komplex mit Mg^{2+} , NADPH und dem Inhibitor eingeht [97]. Die Apo-Form des Enzyms ergab lediglich Spektren mit zu breiten Signalen (siehe Abb. 3.5 bis Abb. 3.8).

3.9 Fazit und Ausblick

Große Proteine ab 30 kDa stellen eine große Herausforderung für die NMR-Strukturaufklärung dar, da die Sensitivität und die Auflösung durch die schnelle Relaxation verringert werden [117].

In den letzten Jahrzehnten hat sich die NMR-Analyse von Proteinen stark weiterentwickelt. Jährlich kommen zahlreiche neue Methoden hinzu: zur Probenvorbereitung und Isotopenmarkierung, neue NMR-Experimente und verbesserte Spektrometer sowie neue Methoden bezüglich der Informationsverarbeitung und Simulation [154-158]. Durch den Einsatz von weiterentwickelten Spektrometern im Frequenzbereich von 800 bis 950 MHz, Optimierung der etablierten NMR-Experimente [118, 120]. und Verwendung von perdeutერიerten ^{13}C - und ^{15}N -markierten Proben kann die Signalstärke auch bei großen Proteinen erhalten bleiben [117]. Der Nachteil bei perdeutერიerten Proteinen ist, dass man keine Kohlenstoffgebundenen Protonensignale bekommen kann und wertvolle $\text{NOE-}^1\text{H}_\text{C}$ -Daten für Strukturinformationen fehlen [157]. Daher eignen sich komplett perdeutერიerte Proteine nur für die Zuordnungsexperimente des Proteinerückgrats. Da auch im Bereich der Informatik, Simulation und Molekülmodellierung viele Fortschritte gemacht werden, z.B. mit Programmen wie TALOS, gibt es immer bessere Ansätze, wie man die Informationen aus der Kristallstruktur vergleichend und unterstützend mit der NMR-Strukturaufklärung kombinieren kann [122].

Bei großen Proteinen besteht die Gefahr, dass die Amidgruppen des Proteinerückgrates so stark vor dem Solvens abgeschirmt werden, dass Deuterium nicht zu Wasserstoff zurücktauscht. Bei der DXR kann man diesen Effekt vermuten, da fast nur die äußeren, Solvens-zugewandten Bereiche zugeordnet werden konnten, während es bei hydrophoben, innen-liegenden Bereichen nicht möglich war (siehe Kapitel 3.4 und Abb. 3.20 in Kapitel 3.6). Eine Möglichkeit, diesem Effekt zu begegnen, ist die von Kay *et al.* beschriebene Denaturierung des perdeutერიerten Proteins und die anschließende Rückfaltung in ^1H -Puffer [150]. Eine andere Möglichkeit besteht darin, die Bakterien in 60-70 %igem Deuteriumpuffer wachsen zu lassen um anstelle einer vollständigen Perdeuterierung eine partielle Deuterierung zu erzeugen [152]. Bei der ersten Methode besteht die Schwierigkeit darin, dass die stark zur Aggregation neigende DXR nicht ausreichend renaturieren und keine

ausreichenden Mengen korrekt gefaltetes Protein erhalten werden könnten. Bei der zweiten genannten Methode muss ein Deuterierungsgrad ermittelt werden, bei dem man mehr TROSY-Signale erhält, die aber dennoch an Schärfe und Signalstärke nicht signifikant verlieren. Neuere Methoden nutzen zudem den Einsatz von selektiv markierten Aminosäuren oder Aminosäurevorstufen aus, so dass im Protein nur einzelne Aminosäuren markiert sind oder bestimmte Seitenketten ausgewählter Aminosäuren selektiv markiert sind [152, 155, 157-161].

Die Auflösung und Signalstärke verbessert sich mit Erhöhung der Messtemperatur. Bei der DXR aus *Escherichia coli* ist die maximale Temperatur, bei der das Protein über längere Zeit stabil bleibt, bei 37 °C erreicht. Daher wäre es sinnvoll, in zukünftigen Experimenten eine rekombinante DXR aus einem thermophilen Organismus zu synthetisieren, da mit diesen noch höhere Messtemperaturen möglich sein können [162]. Ein weiterer möglicher Ansatz wäre, durch Mutation die DXR so zu verändern, dass nur ein Monomer exprimiert wird. Dadurch würde sich die Masse von 83 kDa auf 41,5 kDa reduzieren. Auch weitere Nachteile, die sich in der NMR durch ein Homodimer ergeben, würden sich vermeiden lassen. Mit diesem Protein könnte nun die partielle Deuterierung getestet und eine neue Gruppe an 3D-Experimenten aufgenommen werden [152]. Zusätzlich wäre die Herstellung verschiedener selektiv markierter DXR-Proben sinnvoll, damit mehr Aminosäuren aus dem Inneren der DXR zugeordnet werden können [159-161]. Sobald mehr Aminosäuren der Primärstruktur zugeordnet wären, könnten NOESY-Experimente zur Strukturbestimmung und residuale Kopplungsexperimente für die Molekülorientierung gemacht werden [117].

Mit Hilfe der bereits gewonnenen Ergebnisse aus der Zuordnung und aus den TALOS-Sekundärstrukturvorhersagen sowie weiterführenden TROSY- oder NOESY-basierten Experimenten wird es möglich sein, die Struktur der DXR in ihren verschiedenen Konformationen zu lösen [158].

Anhang A. Tabellen der chemischen Verschiebungen aller zugeordneter Heteroatome

Tabelle A.1 zur Primärsequenz der DXR zugeordnete Aminosäuren und die chemischen Verschiebungen der Heteroatome des Proteinrückgrades

Aminosäure		chemische Verschiebung				
		HN	N	CO	CA	CB
35	ALA			173,92	51,83	22,34
36	GLY	7,78	109,89	171,98	45,81	
37	LYS	10,37	122,09	177,64	55,26	35,13
38	ASN	10,41	125,26	174,94	52,08	36,18
39	VAL	8,09	127,01	176,62	65,63	31,65
40	THR	8,22	114,28	176,79	66,16	67,71
41	ARG	7,24	120,79	177,37	56,90	29,15
42	MET	7,80	120,26	178,89	57,16	31,45
43	VAL	8,77	120,94	177,03	66,81	30,56
44	GLU	6,92	118,03	180,49	58,91	28,77
45	GLN	8,20	119,72	179,68	58,61	27,49
61	SER			175,27	62,08	63,66
62	ALA	8,19	124,47	178,77	54,65	17,66
63	LYS	7,91	118,36	179,42	59,29	31,24
64	LEU	7,47	121,27	178,55	57,11	40,82
65	LEU	8,44	120,38	177,68	57,48	40,63
66	LYS	8,38	118,15	178,80	59,71	31,53
67	THR	7,69	115,46	176,69	65,97	68,37
68	MET	8,30	121,19	179,29	58,81	32,59
69	LEU	8,73	118,49	179,84	57,31	39,22

Aminosäure		chemische Verschiebung				
		HN	N	CO	CA	CB
70	GLN	8,15	119,99	180,34	58,66	27,23
71	GLN	7,86	119,30	177,48	57,89	27,44
72	GLN	7,31	114,58	176,09	54,57	28,26
73	GLY	7,64	108,06	174,69	45,45	
74	SER	7,56	112,93	176,47	57,48	63,09
75	ARG	8,69	127,36	176,51	54,98	28,79
76	THR	8,23	122,67	172,89	65,03	69,48
77	GLU	7,98	129,36	175,01	55,28	30,02
78	VAL	8,45	125,68	175,78	61,24	32,07
79	LEU			174,40	52,67	44,87
80	SER	8,11	110,88	175,25	55,64	66,45
81	GLY	7,86	108,86	174,07	44,19	
82	GLN	8,22	118,82	178,35	58,61	29,52
83	GLN	8,58	120,77	177,87	58,61	26,49
84	ALA	7,89	121,79	179,45	54,01	18,13
85	ALA	7,56	119,80	179,06	55,26	17,64
86	CYS	7,71	115,19	176,40	62,73	25,71
87	ASP	8,33	120,45	179,81	56,60	38,56
88	MET	7,90	117,93	178,54	55,20	32,96
89	ALA	7,42	123,12	174,03	52,63	19,08
90	ALA	6,70	113,25	176,80	49,46	19,45
91	LEU	6,60	121,91	179,65	55,35	42,13
92	GLU	8,83	125,09	176,87	59,38	28,90
93	ASP	8,47	112,80	176,01	53,50	39,20
94	VAL	7,07	118,24	174,93	62,78	32,26

Aminosäure		chemische Verschiebung				
		HN	N	CO	CA	CB
95	ASP	8,86	124,95	176,33	55,77	44,60
100	ALA			175,04	51,27	17,82
101	ILE	6,77	118,06	174,18	61,01	36,46
102	VAL	5,46	118,34	174,45	58,76	31,48
103	GLY	6,30	108,76	178,22	42,99	
104	ALA	10,29	124,70	179,00	53,44	
105	ALA	8,62	122,27	175,85	53,65	16,24
106	GLY	7,29	103,98	177,53	45,39	17,31
107	LEU	7,90	126,34	178,56	59,33	40,86
108	LEU	9,08	118,04		59,46	36,18
114	ILE			179,11	64,65	36,57
115	ARG	8,52	119,31	177,79	57,88	28,64
116	ALA	7,14	118,93	177,36	51,12	18,36
117	GLY	8,37	109,41	174,87	45,55	
118	LYS	7,33	116,00	175,52	53,87	31,86
119	THR	7,14	114,63	173,20	63,04	68,51
130	THR				64,31	67,76
131	CYS	6,65	116,42		58,22	30,36
132	GLY	8,14	109,00	174,36	45,37	
133	ARG	8,07	129,36	177,14	58,17	28,44
134	LEU	7,32	115,34	179,43	57,08	40,97
139	VAL			177,75	58,18	31,33
140	LYS	7,69	119,73	180,01	58,18	31,33
141	GLN	8,42	117,81	177,89	57,64	27,73
142	SER	7,61	112,70	173,26	58,12	64,07

Aminosäure		chemische Verschiebung				
		HN	N	CO	CA	CB
143	LYS	7,65	115,53	176,06	56,62	27,92
144	ALA	7,72	120,81	175,59	50,99	19,40
145	GLN	7,65	119,85	173,49	54,08	30,09
146	LEU	8,55	128,64	174,38	53,19	43,45
166	HIS	7,76	110,37	174,92	56,44	30,10
167	ASN	7,73	122,23	174,38	51,66	38,63
168	LEU	7,97	123,79	177,10	57,15	40,70
169	GLY	8,19	113,52	174,76	44,64	
170	TYR	7,46	117,27	175,37	57,62	39,19
171	ALA	7,64	123,09	176,85	51,23	20,53
172	ASP	8,64	123,66	176,77	52,95	42,49
173	LEU	9,12	127,98	179,15	58,46	40,14
174	GLU	8,34	122,08	181,25	59,38	28,39
175	GLN	8,76	120,56	176,55	57,46	28,10
176	ASN	7,42	114,98	174,09	53,50	40,75
177	GLY	7,88	107,02	173,00	45,97	
189	PRO			177,28	63,23	30,96
190	PHE	8,34	119,75	177,04	52,73	36,90
191	ARG	6,73	120,65	176,09	58,91	30,02
192	GLU	8,51	112,72	176,43	54,40	29,67
193	THR	7,32	122,42	172,41	61,74	70,51
194	PRO			177,87	63,04	30,96
195	LEU	8,41	125,17	180,48	57,96	40,25
196	ARG	8,43	115,65	176,92	57,47	28,40
197	ASP	7,63	118,25	178,09	54,42	40,43

Aminosäure		chemische Verschiebung				
		HN	N	CO	CA	CB
198	LEU	7,48	120,79	178,67	57,69	40,49
199	ALA	7,79	116,77	179,60	54,34	18,34
200	THR	7,61	106,29	175,50	60,34	68,99
201	MET	7,14	120,87	177,55	54,59	32,65
202	THR	8,78	114,32	175,40	59,37	68,99
203	PRO			177,78	65,69	30,96
204	ASP	8,14	115,42	178,92	56,83	39,78
205	GLN	7,53	117,11	178,68	58,20	28,54
206	ALA	8,36	119,95	176,40	53,65	18,47
207	CYS	7,51	109,25	173,53	60,40	27,13
208	ARG	6,88	122,04	173,96	53,89	28,21
209	HIS	8,29	127,28	175,54	56,05	31,41
210	PRO			177,24	64,17	
211	ASN	10,46	115,19	173,80	52,98	41,32
212	TRP	7,66	118,80	175,70	54,89	32,34
213	SER	8,50	118,52	174,32	57,13	62,19
214	MET	8,62	126,41	175,71	53,82	36,76
215	GLY	7,28	106,76	174,98	44,83	
216	ARG	9,06	121,58	177,60	60,26	30,06
239	PHE			175,29	54,59	37,26
240	ASN	7,41	118,17	173,58	52,45	36,63
241	ALA	7,23	119,11	177,17	49,54	20,93
242	SER	9,27	120,28	175,06	56,29	63,99
243	ALA	8,52	121,46	180,78	55,39	17,44
244	SER					

Aminosäure		chemische Verschiebung				
		HN	N	CO	CA	CB
245	GLN			175,99	63,72	31,99
246	MET	8,64	127,06	172,26	52,18	39,46
247	GLU	8,18	115,70	176,11	52,92	34,08
248	VAL	8,70	113,77	174,11	58,44	34,80
249	LEU	8,05	116,05	175,26	53,31	38,43
292	SER	8,26	117,46	172,61	56,79	66,46
293	GLY	7,51	106,86	173,92	43,73	
294	VAL	7,32	120,99	176,23	62,10	31,68
295	LYS	8,40	129,90	173,36	54,31	30,83
296	PRO			177,69	61,62	30,64
297	LEU	7,27	125,89	175,40	55,16	41,57
298	ASP	8,47	127,20	177,29	51,46	39,40
299	PHE	8,36	124,38	176,97	61,41	38,56
300	CYS	8,13	113,73	175,15	61,30	26,12
301	LYS	7,04	118,40	175,93	54,66	32,28
302	LEU	6,89	121,01	177,74	54,12	42,57
303	SER	8,04	117,72	173,87	58,21	62,97
304	ALA	7,91	123,04	176,92	51,91	18,98
305	LEU	8,29	118,48	177,32	53,02	40,94
306	THR	8,98	114,38	172,46	59,35	72,12
307	PHE	8,45	115,82	175,26	55,84	43,65
321	ALA			178,57	54,42	17,07
322	MET	7,21	114,85	179,11	59,30	31,90
323	GLU	8,25	119,03	179,81	58,49	28,33
324	ALA	8,79	124,07	178,79	54,46	16,80

Aminosäure		chemische Verschiebung				
		HN	N	CO	CA	CB
325	PHE	7,72	115,83	178,86	60,52	38,08
326	GLU	7,18	115,32	178,34	56,84	28,27
327	GLN	7,67	119,44	177,15	57,31	27,81
328	GLY	7,71	106,93	173,88	43,91	
329	GLN	9,63	122,12	178,26	56,97	28,67
330	ALA	9,51	123,51	179,07	55,96	16,24
331	ALA	8,16	119,15		54,48	17,50
347	LEU			177,79	57,24	40,31
348	ALA	7,53	119,64	176,28	51,21	17,60
349	GLN	8,12	113,93	175,90	56,68	25,29
350	GLN	8,51	115,12	176,34	56,71	29,87
351	ILE	6,88	106,81	174,77	58,38	39,66
352	ARG	9,36	119,83	178,98	54,78	31,25
353	PHE	9,93	122,55	177,52	61,41	37,85
354	THR	6,86	102,15	175,97	61,84	66,64
355	ASP	7,45	120,12	176,75	55,50	40,96
356	ILE	6,81	121,50	177,09	66,32	36,81
357	ALA	8,15	118,06	179,79	54,95	18,34
358	ALA	6,47	117,41	180,37	54,31	17,96
359	LEU					
360	ASN			176,64	55,63	36,38
361	LEU	7,18	117,57	177,66	57,51	40,63
362	SER	7,72	113,87	177,25	60,92	62,62
363	VAL	8,06	118,29	177,63	66,22	30,00
364	LEU	7,14	118,57	179,74	57,88	40,29

Aminosäure		chemische Verschiebung				
		HN	N	CO	CA	CB
365	GLU	7,88	115,94	177,97	57,77	29,18
366	LYS	7,45	117,57	176,79	56,04	32,89
367	MET	7,22	119,28	175,54	54,51	32,29
368	ASP	8,31	123,37	175,66	53,08	40,57
369	MET	8,22	121,88	175,09	54,34	33,55
370	ARG	7,92	122,40	175,88	54,36	30,32
371	GLU	8,47	123,51		53,64	28,57
377	ASP			178,76	56,46	41,09
378	VAL	7,49	122,20	177,75	66,87	30,55
379	LEU	7,96	117,52	180,08	57,17	39,51
380	SER	7,88	117,05	177,09	61,02	62,07
381	VAL	8,22	124,13	177,69	66,33	30,68
382	ASP	8,29	119,47	176,61	57,62	41,90
383	ALA			181,42	54,98	17,36
384	ASN	8,17	118,32	177,38	55,71	38,30
385	ALA	8,70	122,55		54,56	18,85
389	ALA			178,76	54,88	17,63
390	ARG	8,62	118,45	179,51	59,65	29,25
391	LYS	7,70	119,50	179,65	59,13	31,12
392	GLU	8,11	120,68	178,99	58,04	28,45
393	VAL	8,25	119,80	178,12	66,27	30,71
394	MET	7,68	116,85	178,44	57,45	31,41
395	ARG	7,62	119,42	177,74	58,01	28,92
396	LEU	7,33	119,04	177,59	55,41	41,30
397	ALA	7,77	123,04	177,04	52,17	18,60

Aminosäure		chemische Verschiebung				
		HN	N	CO	CA	CB
398	SER	7,65	120,81	178,67	59,69	64,39

Tabelle A.2 Aminosäuren deren Seitenketten-Heteroatome partiell zugeordnet werden konnten mit chemischer Verschiebung der Heteroatome

Aminosäure		Chemische Verschiebung											
		CG	CG1	CG2	CD	CD1	CD2	HG	HG1	HG2	HD	HE	HZ
39	VAL	21,02							0,83	1,09			
40	THR		20,67										
42	MET	32,76											
43	VAL	23,43							0,95	0,82			
44	GLU	35,17											
45	GLN	33,45											
64	LEU										0,84		
65	LEU										0,80		
67	THR	20,53											
68	MET	31,86											
69	LEU							0,74					
70	GLN	33,38											
72	GLN	32,74											
74	SER							8,20					
76	THR			22,53					5,78				
77	GLU	35,24											
78	VAL		21,66	21,18				0,78					
82	GLN	33,66											
83	GLN	32,96											
86	CYS							2,53					

Aminosäure		Chemische Verschiebung											
		CG	CG1	CG2	CD	CD1	CD2	HG	HG1	HG2	HD	HE	HZ
91	LEU	22,47								0,90			
92	GLU	35,17											
94	VAL	22,53					0,90						
101	ILE					14,04							
102	VAL						1,02						
108	LEU									0,70			
119	THR	20,81											
131	CYS						1,94						
140	LYS												7,18
143	LYS	23,85											7,22
145	GLN	33,24											
146	LEU	26,06								0,85			
167	ASN											7,07	
173	LEU									0,69			
174	GLU	35,66											
175	GLN	33,22											
176	ASN											7,10	
191	ARG	26,24											
192	GLU	36,21											
193	THR			20,39									
195	LEU									1,62			
200	THR	20,82											
201	MET	31,10											
202	THR	21,02											
207	CYS						2,65						
208	ARG	25,92			42,77								

Aminosäure		Chemische Verschiebung											
		CG	CG1	CG2	CD	CD1	CD2	HG	HG1	HG2	HD	HE	HZ
209	HIS											10,47	
214	MET	30,55											
248	VAL						0,60						
249	LEU									0,60			
294	VAL						0,73						
295	LYS	23,01					0,99			1,61			
297	LEU									1,01			
302	LEU				23,64								
322	MET	30,55											
323	GLU	35,81											
326	GLU	34,69											
329	GLN	32,69											
349	GLN	34,72											
350	GLN	33,72											
352	ARG	25,99											
354	THR							5,71					
356	ILE										0,97		
361	LEU				24,81					0,83			
362	SER												
363	VAL						0,90						
364	LEU									0,86			
365	GLU	35,80											
366	LYS	23,29											
369	MET	31,79											
370	ARG	25,78			42,50								
371	GLU	34,60											

Aminosäure		Chemische Verschiebung											
		CG	CG1	CG2	CD	CD1	CD2	HG	HG1	HG2	HD	HE	HZ
378	VAL						1,05						
379	LEU									0,85			
381	VAL						1,12						
392	GLU	35,66											
393	VAL						0,78						
396	LEU									0,73			

Anhang B. Ausschnitte des TROSY-Spektrums mit allen zugeordneten Amidgruppen des Proteinrückgrats

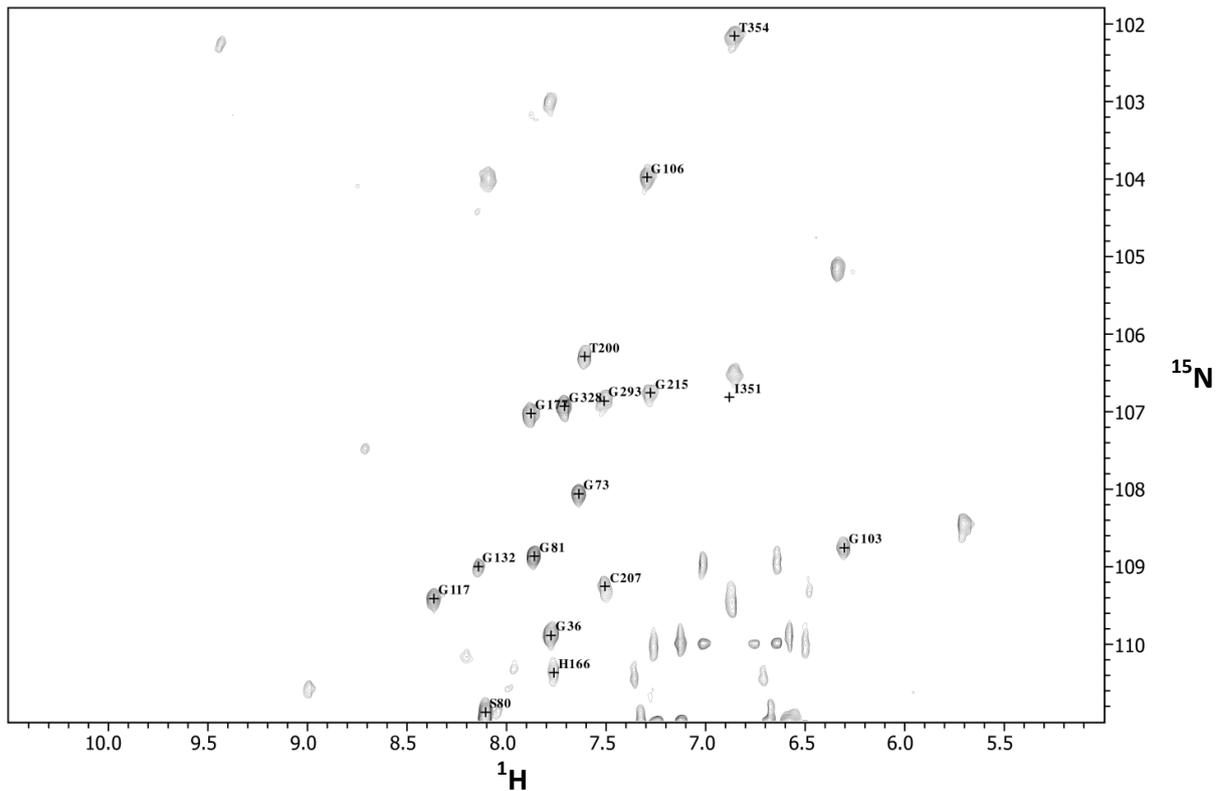


Abb. B.1 TROSY-Spektrum Ausschnitt von 101,8 ppm bis 111,0 ppm

Alle markierten Signale konnten zugeordnet werden. Die nichtmarkierten Signale wurden nicht zugeordnet oder gehören zu Seitenkettenverschiebungen. Zugeordnete AS sind mit der AS-Bezeichnung aus der DXR-Primärsequenz beschriftet

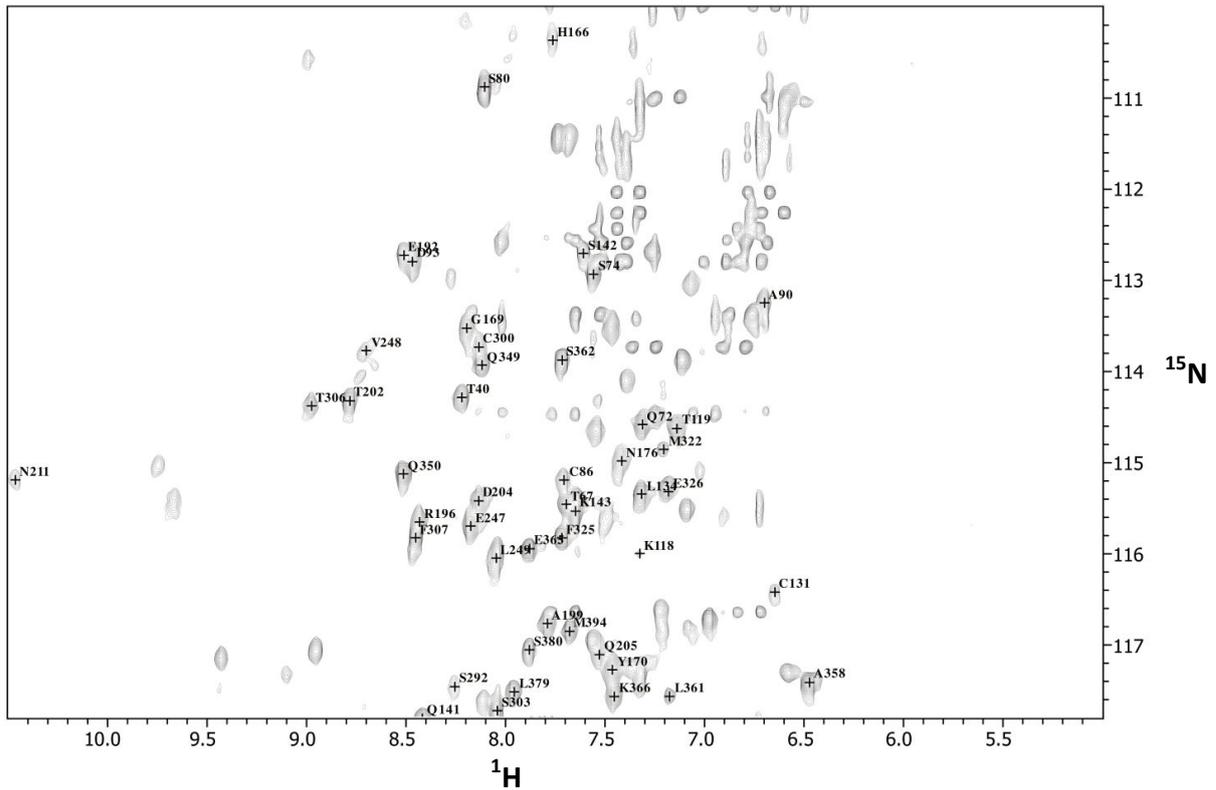


Abb. B.2 TROSY-Spektrum Ausschnitt von 110,0 ppm bis 117,8 ppm

Alle markierten Signale konnten zugeordnet werden. Die nichtmarkierten Signale wurden nicht zugeordnet oder gehören zu Seitenkettenverschiebungen. Zugeordnete AS sind mit der AS-Bezeichnung aus der DXR-Primärsequenz beschriftet

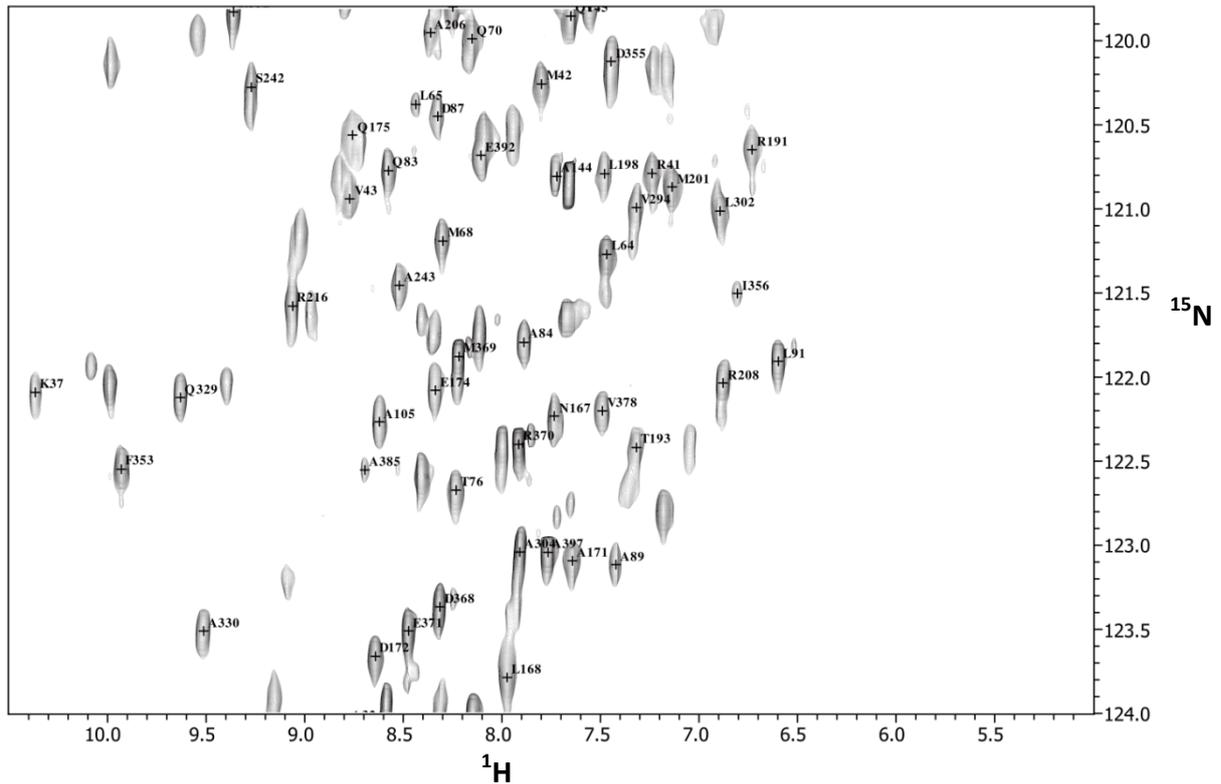


Abb. B.3 TOSY-Spektrum Ausschnitt von 119,8 ppm bis 124,0 ppm

Alle markierten Signale konnten zugeordnet werden. Die nichtmarkierten Signale wurden nicht zugeordnet oder gehören zu Seitenkettenverschiebungen. Zugeordnete AS sind mit der AS-Bezeichnung aus der DXR-Primärsequenz beschriftet

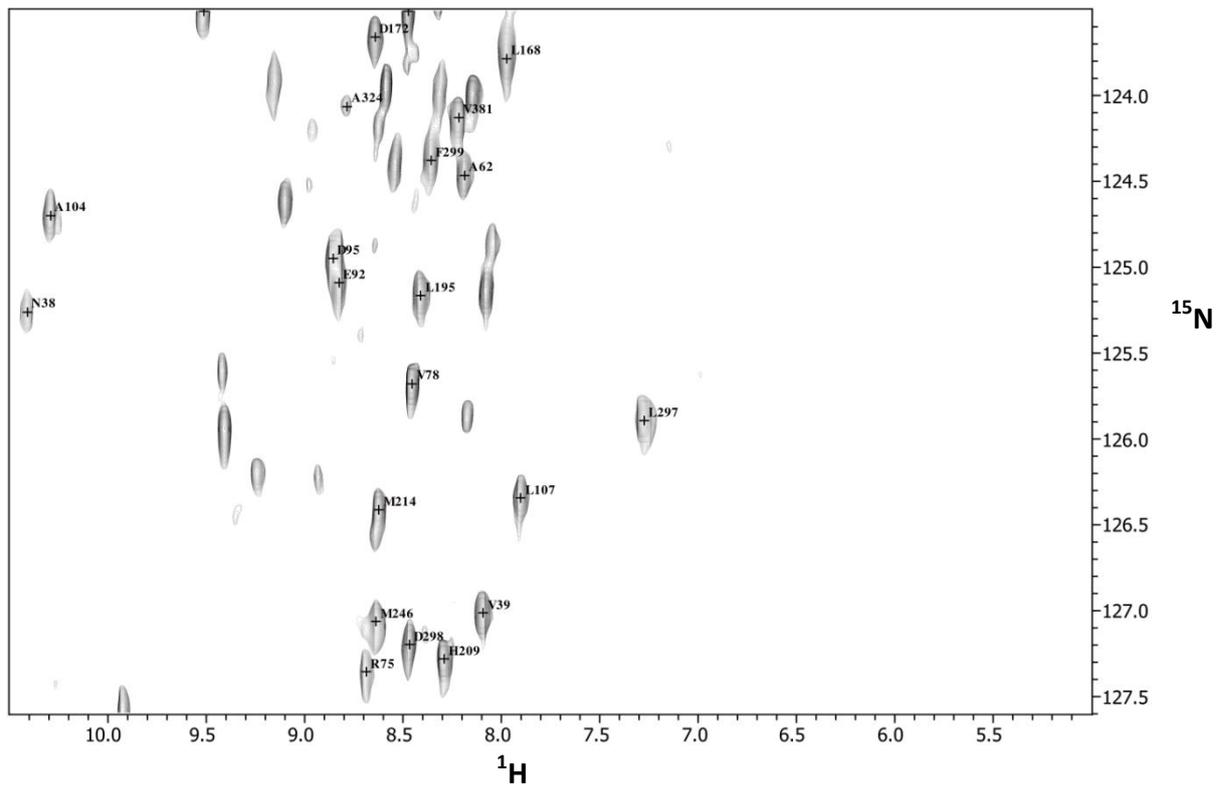


Abb. B.4 TOSY-Spektrum Ausschnitt von 123,5 ppm bis 127,6 ppm

Alle markierten Signale konnten zugeordnet werden. Die nichtmarkierten Signale wurden nicht zugeordnet oder gehören zu Seitenkettenverschiebungen. Zugeordnete AS sind mit der AS-Bezeichnung aus der DXR-Primärsequenz beschriftet

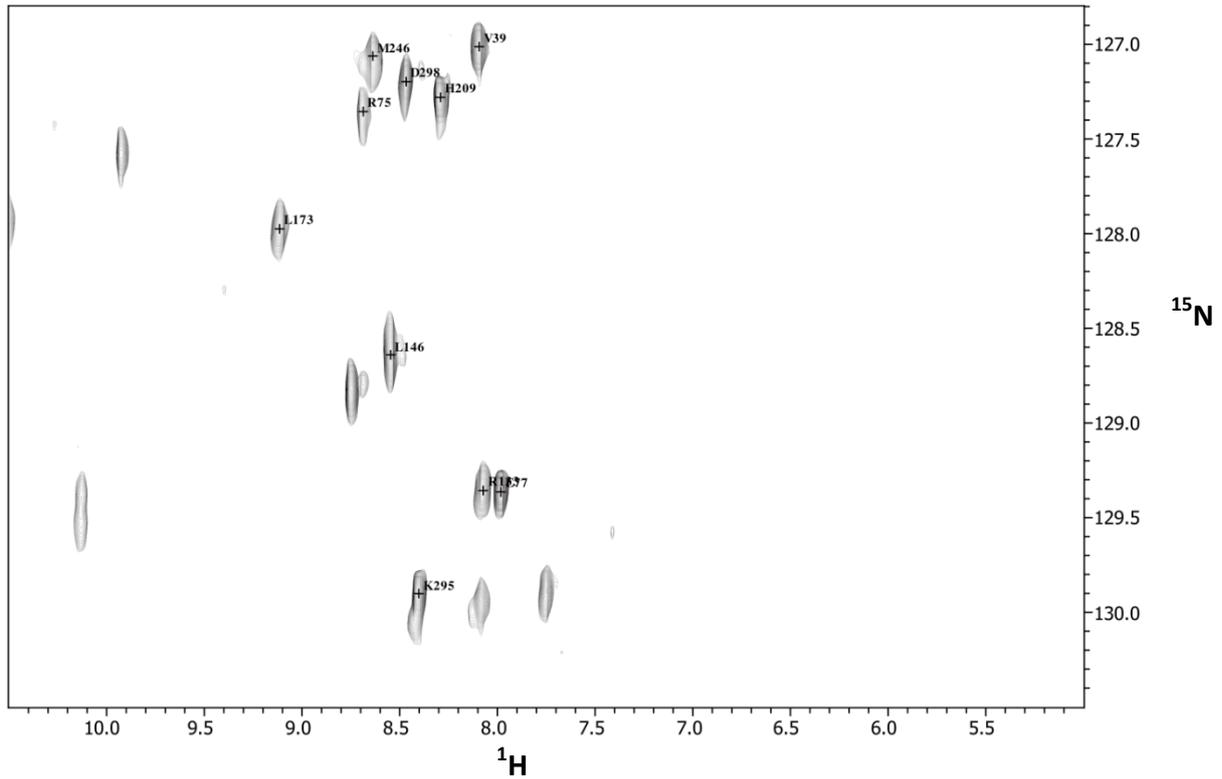


Abb. B.5 TOSY-Spektrum Ausschnitt von 126,8 ppm bis 130,5 ppm

Alle markierten Signale konnten zugeordnet werden. Die nichtmarkierten Signale wurden nicht zugeordnet oder gehören zu Seitenkettenverschiebungen. Zugeordnete AS sind mit der AS-Bezeichnung aus der DXR-Primärsequenz beschriftet

Anhang C. Diagramme der TALOS-Berechnungen

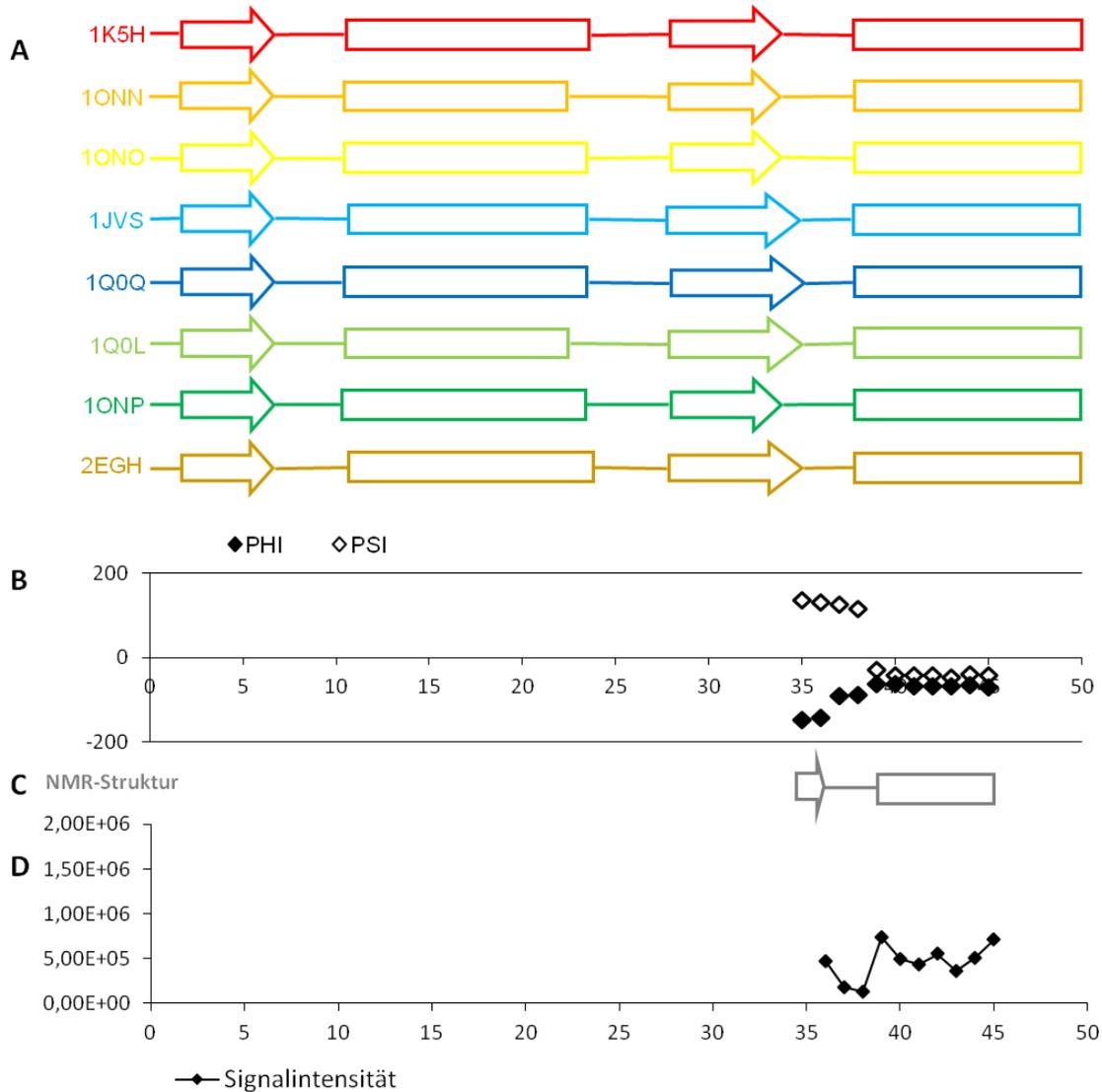


Abb. C.1 Ausschnitt aus der TALOS-Berechnung als Diagramm; DXR-Fragment AS 1 bis AS 50

- (A) Sekundärstrukturmodelle der Röntgenanalyse *Escherichia coli* DXR, Apostrukturen (rot und orange) und Strukturen mit zusätzlich Mn^{2+} im Komplex in Gelb, DXR im Komplex mit entweder Fos oder NADPH, aber nicht beiden zusammen in Blautönen, DXR in einem tertiären Komplex mit zwei Kofaktoren in Grüntönen und die DXR als quaternärer Komplex mit Fos, Mg^{2+} und NADPH in braun
- (B) Phi- und Psi-Werte aus TALOS-Berechnung als Diagramm
- (C) TALOS-Sekundärstrukturvorhersage als Sekundärstrukturschema
- (D) Signalintensitäten der TROSY-Signale

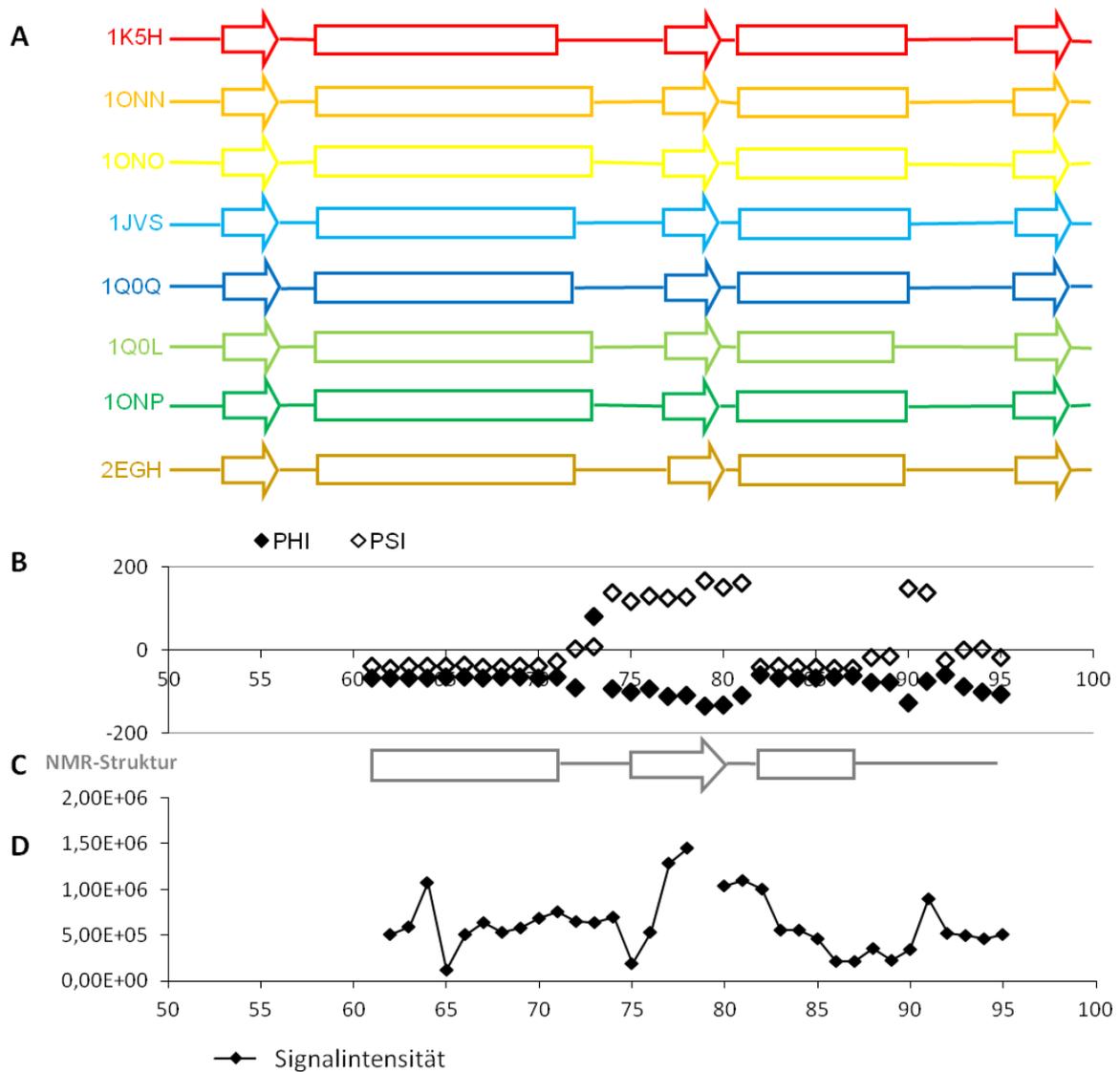


Abb. C.2 Ausschnitt aus der TALOS-Berechnung als Diagramm; DXR-Fragment AS 50 bis AS 100

- (A) Sekundärstrukturmodelle der Röntgenanalyse *Escherichia coli* DXR, Apostrukturen (rot und orange) und Strukturen mit zusätzlich Mn^{2+} im Komplex in Gelb, DXR im Komplex mit entweder Fos oder NADPH, aber nicht beiden zusammen in Blautönen, DXR in einem tertiären Komplex mit zwei Kofaktoren in Grüntönen und die DXR als quaternärer Komplex mit Fos, Mg^{2+} und NADPH in braun
- (B) Phi- und Psi-Werte aus TALOS-Berechnung als Diagramm
- (C) TALOS-Sekundärstrukturvorhersage als Sekundärstrukturschema
- (D) Signalintensitäten der TROSY-Signale

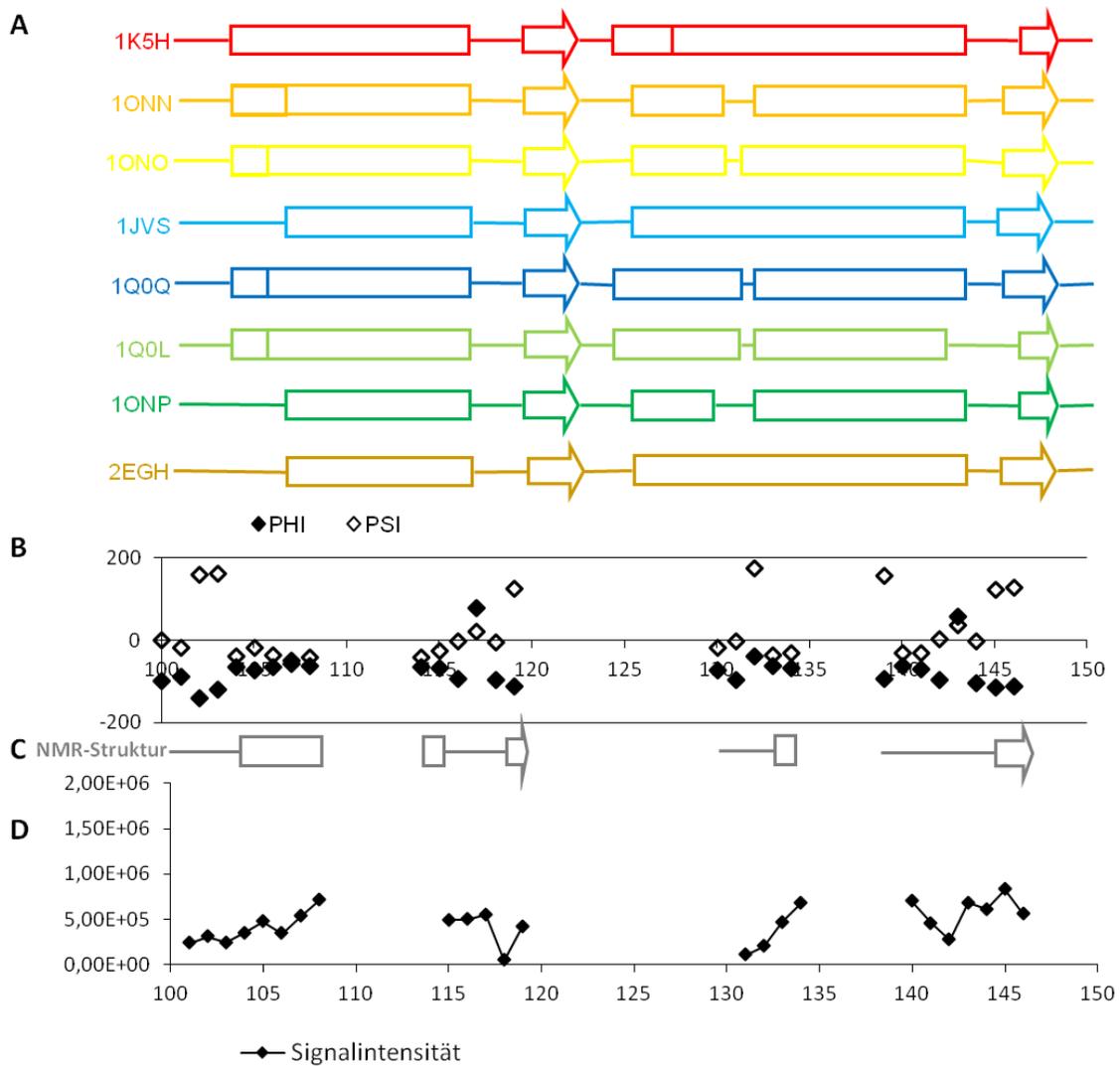


Abb. C.3 Ausschnitt aus der TALOS-Berechnung als Diagramm; DXR-Fragment AS 100 bis AS 150

- (A) Sekundärstrukturmodelle der Röntgenanalyse *Escherichia coli* DXR, Apostrukturen (rot und orange) und Strukturen mit zusätzlich Mn^{2+} im Komplex in Gelb, DXR im Komplex mit entweder Fos oder NADPH, aber nicht beiden zusammen in Blautönen, DXR in einem tertiären Komplex mit zwei Kofaktoren in Grüntönen und die DXR als quaternärer Komplex mit Fos, Mg^{2+} und NADPH in braun
- (B) Phi- und Psi-Werte aus TALOS-Berechnung als Diagramm
- (C) TALOS-Sekundärstrukturvorhersage als Sekundärstrukturschema
- (D) Signalintensitäten der TROSY-Signale

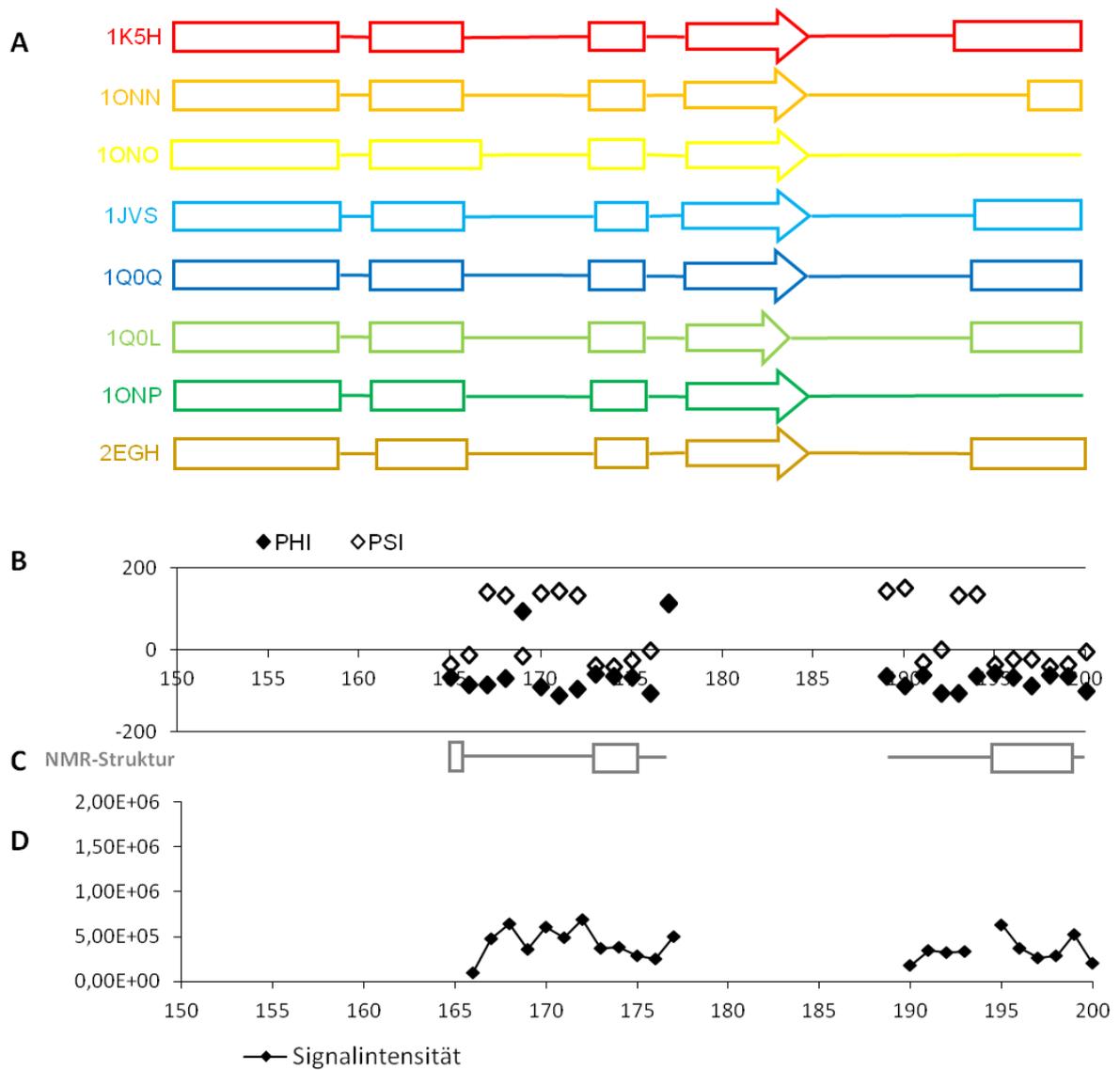


Abb. C.4 Ausschnitt aus der TALOS-Berechnung als Diagramm; DXR-Fragment AS 150 bis AS 200

- (A) Sekundärstrukturmodelle der Röntgenanalyse *Escherichia coli* DXR, Apostrukturen (rot und orange) und Strukturen mit zusätzlich Mn^{2+} im Komplex in Gelb, DXR im Komplex mit entweder Fos oder NADPH, aber nicht beiden zusammen in Blautönen, DXR in einem tertiären Komplex mit zwei Kofaktoren in Grüntönen und die DXR als quaternärer Komplex mit Fos, Mg^{2+} und NADPH in braun
- (B) Phi- und Psi-Werte aus TALOS-Berechnung als Diagramm
- (C) TALOS-Sekundärstrukturvorhersage als Sekundärstrukturschema
- (D) Signalintensitäten der TROSY-Signale

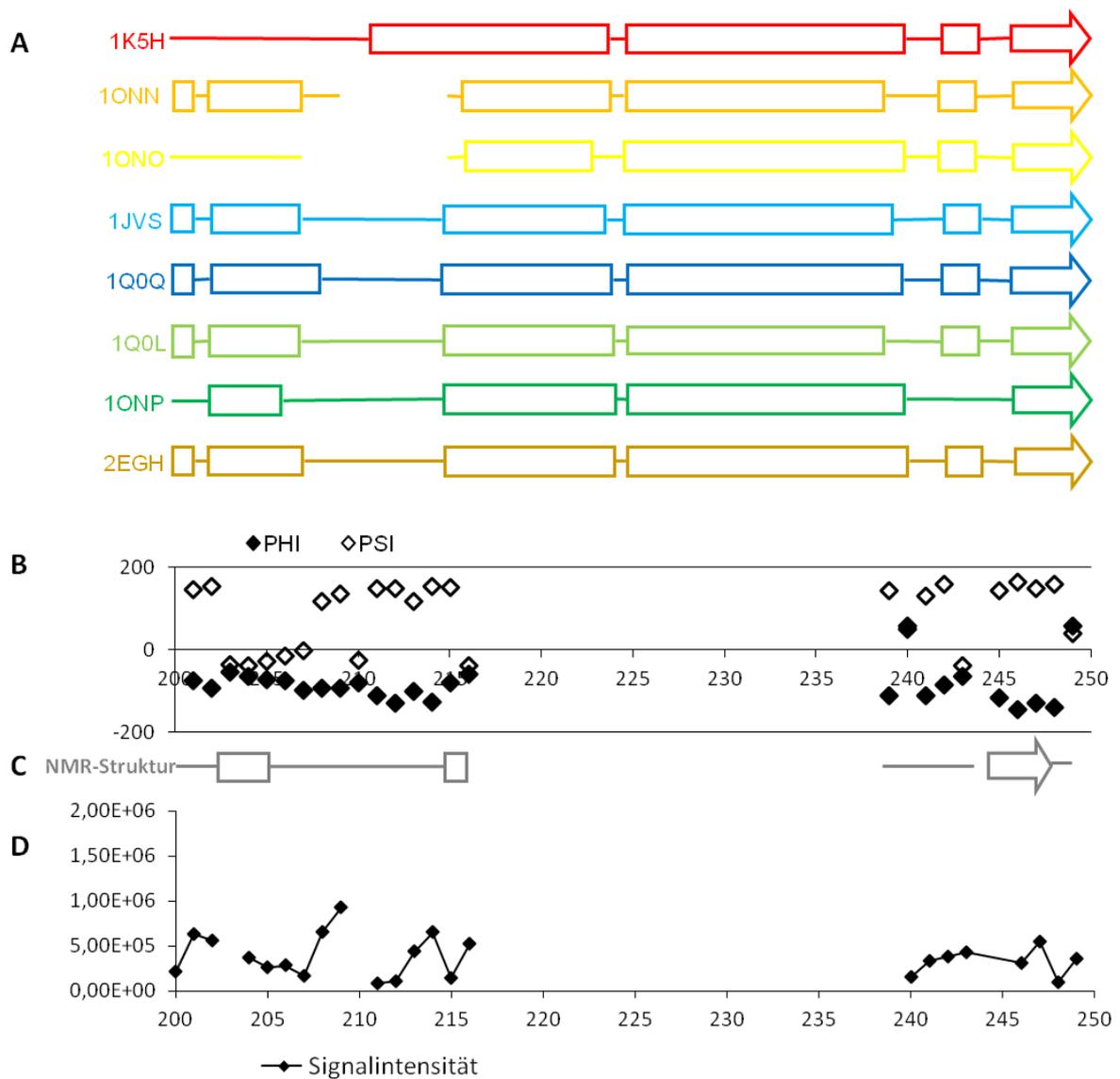


Abb. C.5 Ausschnitt aus der TALOS-Berechnung als Diagramm; DXR-Fragment AS 200 bis AS 250

- (A) Sekundärstrukturmodelle der Röntgenanalyse *Escherichia coli* DXR, Apostrukturen (rot und orange) und Strukturen mit zusätzlich Mn^{2+} im Komplex in Gelb, DXR im Komplex mit entweder Fos oder NADPH, aber nicht beiden zusammen in Blautönen, DXR in einem tertiären Komplex mit zwei Kofaktoren in Grüntönen und die DXR als quaternärer Komplex mit Fos, Mg^{2+} und NADPH in braun
- (B) Phi- und Psi-Werte aus TALOS-Berechnung als Diagramm
- (C) TALOS-Sekundärstrukturvorhersage als Sekundärstrukturschema
- (D) Signalintensitäten der TROSY-Signale

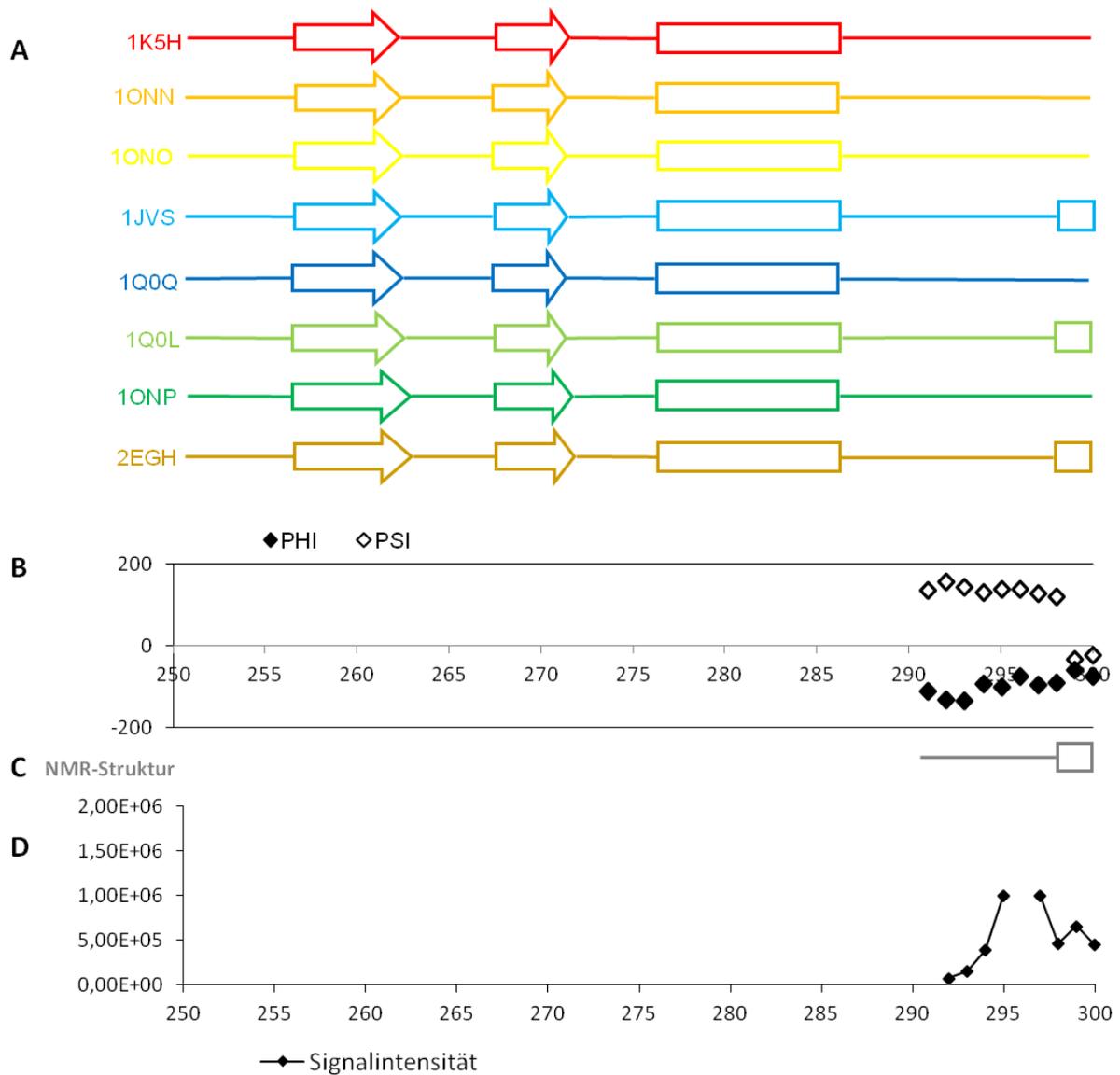


Abb. C.6 Ausschnitt aus der TALOS-Berechnung als Diagramm; DXR-Fragment AS 250 bis AS 300

- (A) Sekundärstrukturmodelle der Röntgenanalyse *Escherichia coli* DXR, Apostrukturen (rot und orange) und Strukturen mit zusätzlich Mn^{2+} im Komplex in Gelb, DXR im Komplex mit entweder Fos oder NADPH, aber nicht beiden zusammen in Blautönen, DXR in einem tertiären Komplex mit zwei Kofaktoren in Grüntönen und die DXR als quaternärer Komplex mit Fos, Mg^{2+} und NADPH in braun
- (B) Phi- und Psi-Werte aus TALOS-Berechnung als Diagramm
- (C) TALOS-Sekundärstrukturvorhersage als Sekundärstrukturschema
- (D) Signalintensitäten der TROSY-Signale

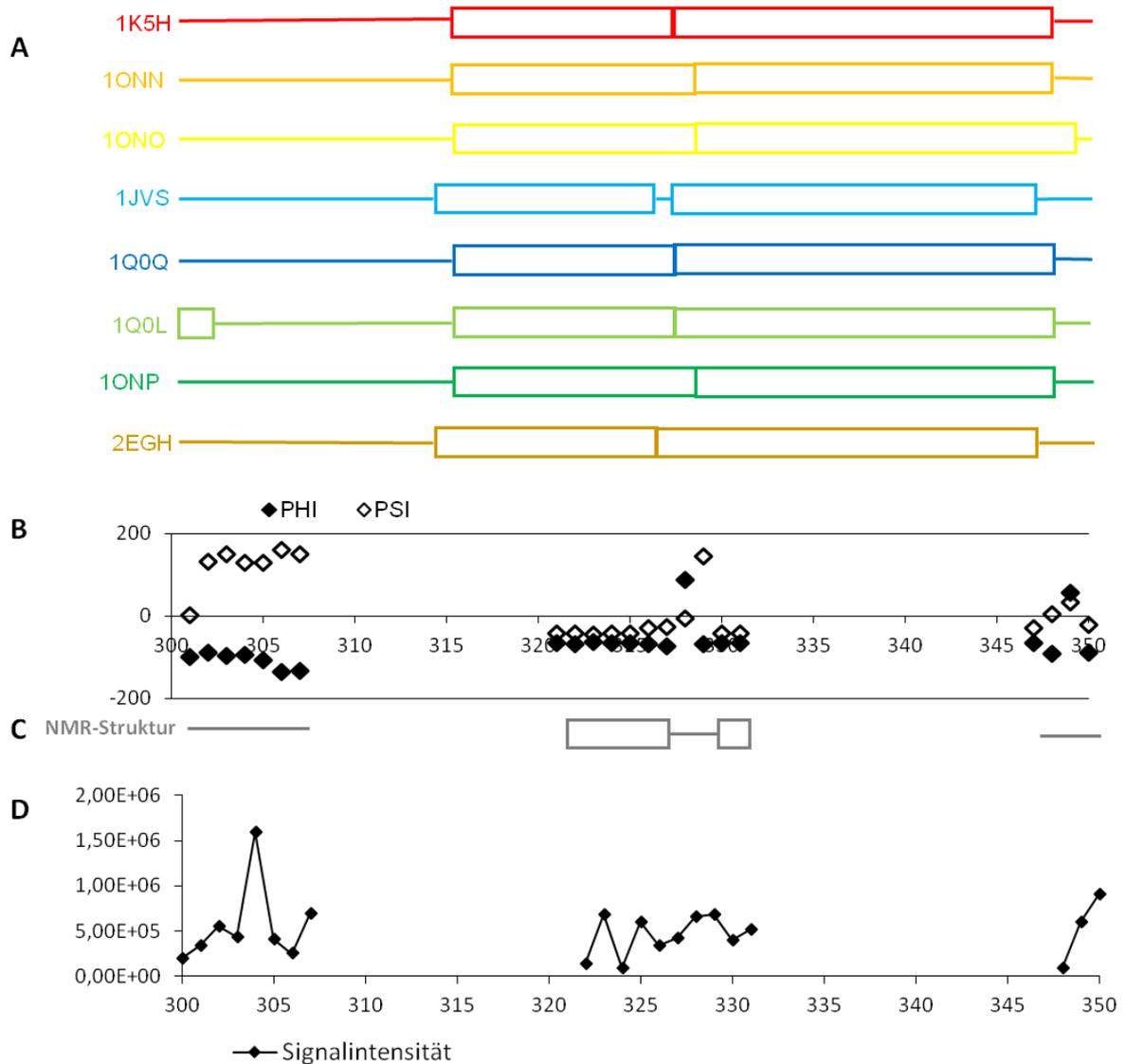


Abb. C.7 Ausschnitt aus der TALOS-Berechnung als Diagramm; DXR-Fragment AS 300 bis AS 350

- (A) Sekundärstrukturmodelle der Röntgenanalyse *Escherichia coli* DXR, Apostrukturen (rot und orange) und Strukturen mit zusätzlich Mn^{2+} im Komplex in Gelb, DXR im Komplex mit entweder Fos oder NADPH, aber nicht beiden zusammen in Blautönen, DXR in einem tertiären Komplex mit zwei Kofaktoren in Grüntönen und die DXR als quaternärer Komplex mit Fos, Mg^{2+} und NADPH in braun
- (B) Phi- und Psi-Werte aus TALOS-Berechnung als Diagramm
- (C) TALOS-Sekundärstrukturvorhersage als Sekundärstrukturschema
- (D) Signalintensitäten der TROSY-Signale

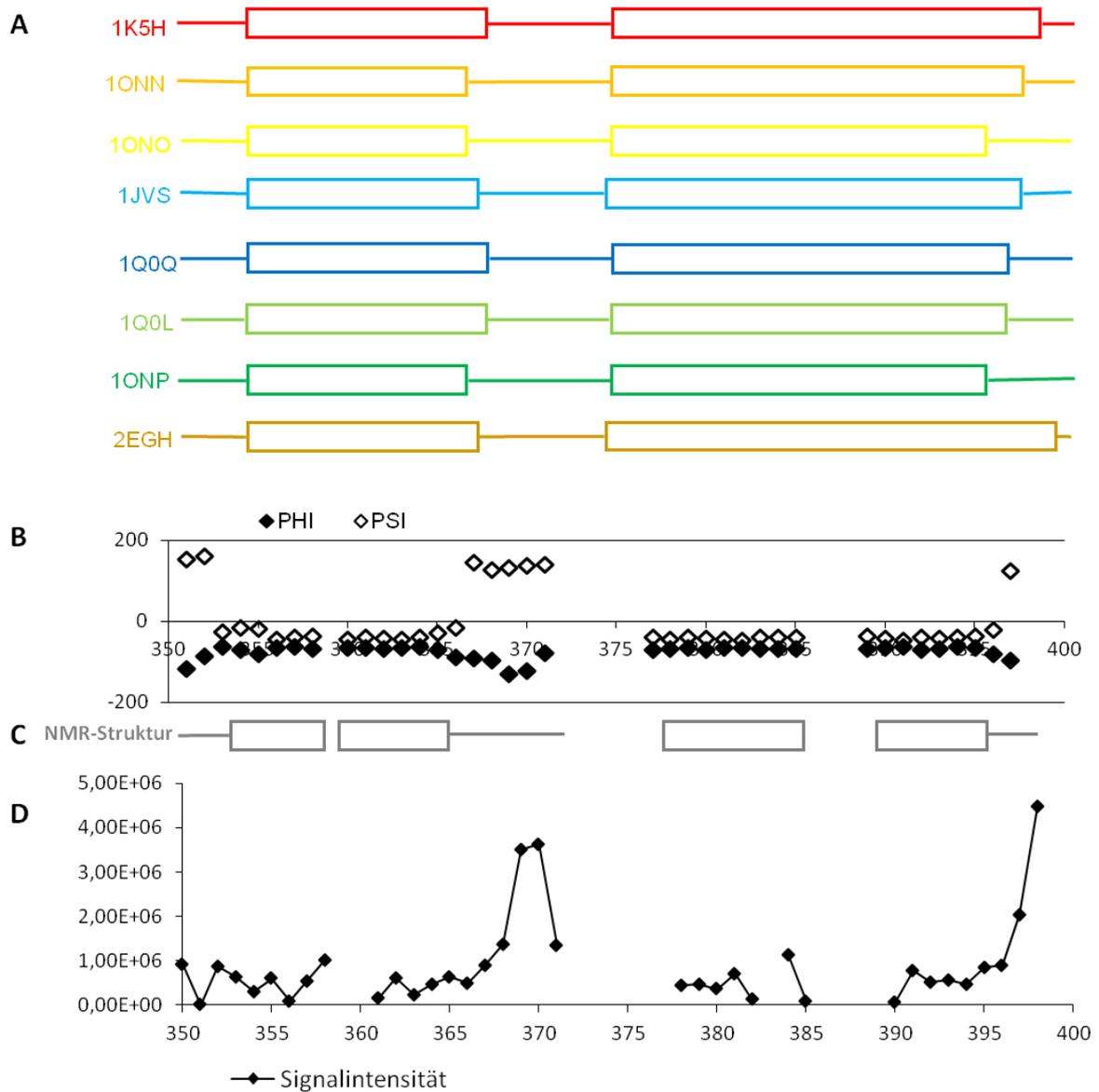


Abb. C.8 Ausschnitt aus der TALOS-Berechnung als Diagramm; DXR-Fragment AS 350 bis AS 400

- (A) Sekundärstrukturmodelle der Röntgenanalyse *Escherichia coli* DXR, Apostrukturen (rot und orange) und Strukturen mit zusätzlich Mn^{2+} im Komplex in Gelb, DXR im Komplex mit entweder Fos oder NADPH, aber nicht beiden zusammen in Blautönen, DXR in einem tertiären Komplex mit zwei Kofaktoren in Grüntönen und die DXR als quaternärer Komplex mit Fos, Mg^{2+} und NADPH in braun
- (B) Phi- und Psi-Werte aus TALOS-Berechnung als Diagramm
- (C) TALOS-Sekundärstrukturvorhersage als Sekundärstrukturschema
- (D) Signalintensitäten der TROSY-Signale

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Mevalonatweg und DOXP-Weg	2
Abb. 1.2	DXS-Reaktion und ihr Kristallstrukturmodell (2O1S).....	4
Abb. 1.3	DXR-Reaktion und ihr Kristallstrukturmodell (2EGH).....	4
Abb. 1.4	IspD-Reaktion und ihr Kristallstrukturmodell (1INI).....	5
Abb. 1.5	IspE-Reaktion und ihr Kristallstrukturmodell (2V2Z).....	6
Abb. 1.6	IspF-Reaktion und ihr Kristallstrukturmodell (1H48)	7
Abb. 1.7	IspG-Reaktion und ihr Kristallstrukturmodell (3NOY)	8
Abb. 1.8	IspH-Reaktion und ihr Kristallstrukturmodell (3DNF)	9
Abb. 1.9	Mechanismus der Synthese von MEP aus DOXP	11
Abb. 1.10	Postulierte Mechanismen zur Bildung des Intermediates 2C-methyl-D-erythrose 4-phosphat und des Produktes MEP	12
Abb. 1.11	Schematische Darstellung des Aufbaus der DXR aus <i>Escherichia coli</i>	13
Abb. 1.12	Schema eines Erythrozyten (rot), der mit <i>Plasmodium</i> (hellblau) infiziert ist.	24
Abb. 1.13	Verbreitungsgebiete von Malaria nach WHO 2009	25
Abb. 1.14	Strukturelle Ähnlichkeit von Fosmidomycin zu 2C-Methyl-D-erythrose-4- phosphat (ÜP) und von FR900098 zu DOXP	27
Abb. 1.15	Durchschnittliche Verteilung der chemischen ¹³ C-Verschiebungen der Aminosäuren.....	40
Abb. 2.1	pREP-4 Plasmidkarte mit <i>lacI</i> -Gen zur Herstellung ausreichender Mengen des Lac Repressor [123].....	53
Abb. 2.2	pQE-60 Vektorkarte mit Klonierungsstelle (MCS) und Schnittstellen für <i>Escherichia coli</i> DXR [123].....	54
Abb. 2.3	Strukturen von [3,3-2H]-13C α -Ketobutyrat, [3-2H]-13C α -Ketoisovalerat, (1H- δ 1- Methyl)-Isoleucin, (1H-Methyl)-Leucin und (1H- γ -Methyl)-Valin.	58
Abb. 2.4	Verschließen der NMR-Röhrchen	62

Abb. 2.5	Magnetisierungstransfer HSQC	66
Abb. 2.6	Magnetisierungstransfer TROSY	67
Abb. 2.7	Magnetisierungstransfer HMQC	68
Abb. 2.8	Magnetisierungstransfer HNCO	70
Abb. 2.9	Magnetisierungstransfer HNCA(CO)	71
Abb. 2.10	Magnetisierungstransfer HNCA	72
Abb. 2.11	Magnetisierungstransfer HN(CO)CA	73
Abb. 2.12	Magnetisierungstransfer HNCACB	74
Abb. 2.13	Magnetisierungstransfer HN(CO)CACB	75
Abb. 2.14	Magnetisierungstransfer HNCCC(CO)NH-TOCSY	77
Abb. 2.15	Magnetisierungstransfer (H)C(CCO)NH	78
Abb. 2.16	Magnetisierungstransfer HMCM(CB)CA	79
Abb. 2.17	Magnetisierungstransfer HMCM(CBCA)CO	80
Abb. 2.18	Magnetisierungstransfer ¹⁵ N-NOESY-TROSY	81
Abb. 2.19	Magnetisierungstransfer NOESY-13C-HMQC	82
Abb. 3.1	Optimierung der Proteinexpression	86
Abb. 3.2	Aufreinigung der DXR: Chromatographie über eine DEAE-Matrix	88
Abb. 3.3	Aufreinigung der DXR: Chromatographie über eine Source 15Q-Matrix	89
Abb. 3.4	Aufreinigung der DXR: Chromatographie über eine Superdex200-Matrix	90
Abb. 3.5	Optimierung der Aufreinigung der DOXP-Reduktoisomerase für die NMR- Experimente	92
Abb. 3.6	Optimierung der Aufreinigung der DOXP-Reduktoisomerase für die NMR- Experimente	93
Abb. 3.7	Optimierung der Aufreinigung der DOXP-Reduktoisomerase für die NMR- Experimente	94

Abb. 3.8	Optimierung der Aufreinigung der DOXP-Reduktoisomerase für die NMR-Experimente.....	96
Abb. 3.9	Massenspektrum der ^{15}N , ^{13}C und ^2H markierten Proben	97
Abb. 3.10	Massenspektrum der ^{15}N , ^{13}C und ^2H markierten Proben mit Ile, Leu, Val endständigen Methylgruppen selektiv ^1H -markiert.....	98
Abb. 3.11	optimiertes ^{15}N , 1H-TROSY der DOXP-Reduktoisomerase	101
Abb. 3.12	ein HNCACB-Fragment zur Darstellung der Konnektivität im <i>Stripscope</i>	104
Abb. 3.13	Zwei Beispiele für je eine Aminosäure und der jeweiligen Vorgängeraminosäure	106
Abb. 3.14	NOESY- ^{15}N -TROSY-Fragment	107
Abb. 3.15	Ausschnitt aus der 2D-Ebene aus dem 3D-NOESY- ^{15}N -TROSY	108
Abb. 3.16	NOESY- ^{13}C -HMQC von der methyl-selektiv-markierten DXR-Probe	109
Abb. 3.17	Primärsequenz der <i>Escherichia coli</i> DXR	111
Abb. 3.18	TROSY-Spektrum gesamt.....	112
Abb. 3.19	TROSY-Spektrum Ausschnitt von 116,9 ppm bis 120,4 ppm.....	113
Abb. 3.20	Kristallstrukturmodell 2EGH	114
Abb. 3.21	NOESY „strips“ in $^1\text{H}/^1\text{H}$ Dimension.....	115
Abb. 3.22	$^1\text{H}/^{15}\text{N}$ TROSY der DXR, Struktur von NADPH oben links dargestellt	117
Abb. 3.23	Ausschnitt aus der TALOS-Berechnung als Diagramm; DXR-Fragment AS 150 bis AS 250.	118
Abb. B.1	TROSY-Spektrum Ausschnitt von 101,8 ppm bis 111,0 ppm.....	134
Abb. B.2	TROSY-Spektrum Ausschnitt von 110,0 ppm bis 117,8 ppm.....	135
Abb. B.3	TROSY-Spektrum Ausschnitt von 119,8 ppm bis 124,0 ppm.....	136
Abb. B.4	TROSY-Spektrum Ausschnitt von 123,5 ppm bis 127,6 ppm.....	137
Abb. B.5	TROSY-Spektrum Ausschnitt von 126,8 ppm bis 130,5 ppm.....	138

Abb. C.1	Ausschnitt aus der TALOS-Berechnung als Diagramm; DXR-Fragment AS 1 bis AS 50	139
Abb. C.2	Ausschnitt aus der TALOS-Berechnung als Diagramm; DXR-Fragment AS 50 bis AS 100	140
Abb. C.3	Ausschnitt aus der TALOS-Berechnung als Diagramm; DXR-Fragment AS 100 bis AS 150	141
Abb. C.4	Ausschnitt aus der TALOS-Berechnung als Diagramm; DXR-Fragment AS 150 bis AS 200	142
Abb. C.5	Ausschnitt aus der TALOS-Berechnung als Diagramm; DXR-Fragment AS 200 bis AS 250	143
Abb. C.6	Ausschnitt aus der TALOS-Berechnung als Diagramm; DXR-Fragment AS 250 bis AS 300	144
Abb. C.7	Ausschnitt aus der TALOS-Berechnung als Diagramm; DXR-Fragment AS 300 bis AS 350	145
Abb. C.8	Ausschnitt aus der TALOS-Berechnung als Diagramm; DXR-Fragment AS 350 bis AS 400	146

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1	Katalytische Eigenschaften der Wildtyp-DXR sowie verschiedener Mutanten,...	16
Tabelle 1.2	Verteilung des DOXP- und des Mevalonatweges in den Organismengruppen der Archaea und Prokaryonten, modifiziert nach [7].	20
Tabelle 1.3	Verteilung des DOXP- und des Mevalonatweges in den Organismengruppen der Eukaryonten, modifiziert nach [7].	22
Tabelle 1.4	NMR-Methode in Abhängigkeit der Proteingröße, nach [117].	34
Tabelle 1.5	3D Experimente zur Zuordnung der Hauptkette und der Seitenketten, nach [117].	41
Tabelle 2.1	Gradient der DEAE-Anionenaustauschchromatographie.	59
Tabelle 2.2	Gradient der Source 15Q-Anionenaustauschchromatographie.	60
Tabelle 2.3	Zusammensetzung der SDS-Gele.	64
Tabelle 3.1	Deuterierungsgrad.	98
Tabelle 3.2	Anzahl der Peaks, die im jeweiligen Experiment gepickt werden konnten.	102
Tabelle 3.3	Anzahl der jeweiligen AS der DXR und der Anzahl an zugeordneten AS.	110
Tabelle 3.4	chemische Verschiebung der NADPH-Protonen, für die Kreuzsignale zu Amidgruppen der DXR gemessen wurden.	116
Tabelle A.1	zur Primärsequenz der DXR zugeordnete Aminosäuren und die chemischen Verschiebungen der Heteroatome des Proteinrückgrades.	122
Tabelle A.2	Aminosäuren deren Seitenketten-Heteroatome partiell zugeordnet werden konnten mit chemischer Verschiebung der Heteroatome.	130

Literaturverzeichnis

1. Rohmer M.: **The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants.** *Nat Prod Rep* 1999, 16(5):565-574.
2. Kuzuyama T., Seto H.: **Diversity of the biosynthesis of the isoprene units.** *Nat Prod Rep* 2003, 20(2):171-183.
3. Sacchettini J.C., Poulter C.D.: **Creating isoprenoid diversity.** *Science* 1997, 277(5333):1788-1789.
4. Rohmer M., Knani M., Simonin P., Sutter B., Sahm H.: **Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate.** *Biochem J* 1993, 295 (Pt 2):517-524.
5. Goldstein J.L., Brown M.S.: **Regulation of the mevalonate pathway.** *Nature* 1990, 343(6257):425-430.
6. Rodriguez-Concepcion M., Boronat A.: **Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics.** *Plant Physiol* 2002, 130(3):1079-1089.
7. Eisenreich W., Bacher A., Arigoni D., Rohdich F.: **Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway.** *Cell Mol Life Sci* 2004, 61(12):1401-1426.
8. Sprenger G.A., Schörken U., Wiegert T., Grolle S., de Graaf A.A., Taylor S.V., Begley T.P., Bringer-Meyer S., Sahm H.: **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* 1997, 94(24):12857-12862.
9. Brammer L.A., Smith J.M., Wade H., Meyers C.F.: **1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase catalyzes a novel random sequential mechanism.** *J Biol Chem* 2011, 286(42):36522-36531.
10. Xiang S., Usunow G., Lange G., Busch M., Tong L.: **Crystal structure of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase, a crucial enzyme for isoprenoids biosynthesis.** *J Biol Chem* 2007, 282(4):2676-2682.
11. Fiedler E., Thorell S., Sandalova T., Golbik R., König S., Schneider G.: **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* 2002, 99(2):591-595.
12. Yajima S., Hara K., Iino D., Sasaki Y., Kuzuyama T., Ohsawa K., Seto H.: **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* 2007, 63(Pt 6):466-470.
13. Richard S.B., Bowman M.E., Kwiatkowski W., Kang I., Chow C., Lillo A.M., Cane D.E., Noel J.P.: **Structure of 4-diphosphocytidyl-2-C- methylerythritol synthetase involved in mevalonate- independent isoprenoid biosynthesis.** *Nat Struct Biol* 2001, 8(7):641-648.
14. Gabrielsen M., Kaiser J., Rohdich F., Eisenreich W., Laupitz R., Bacher A., Bond C.S., Hunter W.N.: **The crystal structure of a plant 2C-methyl-D-erythritol 4-phosphate**

- cytidyltransferase exhibits a distinct quaternary structure compared to bacterial homologues and a possible role in feedback regulation for cytidine monophosphate.** *FEBS J* 2006, 273(5):1065-1073.
15. Gabrielsen M., Bond C.S., Hallyburton I., Hecht S., Bacher A., Eisenreich W., Rohdich F., Hunter W.N.: **Hexameric 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* 2004, 279(50):52753-52761.
 16. Richard S.B., Lillo A.M., Tetzlaff C.N., Bowman M.E., Noel J.P., Cane D.E.: **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* 2004, 43(38):12189-12197.
 17. Miallau L., Alphey M.S., Kemp L.E., Leonard G.A., McSweeney S.M., Hecht S., Bacher A., Eisenreich W., Rohdich F., Hunter W.N.: **Biosynthesis of isoprenoids: crystal structure of 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol kinase.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, 100(16):9173-9178.
 18. Wada T., Kuzuyama T., Satoh S., Kuramitsu S., Yokoyama S., Unzai S., Tame J.R., Park S.Y.: **Crystal structure of 4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol kinase, an enzyme in the non-mevalonate pathway of isoprenoid synthesis.** *J Biol Chem* 2003, 278(32):30022-30027.
 19. Sgraja T., Alphey M.S., Ghilagaber S., Marquez R., Robertson M.N., Hemmings J.L., Lauw S., Rohdich F., Bacher A., Eisenreich W., Illarionova V., Hunter W.N.: **Characterization of Aquifex aeolicus 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-d-erythritol kinase - ligand recognition in a template for antimicrobial drug discovery.** *FEBS J* 2008, 275(11):2779-2794.
 20. Kemp L.E., Bond C.S., Hunter W.N.: **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* 2002, 99(10):6591-6596.
 21. Kishida H., Wada T., Unzai S., Kuzuyama T., Takagi M., Terada T., Shirouzu M., Yokoyama S., Tame J.R., Park S.Y.: **Structure and catalytic mechanism of 2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate (MECDP) synthase, an enzyme in the non-mevalonate pathway of isoprenoid synthesis.** *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2003, 59(Pt 1):23-31.
 22. Ni S., Robinson H., Marsing G.C., Bussiere D.E., Kennedy M.A.: **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* 2004, 60(Pt 11):1949-1957.
 23. Richard S.B., Ferrer J.L., Bowman M.E., Lillo A.M., Tetzlaff C.N., Cane D.E., Noel J.P.: **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* 2002, 277(10):8667-8672.
 24. Steinbacher S., Kaiser J., Wungsintaweekul J., Hecht S., Eisenreich W., Gerhardt S., Bacher A., Rohdich F.: **Structure of 2C-methyl-d-erythritol-2,4-cyclodiphosphate synthase involved in mevalonate-independent biosynthesis of isoprenoids.** *J Mol Biol* 2002, 316(1):79-88.

25. Lee M., Gräwert T., Quitterer F., Rohdich F., Eppinger J., Eisenreich W., Bacher A., Groll M.: **Biosynthesis of isoprenoids: crystal structure of the [4Fe-4S] cluster protein IspG.** *J Mol Biol* 2010, 404(4):600-610.
26. Rekittke I., Nonaka T., Wiesner J., Demmer U., Warkentin E., Jomaa H., Ermler U.: **Structure of the E-1-hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphate synthase (GcpE) from *Thermus thermophilus*.** *FEBS Lett* 2011.
27. Xu W., Lees N.S., Adedeji D., Wiesner J., Jomaa H., Hoffman B.M., Duin E.C.: **Paramagnetic intermediates of (E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate synthase (GcpE/IspG) under steady-state and pre-steady-state conditions.** *J Am Chem Soc* 2010, 132(41):14509-14520.
28. Röhrich R.C., Englert N., Troschke K., Reichenberg A., Hintz M., Seeber F., Balconi E., Aliverti A., Zanetti G., Köhler U., Pfeiffer M., Beck E., Jomaa H., Wiesner J.: **Reconstitution of an apicoplast-localised electron transfer pathway involved in the isoprenoid biosynthesis of *Plasmodium falciparum*.** *FEBS Lett* 2005, 579(28):6433-6438.
29. Xiao Y., Zhao Z.K., Liu P.: **Mechanistic studies of IspH in the deoxyxylulose phosphate pathway: heterolytic C-O bond cleavage at C4 position.** *J Am Chem Soc* 2008, 130(7):2164-2165.
30. Rekittke I., Wiesner J., Röhrich R., Demmer U., Warkentin E., Xu W., Troschke K., Hintz M., No J.H., Duin E.C., Oldfield E., Jomaa H., Ermler U.: **Structure of (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl diphosphate reductase, the terminal enzyme of the non-mevalonate pathway.** *J Am Chem Soc* 2008, 130(51):17206-17207.
31. Gräwert T., Rohdich F., Span I., Bacher A., Eisenreich W., Eppinger J., Groll M.: **Structure of active IspH enzyme from *Escherichia coli* provides mechanistic insights into substrate reduction.** *Angew Chem Int Ed Engl* 2009, 48(31):5756-5759.
32. Wolff M., Seemann M., Grosdemange-Billiard C., Tritsch D., Campos N., Rodriguez-Concepcion M., Boronat A., Rohmer M.: **Isoprenoid biosynthesis via the methylerythritol phosphate pathway. (E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate: chemical synthesis and formation from methylerythritol cyclodiphosphate by a cell-free system from *Escherichia coli*.** *Tetrahedron Letters* 2002, 43(14):2555-2559.
33. Puan K.J., Wang H., Dairi T., Kuzuyama T., Morita C.T.: **fldA is an essential gene required in the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis.** *FEBS Lett* 2005, 579(17):3802-3806.
34. Okada K., Hase T.: **Cyanobacterial non-mevalonate pathway: (E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate synthase interacts with ferredoxin in *Thermosynechococcus elongatus* BP-1.** *J Biol Chem* 2005, 280(21):20672-20679.
35. Durbecq V., Sainz G., Oudjama Y., Clantin B., Bompard-Gilles C., Tricot C., Caillet J., Stalon V., Droogmans L., Villeret V.: **Crystal structure of isopentenyl diphosphate:dimethylallyl diphosphate isomerase.** *EMBO J* 2001, 20(7):1530-1537.
36. Wouters J., Oudjama Y., Barkley S.J., Tricot C., Stalon V., Droogmans L., Poulter C.D.: **Catalytic mechanism of *Escherichia coli* isopentenyl diphosphate isomerase involves Cys-67, Glu-116, and Tyr-104 as suggested by crystal structures of complexes with transition state analogues and irreversible inhibitors.** *J Biol Chem* 2003, 278(14):11903-11908.

37. Zhang C., Liu L., Xu H., Wei Z., Wang Y., Lin Y., Gong W.: **Crystal structures of human IPP isomerase: new insights into the catalytic mechanism.** *J Mol Biol* 2007, 366(5):1437-1446.
38. Zheng W., Sun F., Bartlam M., Li X., Li R., Rao Z.: **The crystal structure of human isopentenyl diphosphate isomerase at 1.7 Å resolution reveals its catalytic mechanism in isoprenoid biosynthesis.** *J Mol Biol* 2007, 366(5):1447-1458.
39. de Ruyck J., Rothman S.C., Poulter C.D., Wouters J.: **Structure of Thermus thermophilus type 2 isopentenyl diphosphate isomerase inferred from crystallography and molecular dynamics.** *Biochem Biophys Res Commun* 2005, 338(3):1515-1518.
40. Steinbacher S., Kaiser J., Gerhardt S., Eisenreich W., Huber R., Bacher A., Rohdich F.: **Crystal structure of the type II isopentenyl diphosphate:dimethylallyl diphosphate isomerase from Bacillus subtilis.** *J Mol Biol* 2003, 329(5):973-982.
41. Argyrou A., Blanchard J.S.: **Kinetic and chemical mechanism of Mycobacterium tuberculosis 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate isomeroreductase.** *Biochemistry* 2004, 43(14):4375-4384.
42. Proteau P.J., Woo Y.H., Williamson R.T., Phaosiri C.: **Stereochemistry of the reduction step mediated by recombinant 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate isomeroreductase.** *Org Lett* 1999, 1(6):921-923.
43. Radykewicz T., Rohdich F., Wungsintaweekul J., Herz S., Kis K., Eisenreich W., Bacher A., Zenk M.H., Arigoni D.: **Biosynthesis of terpenoids: 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase from Escherichia coli is a class B dehydrogenase.** *FEBS Lett* 2000, 465(2-3):157-160.
44. Lauw S., Illarionova V., Bacher A., Rohdich F., Eisenreich W.: **Biosynthesis of isoprenoids: studies on the mechanism of 2C-methyl-D-erythritol-4-phosphate synthase.** *FEBS J* 2008, 275(16):4060-4073.
45. Mac Sweeney A., Lange R., Fernandes R.P., Schulz H., Dale G.E., Douangamath A., Proteau P.J., Oefner C.: **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* 2005, 345(1):115-127.
46. Reuter K., Sanderbrand S., Jomaa H., Wiesner J., Steinbrecher I., Beck E., Hintz M., Klebe G., Stubbs M.T.: **Crystal structure of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase, a crucial enzyme in the non-mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis.** *J Biol Chem* 2002, 277(7):5378-5384.
47. Steinbacher S., Kaiser J., Eisenreich W., Huber R., Bacher A., Rohdich F.: **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* 2003, 278(20):18401-18407.
48. Yajima S., Nonaka T., Kuzuyama T., Seto H., Ohsawa K.: **Crystal structure of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase complexed with cofactors: implications of a flexible loop movement upon substrate binding.** *J Biochem* 2002, 131(3):313-317.
49. Deng L., Endo K., Kato M., Cheng G., Yajima S., Song Y.: **Structures of 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Reductoisomerase/Lipophilic Phosphonate Complexes.** *ACS Medicinal Chemistry Letters* 2011, 2(2):165-170.

-
50. Henriksson L.M., Björkelid C., Mowbray S.L., Unge T.: **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* 2006, 62(Pt 7):807-813.
51. Henriksson L.M., Unge T., Carlsson J., Aqvist J., Mowbray S.L., Jones T.A.: **Structures of Mycobacterium tuberculosis 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase provide new insights into catalysis.** *J Biol Chem* 2007, 282(27):19905-19916.
52. Andaloussi M., Henriksson L.M., Więckowska A., Lindh M., Björkelid C., Larsson A.M., Suresh S., Iyer H., Srinivasa B.R., Bergfors T., Unge T., Mowbray S.L., Larhed M., Jones T.A., Karlén A.: **Design, Synthesis, and X-ray Crystallographic Studies of α -Aryl Substituted Fosmidomycin Analogues as Inhibitors of Mycobacterium tuberculosis 1-Deoxy- d -xylulose 5-Phosphate Reductoisomerase.** *Journal of Medicinal Chemistry* 2011, 54(14):4964-4976.
53. Deng L., Diao J., Chen P., Pujari V., Yao Y., Cheng G., Crick D.C., Prasad B.V.V., Song Y.: **Inhibition of 1-Deoxy- d -Xylulose-5-Phosphate Reductoisomerase by Lipophilic Phosphonates: SAR, QSAR, and Crystallographic Studies.** *Journal of Medicinal Chemistry* 2011, 54(13):4721-4734.
54. Ricagno S., Grolle S., Bringer-Meyer S., Sahm H., Lindqvist Y., Schneider G.: **Crystal structure of 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate reductoisomerase from Zymomonas mobilis at 1.9-Å resolution.** *Biochim Biophys Acta* 2004, 1698(1):37-44.
55. Takenoya M., Ohtaki A., Noguchi K., Endo K., Sasaki Y., Ohsawa K., Yajima S., Yohda M.: **Crystal structure of 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate reductoisomerase from the hyperthermophile Thermotoga maritima for insights into the coordination of conformational changes and an inhibitor binding.** *J Struct Biol* 2010, 170(3):532-539.
56. Umeda T., Tanaka N., Kusakabe Y., Nakanishi M., Kitade Y., Nakamura K.T.: **Molecular basis of fosmidomycin's action on the human malaria parasite Plasmodium falciparum.** *Scientific Reports* 2011.
57. Kuzuyama T., Takahashi S., Takagi M., Seto H.: **Characterization of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, an enzyme involved in isopentenyl diphosphate biosynthesis, and identification of its catalytic amino acid residues.** *J Biol Chem* 2000, 275(26):19928-19932.
58. Pellecchia M., Meininger D., Dong Q., Chang E., Jack R., Sem D.S.: **NMR-based structural characterization of large protein-ligand interactions.** *J Biomol NMR* 2002, 22(2):165-173.
59. Proteau P.J.: **1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase: an overview.** *Bioorg Chem* 2004, 32(6):483-493.
60. Fernandes R.P., Phaosiri C., Proteau P.J.: **Mutation in the flexible loop of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase broadens substrate utilization.** *Arch Biochem Biophys* 2005, 444(2):159-164.
61. Fernandes R.P., Proteau P.J.: **Kinetic characterization of Synechocystis sp. PCC6803 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase mutants.** *Biochim Biophys Acta* 2006, 1764(2):223-229.
62. Yajima S., Hara K., Sanders J.M., Yin F., Ohsawa K., Wiesner J., Jomaa H., Oldfield E.: **Crystallographic structures of two bisphosphonate:1-deoxyxylulose-5-phosphate reductoisomerase complexes.** *J Am Chem Soc* 2004, 126(35):10824-10825.
63. De Rosa M., Gambacorta A., Nicolaus B.: **Regularity of Isoprenoid Biosynthesis in the Ether Lipids of Archaeobacteria.** *Phytochemistry* 1980, 19(5):791-793.
-

-
64. Boucher Y., Doolittle W.F.: **The role of lateral gene transfer in the evolution of isoprenoid biosynthesis pathways.** *Mol Microbiol* 2000, 37(4):703-716.
65. Begley M., Bron P.A., Heuston S., Casey P.G., Englert N., Wiesner J., Jomaa H., Gahan C.G., Hill C.: **Analysis of the isoprenoid biosynthesis pathways in *Listeria monocytogenes* reveals a role for the alternative 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway in murine infection.** *Infect Immun* 2008, 76(11):5392-5401.
66. Begley M., Gahan C.G., Kollas A.K., Hintz M., Hill C., Jomaa H., Eberl M.: **The interplay between classical and alternative isoprenoid biosynthesis controls gammadelta T cell bioactivity of *Listeria monocytogenes*.** *FEBS Lett* 2004, 561(1-3):99-104.
67. Hahn F.M., Hurlburt A.P., Poulter C.D.: ***Escherichia coli* open reading frame 696 is idi, a nonessential gene encoding isopentenyl diphosphate isomerase.** *J Bacteriol* 1999, 181(15):4499-4504.
68. Hurtado-Guerrero R., Pena-Diaz J., Montalvetti A., Ruiz-Perez L.M., Gonzalez-Pacanowska D.: **Kinetic properties and inhibition of *Trypanosoma cruzi* 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase.** *FEBS Lett* 2002, 510(3):141-144.
69. Montalvetti A., Pena-Diaz J., Hurtado R., Ruiz-Perez L.M., Gonzalez-Pacanowska D.: **Characterization and regulation of *Leishmania major* 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase.** *Biochem J* 2000, 349(Pt 1):27-34.
70. Eberl M., Jomaa H.: **A genetic basis for human gammadelta T-cell reactivity towards microbial pathogens.** *Trends Immunol* 2003, 24(8):407-409.
71. Gardner M.J., Hall N., Fung E., White O., Berriman M., Hyman R.W., Carlton J.M., Pain A., Nelson K.E., Bowman S., Paulsen I.T., James K., Eisen J.A., Rutherford K., Salzberg S.L. *et al.*: **Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*.** *Nature* 2002, 419(6906):498-511.
72. Jomaa H., Wiesner J., Sanderbrand S., Altincicek B., Weidemeyer C., Hintz M., Turbachova I., Eberl M., Zeidler J., Lichtenthaler H.K., Soldati D., Beck E.: **Inhibitors of the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis as antimalarial drugs.** *Science* 1999, 285(5433):1573-1576.
73. Aurrecochea C., Brestelli J., Brunk B.P., Dommer J., Fischer S., Gajria B., Gao X., Gingle A., Grant G., Harb O.S., Heiges M., Innamorato F., Iodice J., Kissinger J.C., Kraemer E. *et al.* **PlasmoDB** <http://plasmodb.org/plasmo/> (2011/04/25),
74. Aurrecochea C., Brestelli J., Brunk B.P., Dommer J., Fischer S., Gajria B., Gao X., Gingle A., Grant G., Harb O.S., Heiges M., Innamorato F., Iodice J., Kissinger J.C., Kraemer E. *et al.*: **PlasmoDB: a functional genomic database for malaria parasites.** *Nucleic Acids Res* 2009, 37(Database issue):D539-543.
75. Clastre M., Goubard A., Prel A., Mincheva Z., Viaud-Massuart M.C., Bout D., Rideau M., Velge-Roussel F., Laurent F.: **The methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in coccidia: presence and sensitivity to fosmidomycin.** *Exp Parasitol* 2007, 116(4):375-384.
76. Gajria B., Bahl A., Brestelli J., Dommer J., Fischer S., Gao X., Heiges M., Iodice J., Kissinger J.C., Mackey A.J., Pinney D.F., Roos D.S., Stoeckert C.J., Jr., Wang H., Brunk B.P.: **ToxoDB: an integrated *Toxoplasma gondii* database resource.** *Nucleic Acids Res* 2008, 36(Database issue):D553-556.
77. Gajria B., Bahl A., Brestelli J., Dommer J., Fischer S., Gao X., Heiges M., Iodice J., Kissinger J.C., Mackey A.J., Pinney D.F., Roos D.S., Stoeckert C.J., Jr., Wang H., Brunk B.P. **ToxoDB.** <http://toxodb.org/toxo/> (2011/04/25),
-

-
78. Disch A., Schwender J., Muller C., Lichtenthaler H.K., Rohmer M.: **Distribution of the mevalonate and glyceraldehyde phosphate/pyruvate pathways for isoprenoid biosynthesis in unicellular algae and the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6714.** *Biochem J* 1998, 333 (Pt 2):381-388.
79. Mine Y., Kamimura T., Nonoyama S., Nishida M., Goto S., Kuwahara S.: **In vitro and in vivo antibacterial activities of FR-31564, a new phosphonic acid antibiotic.** *J Antibiot (Tokyo)* 1980, 33(1):36-43.
80. Wiesner J., Reichenberg A., Heinrich S., Schlitzer M., Jomaa H.: **The plastid-like organelle of apicomplexan parasites as drug target.** *Curr Pharm Des* 2008, 14(9):855-871.
81. Eoh H., Brennan P.J., Crick D.C.: **The Mycobacterium tuberculosis MEP (2C-methyl-d-erythritol 4-phosphate) pathway as a new drug target.** *Tuberculosis (Edinb)* 2009, 89(1):1-11.
82. Jackson E.R., Dowd C.S.: **Inhibition of 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase (Dxr): A Review of the Synthesis and Biological Evaluation of Recent Inhibitors.** *Curr Top Med Chem* 2012.
83. Cavalier-Smith T.: **Nucleomorphs: enslaved algal nuclei.** *Curr Opin Microbiol* 2002, 5(6):612-619.
84. Lang W.: **Malaria.** In: *Tropenmedizin in Klinik und Praxis*. Editiert von W. Lang, T. Löscher, 3 Ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2000: 10-33.
85. **WHO Parasitic Diseases: Malaria.**
http://www.who.int/vaccine_research/diseases/soa_parasitic/en/index4
(2008/09/13),
86. WHO: **WHO Report 2010 Global Tuberculosis Control.** In: *WHO Report 2010*. Editiert von W. Press. Geneva: World Health Organization (WHO); 2010: 1-205.
87. Rosenthal P.J., Miller L.H.: **The Need for New Approaches to Antimalarial Chemotherapy.** In: *Antimalarial Chemotherapy*. Editiert von P.J. Rosenthal. Totowa, New Jersey: Humana Press; 2001: 3-13.
88. **WHO Malaria Fact sheet N°94.**
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/index.html> (2011/03/05),
89. WHO: **World Malaria Report 2010.** In. Editiert von WHO; 2010.
90. Olliaro P.L., Bloland P.B.: **Clinical and Public Health - Implications of Antimalarial Drug Resistance.** In: *Antimalarial Chemotherapy*. Editiert von P.J. Rosenthal. Totowa, New Jersey: Humana Press; 2001: 65-83.
91. Okuhara M., Kuroda Y., Goto T., Okamoto M., Terano H., Kohsaka M., Aoki H., Imanaka H.: **Studies on new phosphonic acid antibiotics. III. Isolation and characterization of FR-31564, FR-32863 and FR-33289.** *J Antibiot (Tokyo)* 1980, 33(1):24-28.
92. Okuhara M., Kuroda Y., Goto T., Okamoto M., Terano H., Kohsaka M., Aoki H., Imanaka H.: **Studies on new phosphonic acid antibiotics. I. FR-900098, isolation and characterization.** *J Antibiot (Tokyo)* 1980, 33(1):13-17.
93. Kuemmerle H.P., Murakawa T., Sakamoto H., Sato N., Konishi T., De Santis F.: **Fosmidomycin, a new phosphonic acid antibiotic. Part II: 1. Human pharmacokinetics. 2. Preliminary early phase IIa clinical studies.** *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* 1985, 23(10):521-528.
-

-
94. Kuzuyama T., Shimizu T., Takahashi S., Seto H.: **Fosmidomycin, a specific inhibitor of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase in the nonmevalonate pathway for terpenoid biosynthesis.** *Tetrahedron Letters* 1998, 39(43):7913-7916.
95. Zeidler J., Schwender J., Müller C., Wiesner J., Weidemeyer C., Beck E., Jomaa H., Lichtenthaler H.K.: **Inhibition of the Non-Mevalonate 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate Pathway of Plant Isoprenoid Biosynthesis by Fosmidomycin.** *Z Naturforsch* 1998, 53 C:980-986.
96. Wiesner J., Jomaa H.: **Isoprenoid biosynthesis of the apicoplast as drug target.** *Curr Drug Targets* 2007, 8(1):3-13.
97. Koppisch A.T., Fox D.T., Blagg B.S., Poulter C.D.: **E. coli MEP synthase: steady-state kinetic analysis and substrate binding.** *Biochemistry* 2002, 41(1):236-243.
98. Haemers T., Wiesner J., Giessmann D., Verbrugghen T., Hillaert U., Ortmann R., Jomaa H., Link A., Schlitzer M., Van Calenbergh S.: **Synthesis of beta- and gamma-oxa isosteres of fosmidomycin and FR900098 as antimalarial candidates.** *Bioorg Med Chem* 2008, 16(6):3361-3371.
99. Haemers T., Wiesner J., Van Poecke S., Goeman J., Henschker D., Beck E., Jomaa H., Van Calenbergh S.: **Synthesis of alpha-substituted fosmidomycin analogues as highly potent Plasmodium falciparum growth inhibitors.** *Bioorg Med Chem Lett* 2006, 16(7):1888-1891.
100. Tsuchiya T., Ishibashi K., Terakawa M., Nishiyama M., Itoh N., Noguchi H.: **Pharmacokinetics and metabolism of fosmidomycin, a new phosphonic acid, in rats and dogs.** *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 1982, 7(1):59-64.
101. Ortmann R., Wiesner J., Reichenberg A., Henschker D., Beck E., Jomaa H., Schlitzer M.: **Acyloxyalkyl ester prodrugs of FR900098 with improved in vivo anti-malarial activity.** *Bioorg Med Chem Lett* 2003, 13(13):2163-2166.
102. Reichenberg A., Wiesner J., Weidemeyer C., Dreiseidler E., Sanderbrand S., Altincicek B., Beck E., Schlitzer M., Jomaa H.: **Diaryl ester prodrugs of FR900098 with improved in vivo antimalarial activity.** *Bioorg Med Chem Lett* 2001, 11(6):833-835.
103. Brown A.C., Parish T.: **Dxr is essential in Mycobacterium tuberculosis and fosmidomycin resistance is due to a lack of uptake.** *BMC Microbiol* 2008, 8:78.
104. Buetow L., Brown A.C., Parish T., Hunter W.N.: **The structure of Mycobacteria 2C-methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphate synthase, an essential enzyme, provides a platform for drug discovery.** *BMC Struct Biol* 2007, 7:68.
105. Sasseti C.M., Boyd D.H., Rubin E.J.: **Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis.** *Mol Microbiol* 2003, 48(1):77-84.
106. Dhiman R.K., Schaeffer M.L., Bailey A.M., Testa C.A., Scherman H., Crick D.C.: **1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (IspC) from Mycobacterium tuberculosis: towards understanding mycobacterial resistance to fosmidomycin.** *J Bacteriol* 2005, 187(24):8395-8402.
107. Uh E., Jackson E.R., San Jose G., Maddox M., Lee R.E., Boshoff H.I., Dowd C.S.: **Antibacterial and antitubercular activity of fosmidomycin, FR900098, and their lipophilic analogs.** *Bioorg Med Chem Lett* 2011, 21(23):6973-6976.
108. Lell B., Ruangweerayut R., Wiesner J., Missinou M.A., Schindler A., Baranek T., Hintz M., Hutchinson D., Jomaa H., Kremsner P.G.: **Fosmidomycin, a novel chemotherapeutic agent for malaria.** *Antimicrob Agents Chemother* 2003, 47(2):735-738.

109. Wiesner J., Henschker D., Hutchinson D.B., Beck E., Jomaa H.: **In vitro and in vivo synergy of fosmidomycin, a novel antimalarial drug, with clindamycin.** *Antimicrob Agents Chemother* 2002, 46(9):2889-2894.
110. Kremsner P.G.: **Clindamycin in malaria treatment.** *J Antimicrob Chemother* 1990, 25(1):9-14.
111. Borrmann S., Adegnika A.A., Matsiegui P.B., Issifou S., Schindler A., Mawili-Mboumba D.P., Baranek T., Wiesner J., Jomaa H., Kremsner P.G.: **Fosmidomycin-clindamycin for Plasmodium falciparum Infections in African children.** *J Infect Dis* 2004, 189(5):901-908.
112. Borrmann S., Issifou S., Esser G., Adegnika A.A., Ramharter M., Matsiegui P.B., Oyakhirome S., Mawili-Mboumba D.P., Missinou M.A., Kun J.F., Jomaa H., Kremsner P.G.: **Fosmidomycin-clindamycin for the treatment of Plasmodium falciparum malaria.** *J Infect Dis* 2004, 190(9):1534-1540.
113. Na-Bangchang K., Ruengweerayut R., Karbwang J., Chauemung A., Hutchinson D.: **Pharmacokinetics and pharmacodynamics of fosmidomycin monotherapy and combination therapy with clindamycin in the treatment of multidrug resistant falciparum malaria.** *Malar J* 2007, 6:70.
114. Oyakhirome S., Issifou S., Pongratz P., Barondi F., Ramharter M., Kun J.F., Missinou M.A., Lell B., Kremsner P.G.: **Randomized controlled trial of fosmidomycin-clindamycin versus sulfadoxine-pyrimethamine in the treatment of Plasmodium falciparum malaria.** *Antimicrob Agents Chemother* 2007, 51(5):1869-1871.
115. Ruangweerayut R., Looareesuwan S., Hutchinson D., Chauemung A., Banmairuroi V., Na-Bangchang K.: **Assessment of the pharmacokinetics and dynamics of two combination regimens of fosmidomycin-clindamycin in patients with acute uncomplicated falciparum malaria.** *Malar J* 2008, 7:225.
116. Wiesner J., Borrmann S., Jomaa H.: **Fosmidomycin for the treatment of malaria.** *Parasitol Res* 2003, 90 Suppl 2:S71-76.
117. Rule G.S., Hitchens T.K.: **Fundamentals of Protein NMR Spectroscopy.** New York: Springer; 2006.
118. Fernandez C., Wider G.: **TROSY in NMR studies of the structure and function of large biological macromolecules.** *Curr Opin Struct Biol* 2003, 13(5):570-580.
119. Ulrich E.L., Akutsu H., Doreleijers J.F., Harano Y., Ioannidis Y.E., Lin J., Livny M., Mading S., Maziuk D., Miller Z., Nakatani E., Schulte C.F., Tolmie D.E., Kent Wenger R., Yao H. *et al.*: **BioMagResBank.** *Nucleic Acids Research* 2007, 36(Database):D402-D408.
120. Pervushin K., Riek R., Wider G., Wüthrich K.: **Attenuated T2 relaxation by mutual cancellation of dipole-dipole coupling and chemical shift anisotropy indicates an avenue to NMR structures of very large biological macromolecules in solution.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, 94(23):12366-12371.
121. Keller R.: **The Computer Aided Resonance Assignment Tutorial** 1Ed.: CANTINA Verlag; 2004.
122. Cornilescu G., Delaglio F., Bax A.: **Protein backbone angle restraints from searching a database for chemical shift and sequence homology.** *J Biomol NMR* 1999, 13(3):289-302.

123. Sanderbrand S.: **Die DOXP-Reduktoisomerase von Plasmodium falciparum als neue Zielstruktur zur Entwicklung von Antimalaria-Wirkstoffen.** *Inauguraldissertation.* Gießen: Justus-Liebig Universität Gießen; 2002.
124. Dong X., Stothard P., Forsythe I.J., Wishart D.S.: **PlasMapper: a web server for drawing and auto-annotating plasmid maps.** *Nucleic Acids Res* 2004, 32(Web Server issue):W660-664.
125. Laemmli U.K.: **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature* 1970, 227(5259):680-685.
126. Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., Klenk D.C.: **Measurement of protein using bicinchoninic acid.** *Anal Biochem* 1985, 150(1):76-85.
127. Bradford M.: **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Analytical Biochemistry* 1976, 72(1-2):248-254.
128. Czisch M., Boelens R.: **Sensitivity enhancement in the TROSY experiment.** *J Magn Reson* 1998, 134(1):158-160.
129. Eletsky A., Kienhofer A., Pervushin K.: **TROSY NMR with partially deuterated proteins.** *J Biomol NMR* 2001, 20(2):177-180.
130. Rance M., Loria J.P., Palmer A.G.r.: **Sensitivity improvement of transverse relaxation-optimized spectroscopy.** *J Magn Reson* 1999, 136(1):92-101.
131. Schulte-Herbrüggen T., Sørensen O.W.: **Clean TROSY: compensation for relaxation-induced artifacts.** *J Magn Reson* 2000, 144(1):123-128.
132. Tugarinov V., Hwang P.M., Ollerenshaw J.E., Kay L.E.: **Cross-correlated relaxation enhanced ^1H [bond] ^{13}C NMR spectroscopy of methyl groups in very high molecular weight proteins and protein complexes.** *J Am Chem Soc* 2003, 125(34):10420-10428.
133. Tugarinov V., Kay L.E.: **Ile, Leu, and Val methyl assignments of the 723-residue malate synthase G using a new labeling strategy and novel NMR methods.** *J Am Chem Soc* 2003, 125(45):13868-13878.
134. Salzmann M., Pervushin K., Wider G., Senn H., Wüthrich K.: **TROSY in triple-resonance experiments: new perspectives for sequential NMR assignment of large proteins.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, 95(23):13585-13590.
135. Salzmann M., Wider G., Pervushin K., Senn H., Wüthrich K.: **TROSY-type Triple-Resonance Experiments for Sequential NMR Assignments of Large Proteins.** *J Am Chem Soc* 1999, 121(4):844-848.
136. Grzesiek S., Bax A.: **Improved 3d Triple-Resonance Nmr Techniques Applied to a 31-Kda Protein.** *Journal of Magnetic Resonance* 1992, 96(2):432-440.
137. Kay L.E., Xu G.Y., Yamazaki T.: **Enhanced-Sensitivity Triple-Resonance Spectroscopy with Minimal H₂O Saturation.** *Journal of Magnetic Resonance, Series A* 1994, 109(1):129-133
138. Schleucher J., Sattler M., Griesinger C.: **Coherence Selection by Gradients without Signal Attenuation - Application to the 3-Dimensional Hnco Experiment.** *Angewandte Chemie-International Edition in English* 1993, 32(10):1489-1491.
139. Löhr F., Rüterjans H.: **Correlation of backbone amide and side-chain (^{13}C) resonances in perdeuterated proteins.** *J Magn Reson* 2002, 156(1):10-18.
140. Carlomagno T., Maurer M., Sattler M., Schwendinger M.G., Glaser S.J., Griesinger C.: **PLUSH TACS Y: Homonuclear planar TACS Y with two-band selective shaped pulses**

- applied to α, C' transfer and $C\beta$, Caromatic correlations. *J Biomol NMR* 1996, 8(2):161-170.
141. Clowes R.T., Boucher W., Hardman C., Domaille P.J., Laue E.D.: **A 4D HCC(CO)NNH experiment for the correlation of aliphatic side-chain and backbone resonances in $^{13}C/^{15}N$ -labelled proteins** *J Biomol NMR* 1993, 3(3):349-354.
142. Logan T.M., Olejniczak E.T., Xu R.X., Fesik S.W.: **A general method for assigning NMR spectra of denatured proteins using 3D HC(CO)NH-TOCSY triple resonance experiments.** *J Biomol NMR* 1993, 3(2):225-231.
143. Lyons B.A., Montelione G.T.: **An HCCNH Triple-Resonance Experiment Using Carbon-13 Isotropic Mixing for Correlating Backbone Amide and Side-Chain Aliphatic Resonances in Isotopically Enriched Proteins.** *J Magn Reson B* 1993, 101(2):206-209.
144. Montelione G.T., Lyons B.A., Emerson S.D., Tashiro M.: **An efficient triple resonance experiment using carbon-13 isotropic mixing for determining sequence-specific resonance assignments of isotopically-enriched proteins.** *J Am Chem Soc* 1992, 114(27):10974-10975.
145. Bairoch A., Apweiler R., Wu C.H., Barker W.C., Boeckmann B., Ferro S., Gasteiger E., Huang H., Lopez R., Magrane M., Martin M.J., Natale D.A., O'Donovan C., Redaschi N., Yeh L.S.: **The Universal Protein Resource (UniProt).** *Nucleic Acids Res* 2005, 33(Database issue):D154-159.
146. Bahr U., Stahl-Zeng J., Gleitsmann E., Karas M.: **Delayed extraction time-of-flight MALDI mass spectrometry of proteins above 25,000 Da.** *J Mass Spectrom* 1997, 32(10):1111-1116.
147. Karas M., Bahr U.: **Laser desorption ionization mass spectrometry of bioorganic molecules.** *Methods Mol Biol* 1993, 17:215-228.
148. Kay L.E.: **Protein dynamics from NMR.** *Nat Struct Biol* 1998, 5 Suppl:513-517.
149. Tadeo X., Castano D., Millet O.: **Anion modulation of the $^1H/^2H$ exchange rates in backbone amide protons monitored by NMR spectroscopy.** *Protein Sci* 2007, 16(12):2733-2740.
150. Tugarinov V., Muhandiram R., Ayed A., Kay L.E.: **Four-dimensional NMR spectroscopy of a 723-residue protein: chemical shift assignments and secondary structure of malate synthase g.** *J Am Chem Soc* 2002, 124(34):10025-10035.
151. Sattler M., Schleucher J., Griesinger C.: **Heteronuclear multidimensional NMR experiments for the structure determination of proteins in solution employing pulsed field gradients.** *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 1999, 34(2):93-158.
152. Löhr F., Katsemi V., Hartleib J., Günther U., Rüterjans H.: **A strategy to obtain backbone resonance assignments of deuterated proteins in the presence of incomplete amide $^2H/^1H$ back-exchange.** *J Biomol NMR* 2003, 25(4):291-311.
153. Voet D., Voet J.G.: **Biochemistry.** New York: Wiley & Sons, INC.; 1995.
154. Reckel S., Gottstein D., Stehle J., Löhr F., Verhoefen M.K., Takeda M., Silvers R., Kainosho M., Glaubitz C., Wachtveitl J., Bernhard F., Schwalbe H., Güntert P., Dötsch V.: **Solution NMR structure of proteorhodopsin.** *Angew Chem Int Ed Engl* 2011, 50(50):11942-11946.
155. Hefke F., Bagaria A., Reckel S., Ullrich S.J., Dötsch V., Glaubitz C., Güntert P.: **Optimization of amino acid type-specific ^{13}C and ^{15}N labeling for the backbone**

-
- assignment of membrane proteins by solution- and solid-state NMR with the UPLABEL algorithm.** *J Biomol NMR* 2011, 49(2):75-84.
156. Sobhanifar S., Reckel S., Junge F., Schwarz D., Kai L., Karbyshev M., Löhr F., Bernhard F., Dötsch V.: **Cell-free expression and stable isotope labelling strategies for membrane proteins.** *J Biomol NMR* 2010, 46(1):33-43.
157. Kainosho M., Torizawa T., Iwashita Y., Terauchi T., Mei Ono A., Guntert P.: **Optimal isotope labelling for NMR protein structure determinations.** *Nature* 2006, 440(7080):52-57.
158. Luy B.: **NMR-spektroskopische Messungen an einem Megadalton-Proteinkomplex.** *Angewandte Chemie* 2007, 119(23):4292-4294.
159. Muchmore D.C., McIntosh L.P., Russell C.B., Anderson D.E., Dahlquist F.W.: **Expression and nitrogen-15 labeling of proteins for proton and nitrogen-15 nuclear magnetic resonance.** *Methods Enzymol* 1989, 177:44-73.
160. Fiaux J., Bertelsen E.B., Horwich A.L., Wüthrich K.: **Uniform and residue-specific ¹⁵N-labeling of proteins on a highly deuterated background.** *J Biomol NMR* 2004, 29(3):289-297.
161. Lee K.M., Androphy E.J., Baleja J.D.: **A novel method for selective isotope labeling of bacterially expressed proteins.** *J Biomol NMR* 1995, 5(1):93-96.
162. Varnay I., Truffault V., Djuranovic S., Ursinus A., Coles M., Kessler H.: **Optimized measurement temperature gives access to the solution structure of a 49 kDa homohexameric beta-propeller.** *J Am Chem Soc* 2010, 132(44):15692-15698.

Publikationsliste

Teilergebnisse wurden in folgender Publikation vorab veröffentlicht:

Englert N.E., Richter C., Wiesner J., Hintz M., Jomaa H., Schwalbe H.
NMR studies of DOXP reductoisomerase and its inhibitor complex.
Chembiochem. 2011 Feb 11;12(3):468-476.

weitere Publikationen:

Begley M., Bron P.A., Heuston S., Casey P.G., Englert N., Wiesner J., Jomaa H., Gahan C.G., Hill C.

Analysis of the isoprenoid biosynthesis pathways in *Listeria monocytogenes* reveals a role for the alternative 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway in murine infection.
Infect Immun. 2008 Nov;76(11):5392-401

Röhrich R.C., Englert N., Troschke K., Reichenberg A., Hintz M., Seeber F., Balconi E., Aliverti A., Zanetti G., Köhler U, Pfeiffer M., Beck E., Jomaa H., Wiesner J.

Reconstitution of an apicoplast-localised electron transfer pathway involved in the isoprenoid biosynthesis of *Plasmodium falciparum*.
FEBS Lett. 2005 Nov 21;579(28):6433-8.

Kehlen A., Englert N., Seifert A., Klonisch T., Dralle H., Langner J., Hoang-Vu C.
Expression, regulation and function of autotaxin in thyroid carcinomas.
Int J Cancer. 2004 May 10;109(6):833-8

Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich allen herzlich danken, die mir die Anfertigung dieser Arbeit ermöglicht haben und durch ihre Unterstützung wesentlich zu ihrem Gelingen beigetragen haben.

Ich danke Prof. Dr. Alfred Pingoud für die freundliche Übernahme der Erstbetreuung dieser Dissertation.

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Ewald Beck danke ich herzlich für die Unterstützung, das Ermöglichen dieser Dissertation und die zahlreichen wertvollen Gespräche.

Mein besonderer Dank geht an PD Dr. Hassan Jomaa für die Überlassung des interessanten Themas, die hervorragende Infrastruktur, die Aufnahme in die Arbeitsgruppe und das Ermöglichen dieser Dissertation.

Bei Prof. Dr. Harald Schwalbe vom Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie der Goethe Universität Frankfurt möchte ich mich herzlich für die Kooperation in diesem NMR-Projekt bedanken. Durch seine Einführung in die NMR hat er mein Interesse für dieses Gebiet geweckt. Seinen Anregungen, den zahlreiche klärenden Diskussionen und Kooperationsmeetings und die großzügige Bereitstellung von Messzeit verdanke ich einen wesentlichen Teil der vorliegenden Arbeit.

Dr. Christian Richter möchte ich danken für die Betreuung und Durchführung der NMR-Experimente, für zahlreiche Hilfestellung beim Auswerten der Spektren und beim Konzipieren neuer Experimente. Dr. Christian Schlörp danke ich ebenfalls für die Durchführung zahlreicher NMR-Experimente, für die Einarbeitung in die CARGO-Software und seine freundschaftliche Aufnahme in das Doktorandenbüro bei meinen Gastaufenthalten im AK Schwalbe. Dr. Henry Jonker danke ich für die Durchführung der TALOS-Strukturvorhersage. Bei Dr. Frank Löhr vom Institut für Biophysikalische Chemie der Goethe Universität Frankfurt bedanke ich mich für die Durchführung des HNCCNH-TOCSY-Experiments. Allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern des AK Schwalbe danke ich für ihre Hilfe bei NMR-Fragestellungen und das gute Klima.

Dr. Ute Bahr vom Institut für Pharmazeutische Chemie der Goethe Universität Frankfurt möchte ich für die massenspektrometrischen Analysen der isotopenmarkierten DXR danken.

Dr. Jochen Wiesner und Dr. Martin Hintz danke ich herzlich für die Betreuung dieser Doktorarbeit, für die fachliche Beratung und das gute Arbeitsklima.

Dr. Ingo Rekitke möchte ich herzlich danken, für die zahlreichen fachlichen Diskussionen, die guten Ratschläge und Tipps. Ganz besonders möchte ich ihm dafür danken, dass er mich unermüdlich motiviert hat diese Arbeit abzuschließen und mit mir durch alle Höhen und Tiefen, die eine solche Forschungsarbeit mit sich bringt, gegangen ist. Unvergesslich bleiben auch die schönen Diskussionen ausserhalb der Wissenschaft über Gott und die Welt, bei denen mir manche seine starken aber vor allem humorvollen Argumentationen im Gedächtnis geblieben sind und seine Nachhilfe in „Popkultur“.

Dr. Armin Reichenberg danke ich für die Bereitstellung von Fosmidomycin und FR900098 und das Recyclen von D₂O.

Sabrina Stiehler und Birte Bärmann sei für die exzellente technische Assistenz, ihre Zuverlässigkeit und den großen Beitrag zu einem guten Arbeitsklima gedankt.

Allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern des Labor Jomaa und der ehemaligen AG Beck danke ich für das gute Arbeitsklima.

Bei Sönke Graf möchte ich mich herzlich für seine freundschaftlichen Ratschläge, sein mitfiebern mit dem Fortgang dieser Arbeit und besonders für die kompetente Unterstützung bei allen Computerfragen bedanken.

Dr. Ingo Rekitke, Dr. Anne Graber, Raffael Englert, Anne Englert und Carmen Bohnacker gilt mein besonderer Dank für das Korrekturlesen des Manuskriptes. Raffael Englert danke ich zusätzlich für seinen Support mit Word und PDF.

Meiner ganzen Familie und meinen Freunden möchte ich aufs herzlichste danken für das Interesse an meiner Arbeit, die ausdauernde und tatkräftige Unterstützung und die vielen aufmunternden Worte während des Studiums, der Promotion und allen anderen Bereichen des Lebens.

Schließlich danke ich Gott, der mir Kraft und Weisheit für diese Arbeit geschenkt hat.

„In allem Streben und Forschen suche ich hinter dem Geheimnis des Lichtstrahls ehfürchtig das Geheimnis des göttlichen Geistes.“ Max Planck

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.

Gießen, 23.04.2012

Nadine E. Englert