

Reduktive Dehydroxylierung von Allylalkoholen durch IspH-Protein

Tobias Gräwert,* Ingrid Span, Adelbert Bacher und Michael Groll*

Desoxyxylulosephosphat · Eisen-Schwefel-Cluster ·
Isoprenoid-Biosynthese · IspH-Protein · LytB-Protein

Die Biosynthese von Naturstoffen ist eine Fundgrube für ungewöhnliche Reaktionsmechanismen. Neue strukturelle und mechanistische Untersuchungen machen verständlich, wie Allylalkohole im Rahmen der Terpen-Biosynthese durch das IspH-Protein reaktiv dehydroxyliert werden.

1. Einleitung

Mit mehr als 35 000 bekannten Vertretern^[1] bilden die Terpene die größte Naturstoffgruppe; sie umfasst unter anderem zahlreiche medizinisch bedeutsame Verbindungen wie Cholesterin, Steroidhormone, Vitamine und Medikamente. Die Biosynthese aller Terpene geht aus von Isopentenyl-diphosphat (IPP, **7**) und dem strukturisomeren Dimethylallyldiphosphat (DMAPP, **8**). Diese beiden Vorstufen können entweder über den Mevalonatweg oder über den erst relativ spät entdeckten Nicht-Mevalonat-Weg biosynthetisiert werden.

Global werden aus IPP und DMAPP beeindruckende Mengen an Biomasse produziert. Koniferen produzieren beispielsweise jährlich etwa 500 Megatonnen an Isopren (C_5H_8) und tragen damit wesentlich zur Aerosolbildung in der Atmosphäre bei.^[2]

Die Aufklärung des Mevalonatwegs in den 1950er Jahren war eine bahnbrechende Leistung, der in Biochemielehrbüchern typischerweise ein eigenes Kapitel gewidmet wird.^[3] Drei Acetatmoleküle, in Form von Acetyl-CoA (**11**), ergeben dabei je ein Molekül CO_2 und IPP. Letzteres liefert DMAPP über eine enzymkatalysierte Isomerisierung.

Die Hydroxyglutaryl-CoA-Reduktase des Mevalonatwegs ist der molekulare Wirkort der Statine, welche die körpereigene Cholesterinbiosynthese hemmen und eine zentrale Rolle bei der Prävention und Behandlung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen spielen.^[4] Der Jahresumsatz für 2008 betrug 26 Milliarden US-Dollar,^[5] und die Statine sind damit die umsatzstärkste Medikamentenfamilie überhaupt.

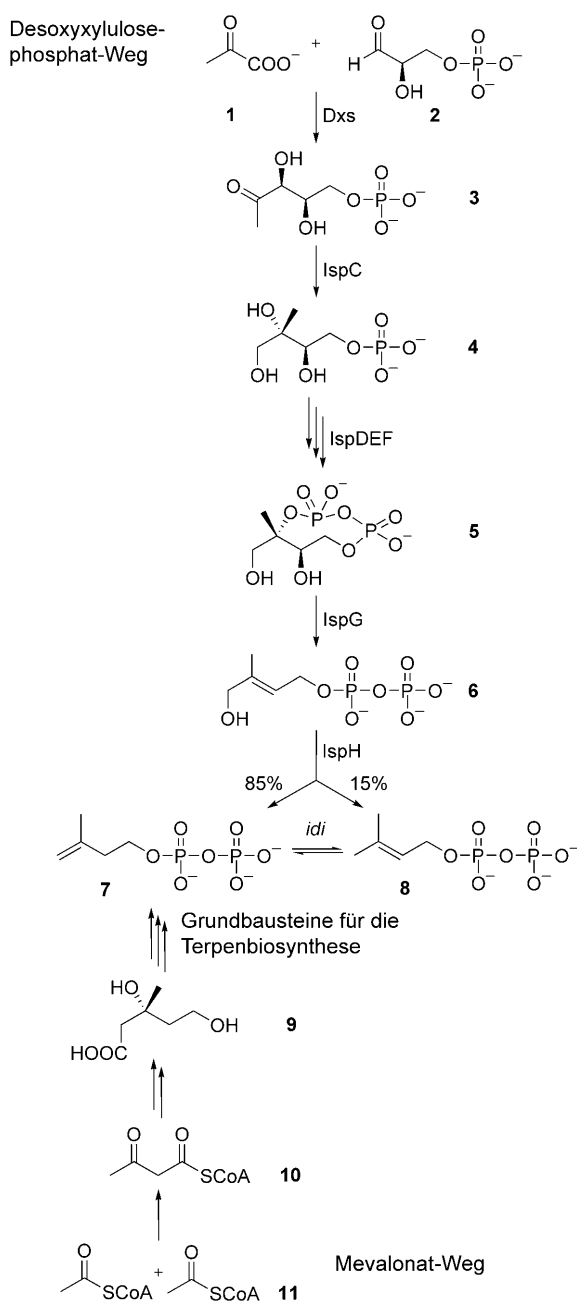
Der außerordentliche Erfolg der Mevalonatforschung hat dazu beigetragen, dass ein zweiter Isoprenoidbiosyntheseweg während mehrerer Jahrzehnte übersehen wurde. Nach den grundlegenden Entdeckungen von Rohmer, Arigoni und Mitarbeitern^[6] wurden dann jedoch die Gene, Enzyme und Intermediate des Nicht-Mevalonat-Biosynthesewegs (Schema 1) in rascher Folge aufgeklärt.^[7–10] Das aufstrebende Fachgebiet der Genomik spielte dabei eine zentrale Rolle.^[11]

2. Die späten Reaktionsschritte des Nicht-Mevalonat-Biosynthesewegs

Bei der Mevalonatbiosynthese führt die Kondensation von Acetoacetyl-CoA (**10**) mit Acetyl-CoA (**11**) direkt zu einem verzweigten C_5 -Gerüst. Beim Nicht-Mevalonat-Weg entsteht das C_5 -Gerüst für die Isoprenoidvorstufen zunächst in linearer Form, und die Verzweigung wird später durch eine Umlagerung eingeführt. Im Einzelnen entsteht durch Kondensation von Glyceraldehyd-Phosphat (**2**) mit Pyruvat (**1**) das Kohlenhydrat 1-Desoxyxylulose-Phosphat (**3**),^[8,12] das durch eine von IspC(Dxr)-Protein katalysierte Abfolge von Isomerisierung und Reduktion in 2C-Methyl-D-erythrityl-4-phosphat (**4**) umgewandelt wird.^[9] Dieses Polyol-Phosphat wird dann durch drei über Cytidin-Diphosphat-Intermediate verlaufende Enzymreaktionen in 2C-Methyl-D-erythrityl-2,4-cyclodiphosphat (**5**) umgewandelt (Schema 1).^[7,13]

Entsprechend seiner Herkunft aus einer Kohlenhydratvorstufe trägt das cyclische Diphosphat **5** mehr Sauerstoffsubstituenten als IPP und DMAPP. Da keine aktivierenden Gruppen vorhanden sind, ist die Entfernung dieser zusätzlichen Sauerstoffsubstituenten mechanistisch schwierig. Das Problem wird gelöst durch enzymkatalysierte Radikalreaktionen. Zunächst erfolgt dabei eine reduktive Öffnung des achtegliedrigen Rings durch das mit einem $[4Fe-4S]$ -Cluster ausgestattete IspG-Protein.^[14] Das Reaktionsprodukt, 1-Hy-

[*] Dr. T. Gräwert, I. Span, Prof. Dr. Dr. A. Bacher, Prof. Dr. M. Groll
Center for Integrated Protein Science, Lehrstuhl für Biochemie
Technische Universität München
Lichtenbergstraße 4, 85747 Garching (Deutschland)
Fax: (+49) 89-289-13363
E-Mail: graewert@mytum.de
michael.groll@ch.tum.de



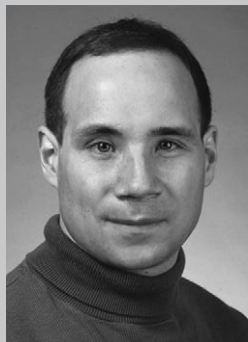
Schema 1. Isoprenoid-Biosynthese.^[20]

droxy-2-methyl-2-butenyl-4-diphosphat (HMBPP, **6**), wird dann durch das Eisen-Schwefel-Protein IspH in eine 6:1-Mischung von IPP und DMAPP überführt.^[15–18] Dieses Produktverhältnis ist signifikant verschieden vom thermodynamischen Gleichgewicht (1:3). Das Produkt der kinetisch kontrollierten IspH-Reaktion kann durch IPP-Isomerasen in das thermodynamische Gleichgewicht überführt werden;^[19] IspH-Protein selbst hat keine Isomerase-Aktivität.

Die Umwandlung von **6** in IPP und DMAPP benötigt zwei Elektronen. In Eubakterien dienen Flavodoxin-Reduktase und Flavodoxin gemeinsam als Elektronentransponder für das IspG- und/oder IspH-Protein.^[18,21] Flavodoxin ist aus diesem Grund bei *Escherichia coli* essenziell, wird jedoch entbehrlich nach Einführung eines rekombinanten Mevalonat-Biosynthese-Operons.^[21] Der (die) physiologische(n) Elektronentransponder für die Eisen-Schwefel-Proteine des Nicht-Mevalonat-Wegs in blaugrünen Algen und Pflanzenchloroplasten ist (sind) nicht ausreichend bekannt; über Komplexe zwischen Ferredoxin mit IspG-Protein von *Thermosynechocystis elongatus* oder mit IspH-Protein von *Plasmodium falciparum* und den Austausch von Elektronen zwischen den Proteinen wurde berichtet.^[22]

Die Handhabung, Reinigung und Kristallisation von IspH-Protein muss wegen der Sauerstoffempfindlichkeit des Eisen-Schwefel-Clusters unter Luftausschluss erfolgen.^[16,17] Die zeitliche Entwicklung der Literaturangaben zur spezifischen Aktivität (Abbildung 1) macht die experimentellen Schwierigkeiten sichtbar. Die höchsten Umsatzgeschwindigkeiten wurden mit nichtnatürlichen Elektronentranspondern wie Methylviologen beobachtet.^[16,23,24] Die Stabilität des Enzyms wird wesentlich erhöht durch Zugabe von Substrat im Überschuss und in Abwesenheit von Elektronendonoren.^[25]

Stereochemische Untersuchungen und der Einsatz von Substratanaloga haben wertvolle Hinweise zum Reaktionsmechanismus von IspH-Protein geliefert. Bei Verwendung von D₂O als Lösungsmittel wird Deuterium spezifisch in die H_{Si}-Position an C3 von IPP eingebaut.^[26] Das 1-Fluorderivat **12** des Enzymsubstrats **6** wird von IspH-Protein zu einer 7:1-Mischung von IPP und DMAPP umgesetzt; dieses Produktverhältnis kommt demjenigen nahe, das mit dem natürlichen Substrat HMBPP erhalten wird (6:1; Tabelle 1).^[27] Strukturanaloga mit Modifikation an C4 (**13**, **15**) können ebenfalls



Michael Groll wurde 1971 in Donauwörth geboren. Nach seiner Doktorarbeit über kristallographische und biochemische Studien des 20S-Proteasoms verbrachte er seine Postdoc-Zeit bei Prof. Robert Huber. Im Jahr 2002 kam er an die Harvard Medical School zu Prof. Finley. Nachdem er eine unabhängige Arbeitsgruppe an der Ludwigs-Maximilians-Universität München geleitet hatte, nahm er eine Professur für Biochemie an der Humboldt-Universität Berlin an. Seit 2007 hat Michael Groll einen Lehrstuhl an der TU München inne. Sein Forschungsaspekt ist die Charakterisierung multifunktionaler



Tobias Grawert wurde 1977 in München geboren. Er studierte ab 1998 Biologie an der TU München, wo er bei Prof. Bacher seine Diplomarbeit machte und 2006 promovierte. Im Jahr 2009 begann er seine Habilitation in der Arbeitsgruppe von Prof. Groll. Seine Forschungsschwerpunkte liegen auf der Charakterisierung von Eisen-Schwefel-Proteinen und der Suche nach Inhibitoren des Mevalonat-unabhängigen Wegs.

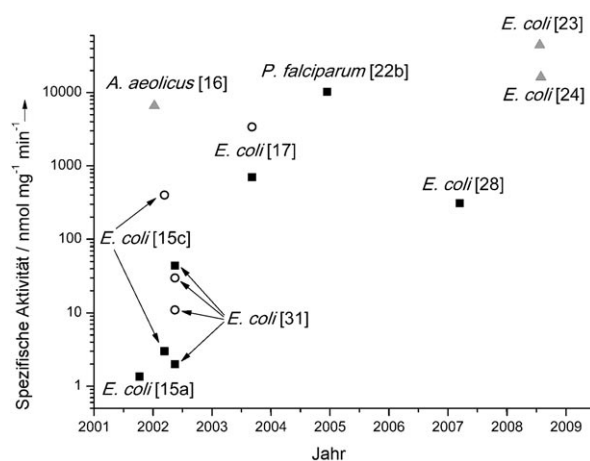

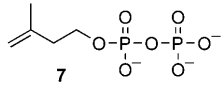
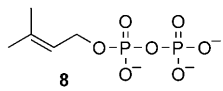

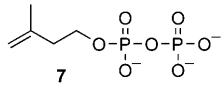
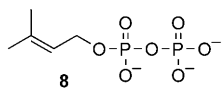

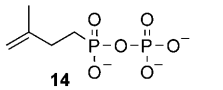

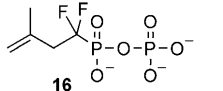


Abbildung 1. Historische Entwicklung und Literaturangaben zur spezifischen Aktivität von IspH-Protein mit NADPH (■), Methylviologen (▲) oder photoaktiviertem Deazaflavin (○) als Elektronentransponder.

Tabelle 1: Von IspH-Protein katalysierte Reaktionen.

Substrat	Produkte	k_{cat} [min ⁻¹]	K_M [μM]	Lit.
 6	 7  8 (Verhältnis 7/8 6:1)	11.6	< 15	[27]
 12	 7  8 (Verhältnis 7/8 7:1)	0.55	3950	[27]
 13	 14	0.44	< 15	[27]
 15	 16	0.022	n.d.	[28]

umgesetzt werden, liefern aber jeweils nur ein Produktisomer (**14** bzw. **16**) in messbarer Menge.^[27,28]

3. Kristallstruktur von IspH

Vor kurzem wurden Kristallstrukturen für IspH-Proteine aus *E. coli*^[23,25] und aus dem hyperthermophilen Eubakterium *Aquifex aeolicus* beschrieben (Abbildung 2).^[29] Interessan-

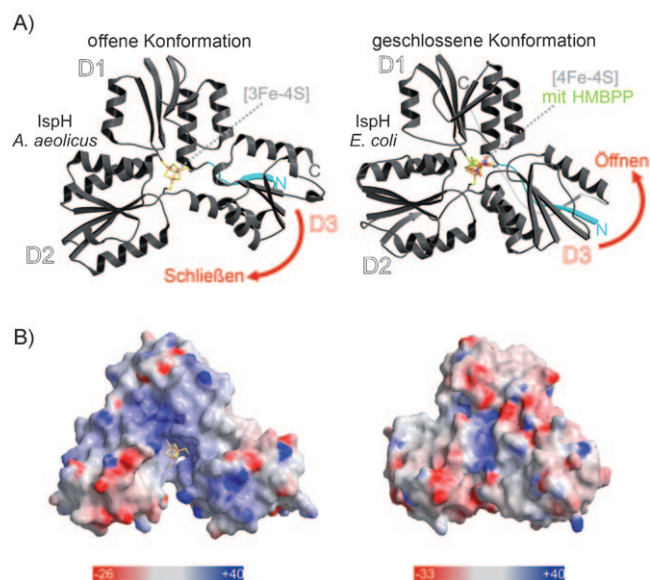


Abbildung 2. Offene und geschlossene Konformationen von IspH-Protein. Links: IspH aus *A. aeolicus*^[29] (ohne Ligand im aktiven Zentrum; PDB-Nummer 3DNF); rechts: IspH aus *E. coli*^[25] (PDB-Nummer 3KE8). A) Bändermodell; rote Pfeile zeigen die vermutete Bewegung der Domäne D3 beim Übergang zwischen der offenen und geschlossenen Konformation. B) Raumfüllende Modelle mit elektrostatischen Potentialen (in kTe⁻¹).

terweise konnte das Enzym aus *E. coli* bisher nur im Komplex mit anionischen Liganden kristallisiert werden, wogegen das Enzym aus *A. aeolicus* nur ohne Liganden am aktiven Zentrum kristallisierte.

Die IspH-Proteine von *A. aeolicus* und *E. coli* sind beide monomer, und ihre Faltungsmuster umfassen jeweils drei Domänen (D1–D3), die eine markante Pseudo-C₃-Symmetrie zeigen, obwohl sie keine Sequenzhomologie aufweisen. Zu IspH-Protein ähnliche Proteinstrukturen sind nicht bekannt. Jede Faltungsdomäne umfasst ein viersträngiges β-Faltblatt (Stränge S1–S4), das durch die α-Helices H1–H3 flankiert wird (Abbildung 2).

Beim Protein aus *E. coli* wird die pseudotrigonale Domänenanordnung stabilisiert durch ein charakteristisches Klammermotiv, das zwischen dem N- und C-Terminus gebildet wird. Das resultierende β-Faltblatt vervollständigt die cyclische Anordnung der Domänen, da der strikt konservierte N-Terminus^[23,29] den Strang S4 der Domäne D3 beisteuert und von dort aus weiterreicht bis zur Helix H1 von D1 (Abbildung 2 A). Die Deletion von 11 N-terminalen oder 30 C-terminalen Aminosäuren ergibt unlösliches Protein; dies unterstreicht die Bedeutung des Klammermotivs für die strukturelle Integrität des Proteins.^[23]

An den N-terminalen Enden aller drei Domänen lokalisierte Cysteinreste koordinieren den Eisen-Schwefel-Cluster. Ihnen folgen die jeweiligen H1-Helices, deren Makrodipol-Vektoren am Ort des [4Fe-4S]-Clusters konvergieren und dadurch ein positives Coulomb-Potential aufbauen,^[23] das seinerseits den reduzierten Zustand des Clusters stabilisiert (im Vergleich mit anorganischen Modellverbindungen). Infolge der geringfügig unterschiedlichen Domänenanordnung umfasst IspH von *E. coli* einen geschlossenen zentralen

Hohlraum, wogegen das Protein aus *A. aeolicus* in einer offenen Konformation vorliegt, in der der zentrale Hohlraum für das Lösungsmittel zugänglich ist.^[23,29]

Röntgenstrukturanalysen für das IspH-Protein aus *E. coli* liegen inzwischen vor im Komplex mit einem frühen Reaktionsintermediat (1), einem späten Reaktionsintermediat, dessen chemische Struktur noch nicht genau bekannt ist (2), den beiden Enzymprodukten IPP und DMAPP (3) sowie mit anorganischem Pyrophosphat (4) und Malonat (5).^[23] Die Polyanion-Motive der gebundenen Intermediate liegen alle am gleichen Ort innerhalb des zentralen Hohlraums und sind dort eingebettet in die polare Umgebung der Seitenketten von Histidin 41, 74 und 124, Serin 225 und 269, Threonin 168, Asparagin 227 und Glutamin 166. Die Pyrophosphat-Ester binden ausnahmslos in einer U-förmigen Konformation; dabei ist die organische Seitenkette zwischen der Pyrophosphat-Einheit und dem Eisen-Schwefel-Cluster eingeschlossen.

4. Der Eisen-Schwefel-Cluster

Die stöchiometrische Zusammensetzung des Eisen-Schwefel-Clusters im aktiven Zentrum ist in der IspH-Forschung bislang umstritten. Im Komplex mit dem frühen oder späten Reaktionsintermediat enthält IspH von *E. coli* einen [4Fe-4S]-Cluster. Andererseits kristallisiert das Protein im Komplex mit IPP, DMAPP, anorganischem Pyrophosphat oder Malonat reproduzierbar mit [3Fe-4S]-Cluster.^[23,25] Wichtig ist auch, dass das *Aquifex*-Enzym in einer offenen Konformation mit einem [3Fe-4S]-Cluster kristallisiert.^[29]

Mößbauer- und ESR-Spektroskopie hatten frühzeitig Hinweise auf [4Fe-4S]-Cluster (Abbildung 3) im katalytisch aktiven Enzym geliefert.^[30–32] Mößbauer-Spektren von intakten Bakterienzellen mit einem hohen Gehalt an rekombinantem IspH-Protein wurden im Sinne von [4Fe-4S]-IspH interpretiert.^[30] Andererseits wurde aber auf der Grundlage von ESR-Spektren auch über katalytisch aktives *E.-coli*-Protein mit [3Fe-4S]-Cluster berichtet.^[17] Derzeit erscheinen in der kontroversen Diskussion um den Eisengehalt die folgenden Punkte konsensfähig:

1. [4Fe-4S]-Cluster ermöglichen einen Reaktionsverlauf über ein Alkoxid-Intermediat (siehe Schema 2B).
2. [4Fe-4S]-IspH verliert relativ leicht das apikale Eisen-Ion, das von keiner Aminosäure koordiniert wird; in Abwesenheit von Elektronendonoren wird die Sauerstoff-Empfindlichkeit von IspH-Protein aus *E. coli* wesentlich verringert durch Komplexierung mit Substrat, was vermutlich durch Schutz des [4Fe-4S]-Clusters zu erklären ist.^[25]
3. Möglicherweise liefert die Isolierung von IspH-Protein aus rekombinanten Hyperexpressionsstämmen Mischungen von [3Fe-4S]- und [4Fe-4S]-Protein, wenn die zellulären Systeme für die Biosynthese von Eisen-Schwefel-Clustern angesichts der gesteigerten Apoprotein-Produktion nicht über ausreichende Kapazität verfügen; dieser Fall könnte selbst bei gleichzeitiger Expression des *isc*-Operons eintreten.^[17,33]
4. Andererseits führt eventuell auch die In-vitro-Rekonstitution von aktivem IspH-Protein aus Apoprotein zu Mi-

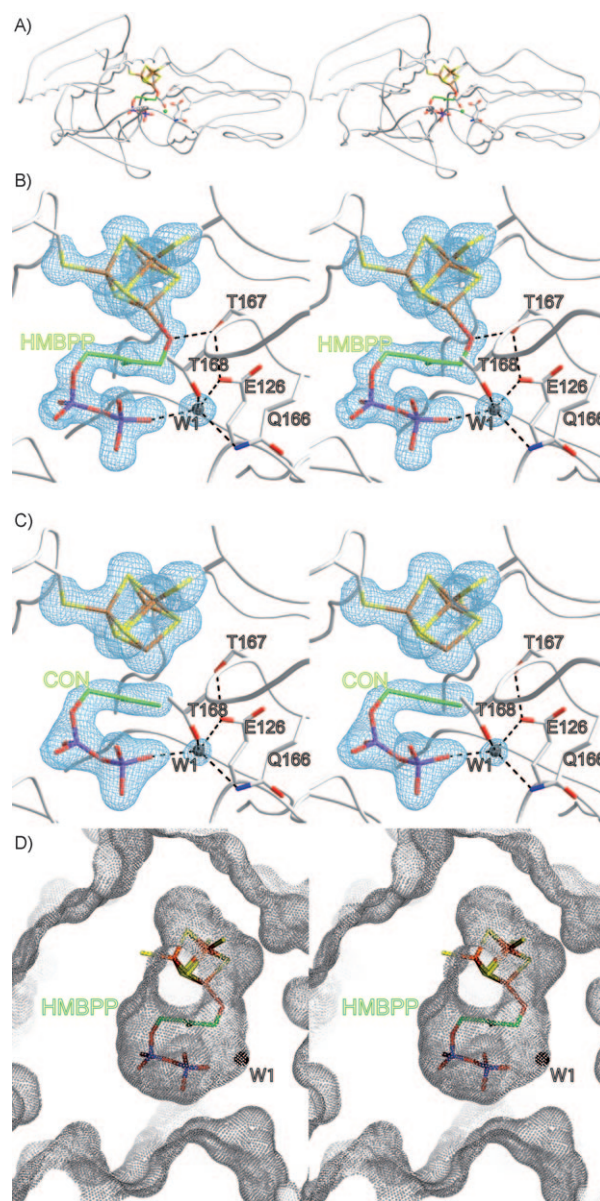


Abbildung 3. Schnappschüsse aus der Reaktionstrajektorie von IspH-Protein (Stereo-paare).^[25] A) Übersicht; B) „frühes Reaktionsintermediat“ im aktiven Zentrum; Elektronendichte (blau) konturiert bei 1.0σ mit $(2F_o - F_c)$ -Koeffizienten (PDB-Nummer 3KE8); C) CON: „spätes Reaktionsintermediat“ (enzymatische Transformation ausgelöst durch $\text{Cu}_{K\alpha}$ -Vorbestrahlung eines IspH:Substrat-Kristalls; PDB-Nummer 3KE9); D) Connolly-Oberfläche des zentralen Hohlraums mit Wassermolekül W1, Eisen-Schwefel-Cluster und dem frühen Reaktionsintermediat.

schungen mit unterschiedlicher Clusterzusammensetzung.^[29,31]

5. In Abhängigkeit von zugesetzten Liganden und dem Ursprung des Proteins werden möglicherweise durch die Kristallisationsbedingungen Proteinspezies mit unterschiedlichen Clustern begünstigt.
6. Nachdem reproduzierbar katalytische Aktivität nachgewiesen wurde in Lösungen von IspH:Pyrophosphat-Cokristallen, deren [3Fe-4S]-Status kristallographisch abgesichert war,^[23] ist die Dismutation von [3Fe-4S]-Protein

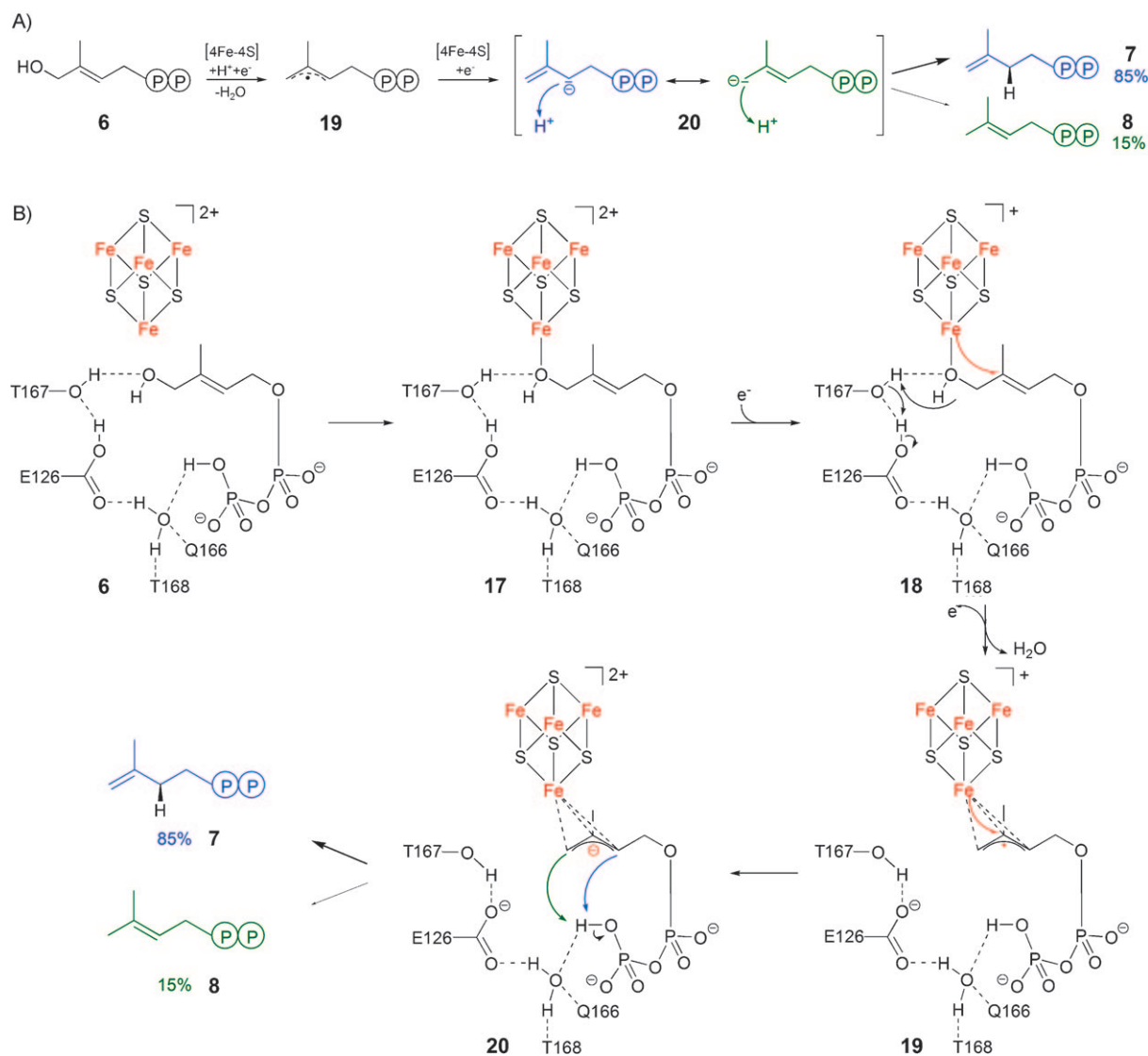
unter Bildung von [4Fe-4S]-Protein nicht auszuschließen; andererseits könnte auch [3Fe-4S]-Protein die Produktbildung geringfügig katalysieren, auf einem Reaktionsweg, der von dem in Schema 2 beschriebenen abweicht.

5. Mechanistische Überlegungen

Auf der Grundlage dieser Befunde kann ein hypothetischer Reaktionsmechanismus für IspH-Protein vorgeschlagen werden (Schema 2B). Im ersten Reaktionsschritt könnte die Hydroxygruppe an C1 des Substrats mit dem apikalen Eisen-Ion eines [4Fe-4S]-Clusters das Alkoxid **17** bilden (siehe Abbildung 3B). Der Eisen-Sauerstoff-Abstand (2.0 Å) entspricht der Erwartung für eine Eisen-Sauerstoff-Bindung. Die Abstände des apikalen Eisen-Ions von C2 und C3 des enzymgebundenen Isoprenoid-Intermediats **17** (2.8 bzw. 2.9 Å) sind signifikant kleiner als der Van-der-Waals-Abstand (ca. 3.6 Å). Deshalb sind zumindest partielle $\sigma\pi$ -Bindungen zwi-

schen dem Eisen-Ion und der gebundenen Alken-Einheit anzunehmen.

In Abwesenheit eines Reduktionsmittels kann das frühe Reaktionsintermediat (Abbildung 3B) nicht weiter umgesetzt werden. Ein wesentlich anderes Bild ergab sich, wenn ein IspH:HMBPP-Cokristall zunächst einer kurzen Röntgen-Bestrahlung ($\text{Cu}_{K\alpha}$) ausgesetzt und dann längere Zeit bei 70 K gelagert wurde. Ein danach mit Synchrotronstrahlung aufgenommener Datensatz ergab, dass die Reaktion weiter fortgeschritten war, offenbar getrieben von den durch die $\text{Cu}_{K\alpha}$ -Bestrahlung freigesetzten Photoelektronen. Bisher ist unbekannt, ob die resultierende Komplexstruktur (Abbildung 3C) als Ligand ein auf den Alkoxid-Komplex **18** folgendes Reaktionsintermediat oder vielmehr die Endprodukte (IPP/DMAPP) enthält. Jedenfalls gibt es für die radiochemisch ausgelöste Transformation eines am Enzym gebundenen Substrats einen Präzedenzfall bei kristallographischen Untersuchungen an DNA-Photolyase.^[34]



Schema 2. Mechanismus der IspH-katalysierten Reaktion. A) Experimentell gesicherte Fakten. B) Ein hypothetisches Modell für die Wechselwirkung der Reaktanten an der Oberfläche des geschlossenen aktiven Zentrums; Clusterladungen nach Wang et al.^[36]

Ausgehend vom Alkoxidkomplex **17** könnten in Schema 2B die Übertragung eines Elektrons auf das Alken-Motiv und die Übertragung eines Protons auf das Sauerstoffatom an C1 die Voraussetzung schaffen für die Spaltung der Kohlenstoff-Sauerstoff-Bindung an C1 des Intermediats (wobei nicht bekannt ist, ob Elektronen- und Protonen-Übertragung gleichzeitig oder sukzessiv erfolgen). Klarerweise müsste das Elektron vom oder über den Eisen-Schwefel-Cluster übertragen werden. Dabei könnte es vom Redoxzustand des Clusters bei Reaktionsbeginn abhängen, ob das Elektron durch eine Änderung im Oxidationszustand des Clusters bereitgestellt werden kann ([4Fe-4S]-Cluster können die Netto-ladungen 0, +1, +2 oder +3 annehmen^[35]) oder ob eine externe Elektronenquelle in diesem Stadium der Reaktion zwingend benötigt wird.

In dem in Abbildung 3B gezeigten Protein kam die Reaktion zum Stillstand, weil kein Elektronendonator zur Verfügung stand. Hingegen ermöglicht die Freisetzung von Photoelektronen im Rahmen der Vorbestrahlung des Kristalls die Spaltung der Kohlenstoff-Sauerstoff-Bindung an C1 (Abbildung 3C, Schema 2B). Allerdings handelt es sich in Bezug auf die fehlende Elektronenquelle (Abbildung 3B) um eine künstliche Situation; im Inneren einer Bakterienzelle (Wildtyp) steht dem IspH-Protein seine natürliche Elektronentransponderkaskade zur Verfügung.^[18]

Die Übertragung eines Protons wäre möglich von der Carboxygruppe von Glu126 über ein Wasserstoffbrückennetzwerk unter Beteiligung von Thr167 sowie des Alkoxid-Intermediats **18**. Der Austausch von Glu126 gegen Gln vermindert die Aktivität von IspH-Protein mindestens um den Faktor 50.^[23] Das Konzept der heterolytischen Spaltung der Kohlenstoff-Sauerstoff-Bindung wird gestützt durch die Beobachtung, dass das Fluoranalogen **12** von IspH-Protein umgesetzt werden kann; eine homolytische Spaltung der Kohlenstoff-Fluor-Bindung wäre nicht möglich. Die nahezu gleichen Produktverhältnisse für das natürliche Substrat **6** und das Fluoranalogen **12** belegen zweifelsfrei, dass die späten Reaktionsschritte in beiden Fällen im Wesentlichen identisch sind.

Die heterolytische Spaltung der Kohlenstoff-Sauerstoff-Bindung liefert das Alkylradikal **19**, das durch eine $\sigma\pi$ -Wechselwirkung mit dem Eisen-Schwefel-Cluster stabilisiert wird.^[25] Übrigens wird die Beteiligung eines Dienyl-Intermediats verbindlich ausgeschlossen durch das Fehlen eines kinetischen Isotopeffekts bei der Umsetzung von $[4\text{-}^2\text{H}_2]\text{-6}$ und durch die Umsetzung der Substratanaloga **13** und **15** zu IPP-Analoga.^[27,28]

Für eine erleichterte Kohlenstoff-Sauerstoff-Bindungsspaltung durch die Erzeugung eines Radikalzustands gibt es Präzedenzfälle.^[37] Am besten untersucht ist der Fall der Ribonukleotidreduktase, wo das Entfernen einer Hydroxygruppe von C2 einer Ribofuranose-Einheit ermöglicht wird durch die Abstraktion eines Wasserstoffatoms vom benachbarten C3.

Im letzten Abschnitt der IspH-Trajektorie muss ein zweites Elektron von einer externen Elektronenquelle geliefert werden; das dabei gebildete Allylanion **20** könnte wiederum durch $\sigma\pi$ -Wechselwirkung mit dem Eisen-Schwefel-Cluster stabilisiert werden (Schema 2B). Die Protonierung

des mesomeren Allylanions **20** an C1 oder C3 kann alternativ DMAPP (**8**) bzw. IPP (**7**) liefern. Bei diesem Reaktionsschritt ist mit einer erheblichen Abnahme der freien Enthalpie zu rechnen, da Allylanionen sehr starke Basen sind. Die Protonierung des Anions wird dadurch unumkehrbar, andernfalls wären die kinetische Kontrolle des Produktverhältnisses und das gänzliche Fehlen einer Isomeraseaktivität^[17] schwer zu erklären.

Bei der IPP-Bildung nimmt das eintretende Proton die C3_{st}-Position ein. Dies liefert eine wichtige stereochemische Randbedingung für das Verständnis der Reprotonierung.^[26] In Anbetracht der Haarnadelkonformation der gebundenen Reaktionsintermediate erscheint die intramolekulare Pyrophosphatgruppe als die wahrscheinlichste Protonenquelle für die IPP-Bildung.

6. IspH – ein allosterisches Enzym?

IspH-Protein von *E. coli* hat nahezu dieselbe Konformation in allen derzeit verfügbaren Röntgen-Strukturanalysen (Abweichung (rmsd) < 0.4 Å, obwohl Strukturen an Kristallen mit unterschiedlichen Raumgruppen bestimmt wurden). Die in diesen Strukturen vorliegende, geschlossene Konformation kann den Eintritt des Substrats und den Austritt der Produkte nicht erklären, da das aktive Zentrum als vollständig abgeschlossener und undurchlässiger Hohlraum erscheint (Abbildung 2B, 3D). Die offene Konformation des Proteins aus *A. aeolicus* bietet einen Ausweg aus diesem Dilemma.^[29]

Das Ensemble der Domänen D1 und D2 erscheint sehr ähnlich in den IspH-Strukturen von *E. coli* und *A. aeolicus*. Andererseits ist die D3-Domäne des Aquifex-Proteins im Vergleich mit dem Protein aus *E. coli* um etwa 20° gekippt (Abbildung 2A). Die Aminosäuren Phe11 und Cys197 könnten wie ein Scharnier zwischen den Domänen wirken.^[23] IspH-Protein wäre vergleichbar mit einem „Nussknacker“, der sich um das Substrat schließt, die Hydroxygruppe reaktiv abspaltet und sich schließlich öffnet, um das Produkt zu entlassen.^[23]

Der vordergründig einfache Übergang zwischen der offenen und geschlossenen Konformation bedingt eine komplizierte Choreographie für die Wassermoleküle. Während der Entstehung des frühen Reaktionsintermediats in Abbildung 3B und 4D muss das Hydratwasser vom Substrat und von der Oberfläche der Reaktionskammer fast vollständig entfernt werden. In der Schlussphase des Katalysezyklus müssen aktives Zentrum (Abbildung 3D) und Produkt rehydratisiert werden. Die entropischen und enthalpischen Beiträge müssen etwa im gleichen Bereich liegen, wobei der Restbetrag den Übergangszustand stabilisiert.

Vor der Substratbindung liegt das Enzym in oxidiert Form vor, sodass zwei Elektronen für die Reaktion erforderlich sind. Entsprechend nimmt die negative Ladung der Reaktionskammer insgesamt um zwei Einheiten zu. Diese Ladungsänderung ist sicherlich für die Öffnung des Hohlraums und damit für den Austritt des Produkts am Ende der Reaktion verantwortlich.

7. Ausblick

Zusammenfassend könnte für die IspH-Reaktion eine Trias aus Konformationsdynamik, Wasserausschluss und Protonierung des reaktiven Zwischenprodukts eine wichtige Rolle spielen bei der Stabilisierung des IspH-Übergangszustands, in Analogie zu den Befunden bei der Chalkon-Isomerase aus *Medicago sativa*.^[38]

Viele humanpathogene Bakterien (unter Ausnahme vor allem der Gram-positiven Kokken) sowie apikomplexe Protozoen nutzen ausschließlich den Nicht-Mevalonat-Weg für die Biosynthese essenzieller Isoprenoide.^[39] Die Enzyme dieses Biosynthesewegs sind deshalb potenzielle Ziele für die Therapie und Prävention von Massenerkrankungen wie Tuberkulose und Malaria.^[40] Kenntnisse über Struktur, Konformationsmodulation und Reaktionsmechanismus von IspH-Protein sind wichtige Voraussetzungen für die Entwicklung therapeutisch einsetzbarer Wirkstoffe.

Wir danken der Hans-Fischer-Gesellschaft für finanzielle Unterstützung.

Eingegangen am 10. Februar 2010

Online veröffentlicht am 4. Oktober 2010

- [1] J. C. Sacchettini, C. D. Poulter, *Science* **1997**, 277, 1788–1789.
- [2] T. E. Kleindienst, *Science* **2009**, 325, 687–688.
- [3] T. J. Bach, *Lipids* **1995**, 30, 191–202; K. Bloch, *Steroids* **1992**, 57, 378–383; D. A. Bochar, J. A. Friesen, C. V. Stauffacher, V. W. Rodwell in *Comprehensive Natural Product Chemistry*, Vol. 2 (Hrsg.: D. E. Cane), Pergamon, Oxford, **1999**, S. 15–44.
- [4] C. Stancu, A. Sima, *J. Cell. Mol. Med.* **2001**, 5, 378–387.
- [5] *Statins: The World Market*, <http://www.visiongain.com/Report/369/Statins-The-World-Market-2009-2024>.
- [6] M. Rohmer, *Prog. Drug Res.* **1998**, 50, 135–154; M. Rohmer in *Comprehensive Natural Product Chemistry*, Vol. 2 (Hrsg.: D. E. Cane), Pergamon, Oxford, **1999**, S. 45–68; M. Rohmer, *Nat. Prod. Rep.* **1999**, 16, 565–574; M. Rohmer, M. Knani, P. Simonin, B. Sutter, H. Sahm, *Biochem. J.* **1993**, 295, 517–524; M. K. Schwarz, Dissertation, ETH Zürich, **1994**; M. K. Schwarz, D. Arigoni in *Comprehensive Natural Product Chemistry*, Vol. 2 (Hrsg.: D. E. Cane), Pergamon, Oxford, **1999**, S. 367–399.
- [7] S. Herz, J. Wungsintaweeikul, C. A. Schuhr, S. Hecht, H. Lüttgen, S. Sagner, M. Fellermeier, W. Eisenreich, M. H. Zenk, A. Bacher, F. Rohdich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 2486–2490; H. Lüttgen, F. Rohdich, S. Herz, J. Wungsintaweeikul, S. Hecht, C. A. Schuhr, M. Fellermeier, S. Sagner, M. H. Zenk, A. Bacher, W. Eisenreich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 1062–1067; F. Rohdich, J. Wungsintaweeikul, W. Eisenreich, G. Richter, C. A. Schuhr, S. Hecht, M. H. Zenk, A. Bacher, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 6451–6456.
- [8] L. M. Lois, N. Campos, S. R. Putra, K. Danielsen, M. Rohmer, A. Boronat, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 2105–2110.
- [9] S. Takahashi, T. Kuzuyama, H. Watanabe, H. Seto, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 9879–9884.
- [10] B. Altincicek, A. Kollas, M. Eberl, J. Wiesner, S. Sanderbrand, M. Hintz, E. Beck, H. Jomaa, *FEBS Lett.* **2001**, 499, 37–40; S. Hecht, W. Eisenreich, P. Adam, S. Amslinger, K. Kis, A. Bacher, D. Arigoni, F. Rohdich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, 98, 14837–14842.
- [11] D. E. Cane, *Science* **2000**, 287, 818–819.
- [12] J. M. Estevez, A. Cantero, A. Reindl, S. Reichler, P. León, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 22901–22909; T. Kuzuyama, M. Takagi, S. Takahashi, H. Seto, *J. Bacteriol.* **2000**, 182, 891–897; G. A. Sprenger, U. Schorken, T. Wiegert, S. Grolle, A. A. de Graaf, S. V. Taylor, T. P. Begley, S. Bringer-Meyer, H. Sahm, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, 94, 12857–12862.
- [13] T. Kuzuyama, M. Takagi, K. Kaneda, T. Daiiri, H. Seto, *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 703–706; T. Kuzuyama, M. Takagi, K. Kaneda, H. Watanabe, T. Daiiri, H. Seto, *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 2925–2928; M. Takagi, T. Kuzuyama, K. Kaneda, H. Watanabe, T. Daiiri, H. Seto, *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 3395–3398.
- [14] M. Seemann, B. T. Bui, M. Wolff, D. Tritsch, N. Campos, A. Boronat, A. Marquet, M. Rohmer, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 4513–4515; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 4337–4339; F. Zepeck, T. Gräwert, J. Kaiser, W. Eisenreich, F. Rohdich, *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 9168–9174; S. Amslinger, K. Kis, S. Hecht, P. Adam, F. Rohdich, D. Arigoni, A. Bacher, W. Eisenreich, *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 4590–4594; M. Hintz, A. Reichenberg, B. Altincicek, U. Bahr, R. M. Gschwind, A. K. Kollas, E. Beck, J. Wiesner, M. Eberl, H. Jomaa, *FEBS Lett.* **2001**, 509, 317–322.
- [15] a) P. Adam, S. Hecht, W. Eisenreich, J. Kaiser, T. Gräwert, D. Arigoni, A. Bacher, F. Rohdich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 12108–12113; b) F. Rohdich, S. Hecht, K. Gärtner, P. Adam, C. Krieger, S. Amslinger, D. Arigoni, A. Bacher, W. Eisenreich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 1158–1163; c) F. Rohdich, F. Zepeck, P. Adam, S. Hecht, J. Kaiser, R. Laupitz, T. Gräwert, S. Amslinger, W. Eisenreich, A. Bacher, D. Arigoni, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 1586–1591.
- [16] B. Altincicek, E. C. Duin, A. Reichenberg, R. Hedderich, A. K. Kollas, M. Hintz, S. Wagner, J. Wiesner, E. Beck, H. Jomaa, *FEBS Lett.* **2002**, 532, 437–440.
- [17] T. Gräwert, J. Kaiser, F. Zepeck, R. Laupitz, S. Hecht, S. Amslinger, N. Schramek, E. Schleicher, S. Weber, M. Haslbeck, J. Buchner, C. Rieder, D. Arigoni, A. Bacher, W. Eisenreich, F. Rohdich, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 12847–12855.
- [18] M. Wolff, M. Seemann, C. Grosdemange-Billiard, D. Tritsch, N. Campos, M. Rodriguez-Concepción, A. Boronat, M. Rohmer, *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 2555–2559.
- [19] R. Laupitz, S. Hecht, S. Amslinger, F. Zepeck, J. Kaiser, G. Richter, N. Schramek, S. Steinbacher, R. Huber, D. Arigoni, A. Bacher, W. Eisenreich, F. Rohdich, *Eur. J. Biochem.* **2004**, 271, 2658–2669; K. Kaneda, T. Kuzuyama, M. Takagi, Y. Hayakawa, H. Seto, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, 98, 932–937; M. Takagi, K. Kaneda, T. Shimizu, Y. Hayakawa, H. Seto, T. Kuzuyama, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2004**, 68, 132–137; S. J. Barkley, S. B. Desai, C. D. Poulter, *Org. Lett.* **2004**, 6, 5019–5021; J. Wouters, Y. Oudjama, S. J. Barkley, C. Tricot, V. Stalon, L. Droogmans, C. D. Poulter, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 11903–11908.
- [20] F. Rohdich, S. Hecht, A. Bacher, W. Eisenreich, *Pure Appl. Chem.* **2003**, 75, 393–405; M. Rohmer, C. Grosdemange-Billiard, M. Seemann, D. Tritsch, *Curr. Opin. Invest. Drugs* **2004**, 5, 154–162; W. Eisenreich, A. Bacher, D. Arigoni, F. Rohdich, *Cell. Mol. Life Sci.* **2004**, 61, 1401–1426; J. F. Hoeffler, A. Hemmerlin, C. Grosdemange-Billiard, T. J. Bach, M. Rohmer, *Biochem. J.* **2002**, 366, 573–583.
- [21] P. Kia-Joo, W. Hong, D. Tohru, K. Tomohisa, T. M. Craig, *FEBS Lett.* **2005**, 579, 3802–3806.
- [22] a) K. Okada, T. Hase, *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 20672–20679; b) R. C. Röhrich, N. Englert, K. Troschke, A. Reichenberg, M. Hintz, F. Seeber, E. Balconi, A. Aliverti, G. Zanetti, U. Kohler, M. Pfeiffer, E. Beck, H. Jomaa, J. Wiesner, *FEBS Lett.* **2005**, 579, 6433–6438.
- [23] T. Gräwert, F. Rohdich, I. Span, A. Bacher, W. Eisenreich, J. Eppinger, M. Groll, *Angew. Chem.* **2009**, 121, 5867–5870; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 5756–5759.
- [24] Y. Xiao, L. Chu, Y. Sanakis, P. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 9931–9933.

- [25] T. Gräwert, I. Span, W. Eisenreich, F. Rohdich, J. Eppinger, A. Bacher, M. Groll, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 1077–1081.
- [26] R. Laupitz, T. Gräwert, C. Rieder, F. Zepeck, A. Bacher, D. Arigoni, F. Rohdich, W. Eisenreich, *Chem. Biodiversity* **2004**, *1*, 1367–1376.
- [27] Y. Xiao, Z. K. Zhao, P. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 2164–2165.
- [28] Y. Xiao, P. Liu, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 9868–9871; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 9722–9725.
- [29] I. Reikittke, J. Wiesner, R. Röhrich, U. Demmer, E. Warkentin, W. Xu, K. Troschke, M. Hintz, J. H. No, E. C. Duin, E. Oldfield, H. Jomaa, U. Ermler, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 17206–17207.
- [30] M. Seemann, K. Janthawornpong, J. Schweizer, L. H. Böttger, A. Janoschka, A. Ahrens-Botzong, E. N. Tambou, O. Rotthaus, A. X. Trautwein, M. Rohmer, V. Schünemann, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 13184–13185.
- [31] M. Wolff, M. Seemann, B. T. Bui, Y. Frapart, D. Tritsch, A. Garcia Estrabot, M. Rodríguez-Concepción, A. Boronat, A. Marquet, M. Rohmer, *FEBS Lett.* **2003**, *541*, 115–120.
- [32] M. Seemann, M. Rohmer, *C. R. Chim.* **2007**, *10*, 748–755.
- [33] U. Tokumoto, S. Nomura, Y. Minami, H. Mihara, S. Kato, T. Kurihara, N. Esaki, H. Kanazawa, H. Matsubara, Y. Takahashi, *J. Biochem.* **2002**, *131*, 713–719; U. Tokumoto, Y. Takahashi, *J. Biochem.* **2001**, *130*, 63–71; D. Vinella, C. Brochier-Armanet, L. Loiseau, E. Talla, F. Barras, *PLoS Genet.* **2009**, *5*, e1000497; L. Zheng, V. L. Cash, D. H. Flint, D. R. Dean, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 13264–13272.
- [34] A. Mees, T. Klar, P. Gnau, U. Hennecke, A. P. M. Eker, T. Carell, L.-O. Essen, *Science* **2004**, *306*, 1789–1793.
- [35] M. K. Johnson, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, *2*, 173–181.
- [36] W. Wang, K. Wang, Y.-L. Liu, J.-H. No, J. Li, M. J. Nilges, E. Oldfield, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 4522–4527.
- [37] W. Buckel, B. M. Martins, A. Messerschmidt, B. T. Golding, *J. Biol. Chem.* **2005**, *386*, 951–959; M. J. Ramos, P. A. Fernandes, *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 689–698.
- [38] S. Hur, Z. E. R. Newby, T. C. Bruice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 2730–2735.
- [39] F. Rohdich, A. Bacher, W. Eisenreich, *Bioorg. Chem.* **2004**, *32*, 292–308; F. Rohdich, A. Bacher, W. Eisenreich, *Biochem. Soc. Trans.* **2005**, *33*, 785–791.
- [40] M. A. Missinou, S. Borrmann, A. Schindler, S. Issifou, A. A. Adegnika, P. B. Matsiegui, R. Binder, B. Lell, J. Wiesner, T. Baranek, H. Jomaa, P. G. Kremsner, *Lancet* **2002**, *360*, 1941–1942.