

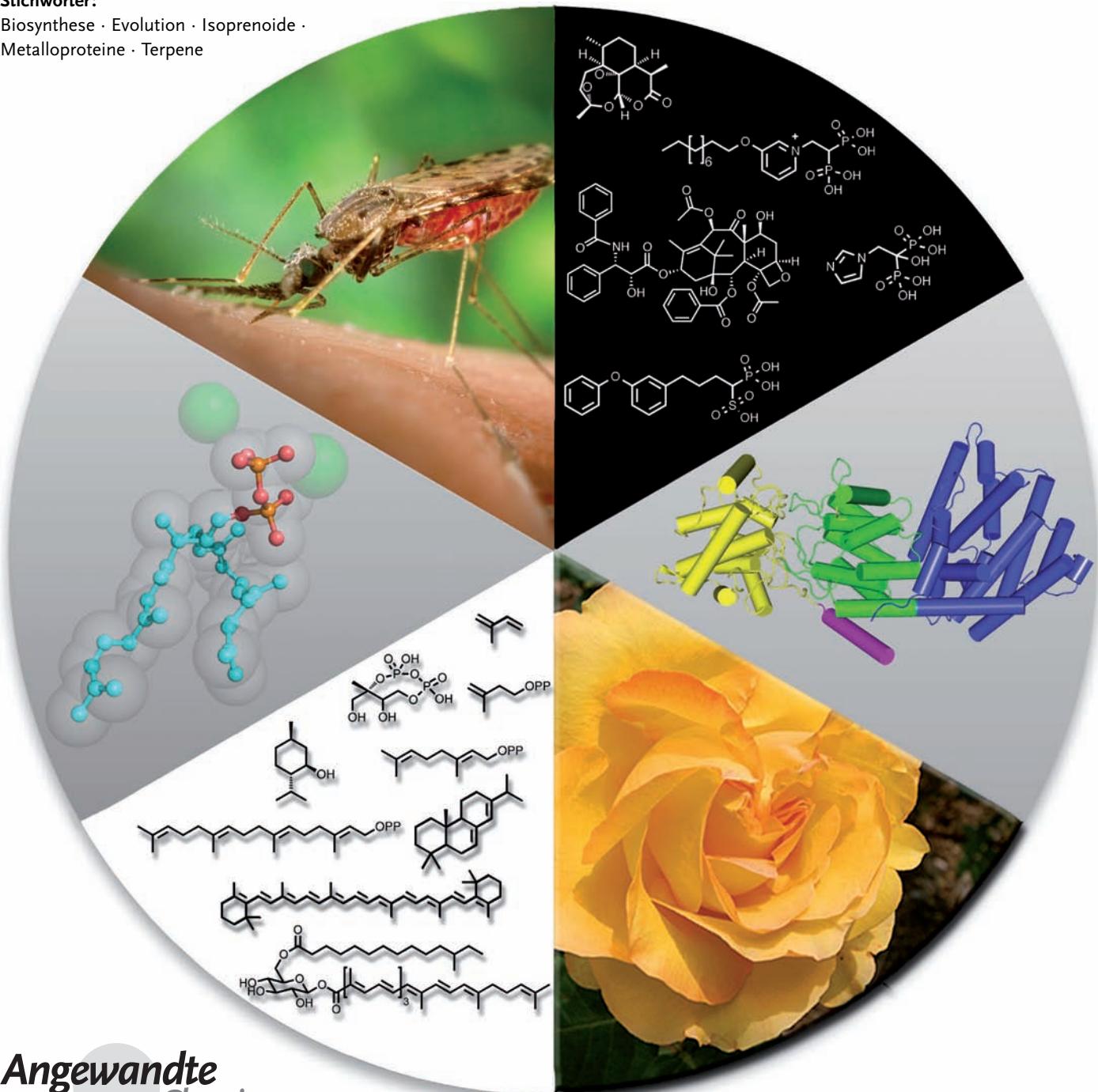
Terpen-Biosynthese: Modularitätsregeln

Eric Oldfield* und Fu-Yang Lin

Stichwörter:

Biosynthese · Evolution · Isoprenoide ·

Metalloproteine · Terpene



Terpene bilden die umfangreichste Klasse niedermolekularer Naturstoffe auf der Erde. Hier werden neuere Entwicklungen bei der Aufklärung von Struktur und Funktion der an der Terpen-Biosynthese beteiligten Proteine zusammengefasst. Die Strukturen dieser Enzyme bestehen aus sechs Hauptbausteinen oder Modulen ($\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon$ und ζ): die $\alpha\alpha$ - und $\alpha\delta$ -Kopf-Schwanz-trans-Prenyltransferasen, die trans-Isoprenoid-Diphosphate aus C₅-Vorstufen synthetisieren; die ϵ -Kopf-Kopf-Prenyltransferasen, die diese Diphosphate in die Tri- und Tetraterpen-Vorstufen von Sterolen, Hopanoiden und Carotinoiden umwandeln; die $\beta\gamma$ -Di- und Triterpensynthetasen; die ζ -Kopf-Schwanz-cis-Prenyltransferasen, welche die cis-Isoprenoid-Diphosphate für die Biosynthese der bakteriellen Zellwand aufbauen; und schließlich die α -, $\alpha\beta$ - und $\alpha\beta\gamma$ -Terpensynthetasen, die pflanzliche Terpene produzieren. Außerdem werden neue Erkenntnisse bezüglich Struktur und Funktion der beiden 4Fe-4S-Reduktasen vorgestellt, die bei der Bildung der C₅-Diphosphate in vielen Bakterien mitwirken, wo wiederum hochmodulare Strukturen auftreten.

1. Einleitung

Terpene oder Isoprenoide bilden die vielfältigste Naturstoffklasse und kommen in fast allen Lebensformen vor, wo sie unzählige Aufgaben – von hauptsächlich strukturellen (Cholesterin in Zellmembranen) bis funktionalen (Carotinoide bei der Photosynthese; Retinal beim Sehvorgang; Chinone beim Elektronentransfer) – übernehmen.^[1] Tatsächlich leiten sich alle – zumindest teilweise – von den C₅-Substraten Dimethylallyldiphosphat (DMAPP, **1**; Schema 1) und Isopentenyldiphosphat (IPP, **2**) ab: Normalerweise wird zunächst DMAPP in einer 1'-4- oder „Kopf-Schwanz“-Kondensation mit einem oder mehreren IPP-Molekülen unter Bildung von Geranyldiphosphat (GPP, **3**; C₁₀), Farnesyldiphosphat (FPP, **4**; C₁₅) oder Geranylgeranyldiphosphat (GGPP, **5**; C₂₀) verknüpft.^[2] FPP und GGPP können dann in „Kopf-Kopf“-Anordnung (manchmal auch als Schwanz-Schwanz-Anordnung bezeichnet^[4]) kondensieren,^[3] um beispielsweise Dehydrosqualen (DHS, **6**), Squalen (**7**) oder Phytoen (**8**) zu bilden, die Vorläufer von Carotinoide wie β -Carotin (**9**), Sterolen wie Cholesterin (**10**) und Hopanoiden wie Bakteriohopantetrol (**11**) – einige der ältesten und häufigsten Naturstoffe.^[1] Isoprenoide können auch verwendet werden, um Proteine posttranslational zu modifizieren (wichtig für die Signalübertragung in der Zelle), oder sie können zu zahlreichen Terpen-Naturstoffen cyclisiert werden: zu C₁₀-Monoterpenen wie Menthol (**12**), C₁₅-Sequiterpenen wie Farnesol (**13**) und Artemisinin (**14**) und C₂₀-Diterpenen, die z.B. in Gibberellinsäure (**15**) und Taxol (**16**) überführt werden. Durch Pflanzen wird DMAPP in einem Ausmaß von ungefähr 100 Megatonnen pro Jahr in Isopren (**17**) umgewandelt – eine Reaktion, die als potenzielle Quelle für „erneuerbare“ Brennstoffe und andere Produkte gegenwärtig interessant ist.^[5]

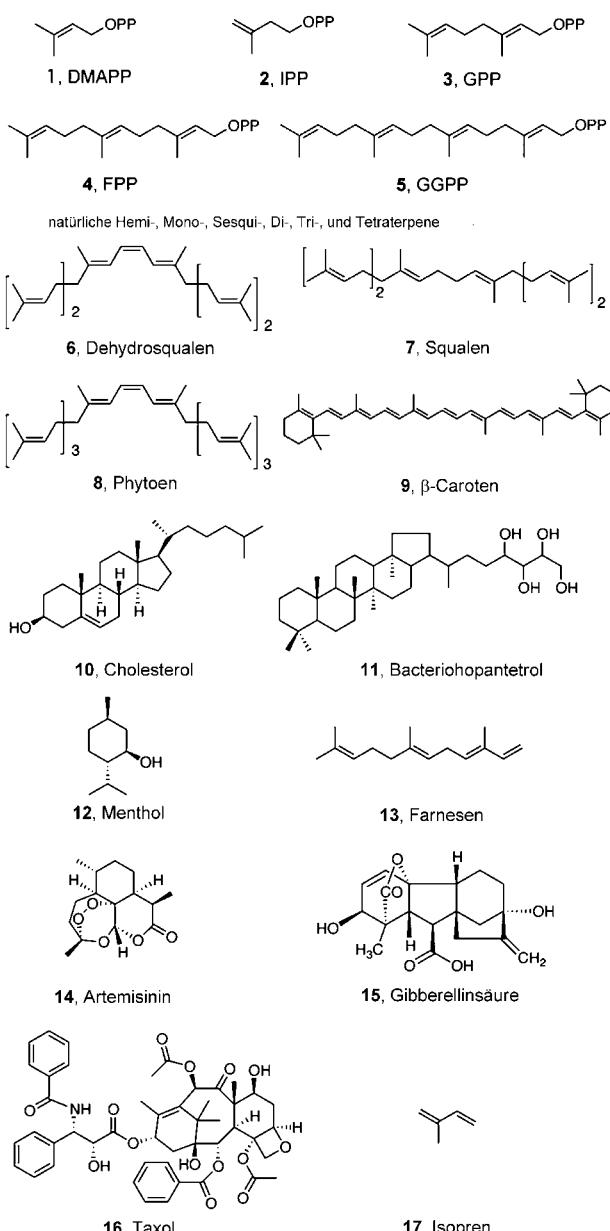
Die DMAPP- und IPP-Vorstufen werden über zwei verschiedene Reaktionswege synthetisiert: den Mevalonat-[⁶]

Aus dem Inhalt

1. Einleitung	1151
2. Kopf-Schwanz-verknüpfende trans-Prenyltransferasen: $\alpha\alpha$- und $\alpha\delta$-Domänenstrukturen	1152
3. FPPS und GGPPS als Wirkstoff-Targets	1153
4. ϵ-Kopf-Kopf-Prenyltransferasen	1154
5. Diterpencyclasen: Die $\alpha\beta\gamma$-Faltung-Hypothese	1155
6. Taxadien-Synthase: Struktur einer $\alpha\beta\gamma$-Faltung und Evolution zu den $\alpha\beta$-Proteinen	1157
7. ζ-(Z- oder cis-)Prenyldiphosphat-Transferasen und die Tuberculosinol-Synthase	1158
8. Die dynamische Struktur der Prenyltransferase UPPS	1159
9. 4Fe-4S-Reduktasen: Fortschritte und offene Fragen bei IspG und IspH	1159
10. Zusammenfassung und Ausblick	1161

und den Methylerythritolphosphat(MEP)-Weg.^[7] Der Mevalonat-Weg wird von den meisten Eukaryoten (einschließlich Menschen) sowie von Archaeabakterien^[8] genutzt, während der MEP-Weg in den meisten Eubakterien vorkommt. Es gibt natürlich Ausnahmen, z.B. verwendet das Bakterium *Staphylococcus aureus* den Mevalonat-Weg, während (eukaryotische) Malariaparasiten den MEP-Weg nutzen.^[9] In Pflanzen kommen beide Biosynthesewege vor,^[7] wobei der MEP-Weg üblicherweise in den Plastiden zu finden ist und der Mevalonat-Weg im Cytosol: Sterole (Triterpene) werden über Mevalonat synthetisiert, während Hemi-, Mono- und Diterpene sowie Carotinoide (Tetraterpene) über MEP aufgebaut werden. Im Folgenden erläutern wir neuere Erkenntnisse bezüglich Struktur und Funktion bei vielen Schlüsselenzymen der Isoprenoid-Biosynthese: den Kopf-

[*] Prof. Dr. E. Oldfield, Dr. F.-Y. Lin
Department of Chemistry and
Center for Biophysics and Computational Biology
University of Illinois at Urbana-Champaign
600 S Mathews Ave, Urbana, IL, 61801 (USA)
E-Mail: eo@chad.scs.uiuc.edu

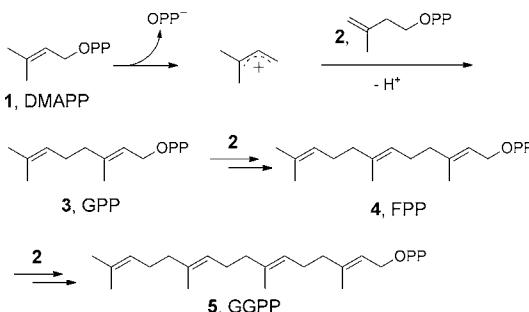


Schema 1. Isoprenoid-Biosynthese: Substrate und Produkte.

Kopf- und Kopf-Schwanz-Prenyltransferasen, den Terpensynthasen sowie den 4Fe-4S-Reduktasen, die in den meisten Eubakterien bei der DMAPP/IPP-Produktion mitwirken. Diese Strukturen liefern wichtige neue Einsichten, wie die etwa 65000 Terpenoid-Naturstoffe^[10] gebildet werden. Insbesondere schlagen wir vor, dass sechs wichtige Protein-„Bausteine“ oder -Module (α , β , γ , δ , ε und ζ) existieren, die – häufig in Kombination – verwendet werden, um die für die Synthese der meisten bekannten Terpene und Isoprenoide zuständigen Enzyme zu bilden.

2. Kopf-Schwanz-verknüpfende trans-Prenyltransferasen: $\alpha\alpha$ - und $\alpha\delta$ -Domänenstrukturen

DMAPP und IPP sind die C₅-Substrate für die Terpensynthese. Sie kondensieren zunächst unter Bildung der all-trans-Isoprenoiddiphosphate GPP, FPP und GGPP in Reaktionen, die nacheinander durch die Enzyme Geranyl-diphosphat-Synthase (GPPS), Farnesyldiphosphat-Synthase (FPPS) und Geranylgeranyldiphosphat-Synthase (GGPPS) katalysiert werden: **1 + 2 → 3 → 4 → 5** in Schema 2. Die erste Struktur, die es aufzuklären galt, war die von FPPS.^[11] Die Struktur



Schema 2. Carbokation-Mechanismus für die Biosynthese von GPP, FPP und GGPP.

(Abbildung 1 a) ist fast durchgängig α -helical mit zwei hochkonservierten Wiederholungssequenzen, die DDXXD-Reste enthalten (Abbildung 1 a, rot). Diese werden verwendet, um



Eric Oldfield erhielt seinen BSc in Chemie von der Bristol University und promovierte in biophysikalischer Chemie an der Sheffield University unter der Anleitung von Dennis Chapman. Er arbeitete anschließend als EMBO-Fellow an der Indiana University bei Adam Allerhand und am MIT bei John Waugh. Er wechselte 1975 an das Chemistry Department der University of Illinois at Urbana-Champaign und ist gegenwärtig Alumni Research Scholar Professor of Chemistry. Seine Forschungsinteressen gelten der NMR-Spektroskopie und der Wirkstoffentwicklung.



Fu-Yang Lin erhielt seinen BS und MS in Life Sciences von der National Central University (Taiwan) und promovierte in Biophysik und Computerbiologie an der University of Illinois at Urbana-Champaign bei Prof. Eric Oldfield. Er untersuchte die Struktur, den Katalysemechanismus und die Hemmung von Prenylsynthasen. Zurzeit arbeitet er als Postdoktorand an der Harvard Medical School.

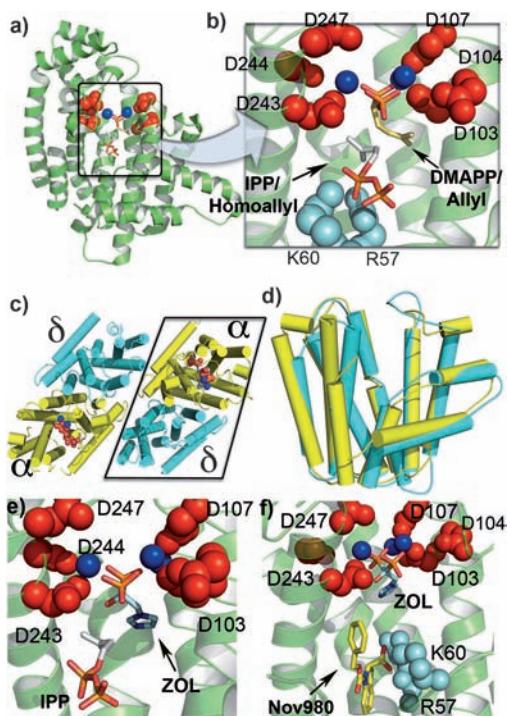


Abbildung 1. a) Struktur der humanen FPPS (PDB-Code: 1ZW5) mit konservierten DDXXD-Motiven (rot), Mg^{2+} - (blau) sowie IPP- (unten) und S-Thiolo-DMAAPP-Liganden (oben, durch Überlagerung mit PDB-Code: 1RQI). b) Vergrößerung der Region um das aktive Zentrum in (a), katalytische Reste sind rot und cyan wiedergegeben. c) Heterotetramer-Struktur von *M.piperata*-GPPS (PDB-Code: 3 KRF) mit katalytischen α - (gelb) und regulatorischen δ -Untereinheiten. d) Überlagerung der α - und δ -Domänen in GPPS. e) Zoledronat und IPP an das aktive Zentrum der humanen FPPS (1ZW5) gebunden: Farben wie in (a). f) Zoledronat und 19 (NOV-980), an die allylische (ZOL) bzw. allosterische (NOV-980) Stelle in humaner FPPS (PDB-Code: 3N46) gebunden.

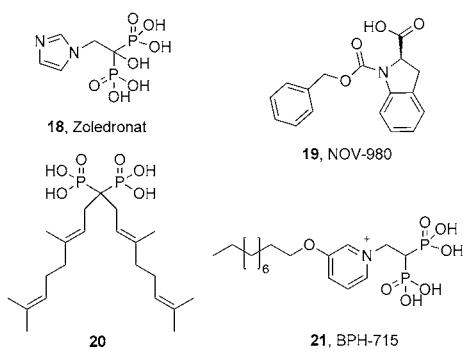
drei Mg^{2+} -Ionen^[12] zu chelatisieren, die wiederum das allylische Substrat (DMAAPP) ionisieren; so wird ein Carbokation gebildet (Schema 2), das dann durch nucleophilen Angriff der olefinischen Doppelbindung in IPP und anschließende H^+ -Eliminierung zu GPP weiterreagiert. Der Vorgang wiederholt sich, um FPP und dann (mit GGPPS) GGPP aufzubauen. DMAAPP (und GPP) binden über Mg^{2+} an das katalytisch wirksame Asp in der Allyl-Bindungsstelle in FPPS, während IPP über einen Cluster aus kationischen Resten (R57, K60 in humaner FPPS) an die zweite, homoallylische Stelle bindet (Abbildung 1b).^[12a]

FPPS- sowie die meisten GGPPS-Moleküle funktionieren als Homodimere ($\alpha\alpha$), wobei – in manchen Fällen – Reste aus beiden Ketten das katalytische Zentrum bilden.^[13] Kürzlich hat man jedoch herausgefunden, dass die C_{10} -Isoprenoid-Synthase GPPS (die das für die Menthol-Biosynthese notwendige GPP liefert), die in Pflanzen wie Pfefferminze und Grüne Minze vorkommt, ein komplizierteres System ist, da sie nicht nur eine, sondern zwei verschiedene Untereinheiten enthält,^[14] die beide für die Aktivität erforderlich sind: eine große Untereinheit (α) mit der katalytischen DD(X)_nD-Anordnung und eine kleinere regulatorische Untereinheit (hier δ genannt) zur Steuerung der Kettenverlängerung. Diese Art

der Heterodimer-Organisation fehlt in der GPPS von *Abies grandis*,^[15] kommt aber auch bei der humanen Decaprenyldiphosphat-Synthase^[16] vor, die das für die CoQ_{10} -Biosynthese erforderliche C_{50} -Isoprenoiddiphosphat synthetisiert. Chang et al.^[17] haben jetzt eine Röntgenkristallstruktur von GPPS aus *M. × piperita*, einem geeigneten Prototyp für andere heterodimere Systeme, veröffentlicht. Die Strukturen zeigen eine neue Architektur, in der die großen und kleinen Untereinheiten ein Heterodimer bilden, das wiederum zu einem Tetramer ($\alpha_2\delta_2$) dimerisiert (Abbildung 1c). Die Strukturen enthalten Mg^{2+} , IPP, S-Thiolo-DMAAPP (ein nichthydrolisierbares DMAAPP-Analoges) und GPP, die alle nur an die große, katalytische α -Untereinheit (gelb in Abbildung 1c) binden. Mit einem C^α -rmsd-Wert von 2.8 Å ähnelt die α -Domänenfalte ziemlich derjenigen, die in FPPS gefunden wurde. In Pfefferminz-GPPS inhibiert die regulatorische Untereinheit eine Kettenverlängerung über C_{10} hinaus, obwohl sich *in vitro* mit FPP als Substrat GGPP bilden kann. In einer vorhergehenden Arbeit^[14] wurde vorgeschlagen, dass sich diese Pflanzen-GPPS aus GGPPS entwickelten, da eine größere Sequenzhomologie mit GGPPS als mit FPPS (75 % gegenüber 25 %) beobachtet wurde. Dieses Ergebnis wird jetzt durch die kleineren (0.9 Å gegenüber 2.7 Å) C^α -rmsd-Werte für die GPPS- α -Untereinheit gegenüber GGPPS bzw. FPPS gestützt. Überraschender bei den neuen GPPS-Ergebnissen ist die bemerkenswert große strukturelle Ähnlichkeit zwischen katalytischen (α) und regulatorischen (δ) Untereinheiten im Tetramer, entsprechend einem C^α -rmsd-Wert von 1.87 Å (Abbildung 1d). Diese starke Strukturähnlichkeit zwischen den α - und δ -Domänen deutet zusammen mit 32 % Identität und 50 % Sequenzähnlichkeit darauf hin, dass solche $\alpha\delta$ -Proteine wie die an den Terpensynthase-Reaktionen beteiligten $\beta\gamma$ -Proteine durch Genverdoppelung entstanden sind. Diese $\alpha\delta$ -katalytisch/regulatorische Domänenorganisation wurde nun auch für die Hexaprenyldiphosphat-Synthase aus *Micrococcus luteus* beschrieben.^[18] Die δ -Domäne in diesem System ist sehr klein (7 Helices gegenüber 17 in der α -Domäne), und der rmsd-Wert zwischen den α - und δ -Domänen beträgt 2.1 Å. Die kleine Untereinheit hilft, das Dimer über hydrophobe Wechselwirkungen zu stabilisieren, und reguliert direkt die Produktkettenlänge.^[18] Aufgrund dieser Befunde und derjenigen mit GPPS ist es wahrscheinlich, dass bei humaner DPPS ähnliche Strukturen gefunden werden.

3. FPPS und GGPPS als Wirkstoff-Targets

FPPS ist als wichtiges Ziel für Wirkstoffe von großem pharmazeutischem Interesse. Die Bisphosphonate zur Behandlung von Osteoporose (und seit kurzem von Interesse für die Krebs- und Immuntherapie^[19]) wie Zoledronat (18, Schema 3) zielen auf die allylische Stelle in FPPS und binden wie DMAAPP (Abbildung 1b) an den $[Mg^{2+}]_3$ -Cluster (Abbildung 1e).^[12,20] Dies blockiert die FPP- und GGPP-Biosynthese und somit die Prenylierung von Proteinen wie Ras, was die Abtötung von Tumorzellen,^[21] die Hemmung der Invasivität,^[22] das Umschalten des Phänotyps in Makrophagen von einem Tumor-fördernden M2- in einen Tumor-abtö-



Schema 3. Inhibitoren der FPPS und GGPPS.

tenden M1-Phänotyp^[23] sowie $\gamma\delta$ -T-Zellaktivierung zur Folge hat,^[24] wobei die aktivierte $\gamma\delta$ -T-Zellen Tumorzellen abtöten.^[25] Diese kombinierten Effekte, so wird angenommen, tragen dazu bei, das Risiko für das Fortschreiten der Krankheit bei Krebspatienten, die mit einem Aromatase-Inhibitor plus dem Bisphosphonat Zoledronat behandelt wurden, um 36 % zu verringern, relativ zu Krebspatienten, die nur der Aromatase-Therapie unterzogen wurden.^[19] Wegen der hohen Polarität und großen Knochenbindungsaffinität^[26] der Bisphosphonate hatte man allerdings schon früh ein beträchtliches Interesse an der Entwicklung lipophilerer FPPS-Inhibitoren.^[27] Jahnke et al.^[28] beschrieben eine dritte, allosterische Stelle in der FPPS zusammen mit einer neuen Generation von Inhibitoren (wie **19**), die an diese Stelle^[28] binden (Abbildung 1 f). Diese Inhibitoren docken mit ihren polaren Gruppen in oder nahe bei der IPP-Diphosphat(PP_i)-Stelle an (Abbildung 1 f) und haben IC₅₀-Werte um 80 nm.^[28] Solchen Nicht-Bisphosphonat-FPPS-Inhibitoren fehlen die strukturellen Voraussetzungen, um an das Knochenmineral zu binden,^[26] sodass sie ein großes Potential als Antikrebsmittel aufweisen.

Neben FPPS ist auch GGPPS ein Ziel für Wirkstoffe. Beide Enzyme haben $\alpha\alpha$ -Strukturen, und der rmsd-Wert zwischen humaner FPPS und GGPPS beträgt nur 2.4 Å (Abbildung 2 a).^[20,29] Überraschenderweise inhibieren Bisphosphonate wie Zoledronat nicht die humane (oder Hefe-)GGPPS, vermutlich weil ein Asp im zweiten Asp-reichen

Cluster (DDXXN anstelle DDXXD) fehlt und dessen Abwesenheit die Anlagerung des dritten Mg²⁺^[30] hemmt. Zoledronat bindet jedoch an GGPPS, die das extra Asp des Malaria-parasiten *Plasmodium vivax* enthält (Abbildung 2 b).^[30] Stärker lipophile Bisphosphonate wie **20** und **21** (Schema 3) binden an GGPPS aus Hefe, Mensch und *P. vivax*,^[30,31] wie in Abbildung 2 c^[31] veranschaulicht (pink gekennzeichnet), wo die lange hydrophobe Seitenkette an der gleichen Stelle^[29] andockt wie das GGPP-Produkt (Abbildung 2 c, blau). Diese lipophilen Bisphosphonate sollten besser zell- und gewebe-gängig sein und schwächer an Knochen binden^[26] als herkömmliche Bisphosphonate, und tatsächlich sind sie sowohl in vitro als auch in vivo effektiver im Abtöten von Tumorzellen^[26a] und Malaria-parasiten^[32] als beispielsweise Zoledronat.

4. ϵ -Kopf-Kopf-Prenyltransferasen

Die von GPPS, FPPS und GGPPS synthetisierten Iso-prenoid-diphosphate können durch zahlreiche Terpensynthasen (siehe die folgenden Abschnitte) cyclisiert werden, und die C₁₅- und C₂₀-Diphosphate können auch in einer 1'-2,3- oder „Kopf-Kopf“-Anordnung^[3] zu C₃₀- und C₄₀-Kohlenwas-serstoffen verknüpft werden. Diese sind Vorstufen für Sterole, Carotinoide und Hopanoide, deren diagenetische Pro-dukte zu den häufigsten niedermolekularen organischen Verbindungen auf der Erde gehören (etwa 10¹² Tonnen ge-genwärtig, in Sedimenten).^[33] In einer durch die Squalen-Synthase (SQS) oder Dehydrosqualen-Synthase (CrtM) ka-talysierten Reaktion entsteht ausgehend von FPP als erstes Kondensationsprodukt (Schema 4) das C₃₀-Diphosphat Pre-squalen-diphosphat (PSPP, **22**).

In Pflanzen, Tieren, Pilzen und einigen Bakterien wird PSPP dann Mg²⁺-abhängig ionisiert, und es folgen die Ab-spaltung von PP_i, Ringöffnung und Reduktion (durch NADPH) zu Squalen, der Vorstufe zu Sterolen wie Sitosterol, Cholesterin und Ergosterol sowie zu vielen Hopanoiden wie Hopen (**23**). Im Bakterium *S. aureus* fehlt der reduktive Schritt, sodass als Produkt Dehydrosqualen (**6**) entsteht, die Vorstufe des Carotinoid-Virulenzfaktors Staphyloxanthin, ein Target für die Entwicklung von Antiinfektiva.^[34] In

Pflanzen kondensiert das C₂₀-Diphosphat GGPP in ähnlicher Weise zu C₄₀-Prephy-toendiphosphat und dann zu Phytoen, der Vorstufe von Carotinoiden wie β -Caro-tin.^[35]

In Anbetracht der Häufigkeit und Bedeutung von Sterolen, Carotinoiden und Hopanoiden ist es überraschend, dass bis vor kurzem die einzige bekannte Struktur einer Kopf-Kopf-Prenyltransfe-rase die der humanen SQS^[36] war (Abbildung 3 a, orange). Wie bei FPPS ist die Struktur hoch α -helical (mit einem rmsd-Wert von 3.5 Å für C^a gegenüber FPPS für 189 Reste). Die SQS-Struktur lieferte jedoch wenig mechanistische Information, da der verwendete Inhibitor dem Substrat

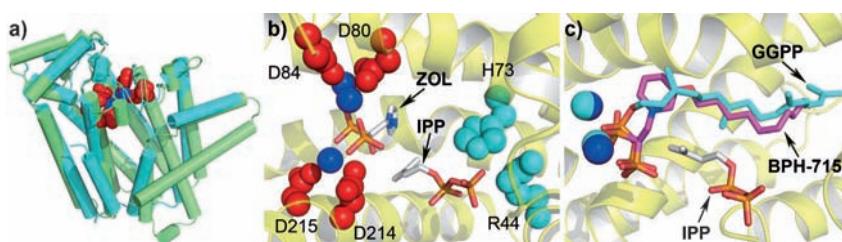
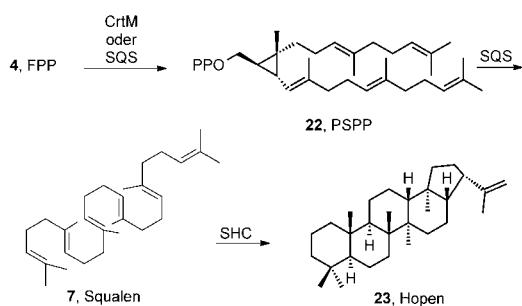
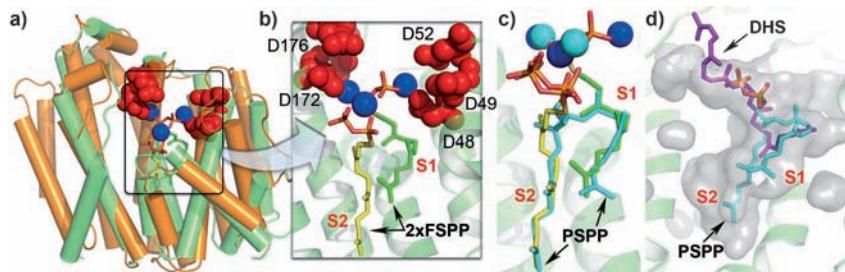


Abbildung 2. GGPPS-Strukturen. a) Überlagerung von humaner FPPS (grün; PDB-Code: 2F8C) und humaner GGPPS (blaugrün; PDB-Code: 2Q80) mit der Asp-reichen Domäne (rot) und Mg²⁺ (blau) als Kugeln hervorgehoben. b) Zoledronat (ZOL) und IPP gebunden an das aktive Zentrum der GGPPS aus *P. vivax* (PDB-Code: 3LDW). c) Verbindung **21** (BPH-715, pink), IPP, Mg²⁺ an *S.-cerevisiae*-GGPPS (PDB-Code: 2Z4V) gebunden, überlagert von GGPP (grünblau; PDB-Code: 2Q80), das an die Produktstelle gebunden ist. Humane GGPPS hat eine sehr ähnliche lokale Struktur und wird durch **21** stark inhibiert, aber nicht durch Zoledronat.



Schema 4. Umwandlung von FPP in cyclische Produkte.

Abbildung 3. Strukturen von CrtM und SQS. a) *S.-aureus*-CrtM (grün; PDB-Code: 2ZCP) mit FSPP, Mg^{2+} eingebettet auf humane SQS (orange; PDB-Code: 1EZF); es sind essentielle Asp-Reste und Mg^{2+} , farbig gekennzeichnet wie in Abbildung 1. b) Aktives Zentrum in CrtM + FSPP (grün, gelb), Mg^{2+} (rot). c) PSPP, Mg^{2+} (alle blaugrün; PDB-Code: 3NPR), gebunden an CrtM, überlagert durch die FSPP/ Mg^{2+} -Struktur (in grün/gelb/blau; PDB-Code: 2ZCP). d) Dehydrosqualen-Produkt (pink; PDB-Code: 3NRI), gebunden an CrtM und überlagert von der PSPP-Struktur (grünblau). S1 = Allyl-Bindungsstelle; S2 = Homoallyl-Bindungsstelle.

oder Produkt offensichtlich nicht ähnlich war. Kürzlich wurde die Struktur der Dehydrosqualen-Synthase aus *S. aureus*, CrtM (in Gegenwart des nichtreaktiven, FPP-Substrat-ähnlichen Inhibitors *S-Thiolo*-Farnesyldiphosphat, FSPP) beschrieben.^[34] Die Gesamtgefaltung (mit e bezeichnet) ist ähnlich der bei SQS beobachteten (ein C^{α} -rmsd-Wert von 2.7 Å, Abbildung 3a), und es sind zwei FSPP-Liganden sowie drei Mg^{2+} vorhanden (Abbildung 3b). Aber welches FPP ionisiert, um das Farnesyl-Kation zu bilden und welches fungiert als Nucleophil, das mit dem Carbokation reagiert? Dies lässt sich anhand der FSPP-Röntgenstruktur (Abbildung 3b) nicht klären, da beide Sätze möglicher Kation/Olefin-Kohlenstoff-Abstände Werte um 5.5 Å ergeben.^[34]

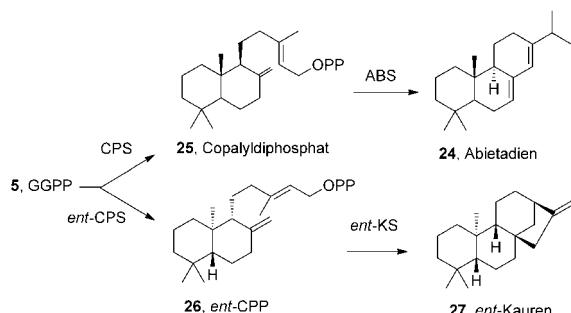
Erfreulicherweise wurde nun die Röntgenkristallstruktur der an CrtM gebundenen PSPP-Zwischenstufe beschrieben.^[37] Die Ergebnisse (Abbildung 3c, blaugrün) zeigen, dass wahrscheinlich das FPP an der S1-Stelle ionisiert wird und anschließend mit der Doppelbindung des FPP an der S2-Stelle unter Bildung von Cyclopropylcarbinyl-diphosphat (PSPP, Abbildung 3c) reagiert. Das PSPP „schnippt“ dann zurück zum $[Mg^{2+}]_3$ -Cluster, wird ein zweites Mal ionisiert und reagiert über Ringöffnung und H^+ -Abgabe zu Dehydrosqualen, das nun in einer Oberflächentasche detektiert wurde (Abbildung 3d, violett). Dieser Mechanismus wird durch Resultate aus ortsgerichteter Mutagenese^[37] gestützt sowie durch die Beobachtung, dass bei Überlagerung der FSPP/ Mg^{2+} -CrtM-Struktur mit der von Prenylsynthasen (FPPS, GGPPS), deren Mechanismus bekannt ist, die S1-

Stelle in der „allylischen“ Position, die in solchen Enzymen sowie in Terpencyclasen mit bekanntem Mechanismus gefunden wurde, platziert ist.^[37] Werden CrtM, FSPP und FPP gemischt, entsteht *S-Thiolo*-PSPP (aber kein Dehydrosqualen), was im Einklang ist mit der Ionisierung von FPP in S1 und der hohen Nucleophilie von FSPP in S2. *S-Thiolo*-PSPP kann an der allylischen Stelle nicht ionisieren, ebenso wie *S-Thiolo*-Diphosphat-Inhibitoren anderer Prenylsynthasen.^[38] Die Erforschung der Bindungsstellen für das FPP-Substrat und die PSPP-Zwischenstufe sowie die Beobachtung, dass potente SQS-Inhibitoren (von Interesse als Antiinfektiva) auch CrtM inhibieren und beträchtliche hydrophobe Wechselwirkungen in den S1- und S2-Bindungsstellen^[37] eingehen, öffnet neue Wege für die Entwicklung antiinfektiver Wirkstoff-Leitstrukturen, die auf die Sterol-Biosynthese^[39] sowie die Virulenzfaktor-Bildung in *S. aureus*^[34] gerichtet sind. Es bleibt aber noch aufzuklären, wo und wie der NADPH-Reduktionsschritt in SQS abläuft.

5. Diterpencyclasen: Die „ $\alpha\beta\gamma$ -Faltung“-Hypothese

Die meisten Terpene enthalten Ringstrukturen, die von Terpensynthasen, allgemein als Terpencyclasen bezeichnet, gebildet werden. Einige Jahre zuvor gab es verstärkte Aktivität auf diesem Gebiet

mit der Veröffentlichung der Strukturen der (C_{30})-Triterpenacyclasen Squalen-Hopen-Cyclase^[40] (SHC) und Oxidosqualen-Cyclase,^[41] der (C_{15})-Sesquiterpencyclasen Epiaristolochen-Synthase (EAS)^[42] und Pentalen-Synthase^[43] sowie der (C_{10})-Monoterpen-Synthase Bornyldiphosphat-Synthase (BS)^[44]. Die Strukturen der (C_{20})-Diterpencyclasen waren jedoch sehr viel schwieriger zu erhalten, sind jedoch wichtig, da sie z.B. an der Biosynthese von Taxol und Gibberellin beteiligt sind. Um diesen Mangel an direkten Strukturinformationen zu beheben, wurden kürzlich Bioinformatikstudien und Mutagenese-Experimente zur Aufklärung einiger Schlüsselmerkmale der Diterpencyclase-Struktur und -Funktion ausgeführt.^[45] Angeregt wurde diese Arbeit durch eine frühere Genom-Studie,^[46] die darauf hindeutete, dass eine ancestrale Diterpencyclase der Vorläufer der Terpencyclasen in modernen Pflanzen sein könnte; durch die Beobachtung,^[47] dass es Strukturähnlichkeiten zwischen einer Triterpencyclase und einer Sesquiterpencyclase gibt, und durch ähnliche Beobachtungen,^[48] dass Sequenzähnlichkeiten zwischen der difunktionalen Diterpencyclase Abietadien(24)-Synthase (deren Struktur nicht beschrieben ist) und der Sesquiterpencyclase Epiaristolochen-Synthase (deren Struktur bekannt ist) bestehen. Die Diterpencyclasen katalysieren zwei Reaktionstypen. Bei Cyclasen der Klasse II wird GGPP (5) zu einem Carbokation protoniert, das dann z.B. zu Copalyldiphosphat (25) cyclisiert wird (Schema 5). Es ist bekannt, dass diese Reaktion durch ein DXDD-Motiv (kein DDXDD-Motiv) katalysiert wird und chemisch ähnlich ver-



Schema 5. Die Bildung von Diterpenen aus GGPP.

läuft wie die Protonierungs-Cyclisierungs-Reaktion, die beispielsweise durch die Squalen-Hopen-Cyclase (7→23; Schema 4) – die ebenfalls eine hoch konservierte katalytische DXDD-Domäne aufweist – katalysiert wird. Bei Cyclasen der Klasse I erfolgt die Katalyse grundlegend anders, und es ist der gleiche Typ DDXD/[Mg²⁺]-Domänen^[12b] beteiligt wie bei den Kopf-Kopf- und *trans*-Kopf-Schwanz-Prenyltransferasen: die Produkte sind die vielfältigen Monoterpene, Sesquiterpene und Diterpene, die in Pflanzen vorkommen. Die dritte Klasse Terpencyclasen sind „gemischte“ Klasse-I + II-Cyclasen, dazu gehören die Abietadien-Synthase und Levopimaradien-Synthase, die sowohl durch Protonierung ausgelöste als auch durch Ionisierung ausgelöste Reaktionen durchführen können. Aber wie könnten deren Strukturen oder die irgendeiner anderen Diterpencyclase aussehen?

Um diese Frage zu beantworten, folgten Cao et al.^[45] früheren Beobachtungen, nach denen viele Terpencyclasen (wie EAS) eine hoch α -helicale katalytische Domäne (DDXXD/Mg²⁺) enthalten, die an eine rudimentäre N-terminalen Region geknüpft ist, ein Muster, das in vielen anderen Proteinen – einschließlich der Bornyldiphosphat-Synthase und unlängst der Isopren-Synthase^[49] – gefunden wurde. Die katalytische DDXD-enthaltende Domäne bezeichnen wir mit α , da deutliche 3D-Strukturähnlichkeit zwischen dem α -Domänenprotein FPPS und dieser Domäne in solchen Terpencyclasen besteht, z.B. beträgt der rmsd-Wert zwischen humarer FPPS und IS 3.4 Å. In den Hemi-, Mono- und Sesquiterpencyclasen existiert im Allgemeinen auch eine zweite helicale Domäne, die wir mit β bezeichnen und die Strukturhomologie zur Fass-Struktur der Squalen-Hopen-Cyclase^[45] aufweist (Abbildung 4a). Dies ließ darauf schließen, dass pflanzliche Diterpencyclasen nicht nur α - (Abbildung 4b) und β -Domänen enthalten, sondern auch eine dritte helicale γ -Domäne – da die β -Domäne in Mono- und Sesquiterpencyclasen der β -Domäne in SHC strukturell ähnelt, die Diterpencyclasen in Pflanzen sehr groß sind und SHC selbst zwei β -Fass-Domänen aufweist.^[40] Die Diterpencyclasen könnten dann aus einer Fusion der Gene für die α - und $\beta\gamma$ -Domänenproteine hervorgegangen sein,^[45] wie in der hypothetischen $\alpha\beta\gamma$ -Struktur in Abbildung 4c veranschaulicht. Dieser „Struktur“ (erhalten durch SHC/EAS/FPPS-Abgleich) fehlt eine kovalente Bindung zwischen α - und $\beta\gamma$ -Domäne, aber der C-Terminus von SHC ist nur etwa 2.5 Å vom N-Terminus in FPPS entfernt (Abbildung 4c, orange).

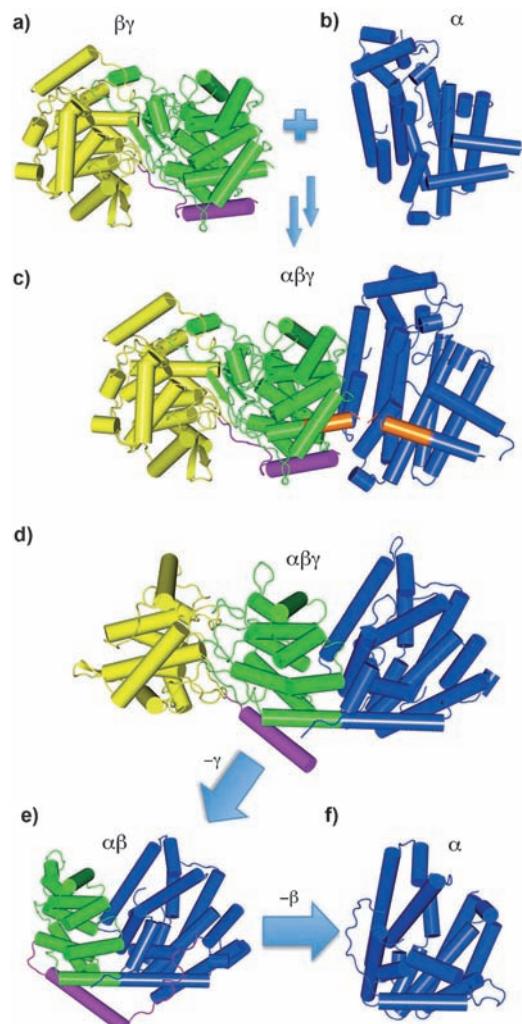


Abbildung 4. Entstehung und Entwicklung der Terpencyclasen. a) Gene für ancestrale $\beta\gamma$ -Domänen-Proteine (wie SHC; PDB-Code: 3SQC) verschmelzen mit Genen für ursprüngliche α -Domänen-Spezies wie FPPS (PDB-Code: 1ZW5), b) um eine Diterpencyclase mit drei helicalen Domänen ($\alpha\beta\gamma$) zu erzeugen: c) Orangefarbene Schattierung zeigt enge Nachbarschaft (ca. 2.5 Å) von SHC-C-Terminus und FPPS-N-Terminus (bei einer $\alpha/\alpha\beta/\beta\gamma$ -FPPS/EAS/SHC-Anordnung). d) Struktur einer aktuellen Diterpencyclase, Taxadien-Synthase^[53] (PDB-Code: 3P5P). e) Verlust der γ -Domäne liefert ein $\alpha\beta$ -Protein, z.B. die Sesquiterpencyclase Isopren-Synthase (PDB-Code: 3N0F). f) Weiterer Verlust der β -Domäne ergibt andere Cyclasen, z.B. Pentalenen-Synthase (PDB-Code: 1PS1), eine α -Domänen-Cyclase. Ursprüngliche α - und $\beta\gamma$ -Domänen-Spezies synthetisierten vermutlich FPP, GGPP und Squalen, die verwendet wurden, um in Archaeabakterien Lipide aufzubauen; die $\alpha\beta\gamma$ -abgeleiteten Familien sind viel spätere Abkömmlinge. Besonders zu erwähnen ist, dass der N-terminale Helixteil (magenta) in $\alpha\beta$ -, $\beta\gamma$ - und $\alpha\beta\gamma$ -Proteinen konserviert ist und für die Aktivität benötigt wird.

In Diterpencyclasen der Klasse I wie der Taxadien-Synthase (TXS) wäre nur die konservierte DDXD- α -Domäne (blau) funktionsfähig, obwohl die $\beta\gamma$ -Domänen vorhanden sind (und wahrscheinlich wichtig für die Faltung wären). In den Diterpencyclasen der Klasse II wären die β - (grün, Abbildung 4c) und γ -Domänen (gelb) funktional, aber die α -Domäne nicht – abgesehen von einer wahrscheinlichen Funktion bei der Faltung – da die DDXD-Domäne fehlt. In

Diterpencyclases der difunktionalen Klasse I + II wären alle drei Domänen vorhanden und an der Katalyse beteiligt: Die $\beta\gamma$ -Domäne katalysiert die Cyclisierung von GGPP, die α -Domäne verarbeitet das Produkt aus der ersten Reaktion.

Diese Strukturvorstellungen wurden durch die Beobachtung gestützt, dass viele Bakterien^[50] Gibberelline (Diterpene) synthetisieren, aber ihre Biosynthese wird in Bakterien durch zwei getrennte Enzyme katalysiert: einer *ent*-Copolyldiphosphat-Synthase (*ent*-CPPS; GGPP → *ent*-CPP, 26) aus der Klasse II und einer Kauren-Synthase (KS; *ent*-CPP → *ent*-Kauren, 27) aus der Klasse I. In *Bradyrhizobium japonicum* überlappen die beiden offenen Leseraster, die für diese verschiedenen Proteine codieren, an einem einzigen Nucleotid. Interessant bei dieser *ent*-CPPS ist, dass nicht nur das katalytische DXDD-Motiv vorkommt, sondern auch zwei „QW“-Motive oder Foldons, die charakteristisch sind für ein β -Fass. Ein β -Fass hat 6 innere und 6 äußere Helices, sodass eine $\beta\gamma$ -Struktur 24 Helices aufweisen sollte. Unter Verwendung der Bioinformatik-Computerprogramme JPRED^[51] und COUDES^[52] wurden 23 erfasst.^[45] Aber sind diese Strukturvorstellungen korrekt?

6. Taxadien-Synthase: Struktur einer $\alpha\beta\gamma$ -Faltung und Evolution zu den $\alpha\beta$ -Proteinen

Die Analyse^[53] der ersten Einkristallröntgenstruktur einer Diterpencyclase, Taxadien-Synthase (TXS), belegt die oben beschriebenen Strukturvorhersagen. Wie vorausgesagt enthält TXS tatsächlich drei helicale Domänen, eine $\alpha\beta\gamma$ -Struktur (Abbildung 4d). In TXS ist, da es sich um eine Klasse-I-Cyclase handelt, nur das DDXXD-Motiv vorhanden, das ursprünglichere katalytische DXDD-Motiv fehlt. Es ist daher bemerkenswert, dass die $\alpha\beta\gamma$ -Struktur noch bewahrt ist, obwohl die β - und γ -Domänen bei der Katalyse an sich nicht beteiligt sind, dennoch können sie natürlich für die Faltung wichtig sein. Mit Chimären^[45] einer Pflanzen-($\alpha\beta\gamma$)-CPS wurde kürzlich gezeigt, dass – obwohl die α -Domäne für die Aktivität benötigt wird – diese keine Wirkung auf das stereochemische Resultat der eigentlichen, durch die $\beta\gamma$ -Domäne katalysierten Reaktion hat und daher wahrscheinlich nur für die Proteinfaltung/Stabilität von Bedeutung ist.

Diese TXS-Strukturergebnisse stützen den früher^[45] vorgebrachten Vorschlag, dass eine ursprüngliche Klasse-II- $\beta\gamma$ -Triterpencyclase (wie SHC) sich evolutionär zu einer moderneren bakteriellen Klasse-II-Diterpencyclase entwickelt hat, die dann mit einer ursprünglichen Klasse-I-Cyclase fusionierte und eine difunktionale, Abietadien-Synthase-ähnliche Diterpencyclase bildete, den Vorläufer (nach Exonverlust und Rekombination)^[46] vieler moderner Mono-, Sesqui- und Diterpencyclases neben der Isopren-Synthase selbst.^[49] Die α -Domäne in TXS ist ziemlich ähnlich zu der in FPPS (3.4 Å rmsd), aber die γ -Domäne enthält deutlich weniger Helices, als für eine „vollständige“ $\beta\gamma$ -Fass-Struktur erwartet wird. In vielen pflanzlichen Terpencyclasen sowie in der Isopren-Synthase fehlt die γ -Domäne vollständig, obschon die β -Domäne bleibt – auch wenn sie bei der Katalyse keine direkte Funktion erfüllt.

Diese $\alpha\beta$ -Domänen-Proteine enthalten eine sehr lange Helix-„Brücke“, die sowohl zur α - als auch zur β -Domäne gehört (Abbildung 4e) und auch in TXS vorkommt (Abbildung 4d). Und wie oben angemerkt, ist es wahrscheinlich, dass diese Brücke durch Fusion des C-Terminus eines $\beta\gamma$ -Domänen-Proteins mit dem N-Terminus einer α -Domäne (orange in Abbildung 4c) entstanden ist. Das $\alpha\beta$ -Protein Isopren-Synthase zeigt positive Kooperativität, die auf die Bildung einer dimeren, Quartärstruktur $\alpha_2\beta_2$ zurückgeführt wird. Diese Dimerstruktur liegt sowohl in Lösung als auch im kristallinen Feststoff vor. Auffällig ist, dass die Röntgenstruktur der Isopren-Synthase und die zweier Monoterpencyclasen, Limonen-Synthase und Bornyldiphosphat-Synthase, fast identische $\alpha_2\beta_2$ -Quartärstrukturen aufweisen,^[49] wie in Abbildung 5 zu sehen ist. Zum Mechanismus wurde vorgeschlagen, dass in der Isopren-Synthase die Diphosphatgruppe als allgemeine Base wirkt und eines der Methylprotonen im DMAPP-Substrat (1) unter Bildung von Isopren (17) abstrahiert (Schema 6). Der Ablauf dieses Eliminierungsschritts wäre dann gleich zu dem, der Farnesen liefert. Farnesen, ein potenziell wichtiger Ersatz für Dieseltreibstoff, wird in einer Reaktion gebildet, die durch Farnesen-Synthase, ein weiteres

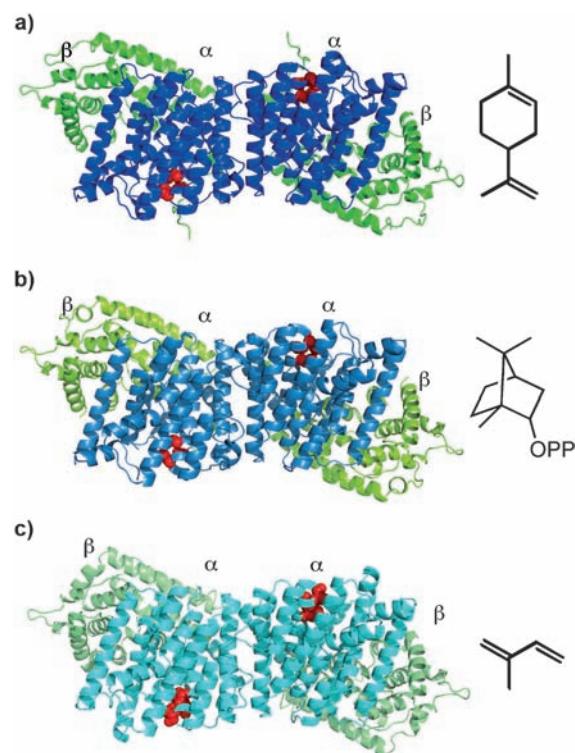
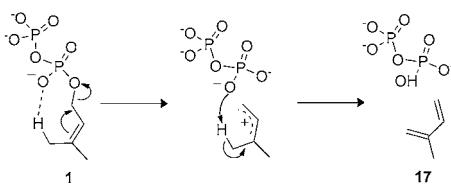


Abbildung 5. Quartärstruktur dreier dimerer $\alpha_2\beta_2$ -Terpensynthasen.
a) Limonen-Synthase mit Produkt Limonen. b) Bornyldiphosphat-Synthase mit Produkt Bornyldiphosphat. c) Isopren-Synthase mit Produkt Isopren. Die katalytischen α - oder C-terminalen Domänen sind blau, die β - oder N-terminalen Domänen grün gekennzeichnet. Die verdeckten Oberflächenregionen, die die Dimerisierungskontaktfläche einschließen, sind (1148 ± 88) Å² groß. Der C^α-rmsd-Wert zwischen den drei Strukturen beträgt 1.4 Å. Diese Abbildung beruht auf Abbildung 8 in Lit. [49] und wurde unter Verwendung der Proteindatenbank-Einträge 2ONG, 1N1B und 3NOF erstellt.



Schema 6. Diphosphat wirkt als allgemeine Base bei der durch die Isopren-Synthase katalysierten Umwandlung von DMAPP in Isopren.

(vorhergesagtes) $\alpha\beta$ -Protein, katalysiert wird. Die molekulare Basis der bei der Isopren-Synthase festgestellten Kooperativität bleibt jedoch noch aufzuklären. Nach Verlust der β -Domäne bilden sich die α -Domänen-Cyclasen, z.B. die Pentalenen-Synthase^[43] (Abbildung 4 f), wie früher vorgeschlagen.^[46]

Die Auflösung der TXS-Struktur ist eine wichtige Entwicklung, da sie die bisherigen, auf dem Genom und der Bioinformatik basierenden Vorstellungen^[45,46] zur Genese und Evolution vieler moderner Pflanzen-Terpensynthasen stark untermauert und zudem vermehrtes Vertrauen bezüglich der Verwendung bioinformatischer Methoden zur korrekten Vorhersage von Struktur und Funktion schafft. Unlängst wurde die Struktur einer *ent*-Copolyldiphosphat-Synthase beschrieben.^[54] Wie TXS ist sie ein $\alpha\beta\gamma$ -Protein mit drei helicalen Domänen, doch das aktive Zentrum befindet sich an der Kontaktfläche zwischen β - und γ -Domäne.

7. ζ -(Z- oder cis-)Prenyldiphosphat-Transferasen und die Tuberculosinol-Synthase

Bisher haben wir nur die Strukturen und Funktion der *trans*-Prenyltransferasen und einiger Terpencyclasen betrachtet. Es gibt jedoch noch eine weitere wichtige Klasse von Prenyltransferasen, die Z- oder *cis*-Prenyltransferasen. Sie katalysieren die Bildung von Isoprenoiddiphosphaten mit überwiegend *cis*-Doppelbindungen. Diese Enzyme sind essenziell für die Synthese der Zellwand in Bakterien und damit mögliche wichtige Ziele für die Entwicklung von Antiinfektiva. Die Proteinfaltung, hier ζ -Faltung (für Z) genannt, ist völlig anders als die in den „FPPS-artigen“ α -, δ - und ε -Prenyltransferasen beobachtete.^[55]

Die Undecaprenyl(C_{55})-Diphosphat-Synthase (UPPS) aus *E. coli* besteht aus einem zentralen β -Faltblatt mit 6 parallelen Strängen und 7 umliegenden α -Helices (Abbildung 6 a).^[56] Die FPP- und IPP-Substrate binden wie in Abbildung 6 b gezeigt und anders als bei den *trans*-Prenyltransferasen und Terpencyclasen gibt es keine konservierten DDXXD-Motive und keinen $[Mg^{2+}]_3$ -Cluster, obwohl Mg^{2+} für die Katalyse erforderlich ist.^[57] Diese Befunde deuten daraufhin, dass sich der Mechanismus für die UPPS-Katalyse vom sequenziellen Ionisierungs-Kondensations-Eliminierungs-Mechanismus der *trans*-Prenylsynthasen unterscheidet. Vor kurzem zeigten Lu et al.,^[57] dass es mit IPP als Substrat keinen Hinweis für die Bildung eines Farnesyl-Carbokation-Intermediats (keine 3H -Farnesol-Bildung aus $[^3H]$ -FPP) gibt, weder mit der *trans*-Prenyltransferase Octaprenyldiphosphat-Synthase (OPPS) noch mit UPPS, aber wenn die Reaktions-

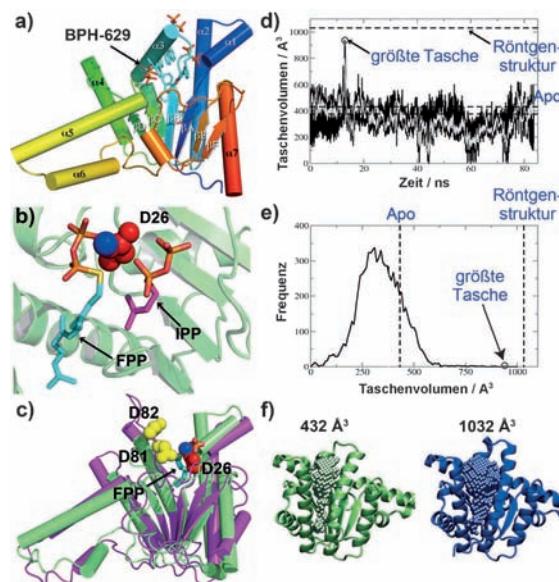
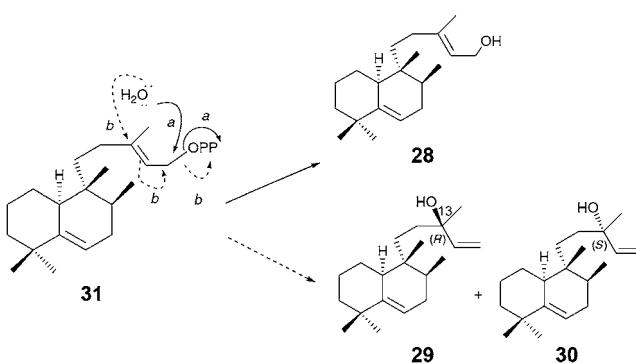


Abbildung 6. Strukturen und Dynamik der ζ -Prenyltransferase UPPS. a) Gesamtstruktur eines Bisphosphonat-gebundenen *E. coli*-UPPS-Monomers (PDB-Code: 2E98). b) Substrate (FPP und IPP), gebunden am aktiven Zentrum von UPPS (PDB-Code: 1X06). c) Strukturelle Ausrichtung der prognostizierten Struktur von Rv3378c mit UPPS. d) Moleküldynamik-Simulation der UPPS. Datenentnahme alle 10 ps (schwarz) oder alle 100 ps (grau). e) Häufigkeit des Auftretens der Tasche gegen Taschenvolumen. Die Apostruktur hat ein kleines Taschenvolumen; das größte Volumen liegt nahe bei jenem, das durch einen großen Inhibitor besetzt wird. Wiedergabe von (d)–(f) nach Lit. [65].

geschwindigkeit durch Verwendung von 3-Br-IPP verringert wird, bildet sich mit OPPS 3H -Farnesol, jedoch nicht mit UPPS.^[57] Da 3-Br-IPP die UPPS-Reaktion verlangsamt, wurde vorgeschlagen, dass das C3 von IPP erst nach der Kondensation, einem konzentrierten Mechanismus, in dem IPP FPP ohne vorherige Bildung eines Farnesyl-Carbokations angreift, kationischen Charakter entwickelt. Diese Ergebnisse stimmen mit der Beobachtung überein, dass zwar einige der stärksten UPPS-Inhibitoren Bisphosphonate sind, der UPPS-Inhibitor Pharmakophor^[56] aber keine kationische Ladung aufweist – im Unterschied zur Situation bei FPPS – und tatsächlich verringert die kationische Struktur die Aktivität um etwa eine Größenordnung.^[56] Die maßgeblichen Eigenschaften für einen Inhibitor sind daher das Vorhandensein mehrfacher hydrophober Strukturen zusätzlich zur polaren Gruppe, während hydrophile Bisphosphonat-Wirkstoffe wie Risedronat tatsächlich keine Aktivität zeigen ($IC_{50} \approx 660 \mu M$ ^[56]).

Es erhebt sich die Frage, ob die ζ -Faltung einzigartig ist und nur beschränkt auf UPPS und eng verwandte Systeme in Mykobakterien oder ob sie auch in anderen Systemen auftreten könnte. Die Verwendung des SSM-Programms,^[58] um ähnliche Faltungen zu finden, lieferte keine Treffer. Naheliegende Proteinkandidaten wären andere Prenylsynthasen, die Mg^{2+} nutzen, doch deren Strukturen sind unbekannt sowie das Rv3378c-Genprodukt von *Mycobacterium tuberculosis*, ein Target für antiinfektive Therapieansätze.^[59] Dieses Protein katalysiert die Bildung des Diterpen-Virulenz-Faktors Tuberculosinol (**28**) und der Isotuberculosinole (**29, 30**)



Schema 7. Bildung des Tuberculosinol-Virulenzfaktors in *M. tuberculosis*.

aus Tuberculosinoldiphosphat (**31**; Schema 7): In diesem Fall wirkt H_2O als Nucleophil und greift entweder C1 oder C3 im allylischen Substrat an.^[60] Mit drei Programmen zur Strukturvorhersage, I-TASSER,^[61] SWISS-MODEL^[62] und Phyre,^[63] stellten wir eine entfernte Sequenzhomologie zwischen Rv3378c und UPPS fest (19 % Identität mit Phyre). Die am besten vorhergesagten Faltungen aus jedem Programm sind sehr ähnlich und eine ist in Abbildung 6c zu sehen, eingebettet auf die UPPS-Struktur, wobei der rmsd-Wert zwischen der Rv3378c-C^a-Vorhersage und der in *E. coli* gefundenen UPPS 1.93 Å beträgt. Besonders interessant an den Modellen ist, dass das DDXXD-Motiv, das bekanntermaßen essenziell für die Katalyse ist,^[64] am Eingang zur hauptsächlichen (UPPS) Ligand-Bindungsstelle und nahe bei den essenziellen D26 und Mg²⁺ in der UPPS-Struktur lokalisiert ist (Abbildung 6c), was die Vorstellung stützt, dass dieses Protein auch die ζ -Faltung annimmt – doch wie bei den Diterpencyclases sind Röntgenstrukturen wünschenswert, um diese Vorhersagen zu bestätigen.

8. Die dynamische Struktur der Prenyltransferase UPPS

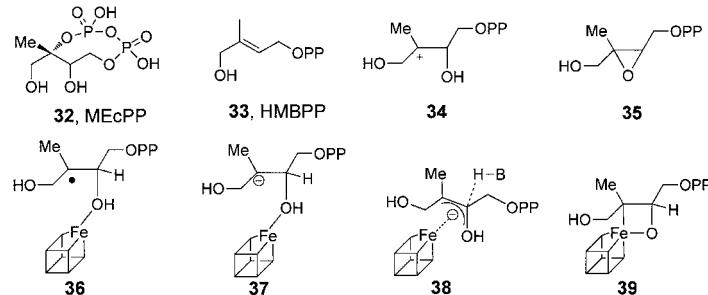
Für die Arzneimittelforschung mit UPPS sowie mit anderen Proteinen ist es wichtig, zu untersuchen wie die Bindung von Liganden die Proteinstruktur beeinflusst. In einigen Fällen mag die Struktur eines Proteins bekannt sein, es gibt aber keine Substrat-, Produkt- oder Inhibitor-gebundene Strukturen, was das Auffinden von Inhibitoren über virtuelles Screening erschwert, da keine offensichtliche Ligandbindungstasche als Target vorhanden ist. Ein ligandfreies Protein muss sich jedoch ausdehnen, um Substrate und Produkte unterzubringen und es ist diese „offenere“ Struktur, die das Auffinden von Inhibitoren ermöglicht. Ein Ansatz, um solche Strukturen zu finden, ist die Verwendung von Moleküldynamik-Simulationen.^[65] Ausgehend von einer „offenen“ UPPS-Form (die in Abbildung 6a gezeigte Struktur, aber ohne gebundenen Ligand) zeigt eine Moleküldynamik-Trajektorie (Abbildung 6d), dass das ursprünglich vom gebundenen Ligand besetzte Volumen (etwa 1000 Å³) rasch abnimmt, dann den größten Teil der Trajektorie

konstant bleibt und dieses Volumen (etwa 430 Å³, Abbildung 6f) ist sehr ähnlich den ungefähr 330 Å³, die in einer Kristallstruktur des ligandfreien Proteins bestimmt wurden.^[56,65] Um die Substrat/Produkt/Inhibitor-Bindungsstelle zu bilden, wird das Protein jedoch vorübergehend geöffnet (Abbildung 6d-f). Bemerkenswerterweise ermöglicht die Verwendung dieses kaum geprüften Konformationszustands (mit dem Glide-Programm^[66]) für eine Reihe von Bisphosphonat-Inhibitoren von UPPS viel engere ligandgebundene Positionen und bessere IC₅₀/„Docking-Score“-Korrelationen wie mit der geschlossenen Form des Enzyms gefunden wurden.^[65] Diese Ergebnisse weisen daraufhin, dass die Verwendung von MD-Methoden, um seltene „Expanded-pocket“-Zustände zu erproben, ein potenziell wichtiger Zugang ist, um die Inhibitorschreibe über virtuelles Screening zu erleichtern, und dass sich dieses Verfahren wahrscheinlich auf die meisten Prenyltransferasen und Terpensynthetasen, in denen große Taschenvolumen benötigt werden, um große Liganden unterzubringen, anwenden lässt.

9. 4Fe-4S-Reduktasen: Fortschritte und offene Fragen bei IspG und IspH

Schließlich wenden wir uns der Frage zu, wie in Pflanzenplastiden und in vielen Bakterien die DMAPP- und IPP-Terpenvorstufen synthetisiert werden. Die Biosynthese von DMAPP und IPP wird eingeleitet durch die Kondensation von Pyruvat mit Glycerinaldehydphosphat unter Bildung von 1-Desoxyxylulosephosphat, das nach vier weiteren Reaktionen 2-C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclo-diphosphat (MEcPP; **32**; Schema 8) ergibt. MEcPP wird dann durch die (E)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat(HMBPP)-Synthase (IspG; auch als GcpE bekannt) in HMBPP (**33**) umgewandelt, das anschließend durch die HMBPP-Reduktase (IspH; auch als Lyt B bekannt) im Verhältnis von ungefähr 5:1 zu IPP und DMAPP reduziert wird. Aber welche Struktur haben diese Enzyme? Wie führen sie diese außergewöhnlichen Reaktionen durch?

Basierend auf chemischer Analyse, Bioinformatik und EPR-Spektroskopie wurde nachgewiesen, dass sowohl IspG als auch IspH 4Fe-4S-Cluster enthalten, die mit den in Ferredoxinen gefundenen verwandt sind, aber mit einer ungewöhnlichen Koordination, nämlich einem Nicht-Cys-Rest am speziellen vierten Fe-Atom;^[67] die Ergebnisse wurden jetzt



Schema 8. Bildung von HMBPP: Substrat, Produkt und mögliche reaktive Zwischenstufen.

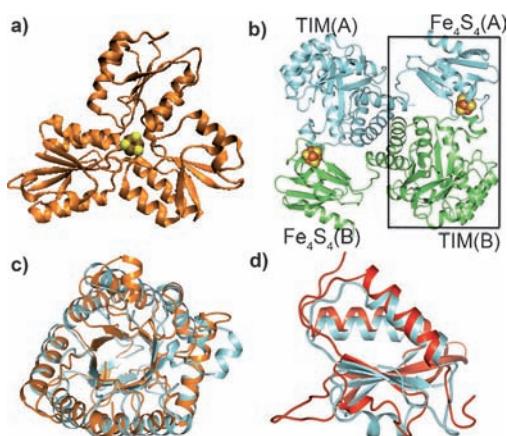


Abbildung 7. Modular Strukturen der 4Fe-4S-Cluster-enthaltenden Proteine IspH und IspG. a) *A.-aeolicus*-IspH (PDB-Code: 3DNF) mit den drei Helix/Faltblatt-Domänen um den 4Fe-4S-Cluster in der „geschlossenen“ Form (verdeckt den Fe-S-Cluster). b) *A.-aeolicus*-IspG (PDB-Code: 3NOY) mit „offener“ Struktur. Der 4Fe-4S-Cluster einer Kette wechselwirkt mit dem TIM-Fass in der zweiten Kette, um das aktive Zentrum zu bilden (schwarzer Kasten). c) Überlagerung des TIM-Fasses in *A.-aeolicus*-IspG (orange) mit Dihydropteroat-Synthase aus *B. anthracis* (grau; PDB-Code: 1TWS). d) Überlagerung der 4Fe-4S-Cluster-Domäne in IspG mit der in Spinat-Nitrit-Reduktase. Die C^α-rmsd-Werte in (c,d) betragen 2.4 bzw. 2.1 Å.

durch Röntgenstrukturen bestätigt.^[68] Die Struktur von IspH (Abbildung 7a) ist ungewöhnlich, denn sie besteht aus einem modularen Kleeblatt oder einer Dreiblatt-artigen Struktur, worin drei verschiedene helicale/Faltblatt-Domänen einen zentralen Fe-S-Cluster umgeben. Diese Faltung ist sehr ähnlich zu der zweier anderer 4Fe-4S-Proteine: der Chinolinat-Synthase^[69] und der Diphthamid-Synthase^[70] mit einem durchschnittlichen C^α-rmsd-Wert von 2.5 Å zwischen jeder der Domänen, was wie bei den anderen Prenylsynthasen wieder auf Genduplikation und Kondensation hinweist. Mechanistisch scheint es, dass das HMBPP-Substrat zuerst an das vierte Fe des 4Fe-4S-Clusters bindet und dann zu einer Allyl-Zwischenstufe reduziert wird.^[68b, 71] Ein Zwischenprodukt, dem das HMBPP-O1 fehlt, kann kristallographisch erkannt werden^[68b] und hat Fe-C-Bindungslängen um 2.6–2.7 Å, was eine Metall-Ligand-Wechselwirkung nahelegt (Summe der Van-der-Waals-Radien von Fe und C: ca. 3.6 Å^[72]). Eine ausführliche Besprechung der IspH-Struktur und des Mechanismus ist kürzlich in dieser Zeitschrift erschienen.^[73] Bei IspG ist die Sachlage jedoch komplexer.

Zwei Mechanismen erscheinen für die IspG-Katalyse plausibel. In einem öffnet sich der *cyclo*-Diphosphat-Ring im MEcPP-Substrat zum Carbokation (34), dieses wird zunächst zu einem Anion reduziert und anschließend in das HMBPP-Produkt überführt. Im anderen Mechanismus isomerisiert das *cyclo*-Diphosphat zuerst zum Epoxid (35), das dann durch den 4Fe-4S-Cluster desoxygiert wird. Für letzteren Mechanismus spricht, dass Epoxide in Modellsystemen^[74] durch reduzierte 4Fe-4S-Cluster zu Olefinen reduziert werden, und zudem wird HMBPP-Epoxid – mit ähnlicher Kinetik wie bei MEcPP gemessen – durch IspG zu HMBPP reduziert.^[75] Jedoch wurde jetzt beschrieben, dass die Geschwindigkeit der durch IspG katalysierten MEcPP→Epoxid-Reaktion sehr

langsam ist^[76] und nicht vereinbar mit den beobachteten *k*_{cat} für MEcPP und HMBPP-Epoxid^[77] als Substrate, was eher auf parallele statt aufeinanderfolgende Reaktionen und eine gemeinsame Zwischenstufe deutet. Zudem gibt es Hinweise, dass sich ein Carbokation MEcPP + IspG bildet.^[77] Was könnte dann die Reaktionszwischenstufe sein?

Gibt man entweder MEcPP oder HMBPP-Epoxid zu reduziertem IspG, wird das gleiche reaktive Intermediat „X“^[78] gebildet,^[78, 79] was über EPR-, ENDOR- oder HYSCORE-Spektroskopie zu beobachten ist. Bei Inkubation reagiert „X“ zum HMBPP-Produkt, das wie bei IspH dann an den 4Fe-4S-Cluster bindet.^[79] Für „X“ hat man mehrere Strukturen (z. B. 36–39) in Betracht gezogen: Ein Radikal (36) ist unwahrscheinlich, da keine Radikal-ähnlichen Signale in den EPR-Spektren auftreten und sich die beobachtete Resonanz durch ⁵⁷Fe-Markierung verbreitert.^[79b] Ein Carbanion (37) ist unwahrscheinlich, da es sehr reaktiv wäre und ein π/η-Komplex (38) ist unwahrscheinlich, da kein η³-Oxaallyl vorliegt (da das Sauerstoffatom protoniert ist) und H3 während der Isoprenoid-Biosynthese erhalten bleibt, wie ²H-Markierungsstudien beweisen.^[80] Die beobachtete ¹³C-Hyperfeinkopplung (ca. 16 MHz) ist ähnlich wie die für eine Fe-C-Bindung in einer Fe-Fe-Hydrogenase (17 MHz) ermittelte^[81] sowie die für eine Mo-C-Einfachbindung in einem Formaldehyd-Xanthin-Oxidase-Komplexmodell (ca. 16 MHz) berechnete,^[82] sie ist aber ungefähr dreimal kleiner als die „transannulare“ Hyperfeinkopplung über zwei Bindungen, die im quadratisch-pyramidalen Formaldehyd-inhibierten Xanthin-Oxidase-Komplex beobachtet und berechnet wurde.^[82] Diese Ergebnisse sprechen für das Vorliegen einer Fe-C-Bindung wie in Ferraoxetanen wie 39; zudem ist von Ferraoxetan bekannt, dass es über eine [2+2]-Reaktion Ethylen bilden kann.^[83] Doch wie sieht die Struktur von IspG aus, und wie kann es solche Reaktionen katalysieren?

Vor kurzem wurde die erste Einkristall-Röntgenstrukturanalyse von IspG aus *Aquifex aeolicus* veröffentlicht.^[84] Die Struktur ist insofern interessant, als sie wiederum modular ist und zwei gesonderte Domänen aufweist (Abbildung 7b). Die große N-terminale Domäne besteht aus einem Triosephosphat-Isomerase(TIM)-Fass, das zur Struktur der Dihydropteroat-Synthase aus *Bacillus anthracis* (Abbildung 7c) stark homolog ist (C^α-rmsd von 2.4 Å), während die C-terminale Domäne (die den 4Fe-4S-Cluster enthält) eine starke Homologie (C^α-rmsd von 2.1 Å) zur Spinat-Nitrit-Reduktase (Abbildung 7d) aufweist. Die kristallographischen Befunde belegen auch, dass drei Cys-Reste an den 4Fe-4S-Cluster gebunden sind, zusammen mit einem hochkonservierten Glu, das an das vierte Fe-Atom koordiniert ist. Die Struktur des Proteins aus *Thermus thermophilus*^[85] ist sehr ähnlich. Aufgrund der kristallographischen Strukturen ist es unwahrscheinlich, dass die beiden Domänen selbstständig in einem Monomer funktionieren, da die DHPS- und 4Fe-4S-Cluster-Regionen etwa 45 Å voneinander entfernt sind. Wenn jedoch IspG als Dimer wirkt – was durch die Beobachtung, dass es als Dimer kristallisiert, nahe liegt – kommt der C-Terminus (4Fe-4S-Cluster) eines Moleküls im Dimer nahe an den N-Terminus (TIM-Barrel) des zweiten Moleküls im Dimer heran (Abbildung 6b), und Lee et al.^[84] schlugen vor, dass diese beiden Domänen eine „geschlossene“ Konforma-

tion bilden können. Dies erinnert an die Annäherung einer der drei Domänen in IspH, die zum Schutz reaktiver Zwischenstufen während der Katalyse eine „geschlossene“ Struktur bilden,^[68b] ebenso wie an das Umschließen des 4Fe-4S-Clusters durch zwei Domänen in der Acetyl-CoA-Synthase/Kohlenmonoxid-Dehydrogenase.^[86]

In der geschlossenen Konformation würde das Substrat zwischen dem TIM-Fass des einen Moleküls und dem 4Fe-4S-Cluster des zweiten Moleküls im Dimer eingeschoben werden unter Bildung eines einzigen katalytischen Zentrums, in dem das *cyclo*-Diphosphat-Fragment von MEcPP an eine hochkonservierte Stelle mit basischen Resten im TIM-Fass bindet.^[84] Andere hochkonservierte Reste katalysieren dann die Ringöffnung, während die 4Fe-4S-Domäne (in der geschlossenen Konformation) die $2\text{H}^+/\text{2e}^-$ -Redoxreaktion durchführt. Dieses „Hybrid“-Katalysezentrum erinnert natürlich an die $\alpha_2\delta_2$ -Modul-Wechselwirkungen in GPPS (Abbildung 1 c) und wird durch die Beobachtung gestützt, dass es keine hochkonservierten basischen Reste im 4Fe-4S-Cluster gibt, an die eine Diphosphatgruppe binden könnte. Weitere Belege für ein „Offen-und-geschlossen“-Modell liefert die zweite IspG-Struktur (aus *T. thermophilus*): Rekittke et al.^[85] beschreiben eine offenere „offen“-Struktur sowie ein geschlossenes Strukturmodell, in dem sich die beiden Domänen annähern, um ein katalytisches Zentrum zu bilden, wobei die geschlossene Struktur durch die Bewegung eines Gelenkteils zwischen den beiden Domänen erzeugt wird. Es ist jedoch das TIM-Fass des einen Moleküls im Dimer, das mit dem 4Fe-4S-Cluster im zweiten Molekül wechselwirkt, wie im Kasten in Abbildung 7b veranschaulicht. Analysen für geschlossene Strukturen mit Inhibitoren/Substraten werden dringend erwartet.

10. Zusammenfassung und Ausblick

In jüngster Zeit haben zahlreiche wichtige Entwicklungen zu unserem Verständnis von Struktur, Funktion, Entwicklung und Hemmung vieler der Enzyme, die an der Terpen- und Isoprenoid-Biosynthese beteiligt sind, beigetragen. Dies ist nicht nur von wissenschaftlichem Interesse, sondern hat praktische Bedeutung, da viele dieser Proteine Targets für die Wirkstoffsuche sind. Die ($\alpha\alpha$)-Strukturen von FPPS und GGPPS sind von Interesse als Targets für Antikrebsmittel und Antiinfektiva, und es wurden schon zahlreiche neue Wirkstoff-Leitstrukturen identifiziert. Die Strukturen einer GPPS wurden beschrieben und sind bemerkenswert, weil GPPS (aus *M. piperita*) aus einem $\alpha_2\delta_2$ -Heterotetramer aus katalytischen (α)- und regulatorischen (δ)-Untereinheiten besteht. Die beiden Untereinheiten haben ähnliche dreidimensionale Strukturen, doch keine Domäne ist alleine katalytisch wirksam, und auch in den C₃₅- und C₅₀-Prenyltransferasen scheint eine katalytisch/regulatorisch modulare Struktur vorzuliegen.^[18] Die neuen Kopf-Kopf-Synthase-Strukturen (bei CrtM und SQS) helfen, die ersten festgelegten Schritte in der Sterol- und Carotinoid-Biosynthese, die Bildung von Presqualendiphosphat, zu beleuchten, was wiederum für die Wirkstoffsuche von Bedeutung ist. Bioinformatik-Vorhersagen über (pflanzliche) Diterpencyclase-Strukturen

mit drei Domänen (α , β und γ) wurden experimentell bestätigt und führten zu mehr Vertrauen in die Genom- und Bioinformatikvorschläge, dass sich viele Terpencyclase von ursprünglichen $\alpha\beta\gamma$ -Proteinen ableiten, die selbst aus einer Fusion von α - und $\beta\gamma$ -Domänen-Proteinen abzustammen scheinen: In Abbildung 8 sind die mit α , β , γ und δ -Modulen gefundenen unterschiedlichen Strukturanordnungen schematisch dargestellt. Die Strukturen einiger *cis*-Prenyltransferasen, manche mit gebundenen Inhibitoren, wurden eben-

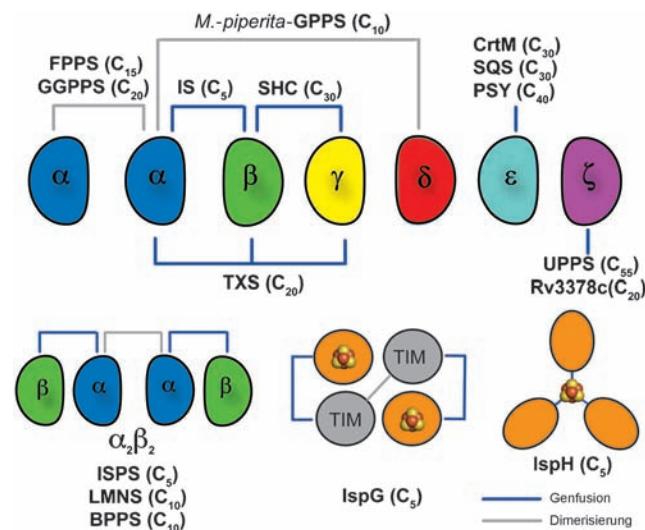


Abbildung 8. Modularer Aufbau vieler Enzyme der Terpen/Isoprenoid-Biosynthese. FPPS und GPPS sind $\alpha\alpha$ -Dimere (humane GGPPS ist ein Trimer von Dimeren); GPPS bildet ein Heterotetramer $\alpha_2\delta_2$; Pflanzen-Diterpencyclasen (wie TXS) sind $\alpha\beta\gamma$; viele andere Pflanzen-Terpencyclasen haben γ verloren und sind $\alpha\beta$, anderen fehlen β und γ , und sie sind rein α .

falls beschrieben. Diese nehmen die ζ -Faltung ein, und wieder ist es auf der Grundlage bioinformatischer Studien wahrscheinlich, dass diese Faltung auch weiter verbreitet sein könnte. Die Strukturen der beiden 4Fe-4S-Proteine, die in den meisten Eubakterien an der Herstellung von C₅-Diphosphat beteiligt sind, sind jetzt ebenfalls aufgeklärt. Beide enthalten ungewöhnliche 4Fe-4S-Cluster mit einem einzelnen Fe, das an der Bildung der Fe-C-Bindung während der Katalyse beteiligt zu sein scheint, und wieder sind beide modulare Proteine. Und schließlich wurden die Strukturen einiger $\alpha\beta$ -Proteine, dazu gehören die Limonen-Synthase und die Isopren-Synthase, aufgeklärt. Deren dreidimensionale Strukturen sind bemerkenswert ähnlich, eine Beobachtung, die sich auch auf ihre im Wesentlichen identischen Quartärstrukturen erstreckt, wobei die der Isopren-Synthase im Zusammenhang mit der Entwicklung alternativer Brennstoffe interessant ist.

Obwohl es „keinen Ersatz“ für die Röntgenkristallographie gibt, haben bioinformatische Methoden geholfen, das Drei-Helix-Modell für TXS korrekt vorausberechnen.

Zukünftige Arbeiten könnten sich die Strukturen vieler Enzyme aus der Carotinoid-Biosynthese zum Ziel nehmen. Dazu gehören die Dehydrogenasen, die z. B. Dehydrosqualen und Phytoen in konjugierte Polyene überführen, sowie Sys-

teme wie die Lycopen-Cyclase, die die Ringbildung katalysieren. Letztere ist von Bedeutung, da es eines der Nicht-Redox-Flavoproteine ist, in dem anscheinend ein anionischer reduzierter Flavin-Cofaktor (FAD) eine kationische Zwischenstufe oder einen Übergangszustand stabilisiert,^[87] was der Situation in den Klasse-II-Terpensynthasen formell ähnlich ist. Eine neue Reaktion, worin FAD eine wichtige Redoxfunktion ausübt, ist die FAD-katalysierte Reduktion von GGPP-Ketten durch die Geranylgeranyl-Reduktase aus *Thermoplasma acidophilum*.^[88] Dieses Enzym katalysiert die Reduktion von Geranylgeranyl-Seitenketten in Lipiden von Archaeabakterien zu Phytanyl-Seitenketten. Wie solche C₂₀-Seitenketten über ihre terminalen Methylgruppen miteinander kuppeln, um C₄₀-Lipide zu bilden, die die Lipid-Doppelenschicht in Archaeabakterien aufspannen, bleibt jedoch noch rätselhaft. Das Interesse an diesen Systemen ist wiederum nicht rein wissenschaftlich, da Inhibitoren von Dehydrogenasen als Antivirulenzfaktoren für Staphylokokken-Infektionen fungieren könnten; Inhibitoren der Carotinoid-Biosynthese sind Targets für bleichende Herbizide, und möglicherweise kann ein strukturbasiertes Design verwendet werden, um Reduktasen aufzubauen, die beispielsweise β-Farnesen in den Biobrennstoff Farnesan überführen, oder um über GPP niedermolekulare Spezies wie Dimethyloctan herzustellen.

Wir sind daher dem Ende des Anfangs nahe: Die Strukturen vieler wichtiger, direkt an der Terpen/Isoprenoïd-Biosynthese beteiligten Proteine sind jetzt bekannt, und die Voraussetzungen sind geschaffen, um neue Inhibitoren zu entwickeln, die zu neuen Arzneimitteln führen können, oder um neue Wege zu erneuerbaren Brennstoffen und anderen Materialien zu erschließen.

Diese Arbeit wurde vom United States Public Health Service (NIH grants GM65307, GM073216, AI074233 und CA158191) gefördert. Wir danken Dr. Rong Cao und Dr. Ke Wang für die Hilfe bei den Strukturen und Graphiken sowie Professor Robert Coates für hilfreiche Anregungen.

Eingegangen am 6. Mai 2011
Online veröffentlicht am 18. November 2011

Übersetzt von Dr. Margit Knauer, Bensheim

- [1] J. Chappell, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1995**, *46*, 521–547.
- [2] a) P. H. Liang, T. P. Ko, A. H. Wang, *Eur. J. Biochem.* **2002**, *269*, 3339–3354; b) H. V. Thulasiram, H. K. Erickson, C. D. Poulter, *Science* **2007**, *316*, 73–76.
- [3] C. D. Poulter, *Acc. Chem. Res.* **1990**, *23*, 70–77.
- [4] J. M. Berg, L. Stryer, *Biochemistry*, 5. Aufl., Freeman, New York, **2002**.
- [5] J. Bohlmann, C. I. Keeling, *Plant J.* **2008**, *54*, 656–669.
- [6] H. M. Mizorko, *Arch. Biochem. Biophys.* **2011**, *505*, 131–143.
- [7] M. Rohmer, *Lipids* **2008**, *43*, 1095–1107.
- [8] a) Y. Koga, H. Morii, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2007**, *71*, 97–120; b) J. Lombard, D. Moreira, *Mol. Biol. Evol.* **2011**, *28*, 87–99.
- [9] M. Eberl, M. Hintz, A. Reichenberg, A. K. Kollas, J. Wiesner, H. Jomaa, *FEBS Lett.* **2003**, *544*, 4–10.

- [10] J. Buckingham, *Dictionary of Natural Products on DVD*, CRC, Boca Raton, FL, **2007**.
- [11] L. C. Tarshis, M. Yan, C. D. Poulter, J. C. Sacchettini, *Biochemistry* **1994**, *33*, 10871–10877.
- [12] a) D. J. Hosfield, Y. Zhang, D. R. Dougan, A. Broun, L. W. Tari, R. V. Swanson, J. Finn, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 8526–8529; b) J. A. Aaron, D. W. Christianson, *Pure Appl. Chem.* **2010**, *82*, 1585–1597.
- [13] T. H. Chang, R. T. Guo, T. P. Ko, A. H. Wang, P. H. Liang, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 14991–15000.
- [14] C. Burke, R. Croteau, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 3141–3149.
- [15] C. Burke, R. Croteau, *Arch. Biochem. Biophys.* **2002**, *405*, 130–136.
- [16] R. Saiki, A. Nagata, T. Kainou, H. Matsuda, M. Kawamukai, *FEBS J.* **2005**, *272*, 5606–5622.
- [17] T. H. Chang, F. L. Hsieh, T. P. Ko, K. H. Teng, P. H. Liang, A. H. Wang, *Plant Cell* **2010**, *22*, 454–467.
- [18] D. Sasaki, M. Fujihashi, N. Okuyama, Y. Kobayashi, M. Noike, T. Koyama, K. Miki, *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 3729–3740.
- [19] M. Gnant, B. Mlinertsch, W. Schippinger, G. Luschin-Ebengreuth, S. Postlberger, C. Menzel, R. Jakesz, M. Seifert, M. Hubalek, V. Bjelic-Radisic, H. Samonigg, C. Tausch, H. Eidmann, G. Steger, W. Kwasny, P. Dubsky, M. Fridrik, F. Fitzal, M. Stierer, E. Rucklinger, R. Greil, C. Marth, *N. Engl. J. Med.* **2009**, *360*, 679–691.
- [20] J. M. Rondeau, F. Bitsch, E. Bourgier, M. Geiser, R. Hemmig, M. Kroemer, S. Lehmann, P. Ramage, S. Rieffel, A. Strauss, J. R. Green, W. Jahnke, *ChemMedChem* **2006**, *1*, 267–273.
- [21] S. G. Senaratne, G. Pirianov, J. L. Mansi, T. R. Arnett, K. W. Colston, *Br. J. Cancer* **2000**, *82*, 1459–1468.
- [22] C. Denoyelle, L. Hong, J. P. Vannier, J. Soria, C. Soria, *Br. J. Cancer* **2003**, *88*, 1631–1640.
- [23] M. Coscia, E. Quaglino, M. Iezzi, C. Curcio, F. Pantaleoni, C. Riganti, I. Holen, H. Monkkonen, M. Boccadoro, G. Forni, P. Musiani, A. Bosia, F. Cavallo, M. Massaia, *J. Cell Mol. Med.* **2009**, *14*, 2803–2815.
- [24] V. Kunzmann, H. Jomaa, J. Feurle, E. Bauer, M. Herderich, M. Wilhelm, *Blood* **1997**, *90*, 2558–2558.
- [25] V. Kunzmann, S. Eckstein, A. Lindner, H. P. Tony, M. Wilhelm, *Blood* **2002**, *100*, 309B–309B.
- [26] S. Mukherjee, C. Huang, F. Guerra, K. Wang, E. Oldfield, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 8374–8375.
- [27] a) J. M. Sanders, Y. Song, J. M. Chan, Y. Zhang, S. Jennings, T. Kosztowski, S. Odeh, R. Flessner, C. Schwerdtfeger, E. Kotsikorou, G. A. Meints, A. O. Gomez, D. Gonzalez-Pacanowska, A. M. Raker, H. Wang, E. R. van Beek, S. E. Papapoulos, C. T. Morita, E. Oldfield, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 2957–2963; b) S. Cotesa, J. F. Glickman, W. Jahnke, A. Marzinzik, S. Ofner, J. Rondeau, T. Zoller (Novartis AG), PCT/EP2009/063257, **2010**.
- [28] W. Jahnke, J. M. Rondeau, S. Cotesa, A. Marzinzik, X. Pelle, M. Geiser, A. Strauss, M. Gotte, F. Bitsch, R. Hemmig, C. Henry, S. Lehmann, J. F. Glickman, T. P. Roddy, S. J. Stout, J. R. Green, *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 660–666.
- [29] K. L. Kavanagh, J. E. Dunford, G. Bunkoczi, R. G. Russell, U. Oppermann, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 22004–22012.
- [30] J. D. Artz, A. K. Wernimont, J. E. Dunford, M. Schapira, A. Dong, Y. Zhao, J. Lew, R. G. Russell, F. H. Ebetino, U. Oppermann, R. Hui, *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 3315–3322.
- [31] Y. Zhang, R. Cao, F. Yin, M. P. Hudock, R. T. Guo, K. Krysiak, S. Mukherjee, Y. G. Gao, H. Robinson, Y. Song, J. H. No, K. Bergan, A. Leon, L. Cass, A. Goddard, T. K. Chang, F. Y. Lin, E. Van Beek, S. Papapoulos, A. H. Wang, T. Kubo, M. Ochi, D. Mukkamala, E. Oldfield, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 5153–5162.
- [32] A. P. Singh, Y. Zhang, J. H. No, R. Docampo, V. Nussenzweig, E. Oldfield, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54*, 2987–2993.
- [33] G. Ourisson, P. Albrecht, *Acc. Chem. Res.* **1992**, *25*, 398–402.

- [34] C. I. Liu, G. Y. Liu, Y. Song, F. Yin, M. E. Hensler, W. Y. Jeng, V. Nizet, A. H. Wang, E. Oldfield, *Science* **2008**, *319*, 1391–1394.
- [35] F. X. Cunningham, E. Gantt, *Annu. Rev. Plant Biol.* **1998**, *49*, 557–583.
- [36] J. Pandit, D. E. Danley, G. K. Schulte, S. Mazzalupo, T. A. Pauly, C. M. Hayward, E. S. Hamanaka, J. F. Thompson, H. J. Harwood, Jr., *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 30610–30617.
- [37] F. Y. Lin, C. I. Liu, Y. L. Liu, Y. Zhang, K. Wang, W. Y. Jeng, T. P. Ko, R. Cao, A. H. Wang, E. Oldfield, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 21337–21342.
- [38] R. M. Phan, C. D. Poulter, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 6705–6710.
- [39] J. C. Fernandes Rodrigues, J. L. Concepcion, C. Rodrigues, A. Caldera, J. A. Urbina, W. de Souza, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**, *52*, 4098–4114.
- [40] K. U. Wendt, A. Lenhart, G. E. Schulz, *J. Mol. Biol.* **1999**, *286*, 175–187.
- [41] R. Thoma, T. Schulz-Gasch, B. D'Arcy, J. Benz, J. Aebi, H. Dehmlow, M. Hennig, M. Stihle, A. Ruf, *Nature* **2004**, *432*, 118–122.
- [42] C. M. Starks, K. Back, J. Chappell, J. P. Noel, *Science* **1997**, *277*, 1815–1820.
- [43] C. A. Lesburg, G. Z. Zhai, D. E. Cane, D. W. Christianson, *Science* **1997**, *277*, 1820–1824.
- [44] D. A. Whittington, M. L. Wise, M. Urbansky, R. M. Coates, R. B. Croteau, D. W. Christianson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 15375–15380.
- [45] R. Cao, Y. Zhang, F. M. Mann, C. Huang, D. Mukkamala, M. P. Hudock, M. E. Mead, S. Prsic, K. Wang, F. Y. Lin, T. K. Chang, R. J. Peters, E. Oldfield, *Proteins Struct. Funct. Genet.* **2010**, *78*, 2417–2432.
- [46] S. C. Trapp, R. B. Croteau, *Genetics* **2001**, *158*, 811–832.
- [47] K. U. Wendt, G. E. Schulz, *Structure* **1998**, *6*, 127–133.
- [48] R. J. Peters, R. B. Croteau, *Biochemistry* **2002**, *41*, 1836–1842.
- [49] M. Köksal, I. Zimmer, J. P. Schnitzler, D. W. Christianson, *J. Mol. Biol.* **2010**, *402*, 363–373.
- [50] D. Morrone, J. Chambers, L. Lowry, G. Kim, A. Anterola, K. Bender, R. J. Peters, *FEBS Lett.* **2009**, *583*, 475–480.
- [51] J. A. Cuff, M. E. Clamp, A. S. Siddiqui, M. Finlay, G. J. Barton, *Bioinformatics* **1998**, *14*, 892–893.
- [52] P. F. Fuchs, A. J. Alix, *Proteins Struct. Funct. Genet.* **2005**, *59*, 828–839.
- [53] M. Köksal, Y. Jin, R. M. Coates, R. Croteau, D. W. Christianson, *Nature* **2011**, *469*, 116–120.
- [54] M. Köksal, H. Hu, R. M. Coates, R. J. Peters, D. W. Christianson, *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 431–433.
- [55] M. Fujihashi, Y. W. Zhang, Y. Higuchi, X. Y. Li, T. Koyama, K. Miki, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 4337–4342.
- [56] R. T. Guo, R. Cao, P. H. Liang, T. P. Ko, T. H. Chang, M. P. Hudock, W. Y. Jeng, C. K. M. Chen, Y. H. Zhang, Y. C. Song, C. J. Kuo, F. L. Yin, E. Oldfield, A. H. J. Wang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 10022–10027.
- [57] Y. P. Lu, H. G. Liu, P. H. Liang, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2009**, *379*, 351–355.
- [58] E. Krissinel, K. Henrick, *PDBeFold*, <http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/ssm>.
- [59] a) K. Pethe, D. L. Swenson, S. Alonso, J. Anderson, C. Wang, D. G. Russell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 13642–13647; b) T. Hoshino, C. Nakano, T. Ootsuka, Y. Shinohara, T. Hara, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 2156–2165.
- [60] T. Hoshino, C. Nakano, T. Ootsuka, Y. Shinohara, T. Hara, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 2156–2165.
- [61] A. Roy, A. Kucukural, Y. Zhang, *Nat. Protoc.* **2010**, *5*, 725–738.
- [62] F. Kieler, K. Arnold, M. Kunzli, L. Bordoli, T. Schwede, *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, D387–392.
- [63] L. A. Kelley, M. J. Sternberg, *Nat. Protoc.* **2009**, *4*, 363–371.
- [64] C. Nakano, T. Ootsuka, K. Takayama, T. Mitsui, T. Sato, T. Hoshino, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2011**, *75*, 75–81.
- [65] W. Sinko, C. de Oliveira, S. Williams, A. Van Wynsberghe, J. D. Durrant, R. Cao, E. Oldfield, J. A. McCammon, *Chem. Biol. Drug Des.* **2011**, *77*, 412–420.
- [66] R. A. Friesner, J. L. Banks, R. B. Murphy, T. A. Halgren, J. J. Klicic, D. T. Mainz, M. P. Repasky, E. H. Knoll, M. Shelley, J. K. Perry, D. E. Shaw, P. Francis, P. S. Shenkin, *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1739–1749.
- [67] a) P. Adam, S. Hecht, W. Eisenreich, J. Kaiser, T. Grawert, D. Arigoni, A. Bacher, F. Rohdich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 12108–12113; b) 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.
- [68] a) I. Rekittke, J. Wiesner, R. Rohrich, 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; b) T. Grawert, I. Span, W. Eisenreich, F. Rohdich, J. Eppinger, A. Bacher, M. Groll, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 1077–1081.
- [69] H. Sakuraba, H. Tsuge, K. Yoneda, N. Katunuma, T. Ohshima, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 26645–26648.
- [70] Y. Zhang, X. Zhu, A. T. Torelli, M. Lee, B. Dzikowski, R. M. Koralewski, E. Wang, J. Freed, C. Krebs, S. E. Ealick, H. Lin, *Nature* **2010**, *465*, 891–896.
- [71] 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.
- [72] S. S. Batsanov, *Inorg. Mater.* **2001**, *37*, 871–885.
- [73] T. Gräwert, I. Span, A. Bacher, M. Groll, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 8984–8991; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 8802–8809.
- [74] T. Itoh, T. Nagano, M. Sato, M. Hirobe, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 6387–6388.
- [75] R. L. Nyland II, Y. Xiao, P. Liu, C. L. Freel Meyers, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 17734–17735.
- [76] Y. L. Xiao, R. L. Nyland, C. L. Freel Meyers, P. H. Liu, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 7220–7222.
- [77] Y. Xiao, D. Rooker, Q. You, C. L. Freel Meyers, P. Liu, *Chem.-Biol. Chem.* **2011**, *12*, 527–530.
- [78] D. Adedeji, H. Hernandez, J. Wiesner, U. Kohler, H. Jomaa, E. C. Duin, *FEBS Lett.* **2007**, *581*, 279–283.
- [79] a) W. Wang, J. Li, K. Wang, C. Huang, Y. Zhang, E. Oldfield, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 11189–11193; b) W. Y. Xu, N. S. Lees, D. Adedeji, J. Wiesner, H. Jomaa, B. M. Hoffman, E. C. Duin, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 14509–14520.
- [80] J. F. Hoeffler, A. Hemmerlin, C. Grosdemange-Billiard, T. J. Bach, M. Rohmer, *Biochem. J.* **2002**, *366*, 573–583.
- [81] A. Silakov, B. Wenk, E. Reijerse, S. P. Albracht, W. Lubitz, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2009**, *14*, 301–313.
- [82] M. Shanmugam, B. Zhang, R. L. McNaughton, R. A. Kinney, R. Hille, B. M. Hoffman, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 14015–14017.
- [83] Z. H. Kafafi, R. H. Hauge, W. E. Billups, J. L. Margrave, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 4775–4780.
- [84] M. Lee, T. Grawert, F. Quitterer, F. Rohdich, J. Eppinger, W. Eisenreich, A. Bacher, M. Groll, *J. Mol. Biol.* **2010**, *404*, 600–610.
- [85] I. Rekittke, T. Nonaka, J. Wiesner, U. Demmer, E. Warkentin, H. Jomaa, U. Ermler, *FEBS Lett.* **2011**, *585*, 447–451.
- [86] C. Darnault, A. Volbeda, E. J. Kim, P. Legrand, X. Vernede, P. A. Lindahl, J. C. Fontecilla-Camps, *Nat. Struct. Biol.* **2003**, *10*, 271–279.
- [87] Q. Yu, P. Schaub, S. Ghislain, S. Al-Babili, A. Krieger-Liszkay, P. Beyer, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 12109–12120.
- [88] Q. Xu, T. Eguchi, Mathews II, C. L. Rife, H. J. Chiu, C. L. Farr, J. Feuerhelm, L. Jaroszewski, H. E. Klock, M. W. Knuth, M. D. Miller, D. Weekes, M. A. Elsliger, A. M. Deacon, A. Godzik, S. A. Lesley, I. A. Wilson, *J. Mol. Biol.* **2010**, *404*, 403–417.