

Modifizierung von prenylierenden Enzymen

Dissertation

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

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Frau Julia Kufka

geb. am 27.11.1982 in Salzgitter

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum zwischen November 2007 und Dezember 2011 am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie in Halle (Saale), in der Abteilung Natur- und Wirkstoffchemie unter der Betreuung von Prof. Dr. Ludger A. Wessjohann angefertigt.

Eingereicht am: 06.07.2015

Verteidigt am: 03.05.2016

Gutachter:

1. Prof. Dr. Birgit Dräger
2. Prof. Dr. Ludger A. Wessjohann
3. Prof. Dr. Oliver Kayser

*Wunder stehen nicht im Gegensatz zur Natur, sondern nur im Gegensatz zu dem, was wir
über die Natur wissen.*

Augustinus von Canterbury

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
Abbildungs-, Schemata-, Tabellen- und Formelverzeichnis	IX
Motivation der Arbeit	XIII
1. <u>Einleitung</u>	1
1.1. Terpene	1
1.2. Isopentenylidiphosphat-Biosynthese	2
1.2.1. Mevalonatweg (MVA-Weg)	3
1.2.2. Methylerythritolphosphatweg (MEP-Weg)	4
1.3. Prenylierende Enzyme	6
1.3.1. Isomerasen	6
1.3.2. Isoprenyldiphosphatsynthasen (IPPS)	7
1.3.3. Terpensynthasen (-zyklasen)	8
1.3.4. aromatische Prenyltransferasen (aPTasen)	10
1.3.5. Proteinprenyltransferasen (PPTasen)	14
1.4. Referenzen	15
2. <u>Die Hydrolyse eines allylischen Diphosphates</u>	21
2.1. Einleitung	21
2.2. Ergebnisse und Diskussion	22
2.2.1. ^{31}P - und ^1H -NMR-Spektren-Analyse der C–O-Bindungsspaltung im Dimethylallyldiphosphat	22
2.2.2. Löslichkeitsverhalten von Dimethylallyldiphosphat	24
2.2.3. Chemische Verschiebungen in ^{31}P -NMR-Spektren in Abhängigkeit unterschiedlicher pH-Werte zur Bestimmung von pK_s -Werten	25
2.2.4. Hydrolyserate von Dimethylallyldiphosphat	28
2.2.4.1. Abhängigkeit von Temperatur und pH-Wert	28
2.2.4.2. Abhängigkeit von divalenten Kationen und pH-Wert	30
2.2.4.3. Abhängigkeit von unterschiedlichen MgCl_2 -Konzentrationen	31
2.2.4.4. Abhängigkeit von ein- bzw. zweiwertigen Kationen	32

2.2.4.5.	Abhängigkeit von monovalenten Kationen und pH-Wert	33
2.2.5.	Hydrolyse vom allylischen DMAPP im Vergleich zum nicht allylischen IPP	34
2.3.	Zusammenfassung	35
2.4.	Referenzen	36
3.	<u>Die funktionale Rolle spezifischer Aminosäuren während der Katalyse einer aromatischen Prenyltransferase</u>	38
3.1.	Einleitung	
3.1.1.	<i>p</i> -Hydroxybenzoesäure Oligoprenyltransferase (UbiA) aus <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)	38
3.2.	Ergebnisse	
3.2.1.	Gewinnung der aromatischen Prenyltransferase UbiA aus <i>E. coli</i>	42
3.2.2.	Mutationsstudien an UbiA	44
3.3.	Diskussion	47
3.4.	Referenzen	52
4.	<u>Nachweis einer katalytischen Diade einer Monoterpensynthese</u>	54
4.1.	Die Limonensynthese aus <i>Cannabis sativa</i> L. (CsTPS1)	54
4.2.	Ergebnisse	55
4.2.1.	Reinigung der rekombinanten CsTPS1	55
4.2.2.	Mutationsstudien an CsTPS1	56
4.2.2.1.	Sekundärstrukturanalyse	57
4.2.2.2.	Produktspektrum	58
4.2.2.3.	Enzymkinetik	60
4.3.	Diskussion	63
4.4.	Referenzen	67
5.	<u>Material und Methoden</u>	68
5.1.	Materialien	68
5.1.1.	Geräte und Verbrauchsmaterialien	68
5.1.2.	Chemikalien	68

5.1.3. Enzyme	68
5.1.4. Antikörper	69
5.1.5. Bakterienstämme	69
5.1.6. Plasmide	70
5.1.7. Oligonukleotide	70
5.1.8. Puffer und Lösungen	72
5.1.8.1. Gelelektrophorese / Western Blot	72
5.1.8.2. Proteinreinigung	73
5.2. Methoden	74
5.2.1. Molekularbiologische Methoden	74
5.2.1.1. Stammhaltung	74
5.2.1.2. Kultivierung von <i>E. coli</i>	75
5.2.1.3. Hitzeschock-Transformation in <i>E. coli</i> Zellen	75
5.2.1.4. Plasmidpräparation mittels <i>QIAprep Spin Miniprep Kit</i> (QIAGEN)	76
5.2.1.5. Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung	76
5.2.1.6. Sequenzierung von Plasmid-DNA	76
5.2.1.7. Polymerasekettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i> , PCR)	77
5.2.1.7.1. Zielgerichtete Mutagenese	77
5.2.1.7.2. Kolonie-PCR	78
5.2.1.8. Klonierungsstrategien	78
5.2.1.8.1. Klonierung mittels <i>TOPO</i> [®] -Klonierungs-Technologie	78
5.2.1.8.2. Klonierung mittels <i>Gateway</i> [™] -Technologie	79
5.2.1.9. DNA-Agarosegelelektrophorese	80
5.2.2. Biochemische Methoden	80
5.2.2.1. Proteinexpression und Zellernte	80
5.2.2.2. Zellaufschluss mittels Ultraschall	80
5.2.2.3. Proteinreinigung	81
5.2.2.3.1. Proteinreinigung mittels Metallaffinitätschromatographie	81
5.2.2.3.2. Proteinreinigung membrangebundener Enzyme	81
5.2.2.4. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	81
5.2.2.5. Coomassie-Färbung	82
5.2.2.6. Western-Blot	82
5.2.2.7. Tryptischer <i>In-Gel</i> -Verdau	83
5.2.2.8. Proteinbestimmung nach Bradford	84

5.2.2.9.	Bestimmung der Protein-Sekundärstruktur mittels Circular dichroismus-(CD) Spektroskopie	84
5.2.3	Analytische Methoden	85
5.2.3.1.	Kernresonanzspektroskopie (<i>nuclear magnetic resonance</i> , NMR)	85
5.2.3.1.1.	Nachweis der Hydrolyse von allylischen Diphosphaten mittels ³¹ P-NMR-Spektroskopie	85
5.2.3.1.2.	Bestimmung der katalytischen Aktivität einer Monoterpensynthese mittels ¹ H-NMR-Spektroskopie	86
5.2.3.2.	HPLC-Analyse der enzymatischen Umsetzung von <i>p</i> -Geranylhydroxybenzoesäure	86
5.2.3.3.	Auftrennung und Nachweis von Terpenen mittels Gas-chromatographie und Massenspektrometrie (GC/MS)	87
5.3.	Referenzen	89
6.	<u>Zusammenfassung</u>	90
7.	<u>Abstract</u>	91
8.	<u>Anhang</u>	92
	Lebenslauf	i
	Danksagung	iii
	Eidesstattliche Erklärung	iv

Abkürzungsverzeichnis

1,4-DTT	1,4-Dimercapto-2,3-butandiol
1,6-DHN	1,6-Dihydroxynaphthalen
3D	dreidimensional
ACD/Labs	<i>Advanced Chemistry Development</i> Software
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
Ak	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
aPTase	aromatische Prenyltransferase
ATP	Adenosintriphosphat
AuaA	<i>Stigmatella aurantiaca</i> Farnesyltransferase
BSA	Rinderalbumin
Ca ²⁺	Calcium-Dikation
CD	Circulardichroismus
CID	stoßinduzierte Dissoziation
CloQ	<i>Streptomyces roseochromogenes</i> Prenyltransferase
CMK	Cytidyl-Methyl-Kinase
CMP	Cytidinmonophosphat
CMS	Cytidindiphosphat-Methylerythryl
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Co ²⁺	Kobalt-Dikation
CoA-SH	Coenzym A
Cox10	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Farnesyltransferase
CsTPS1	Limonensynthase aus <i>Cannabis sativa</i> L.
CTP	Cytidintriphosphat
Cu ²⁺	Kupfer-Dikation
CymD	<i>Salinispora arenicola</i> CNS-205 Cyclomarin/Cyclomarazin Prenyltransferase
D ₂ O	Deuteriumoxid („schweres Wasser“)
DMAPP	Dimethylallyldiphosphat
DMATS	Dimethylallyltryptophansynthase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>Dpnl</i>	<i>Diplococcus pneumoniae</i>

DPRRs	5-Phosphoribose-1-diphosphat:decaprenylphosphat-5-phospho- ribosyltransferase
dsDNA	doppelstängige DNA
DSS	4,4-Dimethyl-4-silapentansulfonsäure
DXR	Deoxyxylulosephosphat-Reduktase
DXS	Deoxyxylulosephosphat-Synthase
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i> – Lösung
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Fd _{red / ox}	Ferredoxin _{reduziert} / Ferredoxin _{oxidiert}
FID	<i>free induction decay</i>
Fnq26	<i>Streptomyces cinnamonensis</i> Prenyltransferase
FPP	Farnesyldiphosphat
FPPs	Farnesyldiphosphatsynthase
GC	Gaschromatographie
GGPP	Geranylgeranyldiphosphat
GGPPs	Geranylgeranyldiphosphatsynthase
GHB	Geranylhydroxybenzoesäure
GPP	Geranyldiphosphat
GPPs	Geranyldiphosphatsynthase
GTPasen	Guaninnukleotid-bindendes Protein
HBA	<i>p</i> -Hydroxybenzoesäure
HDR	4-Hydroxy-3-methylbut-2-enyl-diphosphat-Reduktase
HDS	4-Hydroxy-3-methylbut-2-enyl-diphosphat-Synthase
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym-A
HMGR	3-Hydroxymethylglutaryl-CoA-Reduktase
HMGS	3-Hydroxymethylglutaryl-CoA-Synthase
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HPR	<i>Horseradish Peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)
IDS	IPP/DMAPP-Synthase
IMAC	immobilisierte Metallaffinitätschromatographie
IPP	Isopentenylidiphosphat
IPPS	Isoprenyldiphosphatsynthase
lptA	<i>Streptomyces</i> sp. SN-593 Indolprenyltransferase
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
ITC	isothermale Titrationskalorimetrie
LB	<i>lysogeny broth</i>

LC/MS	Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
LePGT1	<i>Lithospermum erythrorhizon</i> <i>p</i> -Hydroxybenzoesäure Geranyltransferase
LtxC	Cyanobakterielle (-)-Indolactam V Geranyltransferase
MBP	Maltose-Bindeprotein
MCS	Methyl-erythrityl-zyklo-Diphosphat
MenA	<i>Escherichia coli</i> 1,4-Dihydroxy-2-naphthoate Prenyltransferase
MEP	Methylerythritolphosphat
Mg ²⁺	Magnesium-Dikation
MHz	Megahertz
Mn ²⁺	Mangan-Dikation
MVA	Mevalonat
MVK	Mevalonat-Kinase
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i> , Datenbank
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> (Kernspinresonanzspektroskopie)
NphB	<i>Streptomyces</i> sp. CL190 Geranyltransferase
OD	optische Dichte
OPP	Octaprenyldiphosphat
OPPs	Octaprenyldiphosphatsynthase
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDB	Proteindatenbank
PFTase	Proteinfarnesyltransferase
<i>pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PGGTase	Proteingeranylgeranyltransferase
P _i	anorganisches Phosphat
PMD	Diphosphomevalonat-Decarboxylase
PMK	Phosphomevalonat-Kinase
PP _i	anorganisches Diphosphat
ppm	<i>parts per million</i>
PPTase	Proteinprenyltransferase
PpzP	<i>Streptomyces annulatus</i> 9663 Phenazin Prenyltransferase
PT	Prenyltransferase
QM/MM	Quantenmechanische / molekülmechanische Methoden
SAM	S-Adenosylmethionin
SCD	Schnyders Hornhaut-Dystrophie
SCO7190	<i>Streptomyces coelicolor</i> Prenyltransferase

SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
S _N 1	nukleophile Substitution
SOC	<i>super optimal broth with catabolite repression</i>
SQS	Squalensynthase
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBST	Tris-gepufferte Saline mit 0,05% Tween
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TERE1	<i>transitional epithelial response protein 1</i>
TFA	Trifluoressigsäure
TIC	<i>total ion current</i> , Totalionenstrom
TMHMM	Transmembran-Helix-Vorhersage nach Markov Model
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UbiA	<i>Escherichia coli</i> 4-Hydroxybenzoesäure Oligoprenyltransferase
Upm	Umdrehungen pro Minute
UPP	Undecaprenyldiphosphat
VF	Verdünnungsfaktor
WMU	Wagner-Meerwein-Umlagerung
WT	Wildtyp
YASARA	<i>Yet Another Scientific Artificial Reality Application</i> , Molekül-Dynamik-Programm
Zn ²⁺	Zink-Dikation

Abbildungs-, Schemata-, Tabellen- und Formelverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Übersicht und Kompartimentierung des Mevalonat- (MVA) und Methylerythritolphosphatweges (MEP).

Abbildung 1.2: MVA-Weg.

Abbildung 1.3: MEP-Weg.

Abbildung 1.4: Übersicht der prenylkonvertierenden Enzyme.

Abbildung 1.5: Reaktionsmechanismus zyklischer Monoterpensynthesen.

Abbildung 1.6: Gruppierung der aromatischen Prenyltransferasen.

Abbildung 1.7: Fassstruktur des NphB Monomers.

Abbildung 1.8: Reaktionen katalysiert durch aromatische Prenyltransferasen.

Abbildung 2.1: ^{31}P -NMR-Spektren (400 MHz) einer 250 mM DMAPP-Lösung in D_2O vor und nach Wärmezufuhr.

Abbildung 2.2: Chemische Verschiebungen in ^{31}P -NMR Analysen der Hydrolyse von Dimethylallyldiphosphat bei unterschiedlichen pH-Werten.

Abbildung 2.3: Verschiedene Protonierungsformen des DMAPPs.

Abbildung 2.4: Chemische Verschiebungen der Signale im ^{31}P -NMR-Spektrum bei unterschiedlichen pH-Werten.

Abbildung 2.5: ^{31}P -NMR-Spektrum von hydrolysiertem DMAPP mit entsprechenden Integralen.

Abbildung 3.1: A: Röntgenkristallstruktur der 5-*epi*-Aristolochensynthase. B: Modell der reinen α -helixalen UbiA-Tertiärstruktur.

Abbildung 3.2: Hornhaut von SCD-Patienten.

Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der Domänenstruktur des Konstruktes ubiA_pDEST_N112.

Abbildung 3.4: Biochemischer Nachweis der Expression nach Transformation der UbiA-Konstrukte in BL21(DE3) Zellen.

Abbildung 3.5: SDS-PAGE einer UbiA-Reinigung.

Abbildung 3.6: Das aktive Zentrum des UbiA-Modells mit der *p*-Hydroxybenzoesäure (HBA) und dem zweiten Substrat dem Geranyldiphosphat (GPP).

Abbildung 3.7: Optimierte Struktur der Interaktion zwischen dem Dimethylallylkation und dem Indol (links) und der Methioninseitenkette (rechts).

Abbildung 3.8: HPLC-Chromatogramm eines Umsatzes von Geranyldiphosphat und *p*-Hydroxybenzoesäure mit UbiA_W152M.

Abbildung 3.9: Gegenüberstellung der relativen Geranylhydroxybenzoesäure (GHB)-Produktion des UbiA-Wildtyps und den Mutanten.

Abbildung 3.10: Molekülorbitalbild der Kation- π -Wechselwirkung zwischen Indol (als vereinfachte Darstellung des Tryptophans) und Dimethylallylkation (als vereinfachte Darstellung des Geranylkations).

Abbildung 3.11: Kation-Dipol-Wechselwirkung zwischen der Hydroxylgruppe des Serins und dem Dimethylallylkation (als vereinfachte Darstellung des Geranylkations).

Abbildung 4.1: Modell der homodimerischen Limonensynthase.

Abbildung 4.2: SDS-PAGE einer CsTPS1-Reinigung.

Abbildung 4.3: Modell des aktiven Zentrums der Limonensynthase CsTPS1 inklusive seines Polymerrückgrates.

Abbildung 4.4: Prozentuale Verteilung der Sekundärstrukturanteile der Limonensynthase des Wildtyps und seiner Mutanten.

Abbildung 4.5: GC/MS-Chromatogramm eines Umsatzes von GPP mit CsTPS1.

Abbildung 4.6: Prozentuale Produktverteilung der enzymatischen Umwandlung von GPP katalysiert durch die Limonensynthase.

Abbildung 4.7: Relativer Gesamtumsatz der Limonensynthase und ihrer Mutanten.

Abbildung 4.8: NMR basierte Enzymkinetik.

Abbildung 4.9: Modell des aktiven Zentrums der Limonensynthase.

Abbildung 4.10: Modell des aktiven Zentrums der CsTPS1.

Abbildung 8.1: ^1H -NMR-Spektrum von 250 mM DMAPP gelöst in D_2O .

Abbildung 8.2: Chirale GC-Spektren zum Nachweis des Linalool-Racematen.

Abbildung 8.3: GC/MS-Chromatogramm (TIC) eines Umsatzes von GPP mit CsTPS1_WT.

Abbildung 8.4: GC/MS-Chromatogramm (TIC) eines Umsatzes von GPP mit CsTPS1_Y596A.

Abbildung 8.5: GC/MS-Chromatogramm (TIC) eines Umsatzes von GPP mit CsTPS1_D600A.

Abbildung 8.6: GC/MS-Chromatogramm (TIC) eines Umsatzes von GPP mit CsTPS1_D518N.

Abbildung 8.7: GC/MS-Chromatogramm (TIC) eines Umsatzes von GPP mit CsTPS1_D518A.

Abbildung 8.8: Darstellung der CD-Spektren des Wildtyp-Enzyms im Vergleich zu den Varianten.

Abbildung 8.9: Aminosäuresequenzen der verwendeten Enzyme.

Schemataverzeichnis

Schema 2.1: Beispielhafte Reaktionsgleichung der Hydrolyse eines allylischen Diphosphates.

Schema 2.2: Reaktionsgleichung der Hydrolyse eines allylischen Diphosphates.

Schema 3.1: Reaktionsschema der aromatischen Prenylierung am Beispiel von *p*-Hydroxybenzoesäure und Geranyldiphosphat.

Schema 3.2: A: Mögliche Bildung eines Methionin-Geranyl-Kation-Komplexes, B: Struktur des S-Adenosylmethionin.

Schema 3.3: Enzymatischen Prenylierung von *p*-Hydroxybenzoesäure.

Schema 4.1: Protonentransfer innerhalb der postulierten katalytischen Diade zur finalen Limonenformation.

Schema 4.2: A: Mechanismus der α -Terpinylkation Bildung. B: Bildung von (–)-Limonen über einen Protonentransfer vom C_{8/9}-Atom des Terpinylkations zum Tryrosin 596 weiter zum Aspartat 519.

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Berechnete pK_s-Werte mittels ACD/pK_a DB[®] 10.01.

Tabelle 2.2: Hydrolyse von DMAPP in Abhängigkeit von Temperatur und pH-Wert.

Tabelle 2.3: Hydrolyse von DMAPP unter Zusatz von MgCl₂ bei verschiedenen pH-Werten.

Tabelle 2.4: Hydrolyse von DMAPP in Abhängigkeit von der Anwesenheit von Mg²⁺-Ionen in unterschiedlichen Konzentrationen.

Tabelle 2.5: Hydrolyse von DMAPP bei verschiedenen MgCl₂-Konzentrationen.

Tabelle 2.6: Hydrolyse von DMAPP in Abhängigkeit von verschiedenen Puffern.

Tabelle 2.7: Hydrolyse von DMAPP unter Zusatz von NaCl bei verschiedenen pH-Werten.

Tabelle 2.8: Hydrolyse von DMAPP bei unterschiedlichen LiCl-Konzentrationen bei verschiedenen pH-Werten.

Tabelle 3.1: Normalisierte Spektrenzahlen in % von verschiedenen UbiA-Konstrukten.

Tabelle 3.2: Berechnete Energien (kJ/mol) für die Interaktion zwischen dem Dimethylallylkation und den funktionellen Gruppen ausgewählter Aminosäuren.

Tabelle 4.1: Prozentualer Anteil der gebildeten Monoterpene durch CsTPS1 und seiner Mutanten.

Tabelle 4.2: Kinetische Konstanten der Limonensynthase (WT), erhalten mithilfe von NMR-Experimenten.

Tabelle 4.3: Gegenüberstellung kinetischer Parameter der Limonensynthese (WT) erhalten über unterschiedliche Messmethoden.

Tabelle 5.1.1: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Antikörper (Ak).

Tabelle 5.1.2: Verwendete Bakterienstämme mit entsprechendem Genotyp.

Tabelle 5.1.3: Verwendete Plasmide.

Tabelle 5.1.4: Oligonukleotide für UbiA-Mutationsstudien.

Tabelle 5.1.5: Oligonukleotide für CsTPS1-Mutationsstudien.

Tabelle 5.1.6: Sonstige Oligonukleotide.

Tabelle 8.1: Verwendete Geräte bzw. Verbrauchsmaterialien mit Typ- und Herstellerangaben.

Tabelle 8.2: Verwendete Chemikalien mit Herstellerangaben.

Formelverzeichnis

Formel 2.1: Berechnung der pK_s -Werte für die drei-, zwei- und einfach protonierte Form des DMAPPs anhand der chemischen Verschiebungen.

Formel 2.2: Formel zur Berechnung der Hydrolyserate anhand der Intergrale der ^{31}P -NMR-Signale.

Formel 5.1: Bestimmung der Konzentration von dsDNA.

Formel 5.2: Bestimmung der Proteinkonzentration.

Motivation dieser Arbeit

„Weiße Biotechnologie – Chancen für neue Produkte und umweltschonende Prozesse“ heißt es in der Informationslektüre des Bundesamts für Bildung und Forschung (Bonn, Berlin 2008). „Designer Bugs“, „Directed Evolution“, „Metabolic Pathway“- und „Protein-Engineering“ sind hier die tragenden Schlagwörter. Doch was verbirgt sich im Detail hinter diesen zukunftsweisenden Begrifflichkeiten? Die offizielle Definition für „Weiße Biotechnologie“ lautet: Die Anwendung von Naturwissenschaft und Technologie an lebenden Organismen, deren Teilen sowie Produkten (Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung) (OECD)). Der Schlüssel hierbei sind „Enzyme“, welche als Biokatalysatoren in der chemischen Industrie immer häufiger Verwendung finden. Um diese optimal nutzen zu können, müssen deren Wirkungsweisen grundlegend verstanden werden. Wie ist es für das Enzym möglich aus dem jeweiligen Substrat eine Reihe von verschiedensten Produkten herzustellen? Hierbei hilft nur ein Blick in das Herzstück des Enzyms – das aktive Zentrum.

Um den grundlegenden Mechanismus der initialen Diphosphataktivierung erklären zu können, wurden im Rahmen dieser Arbeit Hydrolyseexperimente im enzymfreien System durchgeführt. Hierbei wurde insbesondere auf die Protonierungsgrade und die Metallkomplexierung des Diphosphates eingegangen. Weiterhin habe ich mich mit der Aufklärung funktional spezifischer Aminosäuren während der Katalyse von Prenyltransferasen und -synthasen beschäftigt. Basierend auf *ab initio* Berechnungen und zielgerichteter Mutagenese sollte die essentielle Rolle von aromatischen Aminosäuren und Methionin während der Katalyse einer membrangebundenen Oligoprenyltransferase bewiesen werden. Darüber hinaus sollte eine katalytische Diade, bestehend aus Tyrosin und Aspartat, in einer Terpensynthese ermittelt werden, welche für den intermediären Protonentransfer während der Katalyse verantwortlich ist.

All die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse helfen den Katalysemechanismus prenylierender Enzyme genauer zu verstehen. Somit können diese Enzyme zukünftig effizienter in biotechnologischen Verfahren eingesetzt werden, um beispielsweise anspruchsvolle Synthesen zu vereinfachen.

1. Einleitung

1.1 Terpene

Terpene repräsentieren eine große, mannigfaltige Gruppe von Naturstoffen. Bis heute konnten an die 55.000 Verbindungen aus unterschiedlichsten Lebensformen identifiziert werden.¹ Den Terpenen wird in verschiedensten Bereichen hohe Bedeutung zugesprochen. Als Hauptbestandteil der von Pflanzen produzierten ätherischen Öle finden die Terpene Anwendung im Bereich der Geruchs- und Geschmacksstoffindustrie.² Weiterhin interagieren sie in der sessilen Pflanze mit anderen Organismen in den Bereichen Reproduktion, Abwehr und Symbiose.^{3,4} Ubichinone, Menachinone und Plastochinone sind Bestandteil des Elektronentransports der Atmungskette sowie der Photosynthese.⁵ Darüber hinaus schützen Carotinoide, als photoprotektive Agenzien, Chlorophyllmoleküle vor Zerstörung durch Photooxidation.^{6,7} Neben diesen pflanzenphysiologischen Aspekten, sind die Terpene allgegenwärtig in der pharmazeutischen Industrie.⁸ Hierbei zu nennen wäre das Artemisinin. Dieses Sesquiterpen wird aus den Blättern und Blüten des Einjährigen Beifußes (*Artemisia annua*) gewonnen und als Malariatherapeutikum eingesetzt.⁹ Von hoher Bedeutung für die Krebstherapie ist der Wirkstoff Paclitaxel (Taxol®). Dieses Zytostatikum wurde erstmalig 1967 aus der Rinde der Pazifischen Eibe (*Taxus brevifolia*) isoliert.¹⁰ Da sowohl auf der einen Seite die Extraktion dieser Verbindungen aus natürlichen Material den Weltbedarf nicht decken kann und auf der anderen Seite die anspruchsvollen Totalsynthesen nur mäßige Ausbeuten liefern¹¹, werden heutzutage biotechnologische Verfahren zur Produktion dieser und weiterer Terpene herangezogen.^{12,13}

Trotz der enormen Diversität dieser Substanzklasse lassen sich alle Verbindungen von dem universellen C₅-Baustein Isopentenylidiphosphat (IPP) und dem allylischen Isomer Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) ableiten. Grundlage aller Terpene bilden die Terpene.¹⁴ Je nach Anzahl der Isopreneinheiten lässt sich diese Stoffklasse in die Hemi- (C₅), Mono- (C₁₀), Sesqui- (C₁₅), Di- (C₂₀), Sester- (C₂₅), Tri- (C₃₀, Steroide), Tetra- (C₄₀, Carotenoide) und Polyterpene (C₅)_{n>8} unterteilen. Innerhalb jeder Gruppe unterscheidet man azyklische und zyklische Terpene, wobei letztere weiter nach der Anzahl der carbozyklischen Ringe im Molekül unterteilt werden.

Die Isopentenyl-Basiseinheiten können entweder „Kopf-Schwanz“- oder „Kopf-Kopf“-verknüpft sein. Hierbei stellt der Prenylrest den „Schwanz“ und das Diphosphat den „Kopf“ dar. Diese Formulierung wurde erstmals 1887 von Otto Wallach eingeführt und 1922 nach Leopold Ruzicka als *biogenetische Isoprenregel* bezeichnet.¹⁵

1.2 Isopentenylidiphosphat-Biosynthese

IPP ist über zwei Routen zugänglich: Zum einem der zytosolische Mevalonatweg (MVA) tierischer und pflanzlicher Zellen und zum anderen der Methylerythritolphosphatweg (MEP), welcher in Bakterien und in den Plastiden grüner Algen und Pflanzen vorkommt (siehe Abbildung 1.1).¹⁶ Höhere Pflanzen und verschiedene Algen verfügen daher über beide Möglichkeiten.¹⁷

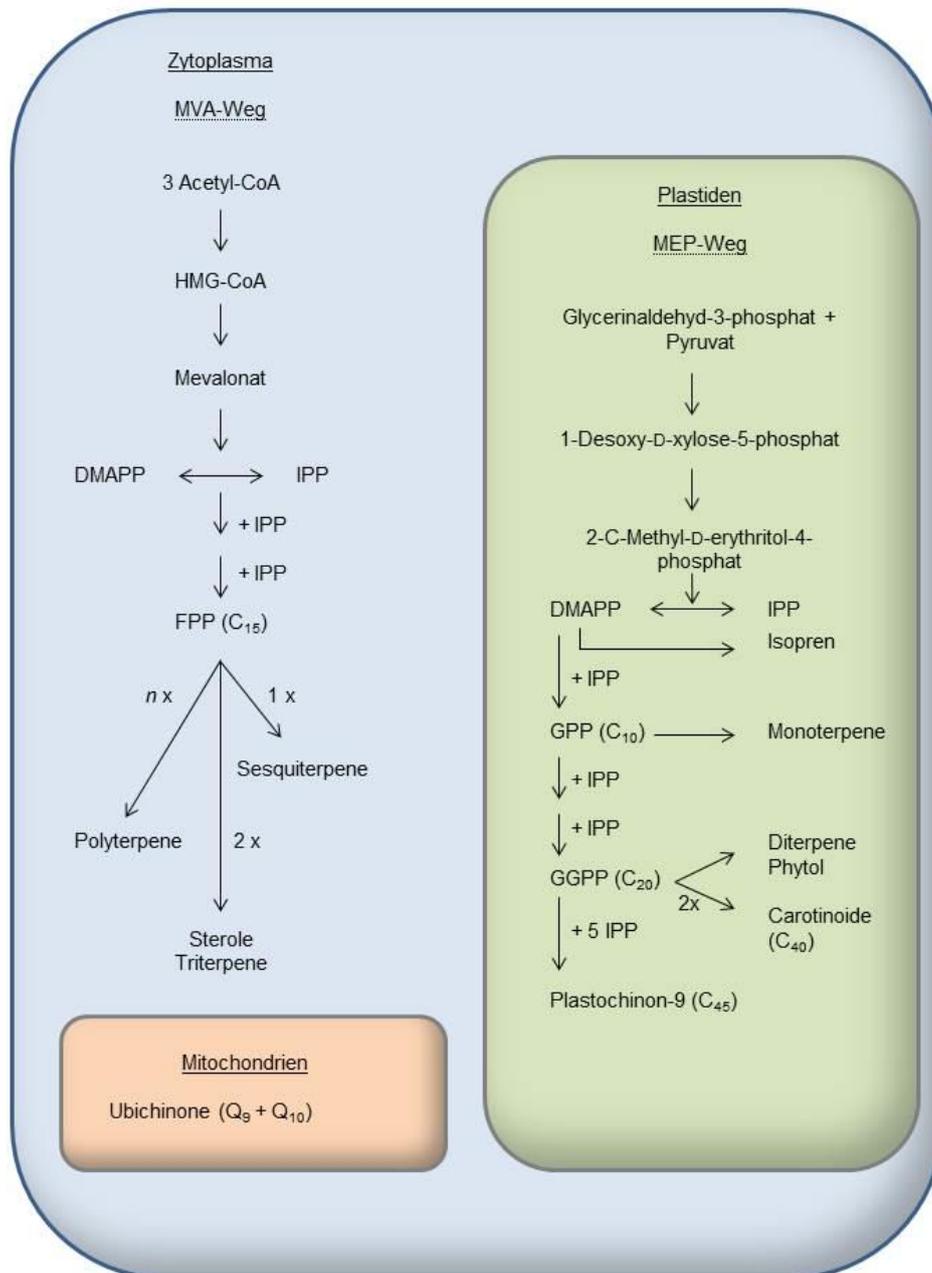


Abbildung 1.1: Übersicht und Kompartimentierung des Mevalonat- (MVA) und Methylerythritolphosphatweges (MEP).¹⁷ HMG-CoA: 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A, IPP: Isopentenylidiphosphat, DMAPP: Dimethylallyldiphosphat, FPP: Farnesylidiphosphat, GPP: Geranylidiphosphat, GGPP: Geranylgeranylidiphosphat.

1.2.1 Mevalonatweg (MVA-Weg)

Untersuchungen in den späten 1950er Jahren führten zur Entdeckung des MVA-Weges in Tieren und Hefen.¹⁸ Mittels radioaktiver Markierungsversuche konnte dieser Biosyntheseweg der Isoprene auch auf Pflanzen übertragen werden.¹⁹

Im Zuge einer Claisen-Thioester-Kondensation reagieren in den Mitochondrien zwei Acetyl-CoA Moleküle zu dem Zwischenprodukt Acetoacetyl-CoA (siehe Abbildung 1.2). Diese Reaktion wird durch eine Thiolase katalysiert. Eine weitere Kondensation eines dritten Acetyl-CoA Moleküls durch die Hydroxymethylglutaryl-CoA-Synthase (HMGS) führt zu 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA. Diese C₆-Verbindung wird nachfolgend durch die NADPH-abhängige HMG-CoA Reduktase (HMGR) zu *R*-Mevalonat reduziert. Katalysiert von der Mevalonat-Kinase (MVK) und der Phosphomevalonat-Kinase (PMK) wird das Mevalonat unter Aufwendung von zwei ATP Molekülen zu Mevalonat-5-diphosphat phosphoryliert. Eine abschließende Decarboxylierung durch die Diphosphomevalonat-Decarboxylase (PMD) stellt den letzten Reaktionsschritt zum IPP dar. Die Isopentenylidiphosphat-Isomerase katalysiert die wechselseitige Isomerisierung von IPP zu DMAPP. Damit stehen IPP und DMAPP im Gleichgewicht, so dass immer beide Prenyleinheiten in aktivierter Form vorliegen.²⁰

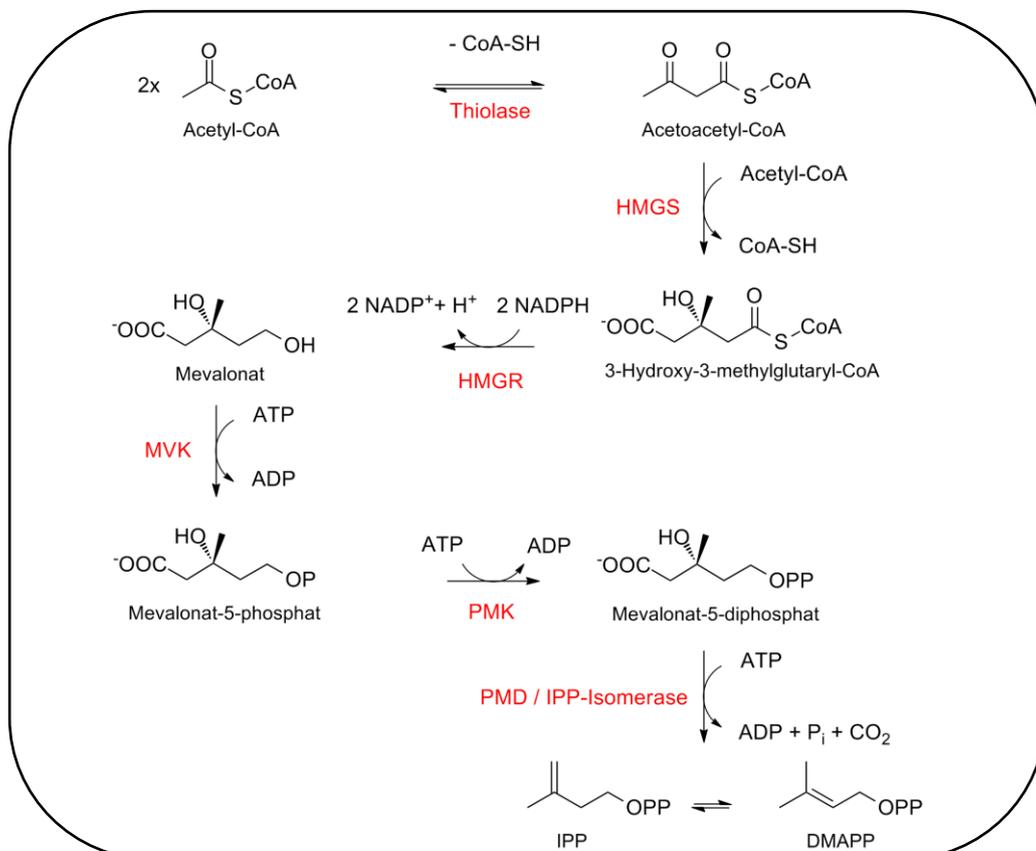


Abbildung 1.2: MVA-Weg. CoA-SH: Coenzym A, HMGS: Hydroxymethylglutaryl-CoA-Synthase, HMGR: Hydroxymethylglutaryl-CoA-Reduktase, NADPH: Nicotinamid-adenin-

dinukleotid-phosphat, ATP: Adenosintriphosphat, MVK: Mevalonat-Kinase, PMK: Phosphomevalonat-Kinase, PMD: Diphosphomevalonat-Decarboxylase, P_i: anorganisches Phosphat, CO₂: Kohlenstoffdioxid, IPP: Isopentenylidiphosphat, DMAPP: Dimethylallyldiphosphat.

1.2.2 Methylerythritolphosphatweg (MEP-Weg)

Ebenfalls über radioaktive Markierungsexperimente konnten Ende der 1980er Jahre die Forschungsgruppen um Michel Rohmer²¹ und Duilio Arigoni²² den sogenannten Methylerythritolphosphatweg aufklären.

Dieser beginnt mit der Verknüpfung von Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-phosphat, welche durch die Deoxyxylulosephosphat-Synthase (DXS) unter CO₂-Abspaltung katalysiert wird (siehe Abbildung 1.3). Hierbei wird das 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat (DXP) gebildet, das wiederum durch die DXP-Reduktase zu 3-Methyl-D-erythrityl-4-phosphat (MEP) reduziert wird. Katalysiert durch die Cytidindiphosphat-Methylerythrityl-Synthase (CMS) wird an das MEP Cytidindiphosphat (CDP) angeknüpft, wobei Cytidintriphosphat (CTP) verbraucht und Diphosphat (PP_i) abgespalten wird. Das entstandene Cytidyl-3-methyl-D-erythrityl-diphosphat (CDP-ME) wird durch ATP und durch die Cytidyl-Methyl-Kinase (CMK) zu Diphosphocytidyl-3-methyl-D-erythrityl-diphosphat (CDP-MEP) phosphoryliert. Die nachfolgende Zyklisierung, katalysiert durch die Methyl-Erythrityl-Zyklo-Diphosphat-Synthase (MCS), findet unter Abspaltung eines Cytidinmonophosphats (CMP) statt. Die Hydroxy-Methyl-Butenyl-Diphosphat-Synthase (HDS) überführt das intermediäre 3-Methyl-D-erythritylen-1,3-zyklodiphosphat unter Wasserabspaltung in das (*E*)-4-Hydroxy-3-methylbut-2-enyldiphosphat (HMB-PP). Der finale Schritt der IPP- / DMAPP-Synthese erfolgt unter NAD(P)H-Oxidation und erneuter Wasserabspaltung, wobei die IPP/DMAPP-Synthase (IDS) das HMB-PP zu IPP und DMAPP umsetzt.

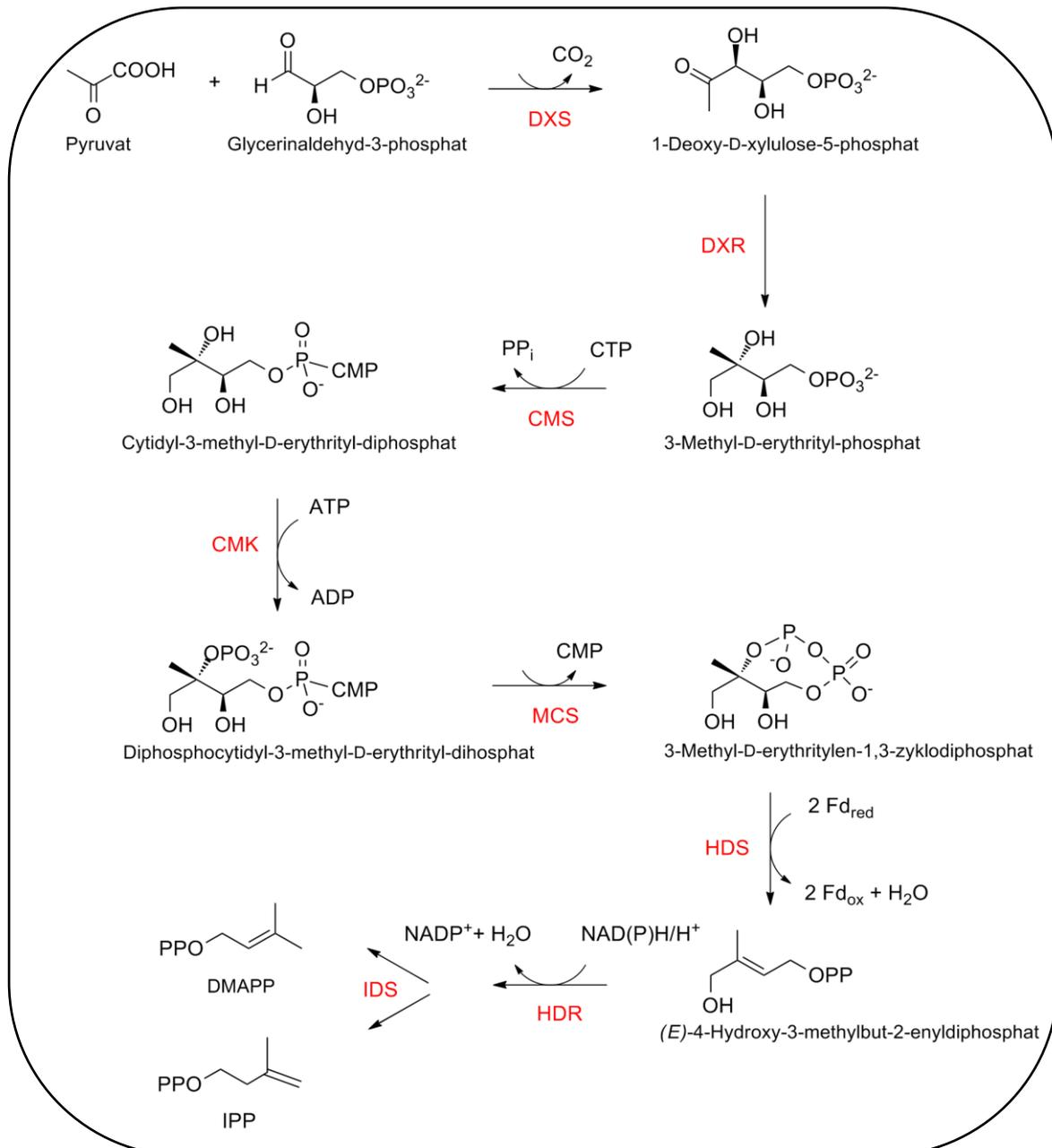


Abbildung 1.3: MEP-Weg. CO₂: Kohlenstoffdioxid, DXS: Deoxyxylulosephosphat-Synthase, DXR: Deoxyxylulosephosphat-Reduktase, CTP: Cytidintriphosphat, PP_i: anorganisches Diphosphat, CMS: Cytidindiphosphat-Methylerythrityl, ATP: Adenosintriphosphat, ADP: Adenosindiphosphat, CMK: Cytidyl-Methyl-Kinase, CMP: Cytidinmonophosphat, MCS: Methyl-Erythrityl-Zyklo-Diphosphat, Fd_{red} / ox = Ferredoxin_{reduziert} / _{oxidiert}, HDS: Hydroxy-Methyl-Butenyl-Diphosphat-Synthase, NADPH: Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat, HDR: Hydroxy-Methyl-Butenyl-Diphosphat-Reduktase, IDS: IPP/DMAPP-Synthase, IPP: Isopentenyl-diphosphat, DMAPP: Dimethylallyldiphosphat.

1.3 Prenylierende Enzyme

Prenylkonvertierende Enzyme sind grundlegend für die außerordentliche Diversität der isoprenoiden Naturstoffe. Sie können die Basisbausteine aller Terpene, IPP und DMAPP, miteinander verknüpfen, um längere Polyisoprenoiddiphosphate zu generieren, sind jedoch auch in der Lage Isoprenoide zu zyklisieren (Terpenzyklen) sowie einen Prenylrest auf ein anderes Substrat zu übertragen (Prenyltransferasen) (siehe Abbildung 1.4). Hierbei kann es sich um ein weiteres Prenyldiphosphat, einen Aromaten oder ein Protein handeln.

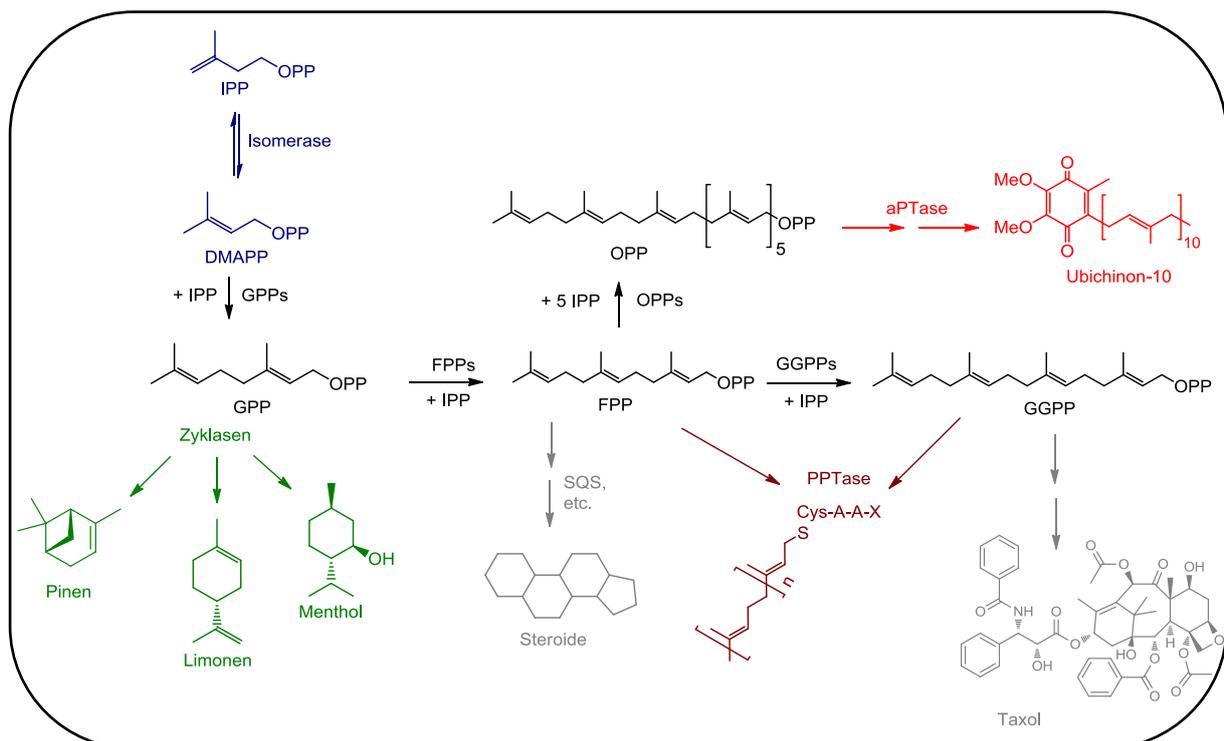


Abbildung 1.4: Übersicht der prenylkonvertierenden Enzyme.²³ IPP: Isopentenylidiphosphat, DMAPP: Dimethylallyldiphosphat, GPPs: Geranylidiphosphatsynthase, GPP: Geranylidiphosphat, FPPs: Farnesylidiphosphatsynthase, FPP: Farnesylidiphosphat, SQS, etc.: Squalensynthase, GGPPs: Geranylgeranylidiphosphatsynthase, GGPP: Geranylgeranylidiphosphat, PPTase: Protein-Prenyltransferase, OPPs: Octaprenylidiphosphatsynthase, OPP: Octaprenylidiphosphat, aPTase: aromatische Prenyltransferase.

1.3.1 Isomerasen

Eine Vielzahl höherer Pflanzen, Bakterien und Algen können selbständig IPP sowie DMAPP über den MEP-Weg biosynthetisieren (siehe Abschnitt 1.2.2). Jedoch sind Eucaria, Archaea und Pilze nicht in der Lage über den MVA-Weg DMAPP herzustellen (siehe Abschnitt 1.2.1). Da dieses jedoch essentiell für die Biosynthese diverser Naturstoffe ist, ist das

Vorhandensein einer IPP-Isomerase unabdingbar. Die Isomerase (PDB-Eintrag: 2dho) katalysiert die reversible Isomerisierung von IPP zu seinem allylischen Isomer dem DMAPP, wobei das Gleichgewicht auf der Seite des DMAPPs liegt.²⁴ Es lassen sich grundlegend zwei Isomerase-Typen unterscheiden. Die Typ I - Isomerasen sind in Eucaria und Bakterien zu finden und in ihrer katalytischen Aktivität abhängig von Metalldikationen (Mg^{2+} im *E. coli* Enzym, Mn^{2+} im humanen Enzym).²⁴ In Archaea und Bakterien kommen die Isomerasen des Typs II vor. Diese benötigen zusätzlich zu Metalldikationen noch reduziertes Flavin.²⁴ Die metallischen Dikationen sind hier nicht an der Komplexierung des Diphosphates beteiligt, sondern erhöhen, durch die Komplexierung einer Glutaminsäure, deren Azidität. Hierbei kommt es durch Protonierung des IPPs zur Isomerisierung. Das entstandene Kation wird nachfolgend protoniert und bildet so DMAPP.²⁴

1.3.2 Isoprenyldiphosphatsynthasen (IPPS)

Die IPPS katalysieren die mehrstufige Verlängerung von DMAPP mittels IPP. Hierbei werden lineare Polyprenyldiphosphate, wie z.B. Geranyldiphosphat (GPP, C_{10}), Farnesyldiphosphat (FPP, C_{15}) und Undecaprenyldiphosphat (UPP, C_{55}), synthetisiert, welche wiederum Bausteine für komplexe Naturstoffe darstellen.^{25,26} Generell findet diese Aneinanderreihung von Prenyleinheiten über die besagte Kopf-Schwanz-Verknüpfung statt (siehe Abschnitt 1.1). Es gibt jedoch ebenfalls Kopf-Kopf-Verknüpfungen, wie es beispielhaft bei den Biosynthesen von Präsqualendiphosphat²⁷ und Präphytoendiphosphat²⁸ der Fall ist.

Je nach Stereochemie der gebildeten Doppelbindung wird in *cis*- und *trans*- Enzyme unterteilt. Die *trans*-Prenyltransferasen sind katalytisch abhängig von drei Mg^{2+} -Ionen²⁹, welche von zwei aspartatreichen DDxxD-Motiven auf Helix D und H komplexiert werden.²⁶ Da die *trans*-Prenyltransferasen untereinander Sequenzähnlichkeiten aufweisen, kann über einen gemeinsamen Vorläufer gemutmaßt werden.^{30,31} Die *cis*-Prenyltransferasen zeigen keinerlei Sequenzähnlichkeit zu den *trans*- Enzymen. Darüber hinaus unterscheiden sie sich ebenfalls in der 3D-Struktur, vor allem im aktiven Zentrum. Den *cis*-IPPS fehlt ein DDxxD Motiv. Dennoch wird das für die katalytische Aktivität benötigte Mg^{2+} -Ion durch ein Glutamat bzw. ein Aspartat komplexiert.³¹⁻³⁴ Der Reaktionsmechanismus, eine Ionisations-Kondensations-Eliminierung, ist für *cis*- und *trans*-IPPS grundlegend gleich.^{26,35} In der Regel binden die zwei diphosphorylierten Substrate, wobei nur das allylische aktiviert und durch Mg^{2+} komplexiert wird.^{33,36} Ein IPP-Molekül wird im aktiven Zentrum so positioniert, dass ein elektrophiler Angriff möglich ist. Nach Spaltung der Prenyldiphosphat-Bindung und Kondensation durch elektrophilen Angriff des IPPs wird, einem S_N1 -Typ-Mechanismus folgend, ein tertiäres carbokationisches, jedoch enzymatisch stabilisiertes, Intermediat

erzeugt.^{26,35} Hierzu wurden verschiedene Untersuchungen an *trans*-IPPS mit fluorierten Substratanaloga³⁷ sowie mit kationischen Aza-Analoga, als starke Inhibitoren³⁸, durchgeführt. SANCHEZ *et al.*³⁹ konnten mittels kombinierten quanten- und molekülmechanischen (QM/MM) Berechnungen einen Ionisations- und Kondensationsprozess mit resultierendem carbokationischen Übergangszustand bestätigen, widerlegten jedoch die Bildung eines stabilen kationischen Intermediates. Nach Protonen-Abstraktion und Entlassen der Diphosphat-Einheit, wechselt das verlängerte Prenyldiphosphat von der nichtaktivierenden Bindungsstelle in die aktivierende. Bindet ein weiteres IPP-Molekül in der nichtaktivierenden Bindungstasche, folgt entweder der nächste Elongationsschritt, oder das Produkt wird entlassen.²⁵

1.3.3 Terpensynthasen (-zyklasen)

Die Terpensynthasen bilden die größte Gruppe der prenylkonvertierenden Enzyme. Sie katalysieren die Biosynthese der Terpene.⁴⁰ Die Bildung der meist zyklischen Produkte, ist hochgradig stereospezifisch.⁴¹ Die Terpensynthasen lassen sich je nach Substrat in Mono- (GPP, C₁₀), Sesqui- (FPP, C₁₅), Di- (GGPP, C₂₀) und Triterpensynthasen (Squalen, C₃₀) unterscheiden. Auf die Monoterpensynthasen wird im Abschnitt 4 näher eingegangen. Der Reaktionsmechanismus der Terpenzyklasen beginnt mit der Bildung eines Carbokations. Dieses hoch reaktive Intermediat kann auf zwei Weisen erzeugt werden. Einen Protonierungs- sowie einen Ionisierungs-abhängigen Weg.⁴¹ Letzterer wird von den α -helikalen Mono-, Sesqui- und Diterpenzyklasen genutzt. Hierbei wird die Abspaltung des Diphosphatrestes durch drei metallische Dikationen unterstützt, welche durch zwei aspartathaltige Motive komplexiert sind. Das erste Motiv ist aspartatreich (DDxxD/E), wobei das zweite Motiv nur ein Aspartat enthält (NSE/DTE).⁴¹ Die Protonierungs-abhängigen Triterpenzyklasen, welche eine α -Fass-Struktur aufweisen, verfügen hingegen nur über ein DxDD-Motiv. Das zentrale Aspartat soll hierbei als Protonen-Donor fungieren und somit die Bildung des Carbokations initiieren.⁴² Terpensynthasen, die azyklische Produkte biosynthetisieren, sind ebenfalls metallabhängig, besitzen jedoch nur das DDxxD-Motiv.^{40,43} Diterpenzyklasen können sowohl dem Protonierungs- als auch dem Ionisierungs-abhängigen Weg folgen.⁴⁴ Abbildung 1.5 zeigt den Bildungsmechanismus zyklischer Monoterpene. Vor der eigentlichen Zyklisierungsreaktion wird Geranyldiphosphat (**1**) in der Bindetasche zu Linalyldiphosphat (**2** und **3**) isomerisiert um eine für die Zyklisierung geeignete Konformation zu ermöglichen. Die Bildung des Carbokations kann zum einen direkt erfolgen, zum anderen von einem Angriff einer π -Bindung begleitet sein. Zeitgleich verlässt die Abgangsgruppe (das Diphosphat) das Molekül. Es handelt sich demnach um eine nukleophile Substitution. Ob

einem S_N1 - oder ein S_N2 -Mechanismus folgend, konnte bis dato nicht geklärt werden. Die mannigfaltige Produktdiversität wird durch abschließende Reaktionen wie Deprotonierung, Hydroxylierung, Ringschlüsse oder Diphosphorylierung begründet. Die 2,3-Doppelbindung des Geranylkatons (**4**) verhindert beginnend die Bildung zyklischer Produkte. Wird das Geranylkation in das tertiäre Linalylkation (**5**) überführt, ist die Bildung eines 6-gliedrigen Ringes möglich. Anschließend folgt ein elektrophiler Angriff von C^1 auf das C^6 der Doppelbindung. Es bildet sich das α -Terpinylkation (**6**), das Schlüsselintermediat für alle zyklischen Monoterpene. Durch eine 5,7-Zyklisierung mit anschließender Protonenabstraktion bildet sich das 3-Caren (**10**). Findet eine 2,7-Zyklisierung nach Markovnikov statt, resultiert aus dem α -Terpinylkation ein Pinylkation (**13**), welches direkt zu α - (**16**) und β -Pinen (**17**) deprotoniert werden kann. Erfolgt eine Wagner-Meerwein-Umlagerung am Pinylkation, bildet sich nach anschließender Wasseranlagerung Fenchol (**15**). Terpinolen (**11**) und Limonen (**12**) werden durch einfache Protonenabstraktion am α -Terpinylkation (**6**) gebildet. Über eine 3,7-Zyklisierung (Anti-Markovnikov-Addition) des α -Terpinylkations entsteht das sekundäre Bornylkation (**7**), welches sich durch eine Wagner-Meerwein-Umlagerung und Protonenverlust in Camphen (**9**) umwandelt. Anhand von QM/MM Berechnungen in der Gasphase wird die Existenz des Bornylkatons jedoch in Frage gestellt. HONG und TANTILLO postulieren, im enzymfreien System, eine dyotrope Umlagerung zweier Alkylgruppen des Pinylkations zur Bildung des Camphylkations (**8**).⁴⁵ Unter einer dyotropen Umlagerung versteht man eine nicht katalysierte, konzertierte Reaktion, bei der gleichzeitig zwei σ -Bindungen intramolekular wandern, wobei ein Übergangszustand durchlaufen wird.

MAJOR und WEIDMANN⁴⁶ konnten am Beispiel der Bornyldiphosphatsynthese zeigen, dass neben den erwähnten chemischen Reaktionen, elektrostatische Dynamiken maßgeblich an der Promiskuität der Terpensynthasen beteiligt sind.

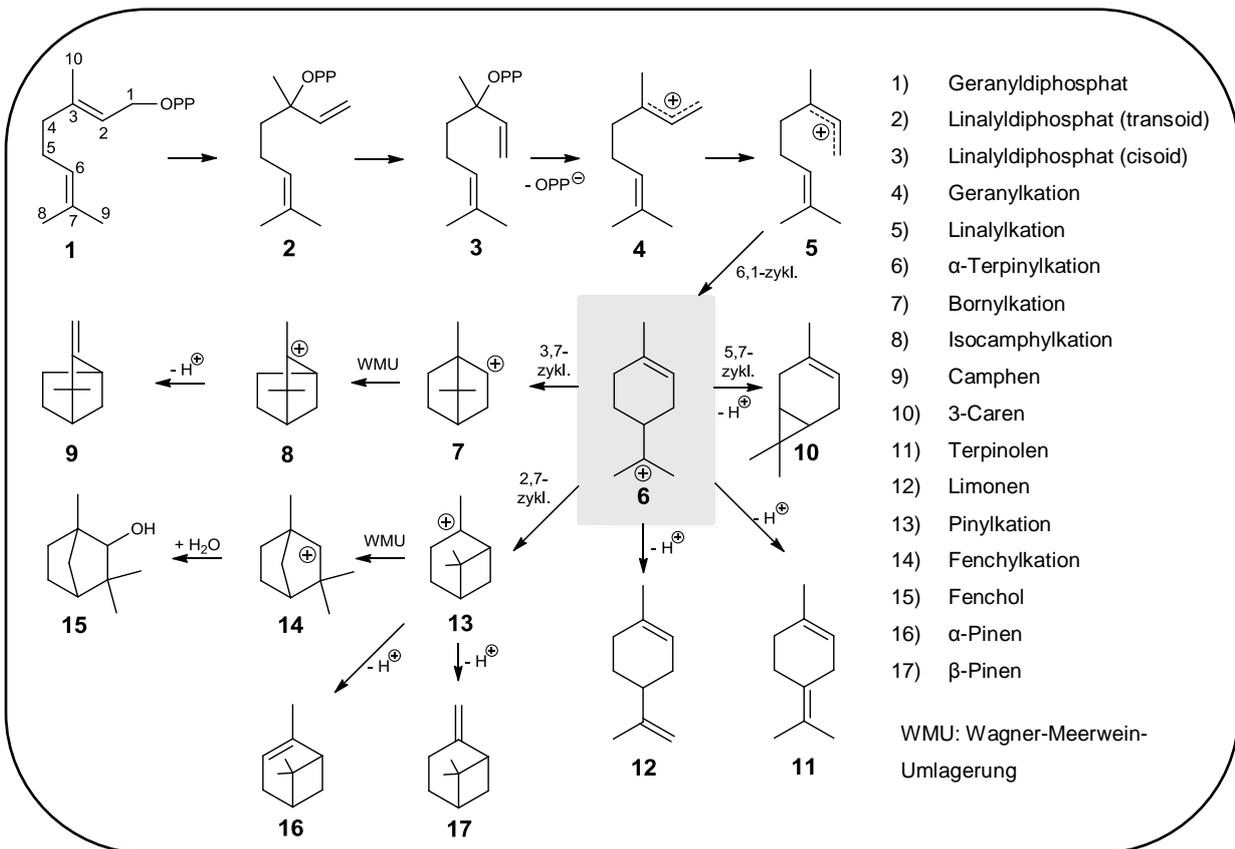


Abbildung 1.5: Reaktionsmechanismus zyklischer Monoterpensynthesen.⁴⁷

1.3.4 aromatische Prenyltransferasen (aPTasen)

Im Allgemeinen katalysieren die aromatischen Prenyltransferasen den Transfer von Prenylresten auf C-, O- oder N-Atome aromatischer Strukturen. Ihre erhöhte Bioaktivität wird durch die verstärkte Affinität der prenylierten Verbindung zu biologischen Membranen begründet.⁴⁸ Grundlegend können zwei verschiedene Gruppen von aromatischen Prenyltransferasen unterschieden werden, welche zueinander keinerlei Ähnlichkeiten in der Proteinsequenz aufweisen (siehe Abbildung 1.6).

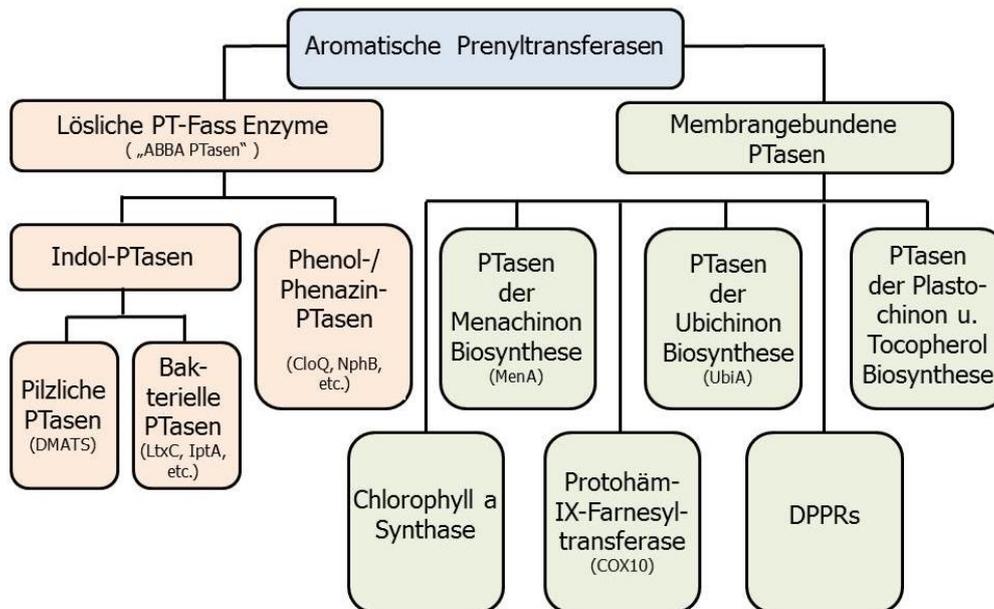


Abbildung 1.6: Gruppierung der aromatischen Prenyltransferasen⁴⁹. DPPRs: 5-Phosphoribose-1-diphosphat:Decaprenylphosphat-5-phosphoribosyltransferasen

Die *integral membrangebundenen aromatischen Prenyltransferasen* besitzen ein aspartathaltiges DxxDDxxxD-Motiv, welches für die Komplexierung der Mg^{2+} -Ionen verantwortlich ist.⁵⁰ Enzyme dieser Klasse katalysieren ausschließlich C-Prenylierungen. Darunter versteht man die Übertragung des Prenylrestes auf ein aktiviertes Kohlenstoffatom des Aromaten. Da es sich bei diesen aPTasen um membrangebundene Enzyme handelt, ist die Proteinreinigung eines intakten Enzyms problematisch. Aus diesem Grund sind bis heute hauptsächlich berechnete Strukturmodelle einiger dieser Proteine bekannt (UbiA^{51,52}, AuaA²⁵, LePGT⁵³). Diese zeigen, dass die Proteinstruktur ausschließlich aus α -Helices besteht. Im Falle von UbiA⁵¹ und LePGT⁵³ konnten die generierten Modelle mit Hilfe von Mutationsexperimenten unterstrichen werden. Weiterhin kann auf der Grundlage semiempirischer Berechnungen ein S_N1 -Mechanismus postuliert werden.⁵¹ CHENG und LI konnten die Kristallstruktur von UbiA aus dem Archaeon *Aeropyrum pernix* publizieren.⁵⁴ Hier konnte gezeigt werden, dass ApUbiA eine seitliche Öffnung besitzt, welche sich in der Membran öffnen kann. Hierüber können Isopreneinheiten kondensieren und in die Membran direkt abgegeben werden. Ballungsanalysen (*Clustering*) der membran-gebundenen aPTasen zeigen drei Hauptballungszentren: PTasen der Menachinon-, der Ubichinon- und der Plastochinon-/Tocopherol-Biosynthese.⁴⁹ Darüber hinaus zeigen die Berechnungen, dass weitere Enzyme in Verbindung mit den aPTasen der Lipochinon-Biosynthese stehen: die Chlorophyll a Synthase und die Protohäm-IX-Farnesyltransferase. Beide übertragen einen Phtyl- bzw. einen Farnesylrest auf die Seitenketten von Tetrapyrrolen.^{55,56} Eine weitere Gruppe bilden die 5-Phosphoribose-1-diphosphat: Decaprenylphosphat-5-phosphoribosyltransferasen (DPPRs), welche an der Lipidbiosynthese der bakteriellen

Zellwand beteiligt sind. Trotz der unterschiedlich katalysierten Reaktionen, gibt es eine Sequenzähnlichkeit zu UbiA.⁵⁷

Die Röntgenkristallstruktur einer *löslichen aromatischen Prenyltransferase* (NphB) zeigt eine neuartige α/β -Fass-Struktur mit antiparallelen Strängen, dem sogenannten „Prenyltransferase (PT)-Fass“ (siehe Abbildung 1.7).⁵⁸ Aufgrund der vorhandenen α - β - β - α -Struktur wird diese Gruppe der löslichen aPTasen auch ABBA-Prenyltransferasen genannt.⁵⁹ Sie weisen kein aspartathaltiges Motiv auf, sind aber dennoch teilweise Magnesium-abhängig.⁵⁸

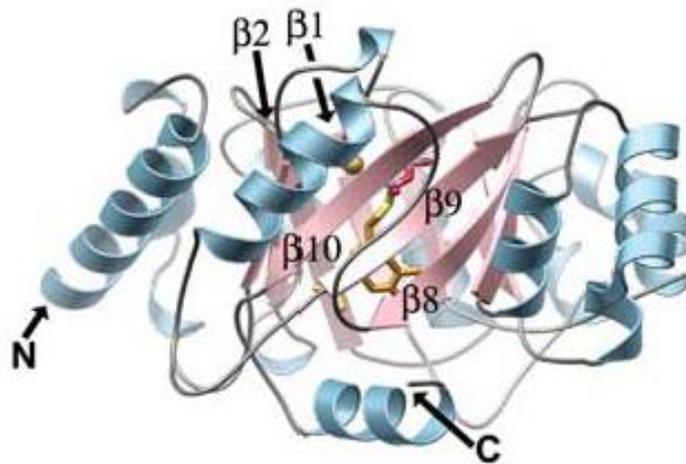


Abbildung 1.7: Fassstruktur des NphB Monomers.⁵⁸ Die zylindrisch angeordneten β -Faltblätter (rosa) werden von antiparallelen α -Strängen (blau) eingefasst. Das gebundene Geranyl-S-Thiolodiphosphat und 1,6-Dihydroxynaphthalen werden als Stabstruktur (gelb und magenta) dargestellt. Die goldfarbene Kugel zeigt das Magnesiumion.

Neben der C-Prenylierung sind diese aPTasen ebenfalls in der Lage den Prenylrest auf ein Sauerstoffatom eines Aromaten zu übertragen. Darüber hinaus kann eine „reverse“ Prenylierung beobachtet werden: hier wird nicht wie sonst üblich das C¹, sondern das C³ der Prenylkette mit dem aromatischen Substrat verknüpft.²⁵ Bis heute wird die Superfamilie der ABBA-PTasen in zwei Untergruppen geteilt: die Phenol-/Phenazin-PTasen und die Indol-PTasen, wobei letztere weiter in pilzliche und bakterielle PTasen klassifiziert werden (siehe Abbildung 1.6). Bedingt durch hohe Sequenzähnlichkeit zählen fünf Proteine zu der Enzym-Gruppe der Phenol-/Phenazin-PTasen: CloQ⁶⁰, NphB⁵⁸, Fnq26⁶¹, SCO7190⁶² und PpzP⁶³. Die Indol-PTs katalysieren C- sowie N-Prenylierungen, wobei diese Reaktionen regulär oder revers ablaufen können. LUK und TANNER⁶⁴ konnten anhand von NMR-Experimenten mit isotopenmarkierten Substraten zeigen, dass die Diphosphatabspaltung reversibel abläuft und die katalysierte Reaktion einem S_N1-Mechanismus folgt. Die erste Röntgenkristallstruktur einer pilzlichen Dimethylallyltryptophansynthase (DMATS) zeigt, trotz fehlender Sequenzähnlichkeit, die bereits beschriebene PT-Fass-Struktur.⁶⁵ Auch sie enthält kein aspartathaltiges Motiv, ist jedoch durchweg Magnesium-unabhängig.⁶⁶ Zu den bakteriellen

Indol-PTasen zählen Enzyme wie z. B. LtxC⁶⁷, CymD⁶⁸ und IptA⁶⁹. Phylogenetische Analysen ermöglichen eine weitere Unterteilung innerhalb der genannten Prenyltransferasegruppe. Hierbei weist das Enzym IptA zwei Homologe auf, die sich auf der Sequenzebene eindeutig von LtxC abgrenzen.⁶⁹

Abbildung 1.8 zeigt exemplarisch Reaktionen katalysiert durch eine Auswahl der genannten aromatischen Prenyltransferasen.

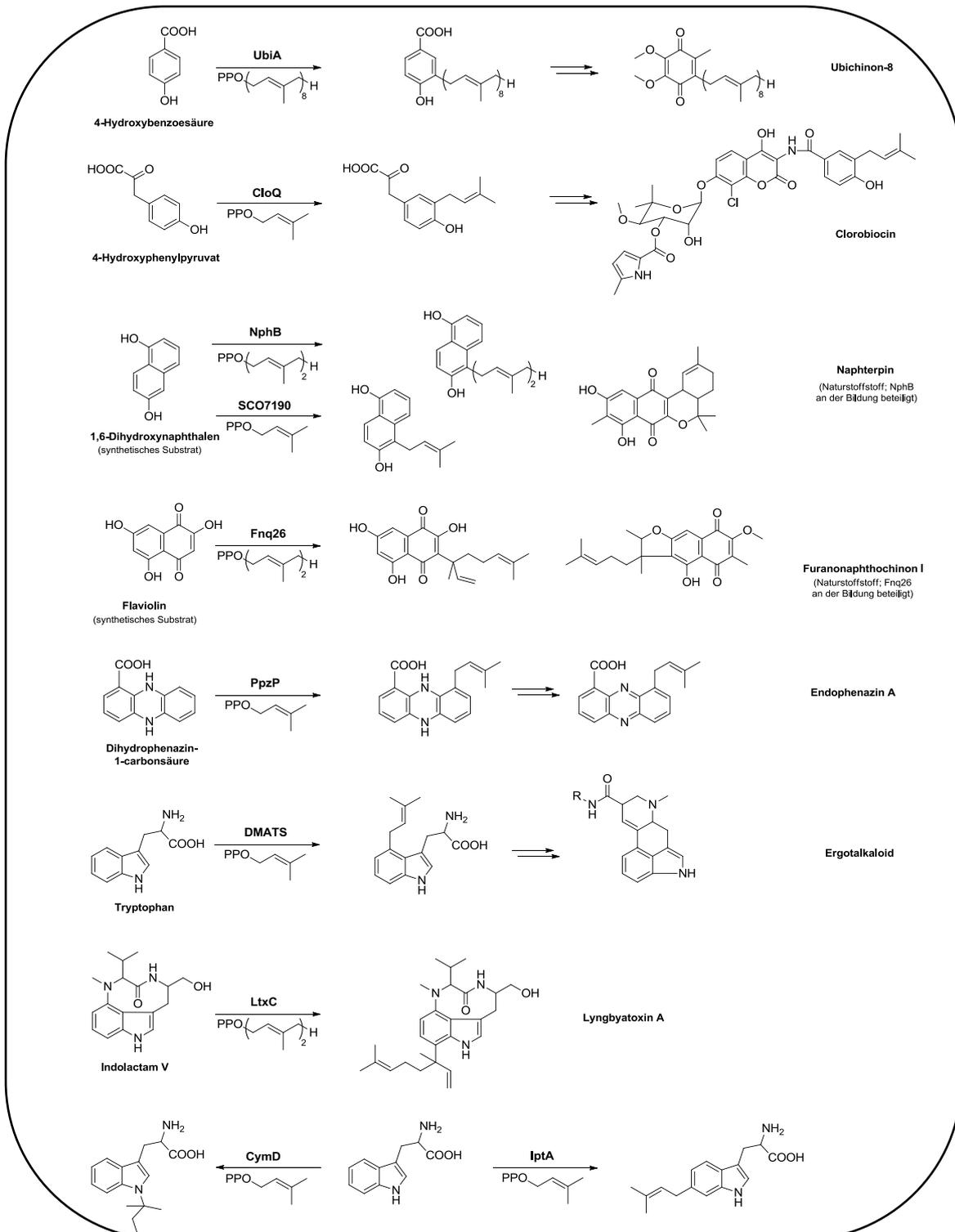


Abbildung 1.8: Reaktionen katalysiert durch aromatische Prenyltransferasen.⁴⁹

1.3.5 Proteinprenyltransferasen (PPTasen)

Die PPTasen lassen sich in drei Gruppen unterteilen: die Proteinfarnesyltransferasen (PFTase) sowie die Proteingeranylgeranyltransferasen Typ I (PGGTase I) und Typ II (PGGTase II).⁷⁰ Grundsätzlich führen die PPTasen eine S-Prenylierung an Cysteinen durch. PFTasen und PGGTasen I transferieren eine Farnesyl- bzw. Geranylgeranylgruppe auf das Cystein eines Cxxx-Motivs (auch „CaaX-Motiv“), am C-Terminus des zu prenylierenden Proteins.⁷¹ Beide Enzyme bestehen aus der gleichen α -, jedoch unterschiedlichen β -Untereinheiten. Auf dieser β -Untereinheit liegt das besagte CaaX-Motiv, welches für die Substratspezifität verantwortlich ist. Ist das X in dem Motiv ein Leucin, Isoleucin oder Valin, wird das Protein geranyliert. Liegt an dieser Stelle ein Methionin, Serin oder Glutamin vor, wird ein Farnesylrest auf das Protein übertragen.^{72,73} Werden die Proteine prenyliert und weiter modifiziert, weist der C-Terminus einen erhöhten hydrophoben Charakter auf, was die Verankerung in der Membran und Protein-Protein-Interaktionen begünstigt.⁷⁴ Die dritte Gruppe der PPTasen sind die PGGTasen II (auch „RabGGTasen“). Sie prenylieren zwei C-terminale Cysteine von Rab-Proteinen. Die Proteine zählen zu den GTPasen und sind an der intrazellulären Vesikelsortierung beteiligt. Die Cysteine der Rab-Proteine sind kein Bestandteil eines CaaX-Motivs, sondern eines CC-, CXC-, CCX- oder CCXX-Motivs.⁷⁵ Neben Zn^{2+} werden zumeist auch Mg^{2+} - bzw. Mn^{2+} - Ionen für die katalytische Aktivität benötigt. Bei Abwesenheit von Mg^{2+} - bzw. Mn^{2+} - Ionen, bleibt die Aktivierung der Diphosphatgruppe aus und es kann kein Prenylrest auf das entsprechende Protein übertragen werden.⁷⁶ Im Gegensatz dazu zeigen ZANG und CASEY⁷⁷ eine Mg^{2+} -unabhängige Aktivität bei PGGTasen I. Um den Mechanismus der Prenylierung zu klären, wurde eine PFTase untersucht. Die Katalyse beginnt mit dem Binden von FPP an dem besagten CaaX-Motiv des Ziel-Proteins. Das Zn^{2+} -Ion aktiviert daraufhin die Cystein-Thiolatgruppe, welche so einen nukleophilen Angriff auf das C^1 -Atom des Prenyldiphosphates ausüben kann.²⁶ Die S-Prenylierung folgt einem S_N2 -Mechanismus.⁷⁶ Da die PTFasen vor allem die Wachstums- und Differenzierungsprozesse regulierenden Ras-Proteine modifizieren, sind Inhibitoren dieser PPTs für die Pharmaindustrie von großem Interesse. 30% der humanen Karzinome zeigen Mutationen in den Ras-Proteinen.⁷²

1.4 Referenzen

1. Christianson, D. W. Unearthing the roots of the terpenome. *Curr. Opin. Chem Biol* **2008**, 12 (2), 141-150.
2. Croteau, R. B.; Wheeler, C. J.; Cane, D. E.; Ebert, R.; Ha, H. J. Isotopically sensitive branching in the formation of cyclic monoterpenes: proof that (-)-alpha-pinene and (-)-beta-pinene are synthesized by the same monoterpene cyclase via deprotonation of a common intermediate. *Biochemistry* **1987**, 26 (17), 5383-5389.
3. Bohlmann, J.; Meyer-Gauen, G.; Croteau, R. Plant terpenoid synthases: molecular biology and phylogenetic analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, 95 (8), 4126-4133.
4. Dudareva, N.; Klempien, A.; Muhlemann, J. K.; Kaplan, I. Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. *New Phytol.* **2013**, 198 (1), 16-32.
5. Barkovich, R.; Liao, J. C. Metabolic engineering of isoprenoids. *Metab Eng* **2001**, 3 (1), 27-39.
6. Krinsky, N. I.; Yeum, K. J. Carotenoid-radical interactions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, 305 (3), 754-760.
7. Zhao, Y. J.; Cheng, Q. Q.; Su, P.; Chen, X.; Wang, X. J.; Gao, W.; Huang, L. Q. Research progress relating to the role of cytochrome P450 in the biosynthesis of terpenoids in medicinal plants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, 98 (6), 2371-2383.
8. Staniek, A.; Bouwmeester, H.; Fraser, P. D.; Kayser, O.; Martens, S.; Tissier, A.; Krol v.d.S.; Wessjohann, L. A.; Warzecha, H. Natural products – learning chemistry from plants. *Biotechnol. J.* **2014**, 326-336.
9. Wallaart, T. E.; Bouwmeester, H. J.; Hille, J.; Poppinga, L.; Maijers, N. C. Amorpha-4,11-diene synthase: cloning and functional expression of a key enzyme in the biosynthetic pathway of the novel antimalarial drug artemisinin. *Planta* **2001**, 212 (3), 460-465.
10. Altmann, K. H.; Gertsch, J. Anticancer drugs from nature - natural products as a unique source of new microtubule-stabilizing agents. *Nat Prod. Rep.* **2007**, 24 (2), 327-357.
11. Julsing, M. K.; Koulman, A.; Woerdenbag, H. J.; Quax, W. J.; Kayser, O. Combinatorial biosynthesis of medicinal plant secondary metabolites. *Biomol. Eng.* **2006**, 23 (6), 265-279.
12. Roberts, S. C. Production and engineering of terpenoids in plant cell culture. *Nat. Chem. Biol.* **2007**, 3 (7), 387-395.
13. Withers, S. T.; Keasling, J. D. Biosynthesis and engineering of isoprenoid small molecules. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, 73 (5), 980-990.
14. Oldfield, E.; Lin, F. Y. Terpen-Biosynthese: Modularitätsregeln. *Angew. Chem.* **2012**, 124 (5), 1150-1163.

15. Ruzicka, L. The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. *Experientia* **1953**, 9 (10), 357-367.
16. Perez-Gil, J.; Rodriguez-Concepcion, M. Metabolic plasticity for isoprenoid biosynthesis in bacteria. *Biochem. J.* **2013**, 452 (1), 19-25.
17. Lichtenthaler, H. K. The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol Plant Mol. Biol.* **1999**, 50, 47-65.
18. Bloch, K.; Chaykin, S.; Phillips, A. H.; De, W. A. Mevalonic acid pyrophosphate and isopentenylpyrophosphate. *J. Biol. Chem.* **1959**, 234, 2595-2604.
19. Lichtenthaler, H. K. Biosynthesis, accumulation and emission of carotenoids, alpha-tocopherol, plastoquinone, and isoprene in leaves under high photosynthetic irradiance. *Photosynth. Res.* **2007**, 92 (2), 163-179.
20. Chappell, J. The biochemistry and molecular biology of isoprenoid metabolism. *Plant Physiol.* **1995**, 107 (1), 1-6.
21. Rohmer, M.; Knani, M.; Simonin, P.; Sutter, B.; Sahm, H. Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochem. J.* **1993**, 295 (2), 517-524.
22. Arigoni, D.; Sagner, S.; Latzel, C.; Eisenreich, W.; Bacher, A.; Zenk, M. H. Terpenoid biosynthesis from 1-deoxy-D-xylulose in higher plants by intramolecular skeletal rearrangement. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **1997**, 94 (20), 10600-10605.
23. Teng, K. H.; Liang, P. H. Undecaprenyl diphosphate synthase, a *cis*-prenyltransferase synthesizing lipid carrier for bacterial cell wall biosynthesis. *Mol. Membr. Biol.* **2012**, 29 (7), 267-273.
24. Zheng, W.; Sun, F.; Bartlam, M.; Li, X.; Li, R.; Rao, Z. The crystal structure of human isopentenyl diphosphate isomerase at 1.7 Å resolution reveals its catalytic mechanism in isoprenoid biosynthesis. *J. Mol. Biol.* **2007**, 366 (5), 1447-1458.
25. Brandt, W.; Bräuer, L.; Günnewich, N.; Kufka, J.; Rausch, F.; Schulze, D.; Schulze, E.; Weber, R.; Zakharova, S.; Wessjohann, L. Molecular and structural basis of metabolic diversity mediated by prenyldiphosphate converting enzymes. *Phytochemistry* **2009**, 70 (15-16), 1758-1775.
26. Liang, P. H.; Ko, T. P.; Wang, A. H. Structure, mechanism and function of prenyltransferases. *Eur. J. Biochem.* **2002**, 269 (14), 3339-3354.
27. Rilling, H. C.; Poulter, C. D.; Epstein, W. W.; Larsen, B. Studies on the mechanism of squalene biosynthesis. Presqualene pyrophosphate, stereochemistry and a mechanism for its conversion to squalene. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, 93 (7), 1783-1785.
28. Altman, L. J.; Ash, L.; Kowerski, R. C.; Epstein, W. W.; Larsen, B. R.; Rilling, H. C.; Muscio, F.; Gregonis, D. E. Prephytoene pyrophosphate. A new intermediate in the biosynthesis of carotenoids. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 94 (9), 3257-3259.

29. Tarshis, L. C.; Yan, M.; Poulter, C. D.; Sacchettini, J. C. Crystal structure of recombinant farnesyl diphosphate synthase at 2.6-Å resolution. *Biochemistry* **1994**, *33* (36), 10871-10877.
30. Chen, A.; Kroon, P. A.; Poulter, C. D. Isoprenyl diphosphate synthases: protein sequence comparisons, a phylogenetic tree, and predictions of secondary structure. *Protein Sci.* **1994**, *3* (4), 600-607.
31. Koyama, T.; Obata, S.; Osabe, M.; Takeshita, A.; Yokoyama, K.; Uchida, M.; Nishino, T.; Ogura, K. Thermostable farnesyl diphosphate synthase of *Bacillus stearothermophilus*: molecular cloning, sequence determination, overproduction, and purification. *J. Biochem.* **1993**, *113* (3), 355-363.
32. Fujihashi, M.; Zhang, Y. W.; Higuchi, Y.; Li, X. Y.; Koyama, T.; Miki, K. Crystal structure of *cis*-prenyl chain elongating enzyme, undecaprenyl diphosphate synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **2001**, *98* (8), 4337-4342.
33. Guo, R. T.; Ko, T. P.; Chen, A. P.; Kuo, C. J.; Wang, A. H.; Liang, P. H. Crystal structures of undecaprenyl pyrophosphate synthase in complex with magnesium, isopentenyl pyrophosphate, and farnesyl thiopyrophosphate: roles of the metal ion and conserved residues in catalysis. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (21), 20762-20774.
34. Kharel, Y.; Zhang, Y. W.; Fujihashi, M.; Miki, K.; Koyama, T. Identification of Significant residues for homoallylic substrate binding of *Micrococcus luteus* B-P 26 undecaprenyl diphosphate synthase. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (30), 28459-28464.
35. Chang, S. Y.; Ko, T. P.; Chen, A. P.; Wang, A. H.; Liang, P. H. Substrate binding mode and reaction mechanism of undecaprenyl pyrophosphate synthase deduced from crystallographic studies. *Protein Sci.* **2004**, *13* (4), 971-978.
36. Gabelli, S. B.; McLellan, J. S.; Montalvetti, A.; Oldfield, E.; Docampo, R.; Amzel, L. M. Structure and mechanism of the farnesyl diphosphate synthase from *Trypanosoma cruzi*: implications for drug design. *Proteins* **2006**, *62* (1), 80-88.
37. Poulter, C. D.; Rilling, H. C. Prenyltransferase: the mechanism of the reaction. *Biochemistry* **1976**, *15* (5), 1079-1083.
38. Wiemer, A. J.; Hohl, R. J.; Wiemer, D. F. The intermediate enzymes of isoprenoid metabolism as anticancer targets. *Anticancer Agents Med. Chem.* **2009**, *9* (5), 526-542.
39. Sanchez, V. M.; Crespo, A.; Gutkind, J. S.; Turjanski, A. G. Investigation of the catalytic mechanism of farnesyl pyrophosphate synthase by computer simulation. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110* (36), 18052-18057.
40. Bohlmann, J.; Steele, C. L.; Croteau, R. Monoterpene synthases from grand fir (*Abies grandis*). cDNA isolation, characterization, and functional expression of myrcene synthase, (-)-(4S)-limonene synthase, and (-)-(1S,5S)-pinene synthase. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272* (35), 21784-21792.
41. Christianson, D. W. Structural biology and chemistry of the terpenoid cyclases. *Chem. Rev.* **2006**, *106* (8), 3412-3442.

42. Wendt, K. U.; Schulz, G. E.; Corey, E. J.; Liu, D. R. Enzyme mechanisms for polycyclic triterpene formation. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2000**, *39* (16), 2812-2833.
43. Dudareva, N.; Martin, D.; Kish, C. M.; Kolosova, N.; Gorenstein, N.; Faldt, J.; Miller, B.; Bohlmann, J. (E)-beta-ocimene and myrcene synthase genes of floral scent biosynthesis in snapdragon: function and expression of three terpene synthase genes of a new terpene synthase subfamily. *Plant Cell* **2003**, *15* (5), 1227-1241.
44. Gao, Y.; Honzatko, R. B.; Peters, R. J. Terpenoid synthase structures: a so far incomplete view of complex catalysis. *Nat. Prod. Rep.* **2012**, *29* (10), 1153-1175.
45. Hong, Y. J.; Tantillo, D. J. Quantum chemical dissection of the classic terpinyl/pinyl/bornyl/camphyl cation conundrum-the role of pyrophosphate in manipulating pathways to monoterpenes. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8* (20), 4589-4600.
46. Major, D. T.; Weitman, M. Electrostatically guided dynamics - the root of fidelity in a promiscuous terpene synthase? *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (47), 19454-19462.
47. Degenhardt, J.; Kollner, T. G.; Gershenzon, J. Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. *Phytochemistry* **2009**, *70* (15-16), 1621-1637.
48. Botta, B.; Delle, M. G.; Menendez, P.; Boffi, A. Novel prenyltransferase enzymes as a tool for flavonoid prenylation. *Trends Pharmacol. Sci.* **2005**, *26* (12), 606-608.
49. Bonitz, T.; Alva, V.; Saleh, O.; Lupas, A. N.; Heide, L. Evolutionary relationships of microbial aromatic prenyltransferases. *PLoS. One.* **2011**, *6* (11), e27336.
50. Heide, L. Prenyl transfer to aromatic substrates: genetics and enzymology. *Current Opinion in Chemical Biology* **2009**, *13* (2), 171-179.
51. Bräuer, L.; Brandt, W.; Wessjohann, L. A. Modeling the *E. coli* 4-hydroxybenzoic acid oligoprenyltransferase (UbiA transferase) and characterization of potential active sites. *J Mol Model* **2004**, *10* (5-6), 317-327.
52. Bräuer, L.; Brandt, W.; Schulze, D.; Zakharova, S.; Wessjohann, L. A structural model of the membrane-bound aromatic prenyltransferase UbiA from *E. coli*. *ChemBiochem* **2008**, *9* (6), 982-992.
53. Ohara, K.; Muroya, A.; Fukushima, N.; Yazaki, K. Functional characterization of LePGT1, a membrane-bound prenyltransferase involved in the geranylation of *p*-hydroxybenzoic acid. *Biochem. J.* **2009**, *421* (2), 231-241.
54. Cheng, W.; Li, W. Structural insights into ubiquinone biosynthesis in membranes. *Sci.* **2014**, *343* (6173), 878-881.
55. Oster, U.; Bauer, C. E.; Rudiger, W. Characterization of chlorophyll a and bacteriochlorophyll a synthases by heterologous expression in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272* (15), 9671-9676.
56. Saiki, K.; Mogi, T.; Anraku, Y. Heme O biosynthesis in *Escherichia coli*: the *cyoE* gene in the cytochrome bo operon encodes a protoheme IX

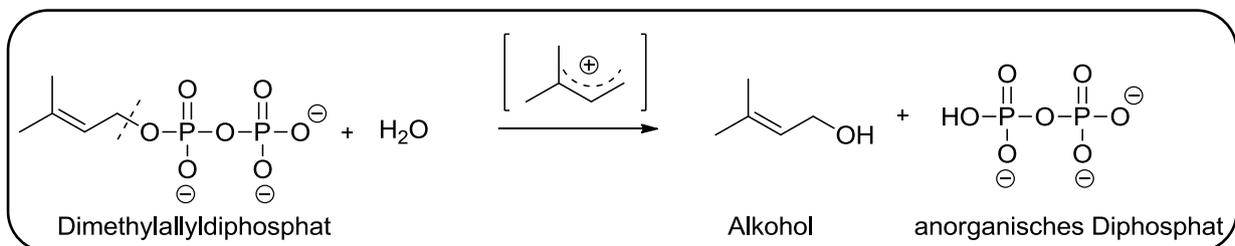
- farnesyltransferase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1992**, 189 (3), 1491-1497.
57. Huang, H.; Scherman, M. S.; D'Haese, W.; Vereecke, D.; Holsters, M.; Crick, D. C.; McNeil, M. R. Identification and active expression of the *Mycobacterium tuberculosis* gene encoding 5-phospho-alpha-D-ribose-1-diphosphate: decaprenyl-phosphate 5-phosphoribosyltransferase, the first enzyme committed to decaprenylphosphoryl-D-arabinose synthesis. *J. Biol. Chem.* **2005**, 280 (26), 24539-24543.
 58. Kuzuyama, T.; Noel, J. P.; Richard, S. B. Structural basis for the promiscuous biosynthetic prenylation of aromatic natural products. *Nature* **2005**, 435 (7044), 983-987.
 59. Tello, M.; Kuzuyama, T.; Heide, L.; Noel, J. P.; Richard, S. B. The ABBA family of aromatic prenyltransferases: broadening natural product diversity. *Cell Mol. Life Sci.* **2008**, 65 (10), 1459-1463.
 60. Pojer, F.; Wemakor, E.; Kammerer, B.; Chen, H.; Walsh, C. T.; Li, S. M.; Heide, L. CloQ, a prenyltransferase involved in clorobiocin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **2003**, 100 (5), 2316-2321.
 61. Haagen, Y.; Unsold, I.; Westrich, L.; Gust, B.; Richard, S. B.; Noel, J. P.; Heide, L. A soluble, magnesium-independent prenyltransferase catalyzes reverse and regular C-prenylations and O-prenylations of aromatic substrates. *FEBS Lett.* **2007**, 581 (16), 2889-2893.
 62. Kumano, T.; Richard, S. B.; Noel, J. P.; Nishiyama, M.; Kuzuyama, T. Chemoenzymatic syntheses of prenylated aromatic small molecules using *Streptomyces* prenyltransferases with relaxed substrate specificities. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, 16 (17), 8117-8126.
 63. Saleh, O.; Gust, B.; Boll, B.; Fiedler, H. P.; Heide, L. Aromatic prenylation in phenazine biosynthesis: dihydrophenazine-1-carboxylate dimethylallyltransferase from *Streptomyces anulatus*. *J. Biol. Chem.* **2009**, 284 (21), 14439-14447.
 64. Luk, L. Y. P.; Tanner, M. E. Mechanism of dimethylallyltryptophan synthase: Evidence for a dimethylallyl cation intermediate in an aromatic prenyltransferase reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131 (39), 13932-13933.
 65. Metzger, U.; Schall, C.; Zocher, G.; Unsold, I.; Stec, E.; Li, S. M.; Heide, L.; Stehle, T. The structure of dimethylallyl tryptophan synthase reveals a common architecture of aromatic prenyltransferases in fungi and bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **2009**, 106 (34), 14309-14314.
 66. Li, S. M. Evolution of aromatic prenyltransferases in the biosynthesis of indole derivatives. *Phytochemistry* **2009**, 70 (15-16), 1746-1757.
 67. Edwards, D. J.; Gerwick, W. H. Lyngbyatoxin biosynthesis: sequence of biosynthetic gene cluster and identification of a novel aromatic prenyltransferase. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126 (37), 11432-11433.
 68. Schultz, A. W.; Oh, D. C.; Carney, J. R.; Williamson, R. T.; Udvary, D. W.; Jensen, P. R.; Gould, S. J.; Fenical, W.; Moore, B. S. Biosynthesis and structures of cyclomarins and cyclomarazines, prenylated cyclic peptides of marine actinobacterial origin. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130 (13), 4507-4516.

69. Takahashi, S.; Takagi, H.; Toyoda, A.; Uramoto, M.; Nogawa, T.; Ueki, M.; Sakaki, Y.; Osada, H. Biochemical characterization of a novel indole prenyltransferase from *Streptomyces* sp. SN-593. *J. Bacteriol.* **2010**, *192* (11), 2839-2851.
70. Benetka, W.; Koranda, M.; Eisenhaber, F. Protein Prenylation: An (almost) Comprehensive overview on Discovery, History, Enzymology, and significance in physiology and disease. *Monatsh. Chem.* **2006**, *137*, 1241-1281.
71. Ibrahim, M. X.; Khan, O. M.; Bergo, M. O. Genetic Analyses of the CAAX protein prenyltransferases in mice. *The Enzymes* **2011**, *29*, 259-274.
72. DeGraw, A. J.; Hast, M. A.; Xu, J.; Mullen, D.; Beese, L. S.; Barany, G.; Distefano, M. D. Caged protein prenyltransferase substrates: tools for understanding protein prenylation. *Chem. Biol. Drug Des* **2008**, *72* (3), 171-181.
73. Guo, Z.; Wu, Y. W.; Das, D.; Delon, C.; Cramer, J.; Yu, S.; Thuns, S.; Lupilova, N.; Waldmann, H.; Brunsveld, L.; Goody, R. S.; Alexandrov, K.; Blankenfeldt, W. Structures of RabGGTase-substrate/product complexes provide insights into the evolution of protein prenylation. *EMBO J.* **2008**, *27* (18), 2444-2456.
74. Basso, A. D.; Kirschmeier, P.; Bishop, W. R. Lipid posttranslational modifications. Farnesyl transferase inhibitors. *J. Lipid Res.* **2006**, *47* (1), 15-31.
75. Gelb, M. H.; Brunsveld, L.; Hrycyna, C. A.; Michaelis, S.; Tamanoi, F.; Van Voorhis, W. C.; Waldmann, H. Therapeutic intervention based on protein prenylation and associated modifications. *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2* (10), 518-528.
76. Huang, C.; Hightower, K. E.; Fierke, C. A. Mechanistic studies of rat protein farnesyltransferase indicate an associative transition state. *Biochemistry* **2000**, *39* (10), 2593-2602.
77. Zhang, F. L.; Casey, P. J. Influence of metal ions on substrate binding and catalytic activity of mammalian protein geranylgeranyltransferase type-I. *Biochem. J.* **1996**, *320* (Pt 3), 925-932.

2. Die Hydrolyse eines allylischen Diphosphates

2.1 Einleitung

Die Hydrolyse verschiedenster Diphosphate ist für das Leben essentiell. So liefert zum Beispiel die Hydrolyse von ATP zu ADP und weiter zu AMP einen Großteil der Energie, die in der Zelle die Arbeitsleistung ermöglicht. Darüber hinaus stellt die Diphosphathydrolyse den initiierenden Schritt der Terpenbiosynthese dar. Die Mannigfaltigkeit dieser Naturstoffklasse deutet auf komplexe Katalysemechanismen der prenylkonvertierenden Enzyme hin. Bei der Hydrolyse von einem allylischen Diphosphat entsteht zunächst ein anorganisches Diphosphat sowie ein reaktives Elektrophil (Carbokation), welches für die weitere Reaktion zum Alkohol zur Verfügung steht (Schema 2.1).



Schema 2.1: Beispielhafte Reaktionsgleichung der Hydrolyse eines allylischen Diphosphates.

Für die Reaktion des Carbokations werden die sp^3 -Kohlenstoffzentren aktiviert und auf elektronenreiche Systeme übertragen. Hierzu sind die prenylkonvertierenden Enzyme in der Lage. Sie können aktivierte Kohlenstoffzentren erzeugen und diese nachfolgend auf nukleophile Reaktionspartner regioselektiv übertragen. Genau dieser Sachverhalt stellt eine große Herausforderung in der chemischen Synthese dar. Nur unter extremen Reaktionsbedingungen, wie hohen Temperaturen oder durch starke Säuren, oftmals unter Anwendung von Schutzgruppenstrategien ist die Knüpfung von C–C-Bindungen möglich. Hierbei haben sich die prenylierenden Enzyme bereits als effiziente Alternative bewiesen.¹ Die enzymatische Diphosphatspaltung ist oftmals metallkationenabhängig. Die Metallionen treiben hierbei in vielerlei Hinsicht die Spaltung des Diphosphates voran. Zum einen orientieren die Metallionen das Substrat optimal in der Bindetasche.^{2,3} Dies geschieht durch Komplexierung des Diphosphates, wodurch Substratspezifität vermittelt wird.^{2,4-6} Zum anderen wird die Abspaltung des Diphosphates durch die Stabilisierung der am Diphosphat entstehenden negativen Ladung erleichtert.^{2,7,8} Abschließend wird die Produktfreigabe durch Metallionen vereinfacht.⁹ Es gibt jedoch auch metallunabhängige Enzyme. Hier übernehmen dipolare Helixstrukturen oder positiv geladene bzw. wasserstoffbrückenbildende Aminosäuren die Aufgaben der Metallkationen.¹⁰ Weiterhin simulieren im Enzym zum Beispiel basische Aminosäuren durch Protonierung des Diphosphates eine saure Umgebung

und erleichtern so die Diphosphatabspaltung.^{3,4,7,11,12} Mehrere Autoren¹³⁻¹⁵ haben bereits diese spontane Hydrolyse im Sauren für allylische Diphosphate beschrieben. Je saurer das umgebende Milieu, desto höher die Hydrolysegeschwindigkeit.^{13,14,16-19} Bei diesen Studien wurden jedoch in allen Fällen Metallionen dem Versuchsansatz zugesetzt und die Messungen erfolgten bei erhöhter Temperatur.

Um den Einfluss dieser unterschiedlichen Parameter - Metallionen-, pH- und Temperaturabhängigkeit - separat auf die Hydrolyse der allylischen Diphosphate untersuchen zu können, wurden ³¹P-NMR-Studien unternommen. Hierbei wurde Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) unter verschiedenen Bedingungen enzymfrei analysiert. Mit der enzymfreien Reaktion konnten die möglichen Einflussfaktoren der Diphosphataktivierung kontrolliert modifiziert und analysiert werden. Zudem wurde das allylische DMAPP als Modell gewählt, da dieses Grundlage für quantenchemische Berechnungen war, welche die Basis dieser Experimente darstellen.²⁰ Weiterhin ist DMAPP ein Substrat für die prenyldiphosphatkonvertierenden Enzyme, die in den nachfolgenden Kapiteln behandelt werden. Somit können die hier gewonnen Erkenntnisse Einblicke in die Katalysemechanismen im Enzym geben.

2.2 Ergebnisse und Diskussion

2.2.1 ³¹P- und ¹H-NMR-Spektren-Analyse der C–O-Bindungsspaltung im Dimethylallyldiphosphat

Abbildung 2.1 zeigt das 400 MHz ³¹P-NMR-Spektrum von 250 mM Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) gelöst in D₂O. Im gelösten Zustand bei Raumtemperatur sind zwei Dubletts zu erkennen. Das Dublett bei -6,6 ppm ist dem endständigen Phosphor zuzuordnen, wobei das Dublett um -10,4 ppm den Phosphor in Nachbarschaft zum organischen Rest zeigt. Das Spektrum wurde direkt nach dem Lösen des DMAPPs aufgenommen und zeigte auch nach 24 h keine Veränderung. Erst nach Erhitzen der Lösung auf 54°C für 16 h ist, neben den bereits erwähnten Dubletts, ein weiteres Singulett bei -7,8 ppm zu sehen. Dieses repräsentiert die abgespaltene Diphosphatgruppe. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass ein spontaner Zerfall des DMAPPs im Zeitrahmen des Experiments bei Raumtemperatur ausgeschlossen werden kann und erst durch Energiezufuhr ermöglicht wird.

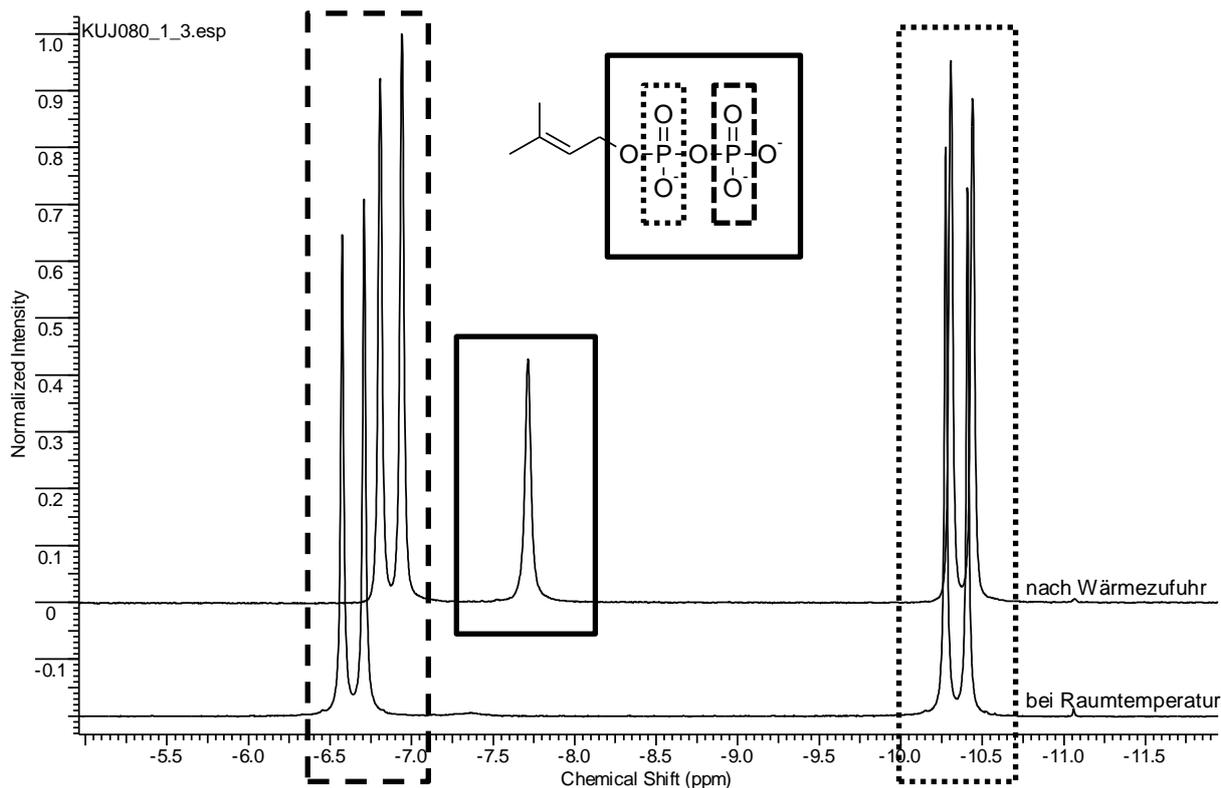
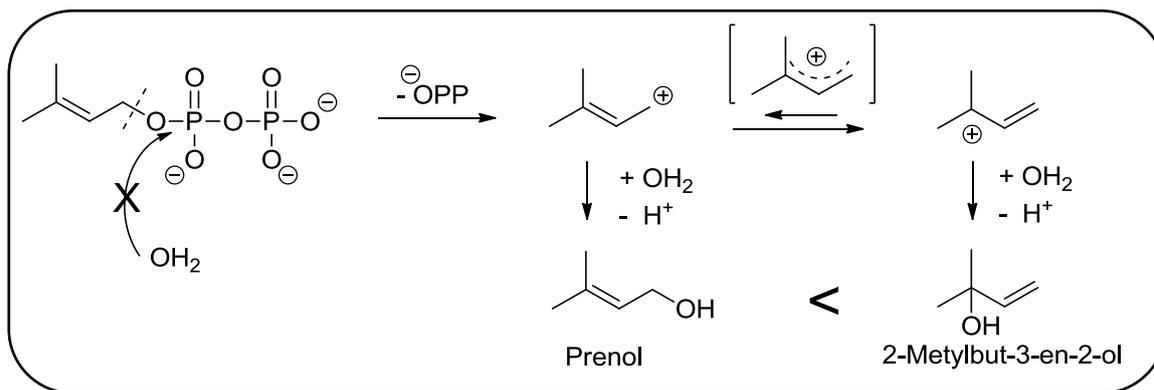


Abbildung 2.1: ^{31}P -NMR Spektren (400 MHz) einer 250 mM DMAPP-Lösung in D_2O vor und nach Wärmezufuhr.

Im ^1H -NMR-Spektrum ist zu erkennen, dass neben dem Prenol auch das 2-Methylbut-3-en-2-ol entsteht (Anhang Abbildung 8.1). Durch die Abspaltung des Diphosphates entsteht als Zwischenprodukt ein primäres Carbokation, welches zum Prenol weiterreagiert. Das primäre Carbokation steht durch Umlagerung im Gleichgewicht mit einem tertiären Carbokation, woraus 2-Methylbut-3-en-2-ol resultiert. Im Molekülorbital des Allylkations liegen die positiven Teilladungen an den Enden des π -Systems, mit besserer Stabilisierung am tertiären Kohlenstoff, aber besserer sterischer Zugänglichkeit am primären Kohlenstoff.²¹ Damit entsteht der tertiäre Alkohol (2-Methylbut-3-en-2-ol) im deutlichen Überschuss zum primären Alkohol (Prenol). Durch das 2-Methylbut-3-en-2-ol ist damit bewiesen, dass die C–O- und nicht die P–O- Bindung gespalten wird (Schema 2.2). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der Arbeit von LUK und TANNER²², die mittels Isotopen-Markierungsexperimente zum gleichen Ergebnis kamen.



Schema 2.2: Reaktionsgleichung der Hydrolyse eines allylischen Diphosphates. Durch die Spaltung der C–O-Bindung entstehen neben dem anorganischen Diphosphat, die Alkohole Prenol und 2-Methylbut-3-en-2-ol.

2.2.2 Löslichkeitsverhalten von Dimethylallyldiphosphat

Im Laufe der Experimente zeigte sich ein wesentlicher Einfluss der Magnesiumkonzentration in den Messpuffern auf das Aggregationsverhalten des Dimethylallyldiphosphates. Da Magnesiumionen von zahlreichen prenylkonvertierenden Enzymen als Cofaktor benötigt werden, war eine genaue Untersuchung der Hydrolyseabhängigkeit der Diphosphate von der Metallionenart und -konzentration grundlegend.

Werden 50 mg DMAPP ohne Zusatz von Metallionen in 700 μL D_2O gelöst, erhält man eine klare Lösung. Nach Zusatz der gleichen DMAPP-Menge zu einer 0,1 molaren MgCl_2 -Lösung ist nach 6 Stunden eine deutliche Trübung zu erkennen. Eine Erhöhung der Magnesiumkonzentration ($c(\text{Mg}_2\text{Cl}) = 0,3 \text{ M}$ und $0,9 \text{ M}$) führt dabei zur vermehrten Niederschlagsbildung. Da das DMAPP als Ammoniumsalz vorliegt, kann es sich bei dem Präzipitat um das unlösliche Magnesiumammoniumphosphat ($\text{Mg}[\text{NH}_4\text{PO}_4]$) handeln. Ein Vergleich der ^{31}P -NMR-Spektren vor und nach Auftreten des Niederschlages zeigt, dass dieser die Qualität der Spektren nicht beeinflusst. Auch beim quantitativen Vergleich des Spektrums vor und nach Auftreten der Niederschlagsbildung sind keine signifikanten Unterschiede ersichtlich. In den durchgeführten Experimenten wurden 10 % (v/v) des Lösungsvermittlers DMSO zugesetzt, um diese Präzipitation zu verhindern, um so Spektren von klaren Lösungen aufnehmen zu können.

2.2.3 Chemische Verschiebungen in ^{31}P -NMR-Spektren in Abhängigkeit unterschiedlicher pH Werte zur Bestimmung von pK_s -Werten

Wie einleitend erwähnt, verhält sich die Hydrolysegeschwindigkeit von DMAPP reziprok proportional zum fallenden pH-Wert. Bei diesen Analysen tritt wie erwartet eine chemische Verschiebung der Phosphorsignale auf. Abbildung 2.2 zeigt eine Versuchsreihe, bei der 250 mM DMAPP unter Zusatz von 250 mM MgCl_2 bei unterschiedlichen pH-Werten gelöst ist.

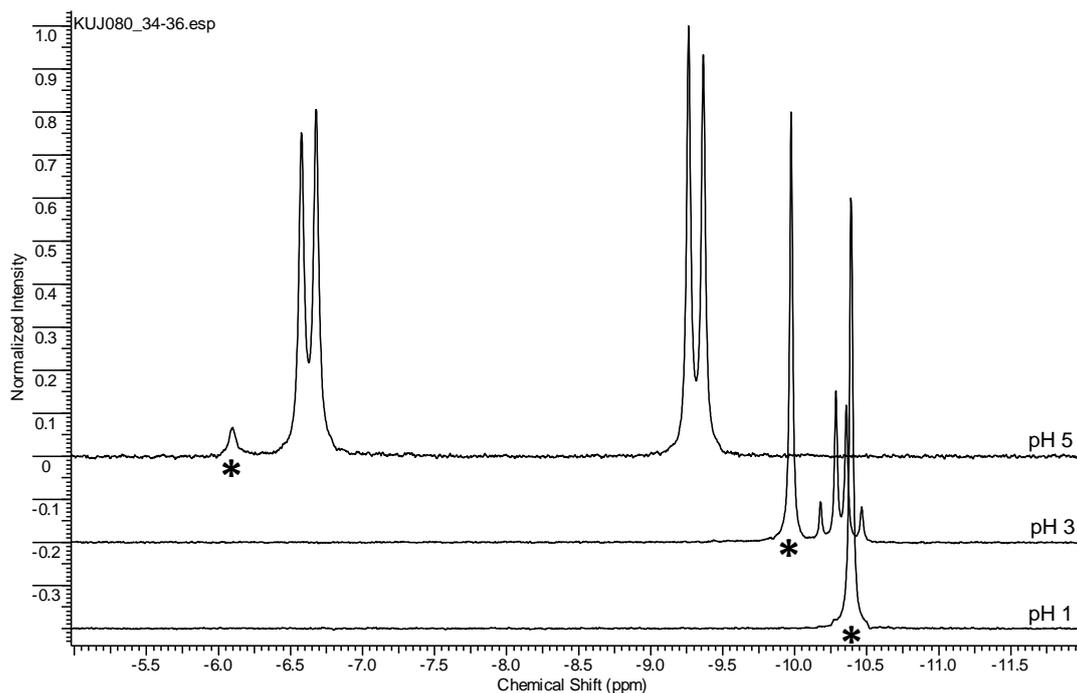


Abbildung 2.2: Chemische Verschiebungen in ^{31}P -NMR Analysen der Hydrolyse von Dimethylallyldiphosphat bei unterschiedlichen pH Werten. * kennzeichnet das Signal der abgespaltenen Diphosphatgruppe.

Das Spektrum bei pH 5 zeigt das Singulett der abgespaltenen Diphosphatgruppe bei -6,15 ppm und die Dubletts der beiden Phosphoratome des intakten DMAPPs bei -6,68 bzw. -9,37 ppm. Bei pH 3 wandern diese beiden Dubletts aufeinander zu und sind bei -10,28 ppm und -10,47 ppm zu finden. Das Singulett ist um 4 ppm hochfeldverschoben. Hat bei pH 1 eine vollständige Hydrolyse stattgefunden, sind die Dubletts nicht mehr vorhanden und das Singulett liegt bei -10,45 ppm. Somit ist eine eindeutige pH-Abhängigkeit der Hydrolyse nachweisbar, verursacht durch unterschiedliche Protonierungsgrade. DMAPP kann theoretisch in sechs verschiedenen Protonierungsformen vorliegen:

- eine Form mit vollständig protoniertem Diphosphat,
- jeweils zwei Formen mit zwei- bzw. einfach protoniertem Diphosphat
- und eine Form mit vollständig deprotoniertem Diphosphat.

Sind nun die chemischen Verschiebungen der Diphosphatanionen und die pH-Werte bekannt, lassen sich unter Verwendung der Formeln 2.1 die pK_s -Werte graphisch ermitteln (Abbildung 2.3).²³

Formel 2.1.: Berechnung der pK_s -Werte für die drei-, zwei- und einfach protonierte Form des DMAPPs anhand der chemischen Verschiebungen.

$$pK_{s1} = pH - \lg \frac{\delta_{H_3B} - \delta_1}{\delta_1 - \delta_{H_2B}} \quad pK_{s2} = pH - \lg \frac{\delta_{H_2B} - \delta_2}{\delta_2 - \delta_{HB^-}} \quad pK_{s3} = pH - \lg \frac{\delta_{HB^-} - \delta_3}{\delta_3 - \delta_{B^{2-}}}$$

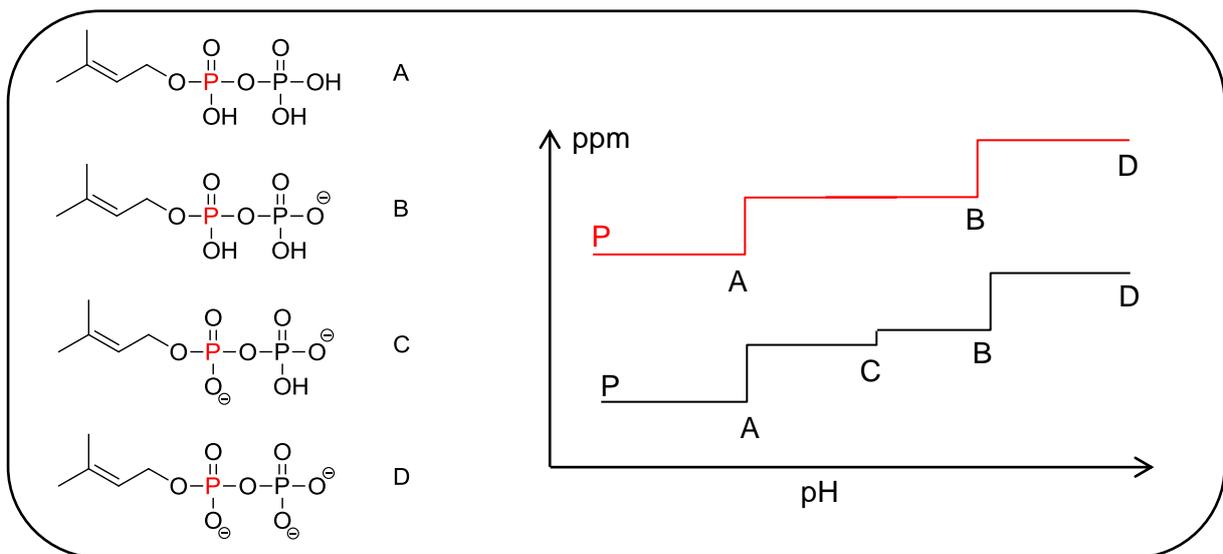


Abbildung 2.3.: Links: verschiedene Protonierungsformen des DMAPPs. Rechts: schematische Darstellung des Kurvenverlaufs der ^{31}P -chemischen Verschiebungen in Abhängigkeit von unterschiedlichen pH-Werten.

Um die pK_s -Werte mit Hilfe der ^{31}P -chemischen Verschiebungen bei unterschiedlichen pH-Werten bestimmen zu können, wurden jeweils 100 mM DMAPP in 750 μL Puffer gelöst und bei 400 MHz vermessen. Die Pufferlösungen wurden so gewählt, dass ein pH-Bereich von sauer bis basisch abgedeckt werden konnte:

- pH 2 – 6: Glycin-Puffer (mit 37 %iger HCl-Lösung),
- pH 6 – 8: Imidazol-Puffer (mit 37 %iger HCl-Lösung),
- pH 8 / 9: Tris-Puffer (mit 37 %iger HCl-Lösung),
- pH 9 – 11: Glycin-Puffer (mit 6 N NaOH-Lösung).

Um mögliche Einflüsse der Puffer auf die chemischen Verschiebungen zu entgegenen, wurden überlappende pH-Bereiche ebenfalls analysiert. Abbildung 2.4 zeigt die chemischen Verschiebungen bei unterschiedlichen pH-Werten in ^{31}P -NMR-Spektren.

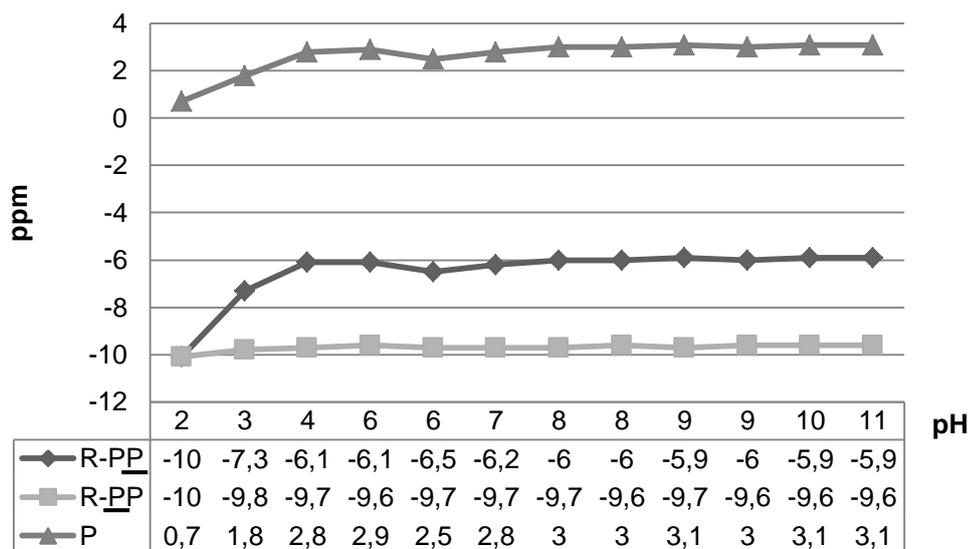


Abbildung 2.4: Chemische Verschiebungen der Signale im ^{31}P -NMR-Spektrum bei unterschiedlichen pH-Werten (R – PP: Signal des endständigen Phosphors, R – PP: Signal des Phosphors gebunden am organischen Rest, P: Monophosphat).

Im Gegensatz zu der schematischen Darstellung in Abbildung 2.3, liegen keine drei Stufen in den einzelnen Graphen vor. Diese würden die unterschiedlichen pK_s -Werte angeben.²⁴ Ein Grund dafür könnte sein, dass sich das eingesetzte DMAPP selbst puffert und es damit nicht zur Ausbildung unterschiedlicher pK_s -Werte kommen kann. Da keine Literaturdaten zur pK_s -Wert-Bestimmung existent waren, wurden die theoretischen pK_s -Werte mittels des Programms ACD/pK_a DB[®] 10.01 berechnet. Die berechneten pK_s -Werte sind der Tabelle 2.1 zu entnehmen.

Tabelle 2.1: Berechnete pK_s -Werte mittels ACD/pK_a DB[®] 10.01.

$$\text{pK}_{s1} = 6,90 \pm 0,53$$

$$\text{pK}_{s2} = 1,93 \pm 0,10$$

$$\text{pK}_{s3} = 1,08 \pm 0,5$$

Grundlegend kann die pH-Abhängigkeit der ^{31}P -chemischen Verschiebung wie folgt begründet werden: Im Fall von erhöhter Azidität der Lösung steigt die Tendenz zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen. Diese führen zu partiell negativ geladenen Sauerstoffatomen. Nimmt die Basizität der Lösung zu, steigt die negative Ladung der Sauerstoffatome infolge der Anionenbildung.²³

2.2.4 Hydrolyserate von Dimethylallyldiphosphat

Die Bestimmung der prozentualen Hydrolyse von DMAPP erfolgte anhand ^{31}P -NMR-Analysen. Hierbei wurde der Anteil des entstehenden anorganischen Diphosphates, als Maß für die Hydrolyserate, bestimmt (Formel 2.2 und Abbildung 2.5).

Formel 2.2: Formel zur Berechnung der Hydrolyserate anhand der Integrale der ^{31}P -NMR-Signale.

$$\text{Hydrolyserate [\%]} = \frac{\int C}{(\int A + \int B + \int C)} \times 100$$

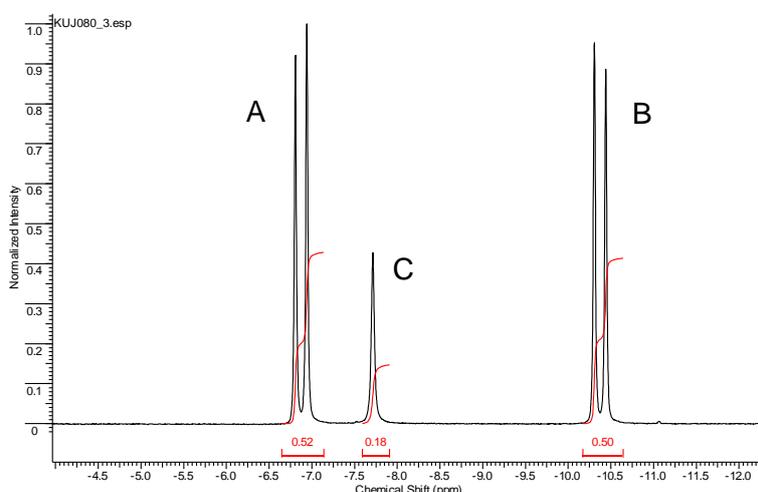


Abbildung 2.5: ^{31}P -NMR-Spektrum von hydrolysiertem DMAPP mit entsprechenden Integralen. A: endständiger Phosphor, B: Phosphor in Nachbarschaft zum organischen Rest, C: abgespaltene Diphosphatgruppe.

Da bei einigen Messungen auf Pufferlösungen verzichtet wurde, war eine erneute Messung des pH-Wertes nach jeder NMR-Analyse unabdingbar, um die Konstanz des jeweils eingestellten Wertes sicherzustellen.

2.2.4.1 Abhängigkeit von Temperatur und pH-Wert

Tabelle 2.2 zeigt die pH-Abhängigkeit der Hydrolyse von DMAPP unter Ausschluss von metallionenhaltigen Puffern. Die pH-Werte wurden mit HCl-Lösung eingestellt. Es ist zu erkennen, dass bei Raumtemperatur (23°C) bei keinem der eingestellten pH-Werte 9, 7, 5, 3 und 1 eine spontane Spaltung erfolgt. Erst nach Erhitzen auf 54°C für 72 h konnte eine pH-abhängige Hydrolyse beobachtet werden. Bei pH 9 kann mit 58 % der geringste Zerfall gemessen werden, wobei pH 1 mit 87 % zur maximalen Umsetzung des DMAPP führte.

Tabelle 2.2: Hydrolyse von DMAPP in Abhängigkeit von Temperatur und pH-Wert.*

*250 mM DMAPP gelöst in 0,1 M Tris/HCl

pH	Inkubationszeit [h]	C°	Hydrolyserate [%]
9			0
7			0
5	24	23	0
3			0
1			0
9			58
7			76
5	72	54	78
3			75
1			87

Diese pH-Abhängigkeit kann auf zwei Effekte zurückgeführt werden: Zum einen findet im sauren Milieu eine stärkere Säurekatalyse statt. Bei dieser Reaktion findet ein elektrophiler Angriff auf das Sauerstoffatom der C–O-Bindung statt, so dass eine positive Teilladung am Kohlenstoffatom generiert wird und so dessen Elektrophilie gesteigert wird. Zum anderen haben quantenchemische Methoden gezeigt, dass mit erhöhtem Protonierungsgrad die C–O-Bindung länger und die P–O-Bindung kürzer wird. Somit wird das Diphosphat in eine leichtere Abgangsgruppe überführt.²⁰ Berechnete Aktivierungsenergien verschiedener Protonierungsgrade von DMAPP zeigen, dass mit steigendem Protonierungsgrad die Aktivierungsenergie zwar abnimmt, jedoch dennoch zu hoch ist, einen Ablauf der Reaktion bei Raumtemperatur zu ermöglichen.²⁰ Erst nach Energiezufuhr in Form von Wärme, können die Aktivierungsenergien überwunden werden. Hierbei kann nun die Abhängigkeit der unterschiedlichen Protonierungsgrade von DMAPP auf die Hydrolyse beobachtet werden. Je saurer das Milieu, desto schneller der Zerfall des Substrates.¹³

2.2.4.2 Abhängigkeit von divalenten Kationen und pH-Wert

Dieselbe pH-Abhängigkeit, wie im vorigen Kapitel gezeigt, ließ sich auch nach Zugabe von zweiwertigen Kationen erkennen (Tabelle 2.3).

Tabelle 2.3: Hydrolyse von DMAPP unter Zusatz von MgCl_2 bei verschiedenen pH-Werten.*

*250 mM DMAPP gelöst in 250 mM MgCl_2 -Lösung, 6 h Inkubation bei 23°C.

pH	7	5	3	2	1
Hydrolyserate [%]	1	1	54	100	100

Für diesen Versuch wurden jeweils 250 mM DMAPP in einer 250 mM MgCl_2 -Lösung bei Raumtemperatur für 6 h inkubiert. Eine pH-Reihe wurde mit 37%iger HCl-Lösung eingestellt. Tabelle 2.3 zeigt, dass auch bei Anwesenheit von metallischen Kationen eine pH-abhängige Hydrolyserate vorliegt. Im neutralen bis leicht sauren Milieu ist nur ein verschwindend geringer Zerfall von DMAPP zu verzeichnen gewesen. Die Hydrolyserate beträgt bei pH 3 bereits 54 % nach 6 h und steigt ab pH 2 auf 100 % an. Im Gegensatz zu den metallionenfreien Messungen (siehe Tabelle 2.2) zeigt sich eine Spaltung von DMAPP bereits bei Raumtemperatur. Demnach muss die Zugabe von Magnesiumionen das Diphosphat in eine leichtere Abgangsgruppe überführen. Diese Hypothese wird durch quantenchemische Berechnungen gestützt.²⁰ Durch Magnesiumionen wird die C–O-Bindung länger und die P–O-Bindung kürzer. STOCKBRIDGE und WOLFENDEN²⁵ postulierten zum einen, dass Mg^{2+} die Hydrolyse von Diphosphaten begünstigt, indem die Aktivierungsentropie angehoben und die -enthalpie herabgesetzt wird und zum anderem, dass Mg^{2+} die negative Ladung des Diphosphates neutralisiert, so dass das Nukleophil besser angreifen kann. Weiterhin geben die Autoren an, dass das nukleophile Wasser so von zwei Mg^{2+} -Ionen koordiniert wird, dass sein pK_s -Wert vermindert wird und es so als besseres Nukleophil agieren kann.²⁵ Bereits in den 1980er Jahren wurde die Abhängigkeit des Hydrolysepotentials von GPP durch Katalyse mit divalenten Metallkationen beschrieben und ihre Effektivität wie folgt bewertet: $\text{Cu}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Co}^{2+} < \text{Mg}^{2+} \sim \text{Ca}^{2+}$.²⁶

2.2.4.3 Abhängigkeit von unterschiedlichen MgCl_2 -Konzentrationen

Die Abhängigkeit der Hydrolyserate von der Anwesenheit unterschiedlich konzentrierter Magnesiumsalze ist der Tabelle 2.4 zu entnehmen. In diesem Versuch wurden jeweils 250 mM DMAPP in 0,1 M Tris/HCl (pH 1) gelöst. Nach Zugabe der verschiedenen konzentrierten Salze wurden die Versuchsansätze 6 h bei Raumtemperatur inkubiert. Je höher die zugegebenen metallischen Kationen konzentriert sind, desto mehr DMAPP unterliegt der Hydrolyse. Die Hydrolyserate steigt von 2 % bei 100 mM MgCl_2 auf 7 % in Anwesenheit von 300 mM MgCl_2 . In den enzymatischen Umsetzungsversuchen wurden Metallkationen in einem Konzentrationsbereich von μM bis zweistellig mM zugesetzt. Diese Konzentrationen sind für NMR-Untersuchungen zu gering und würden bei der eingesetzten DMAPP Konzentration keinen Effekt auslösen. Daher wurde die Metallionenkonzentration der des DMAPPs angepasst.

Tabelle 2.4: Hydrolyse von DMAPP in Abhängigkeit von der Anwesenheit von Mg^{2+} -Ionen in unterschiedlichen Konzentrationen.*

*250 mM DMAPP gelöst in 0,1 M Tris/HCl, pH 1 und 6 h Inkubation bei 23°C

c (MgCl_2) [mM]	Hydrolyserate [%]
100	2
200	3
300	7

Der positive Einfluss von Mg^{2+} -Ionen auf die Hydrolyse von Diphosphaten wurde bereits in den 1950er Jahren postuliert.²⁷ Thermodynamische Berechnungen konnten diese Annahme bestätigen. Die Reaktionsenthalpie für die Hydrolyse am Beispiel von Geranyldiphosphat beträgt in Abwesenheit von Magnesiumionen 122 kJ/mol. Dieser Wert sinkt in Anwesenheit eines Magnesiumions auf 110 kJ/mol und auf 73 kJ/mol bei drei gebundenen Magnesiumionen.²⁸ Durch ihre Wirkung als Lewisäure wird die C–O-Bindung gelockert.

Ein weiterer Versuch zum Einfluss von unterschiedlichen MgCl_2 -Konzentrationen bei identischen pH-Werten auf den Zerfall von DMAPP wurde durchgeführt. Es wurden jeweils 250 mM DMAPP in entweder 250 mM oder 500 mM MgCl_2 -Lösung gelöst. Tabelle 2.5 ist zu entnehmen, dass im neutralen pH-Bereich in beiden Fällen nur kleinste Mengen an Hydrolyseprodukte entstehen. Erst im sauren Milieu bei pH 3 ist ein deutlicher Zerfall von DMAPP zu detektieren. Entgegen der vorangestellten Annahmen, begünstigt die niedriger konzentrierte MgCl_2 -Lösung die DMAPP-Hydrolyse stärker als die höher konzentrierte.

Tabelle 2.5: Hydrolyse von DMAPP bei verschiedenen MgCl_2 -Konzentrationen.*

*250 mM DMAPP gelöst in unterschiedlich konzentrierten MgCl_2 -Lösungen, Zugabe von 10 % D_2O , 10 % DMSO, 6 h Inkubation bei 23°C

c (MgCl_2) [mM]	pH	Hydrolyserate [%]
250	7	1
500	7	1
250	3	54
500	3	31

Entgegen der in Tabelle 2.4 gezeigten Ergebnisse ist hier keine Abhängigkeit der Hydrolyserate von der eingestellten MgCl_2 -Konzentration zu erkennen. Nach 6 h Inkubation war in keiner Probe ein sichtbarer $\text{Mg}[\text{NH}_4\text{PO}_4]$ Niederschlag (vgl. Abschnitt 2.2.2) zu erkennen. Erst weitere 12 h später war dieser in allen Ansätzen zu sehen – in den 500 mM konzentrierten Proben deutlicher als in den Ansätzen mit 250 mM MgCl_2 . Dennoch lieferten ^{31}P -NMR-Messungen nach 6 bzw. 18 h jeweils identische Ergebnisse. Nun ist anzunehmen, dass in den Proben höherer MgCl_2 -Konzentration bereits nach 6 h ein größerer Anteil der Magnesiumionen als $\text{Mg}[\text{NH}_4\text{PO}_4]$ gebunden ist (wenn auch optisch noch nicht als Niederschlag zu erkennen) und so nicht mehr an der Reaktion in Lösung teilnehmen kann.

2.2.4.4 Abhängigkeit von ein- bzw. zweiwertigen Kationen

In früheren Veröffentlichungen wurden bereits die pH- und Metallionen-Abhängigkeit der Hydrolyse von Diphosphaten beschrieben, jedoch enthielten die Versuchspuffer zumeist Natrium- oder Kaliumionen.¹³ Daher wurde nachfolgend der Einfluss von ein- bzw. zweiwertigen metallischen Kationen auf den Zerfall von DMAPP untersucht. Hierfür wurden 250 mM DMAPP in unterschiedlichen Puffern gelöst. Die Ergebnisse sind der Tabelle 2.6 zu entnehmen. Alle Versuche wurden in saurem Milieu bei Raumtemperatur durchgeführt. Befanden sich keine metallischen Kationen im System, ist auch hier (vgl. Ergebnisse zusammengefasst in Tabelle 2.2) keine Hydrolyse zu erkennen. Wurden dem Versuchsansatz einwertige Metallkationen, in Form von Natriumacetat, zugesetzt, kann ein Zerfall von 9 % detektiert werden. Bei Anwesenheit von zweiwertigen Mg^{2+} -Ionen beträgt die Hydrolyserate 15 %.

Tabelle 2.6: Hydrolyse von DMAPP in Abhängigkeit von verschiedenen Puffern.*

*250 mM DMAPP gelöst im jeweiligen Puffer, pH 3 und 6 h Inkubation bei 23°C

Lösungsmittel	Hydrolyserate [%]
H ₂ O	0
0,1 M Na-Acetat	9
0,1 M Mg-Acetat	15

Anhand dieser Versuche ist bewiesen, dass neben Dikationen auch monovalente Metallionen eine treibende Kraft hinsichtlich der Diphosphathydrolyse darstellen. Somit ist anzunehmen, dass erste Untersuchungen bezüglich der Metallionen- bzw. pH-Abhängigkeit¹³ der Diphosphathydrolyse, durch die Verwendung von Na⁺- oder K⁺-haltigen Versuchspuffern, nicht korrekt interpretiert wurden. Bestärkt wird diese Hypothese durch die Existenz einer Reihe Monokationen-abhängiger prenylierender Enzyme.²⁹

2.2.4.5 Abhängigkeit von monovalenten Kationen und pH-Wert

Nachfolgend sollte untersucht werden, ob auch eine pH-Abhängigkeit der DMAPP-Hydrolyse in Anwesenheit von einwertigen Metallkationen besteht (Tabelle 2.7). Es ist zu erkennen, dass nur bei sauren pH-Werten (pH 3 bzw. 1) eine spontane Spaltung von DMAPP erfolgt. Im neutralen / leicht basischen Milieu ist keine Hydrolyse detektierbar. Bei pH 3 kann nach 6 h mit 57 % Hydrolyserate annähernd die Hälfte des DMAPPs umgesetzt werden, wobei pH 1 in diesem Zeitraum zur vollständigen Umsetzung führt.

Tabelle 2.7: Hydrolyse von DMAPP unter Zusatz von NaCl bei verschiedenen pH-Werten.**250 mM DMAPP gelöst in 250 mM NaCl-Lösung, 10 % D₂O, 10 % DMSO, 6 h Inkubation bei 23°C

pH	8	3	1
Hydrolyserate [%]	0	57	100

Da sich das einwertige Lithium aufgrund seiner Schrägbeziehung zu dem zweiwertigen Magnesium-Kation ähnlich verhält, wurde der Einfluss von unterschiedlichen Lithium-Konzentrationen auf die Hydrolyserate von DMAPP untersucht. Diese Schrägbeziehung ist auf vergleichbare Atomradien und ähnliche Ladungsdichten zurückzuführen. Die Ergebnisse sind der Tabelle 2.8 zu entnehmen. Auch in Gegenwart von 250 bzw. 500 mM LiCl ist eine pH-abhängige Hydrolyserate zu erkennen. Bei neutralem pH-Wert ist keine Hydrolyse detektierbar, wobei im sauren Milieu ab pH 3 ein vollständiger Zerfall von DMAPP zu verzeichnen ist. Ein signifikanter Unterschied der Hydrolyserate zwischen den getesteten

Lithium-Konzentrationen ist nicht erkennbar. Im Gegensatz zu der Zugabe von 250 mM MgCl_2 und 250 mM NaCl bei pH 3 ist nach Zugabe von 250 mM LiCl ebenfalls bei pH 3 eine Hydrolyserate von 100 % nachweisbar. Die Zugabe von 250 mM NaCl weist einen DMAPP-Zerfall von 57 % auf (siehe Tabelle 2.5), wobei der Zusatz von 250 mM MgCl_2 mit 54 % die geringste Hydrolyserate bei pH 3 zeigt (siehe Tabelle 2.4). Ein Grund hierfür könnte auch hier die Störung durch das bereits erwähnte $\text{Mg}[\text{NH}_4\text{PO}_4]$ sein.

Tabelle 2.8: Hydrolyse von DMAPP bei unterschiedlichen LiCl-Konzentrationen bei verschiedenen pH-Werten.*

*250 mM DMAPP gelöst in 250 mM bzw. 500 mM LiCl-Lösung, 10 % D_2O , 10 % DMSO, 6 h Inkubation bei 23°C

Zugabe von LiCl	pH	Hydrolyserate [%]
250 mM	7	0
	4	2
	3	100
	1	100
500 mM	7	0
	3	100
	1	100

2.2.5 Hydrolyse vom allylischen DMAPP im Vergleich zu nicht allylischen IPP

Abschließend sollte die Hydrolyse von einem allylischen Diphosphat (DMAPP) der Hydrolyse eines nicht allylischen Diphosphates (IPP) gegenübergestellt werden. Hierfür wurden jeweils 250 mM DMAPP bzw. IPP in 250 mM MgCl_2 -Lösung (pH 2) gelöst und 6 h inkubiert. Die nachfolgenden ^{31}P -NMR-Experimente ergaben, dass sich das DMAPP vollständig in seine Hydrolyseprodukte zersetzt, wohingegen das IPP völlig intakt vorliegt. Generell lässt sich sagen, dass allylischen Diphosphate leichter als nicht allylische hydrolysieren. Grund dafür ist die Ausbildung eines Allylkations bei der Hydrolyse allylischer Diphosphate. Dieses ist, im Gegensatz zu einem Kation resultierend aus der IPP-Hydrolyse, durch Mesomerie stabilisiert. Das Ausbleiben der IPP-Hydrolyse kann durch eine der folgenden Möglichkeiten begründet werden: 1) Ist die freie Reaktionsenthalpie ΔG positiv, würden durch Energieeintrag zunächst Hydrolyseprodukte entstehen, zerfallen jedoch durch sofortige Rückreaktion. Daraus folgt: Ist für eine Reaktion $\Delta G > 0$, so sind auch nach Energieeintrag die Produkte nicht stabil. 2) Ist ΔG negativ, und die Aktivierungsbarriere wird durch ausreichende Energiezufuhr überwunden, entstehen stabile Produkte. Durch vorübergehende Temperaturerhöhung zur Überwindung der Aktivierungsbarriere könnte also

festgestellt werden, welcher der beiden Fälle zutrifft. Bei der Hydrolyse von allylischen Diphosphaten wird von einem S_N1 -Mechanismus ausgegangen, wobei bei nicht allylischen Diphosphaten durchaus eine S_N2 -Reaktion denkbar wäre.¹⁵ Abschließend kann gesagt werden, dass die C–O-Bindung im DMAPP durch die Bildung des stabilen Allylkations aktiviert und somit leichter hydrolysierbar ist, wobei beim nicht allylischen Diphosphat keine Abspaltung des Diphosphates, sondern eine Hydrolyse der zentralen P–O–P-Bindung mit Abspaltung eines Monophosphates stattfindet.¹⁵

2.3 Zusammenfassung

Kapitel 2 beschäftigt sich mit der Aktivierung eines allylischen Diphosphates unter Betrachtung verschiedener Einflüsse wie Temperatur, Protonierungsgrad und Metallkomplexierung. Als Modellreaktion wurde die Hydrolyse des Dimethylallyldiphosphates (DMAPP) gewählt. Hierbei entstehen unter Angriff von Wasser auf die C–O-Bindung die Alkohole Prenol und 2-Methylbut-3-en-2-ol sowie das anorganische Diphosphat. Zur Analyse aller Einflussfaktoren auf die DMAPP-Hydrolyse wurden ^{31}P -NMR-Messungen durchgeführt. Erste Experimente zeigten im metallfreien System erst nach Energiezufuhr in Form von Wärme eine Reaktion. Metallionen können die Aktivierungsenergien herabsetzen, so dass eine Umsetzung bereits bei Raumtemperatur stattfindet. Bis zu einer gewissen Konzentration von Metallionen kann eine Proportionalität zur Hydrolyserate angenommen werden. Überschreitet die Metallionen-Konzentration eine obere Grenze, nimmt die Hydrolyserate ab. Ein Grund könnte das vermehrt auftretende Präzipitat ($\text{Mg}[\text{NH}_4\text{PO}_4]$) sein. Quantenchemische Berechnungen zeigen, dass die Koordination der Metallionen zu einer Verlängerung der C–O-Bindung führt und so das Diphosphat in eine bessere Abgangsgruppe überführt.¹ Die Versuche zeigten weiterhin eine verstärkte Hydrolyserate bei höheren Protonierungsgraden des DMAPPs. Somit begünstigen niedrige pH-Werte die Hydrolyse von DMAPP. Zum einen wird die C–O-Bindung verlängert und damit geschwächt, zum anderen findet bei dieser Reaktion ein elektrophiler Angriff auf das Sauerstoffatom der C–O-Bindung statt, so dass eine positive Teilladung am Kohlenstoffatom generiert, und so dessen Elektrophilie gesteigert wird.

Da oftmals die enzymatische Diphosphatspaltung von Metallkationen abhängig ist und basische Aminosäuren im aktiven Zentrum ein saures Milieu zur leichteren Diphosphat-
abspaltung imitieren, können diese Ergebnisse Hinweise auf den Ablauf enzymatisch katalysierter Reaktionen geben.

2.4 Referenzen

1. Wessjohann, L. A.; Sontag, B. Prenylation of benzoic acid derivatives catalyzed by a transferase from *Escherichia coli* overproduction: Method development and substrate specificity. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2012**, *35*, 1697-1699.
2. King, H. L., Jr.; Rilling, H. C. Avian liver prenyltransferase. The role of metal in substrate binding and the orientation of substrates during catalysis. *Biochemistry* **1977**, *16* (17), 3815-3819.
3. Sanchez, V. M.; Crespo, A.; Gutkind, J. S.; Turjanski, A. G. Investigation of the catalytic mechanism of farnesyl pyrophosphate synthase by computer simulation. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110* (36), 18052-18057.
4. Guo, R. T.; Ko, T. P.; Chen, A. P.; Kuo, C. J.; Wang, A. H.; Liang, P. H. Crystal structures of undecaprenyl pyrophosphate synthase in complex with magnesium, isopentenyl pyrophosphate, and farnesyl thiopyrophosphate: roles of the metal ion and conserved residues in catalysis. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (21), 20762-20774.
5. Saderholm, M. J.; Hightower, K. E.; Fierke, C. A. Role of metals in the reaction catalyzed by protein farnesyltransferase. *Biochemistry* **2000**, *39* (40), 12398-12405.
6. Frick, S.; Nagel, R.; Schmidt, A.; Bodemann, R. R.; Rahfeld, P.; Pauls, G.; Brandt, W.; Gershenzon, J.; Boland, W.; Burse, A. Metal ions control product specificity of isoprenyl diphosphate synthases in the insect terpenoid pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **2013**, *110* (11), 4194-4199.
7. Babaoglu, K.; Qi, J.; Lee, R. E.; White, S. W. Crystal structure of 7,8-dihydropteroate synthase from *Bacillus anthracis*: mechanism and novel inhibitor design. *Structure*. **2004**, *12* (9), 1705-1717.
8. Brems, D. N.; Rilling, H. C. On the mechanism of the prenyltransferase reaction. Metal ion dependent solvolysis of an allylic pyrophosphate. *J Am Chem Soc* **1977**, *99* (25), 8351-8352.
9. Lariviere, L.; Gueguen-Chaignon, V.; Morera, S. Crystal structures of the T4 phage beta-glucosyltransferase and the D100A mutant in complex with UDP-glucose: glucose binding and identification of the catalytic base for a direct displacement mechanism. *J. Mol. Biol.* **2003**, *330* (5), 1077-1086.
10. Lairson, L. L.; Henrissat, B.; Davies, G. J.; Withers, S. G. Glycosyltransferases: structures, functions, and mechanisms. *Annu. Rev. Biochem.* **2008**, *77*, 521-555.
11. Chang, S. Y.; Ko, T. P.; Chen, A. P.; Wang, A. H.; Liang, P. H. Substrate binding mode and reaction mechanism of undecaprenyl pyrophosphate synthase deduced from crystallographic studies. *Protein Sci.* **2004**, *13* (4), 971-978.
12. Park, H. W.; Boduluri, S. R.; Moomaw, J. F.; Casey, P. J.; Beese, L. S. Crystal structure of protein farnesyltransferase at 2.25 angstrom resolution. *Sci.* **1997**, *275* (5307), 1800-1804.

13. Goodman, D. S.; Popjak, G. Studies on the biosynthesis of cholesterol .12. Synthesis of allyl pyrophosphates from mevalonate and their conversion into squalene with liver enzymes. *J. Lipid Res.* **1960**, 1 (4), 286-300.
14. Sofer, S. S.; Rilling, H. C. Mechanism of squalene biosynthesis - Evidence against involvement of free nerolidyl pyrophosphate. *J. Lipid Res.* **1969**, 10 (2), 183-&.
15. Tidd, B. K. Some phosphate esters of biological importance. *J. Chem. Soc. (B)* **1970**, 1168-1176.
16. Alarcon, M.; Cori, O.; Rojas, M. C.; Pavez, H.; Bacaloglu, R.; Bunton, C. A. Hydrolyzes of terpenoid diphosphates - Effects of azide ion on products of hydrolysis. *J. Phys. Org. Chem.* **1992**, 5 (2), 83-92.
17. Bunton, C. A.; Wolfe, B. The problem of pH in micellar catalyzed reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, 95 (11), 3742-3749.
18. Cane, D. E. The stereochemistry of allylic pyrophosphate metabolism. *Tetrahedron* **1980**, 36 (9), 1109-1159.
19. Eggerer, H. Synthese von gamma-gamma-Dimethylallylpyrophosphat und Geranylpyrophosphat. *Chem. Ber.* **1960**, 174-185.
20. Schulze, D. Zur Steuerung der Diphosphataktivierung in Proteinen - Viele Antworten auf eine Frage. *Dissertation* **2011**, MLU Halle.
21. Padmanabhan, J.; Parthasarathia, R.; Subramaniana V; Chattarajb, P. K. Philicity based site activation model towards understanding the Markovnikov regioselectivity rule. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM* **2007**, 804, 17-20.
22. Luk, L. Y. P.; Tanner, M. E. Mechanism of dimethylallyltryptophan synthase: Evidence for a dimethylallyl cation intermediate in an aromatic prenyltransferase reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131 (39), 13932-13933.
23. Ohms, G.; Grossmann, G. Über die pH-Abhängigkeit der ³¹P- und ¹³C-NMR-Spektren von Cyclohexan-, Cyclohexen-, und Benzenphosphonsäuren. *Z. Anorg. Allg. Chem.* **1987**, 544, 232-240.
24. Webb, H.; Tynan-Connolly, B. M.; Lee, G. M.; Farrell, D.; O'Meara, F.; Sondergaard, C. R.; Teilum, K.; Hewage, C.; McIntosh, L. P.; Nielsen, J. E. Remeasuring HEWL pK(a) values by NMR spectroscopy: methods, analysis, accuracy, and implications for theoretical pK(a) calculations. *Proteins* **2011**, 79 (3), 685-702.
25. Stockbridge, R. B.; Wolfenden, R. Enhancement of the rate of pyrophosphate hydrolysis by nonenzymatic catalysts and by inorganic pyrophosphatase. *J. Biol. Chem.* **2011**, 286 (21), 18538-18546.
26. Vial, M. V.; Rojas, C.; Portilla, G.; Chayet, L.; Perez, L. M.; Cori, O.; Bunton, C. A. Enhancement of the hydrolysis of geranyl pyrophosphate by bivalent-metal ions - A model for enzymic biosynthesis of cyclic monoterpenes. *Tetrahedron* **1981**, 37 (13), 2351-2357.
27. Bloch-Frankenthal, L. The role of magnesium in the hydrolysis of sodium pyrophosphate by inorganic pyrophosphatase. *Biochem J* **1954**, 57 (1), 87-92.

28. Brandt, W.; Bräuer, L.; Günnewich, N.; Kufka, J.; Rausch, F.; Schulze, D.; Schulze, E.; Weber, R.; Zakharova, S.; Wessjohann, L. Molecular and structural basis of metabolic diversity mediated by prenyldiphosphate converting enzymes. *Phytochemistry* **2009**, *70* (15-16), 1758-1775.
29. Hosfield, D. J.; Zhang, Y.; Dougan, D. R.; Broun, A.; Tari, L. W.; Swanson, R. V.; Finn, J. Structural basis for bisphosphonate-mediated inhibition of isoprenoid biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279* (10), 8526-8529.

3. Die funktionale Rolle spezifischer Aminosäuren während der Katalyse einer aromatischen Prenyltransferase

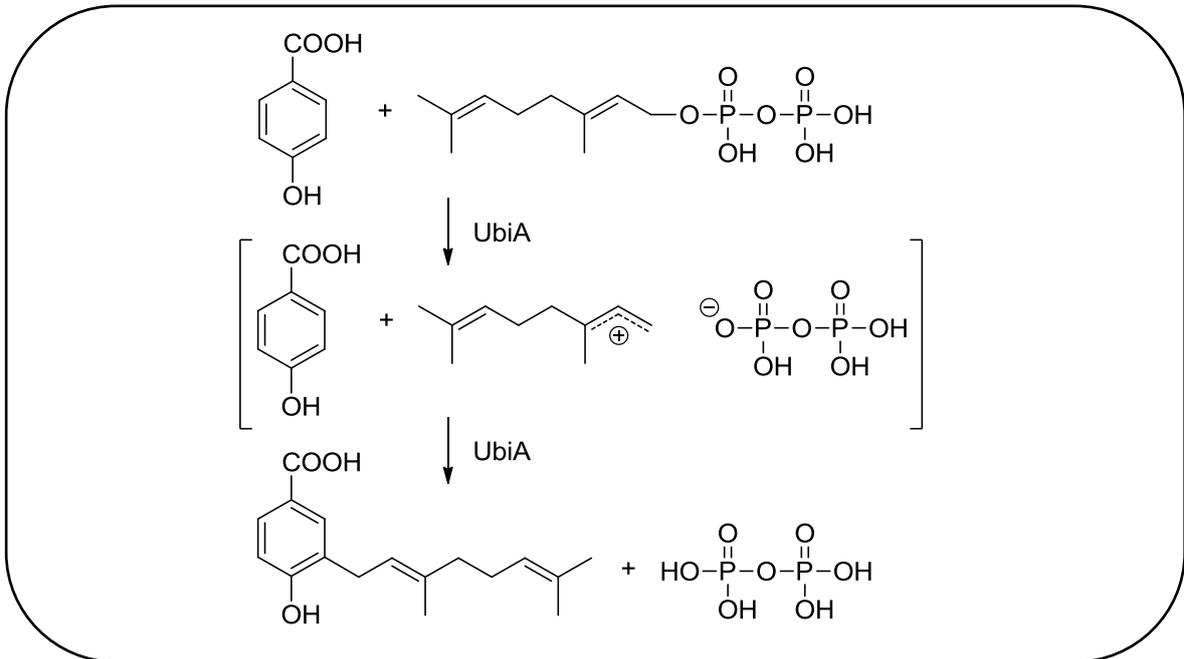
3.1 Einleitung

3.1.1 *p*-Hydroxybenzoesäure Oligoprenyltransferase (UbiA) aus *E. coli* (EC 2.5.1.39)

Die aromatische Prenyltransferase UbiA aus *E. coli* wurde erstmals 1972 von YOUNG *et al.* beschrieben.¹ Zwanzig Jahre später wurde das korrespondierende Gen auf der physikalischen Genkarte des *E. coli* Stammes K-12 lokalisiert^{2,3} und kloniert.⁴ Da das Enzym durch das Gen *ubiA* codiert ist, wird nachfolgend von dem UbiA-Enzym gesprochen. UbiA besteht aus 290 Aminosäuren und weist demzufolge ein Molekulargewicht von ~32 kDa auf. Es handelt sich um ein membrangebundenes Enzym, das selbst mit Hilfe verschiedenster Detergenzien nicht ohne Aktivitätsverlust aus der Membran solibilisiert werden kann.⁵ Dennoch ist es möglich gewesen, UbiA in der Membranfraktion um das 3000-fache anzureichern.⁵ Die Aktivität ist Magnesium-abhängig und bei einem pH von 7,8 am höchsten.⁵ Die gute Lagerstabilität und hohe Substrat-Promiskuität dieses Enzyms ermöglichten erstmals die praktische Anwendung als Biokatalysator. UbiA erlaubt die Prenylierung verschiedener Benzoesäuren.⁶ Die Synthese von Naturstoffen und artifiziellen Derivaten wird somit in biokatalytischen und mutasynthetischen Prozessen sichergestellt. Prenylierungen aromatischer Strukturen spielen eine essentielle Rolle in Pflanzen, Tieren, Pilzen und Bakterien. So katalysiert die *p*-Hydroxybenzoesäure Oligoprenyltransferase den Übertrag diphosphorylierter azyklischer *trans*-Oligoprenyleinheiten in *meta*-Position einer 4-Hydroxybenzoesäure (Schema 3.1). Damit ist dieses Zwei-Substrat-Enzym u. a. an der Biosynthese prenylierter Chinone beteiligt, welche als Elektronenüberträger aller aeroben Lebewesen fungieren und Bestandteil der Zellwand-Biosynthese sind.

Die Substitutionsreaktion an aromatischen Zentren, katalysiert durch UbiA, folgt einem Friedel-Crafts (S_N1)-ähnlichen Mechanismus.^{7,8} Initiierend spaltet sich die Diphosphat-abgangsgruppe von der Prenyleinheit ab, so dass sich ein allylisches intermediäres Prenylkation bildet (Schema 3.1). Die aromatische Prenyltransferase katalysiert hierbei die Bildung einer C–C-Bindung zwischen dem aromatischen Substrat und dem Prenyldiphosphat, welches nach Abspaltung der Diphosphatgruppe als Elektrophil agiert. UbiA zeigt eine hohe Akzeptanz gegenüber aromatischen Substraten und Prenyldiphosphatderivaten.⁹ Neben *p*-Hydroxybenzoesäure wird auch Octaprenyldiphosphat von UbiA als natürliches Substrat verwendet. Aufgrund der geringen Löslichkeit von Octaprenyldiphosphat wurde in der vorliegenden Arbeit mit Geranyldiphosphat gearbeitet.

Alle Berechnungen, Modelle und analytischen Auswertungen beziehen sich auf die Substrate *p*-Hydroxybenzoesäure und Geranyldiphosphat.



Schema 3.1: Reaktionsschema der aromatischen Prenylierung am Beispiel von *p*-Hydroxybenzoesäure und Geranyldiphosphat.

Bis heute ist keine röntgenkristallographische Aufklärung von UbiA möglich gewesen. Um Hinweise auf die Struktur von UbiA zu bekommen, wurde erstmals ein Strukturmodell einer membrangebundenen aromatischen Prenyltransferase generiert, welches durch verschiedene Mutationen bestätigt werden konnte.^{7,8} Dieses Modell wurde anhand eines Struktur-Alignments erhalten. Ungeachtet der geringen Sequenzhomologien von UbiA zu anderen prenylkonvertierende Enzymen, zeigte die Sesquiterpenesynthase *5-epi-Aristolochensynthase* aus *Nicotiana tabacum* die größte Ähnlichkeit in der Sekundärstruktur und diente damit als Grundlage für das UbiA-3D-Modell (Abbildung 3.1).

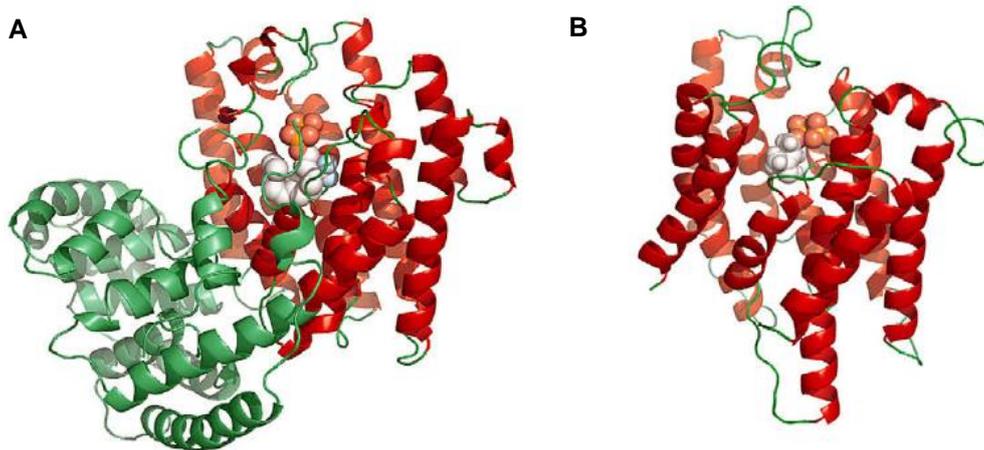


Abbildung 3.1: A: Röntgenkristallstruktur der 5-*epi*-Aristolochensynthase. Die Sekundärstruktur der helixalen Tertiärstruktur (rot) wurde als Vorlage für das UbiA-Modell verwendet. B: Modell der reinen α -helikalen UbiA-Tertiärstruktur.

Laut 3D-Modell und der Transmembran-Helix-Vorhersage nach Markov Modell (*TMHMM*) besteht UbiA aus zehn α -Helices, welche in der Membran eingebettet sind.¹⁰

Aufgrund dieses Modells konnten weitere Strukturvorschläge für verwandte Proteine abgeleitet werden (aromatische Prenyltransferase aus *Lithospermum erythrorhizon*¹¹ und AuaA aus *Stigmatella aurantiaca*^{12,13}).

Auch für das humane Protein UBIAD1 (*TERE1*, *transitional epithelial response protein 1*) wurde das UbiA-Modell zur Strukturanalyse herangezogen. Bis vor kurzem konnte diesem Protein keine Funktion zugeordnet werden. Liegen im Enzym Mutationen vor, ist der Zellproliferationszyklus beeinflusst, so dass sich Karzinome bilden können. Darüber hinaus kann das Krankheitsbild der „Schnyers Hornhautdystrophie“ (SCD) auftreten. Hierbei handelt es sich um eine seltene Erbkrankheit, bei der kristalline Cholesterin- und Lipidablagerungen in der Hornhaut das Sehvermögen stark beeinträchtigen (Abbildung 3.2).¹⁴

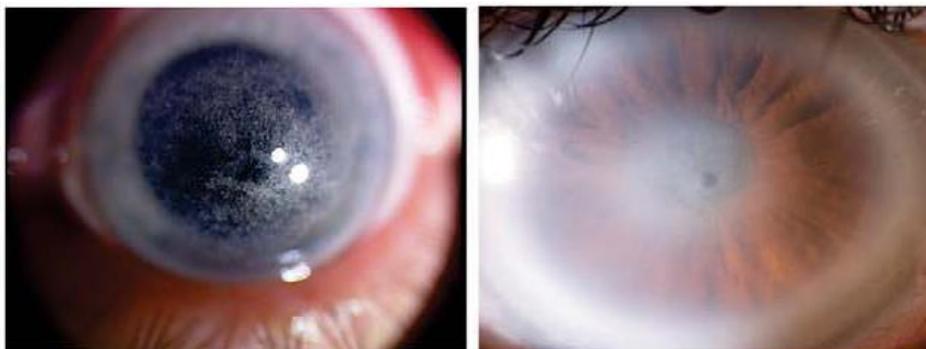


Abbildung 3.3: Hornhaut von SCD-Patienten.¹⁴

Aufgrund der Strukturanalogie zu UbiA wurde eine Prenyltransferase-Aktivität vorhergesagt sowie die Wechselwirkung mit anderen Proteinen spezifiziert. Folglich konnte gezeigt werden, dass TERE1/UBIAD1 die Synthese von Menachinon-4 (Vitamin K₂) durch Prenylierung von Menadion aus pflanzlichem Phyllochinon katalysiert.^{15,16} Hierbei bindet TERE1/UBIAD1 an den Cholesterin-Transporter APO-E. Durch die Mutationen in TERE/UBIAD1 wird die Bindung an APO-E und weitere Enzyme des Sterol-Metabolismus beeinflusst, so dass der Cholesterinhaushalt der SCD-Patienten dramatisch gestört ist.¹⁷⁻¹⁹ Dieses Beispiel veranschaulicht deutlich, dass das Wissen auf diesem Themengebiet noch lange nicht vollkommen ist. Strukturanalysen und Einblicke in den detaillierten Katalysemechanismus der aromatischen Prenyltransferase UbiA geben neue Möglichkeiten im Bereich der biobasierten Chemie, Naturstoffsynthese und Medizin.

3.2 Ergebnisse

3.2.1 Gewinnung der aromatischen Prenyltransferase UbiA aus *E. coli*

Das Vorgehen zur Expression und Reinigung der aromatischen Prenyltransferase UbiA aus *E. coli* Zellen wurde während der Dissertation von Dr. L. Bräuer etabliert und 2008 veröffentlicht.⁷ Zu Beginn der vorliegenden Arbeit wurde mit dem Vektor pALMU3, welcher das *ubiA* Gen trägt, gearbeitet. Da im weiteren Verlauf der Dissertation das Hauptaugenmerk auf dem Expressionsnachweis von UbiA und seinen Mutanten lag, fand eine Umklonierung statt. Hierbei wurde der Vektor pDEST_N112 verwendet (Abbildung 3.3).²⁰



Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der Domänenstruktur des Konstruktes *ubiA_pDEST_N112*. T7: T7 RNA Polymerase Promoter, lacO: lac Operator, SD: *shine dalgarno*, H10: Decahistidin, MBP: Maltose bindendes Protein, attB1/2: Rekombinationsbereich, *ubiA*: Gensequenz der *p*-Hydroxybenzoesäure Oligoprenyltransferase, stop: Stop Codon.

Auf vorige Ergebnisse mit dem pALMU3 Vektor wird in dieser Arbeit nicht eingegangen. Das Plasmid pDEST_N112 wurde gewählt, da durch sein Maltose bindendes Protein die Detektion des UbiA-Konstruktes mittels Western-Blot ermöglicht wird. Als Expressionsstamm wurden *E. coli* Zellen BL21(DE3) verwendet, welche mit den *ubiA_pDEST_112*-Konstrukten chemotransformiert wurden. Durch Zugabe von IPTG wurde die Expression des Zielproteins initiiert. Nach Beendigung der heterologen Expression wurden die Zellen geerntet und mittels Ultraschallstab aufgeschlossen. Die Reinigung der UbiA enthaltenden Membranfraktion erfolgte durch weitere Zentrifugationsschritte. Die finale Ultrazentrifugation erlaubt die Trennung der flüssigen Zytosol- von der gereinigten, UbiA enthaltende Membranfraktion. Zur Identifizierung des Zielproteins mittels LC-MS-Analyse wurde als Reinigungsmethode die Metallaffinitätschromatographie herangezogen. Zur besseren Bindung an die Talon[®]-Matrix wurde die Probe hitzedenaturiert. In der Immundetektion wurde mit einem anti-MBP-Antikörper die Expression der überexprimierten UbiA-Varianten untersucht. Im dargestellten Blot entsprechen die detektierten Banden von überexprimiertem UbiA der erwarteten Größe von ca. 70 kDa (Abbildung 3.4).

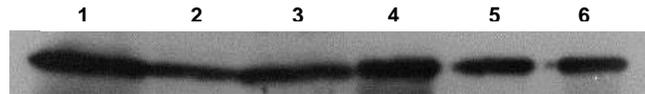


Abbildung 3.4: Biochemischer Nachweis der Expression nach Transformation der UbiA-Konstrukte in BL21(DE3) Zellen. 1: Rohlysat, 2: Überstand nach der Ultrazentrifugation, 3: Überstand nach Bindung an Talon[®]-Matrix, 4: eluierte Fraktion von der Talon[®]-Matrix, 5: eluierte Fraktion nach Größenausschlusschromatographie, 6: Fraktion nach Aufkonzentrierung.

Die Reinigungsschritte der Metallionenaffinitätschromatographie wurden mittels SDS-PAGE verfolgt (Abbildung 3.5). Die Expression der rekombinanten Prenyltransferase UbiA ist nach der Induktion (2) deutlich zu erkennen. Auch im Rohlysat (3) und in dem Überstand vor (4) und nach (5) dem Binden an die Talon[®]-Matrix ist die entsprechende Proteinbande, neben vielen weiteren Proteinbanden, zu erkennen. Erst nach Elution (6, 7 und 8) steigt die Intensität der UbiA-Proteinbande bei ca. 70 kDa an. Eine reine UbiA-Bande kann jedoch nicht detektiert werden. Neben dem MBP-Protein bei ca. 40 kDa treten Banden von weiteren Membranproteinen auf.

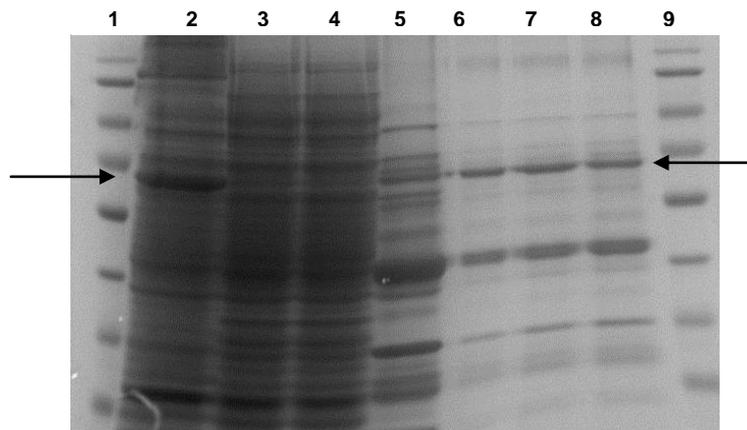


Abbildung 3.5: SDS-PAGE einer UbiA-Reinigung. Das Zielprotein ist mit Pfeilen bei ca. 70 kDa markiert. Es wurden folgende Fraktionen aufgetragen: 1: Proteinstandard (Banden entsprechen 170, 130, 100, 70, 55, 40 35 und 20 kDa), 2: nach Induktion, 3: Rohlysat, 4: Überstand nach Bindung an Talon[®]-Matrix, 5: eluierte Fraktion von der Talon[®]-Matrix, 6, 7 und 8: eluierte Fraktionen nach Größenausschlusschromatographie, 9: Proteinstandard.

Um für die weiteren Aktivitätsuntersuchungen sicherzustellen, dass das Wildtyp-UbiA Protein und seine Mutanten im gleichen Maße exprimiert sind, wurde für die Bestimmung der UbiA-Aminosäuresequenz die entsprechende Proteinbande aus dem SDS-Gel ausgeschnitten und einem tryptischen *In-Gel* Verdau unterzogen. Während einer LC-MS-Analyse (durchgeführt mit freundlicher Unterstützung von Herrn Dr. Kai Naumann) unter Verwendung von stoßinduzierter Dissoziation (CID) werden Fragmentierungsmuster generiert. Die erhaltenen MS-Spektren werden mit Hilfe des Programms *Scaffold Viewer*[®] 3.3.1 einem Protein

zugeordnet. So kann mit der normalisierten Spektrenzahl indirekt Rückschluss auf das Expressionsverhältnis vom Wildtyp-Protein und seinen Mutanten gezogen werden (Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: Normalisierte Spektrenzahlen in % von verschiedenen UbiA-Konstrukten.

UbiA	WT	W152F	W152A	W152S	W152M
Normalisierte Spektrenzahl [%]	3	3	7	5	3

Wie Tabelle 3.1 zu entnehmen ist, liegen die normalisierten Spektrenzahlen zwischen 3 und 7 % und sind somit im Rahmen der Testschwankung miteinander vergleichbar. Bei den nachfolgenden Mutationsstudien kann also von einer annähernd gleich starken Expression von UbiA-Wildtyp und den entsprechenden Mutanten ausgegangen werden.

3.2.2 Mutationsstudien an UbiA

Bis heute ist nur wenig über den detaillierten Katalysemechanismus bei den Prenylübertragenden Enzymen bekannt. Grundlegend kann festgehalten werden, dass die Prenyleinheit als Elektrophil agiert und eine C–C-Doppelbindung angreift. Um Abläufe wie Substrat-Aktivierung, Intermediats- und Übergangsstabilisierung während der enzymatischen Katalyse besser zu verstehen, wurden Mutationsstudien im aktiven Zentrum von UbiA durchgeführt.

Frühere semiempirische Berechnungen haben gezeigt, dass sich während der Katalyse ein positiv geladenes intermediäres Isoprenkation bildet.¹² Für den Prenyltransfer wurde eine Aktivierungsbarriere von 260 kJ/mol berechnet.⁸ Damit stellt sich die Frage, wie diese Aktivierungsbarriere überwunden werden kann. Spielen bei der Aktivierung der Diphosphatabgangsgruppe, der Stabilisierung des intermediären Kations und des π -Komplexes des aromatischen Substrates bestimmte Aminosäuren eine essentielle Rolle? Um zu untersuchen, ob aromatische bzw. nukleophile Aminosäuren Kation-stabilisierend und somit maßgeblich am Katalyseprozess der aromatischen Prenyltransferase UbiA beteiligt sind, wurde das UbiA-Modell analysiert (Abbildung 3.6). Folgender Katalysezyklus wird hier postuliert: Die Diphosphatgruppe (rot dargestellt) des gebundenen Geranyldiphosphates (GPP) wird durch ein Magnesiumion komplexiert. Dieses wird wiederum durch die Aspartate 71 und 75 fixiert (in der Abbildung 3.6 nicht dargestellt). Indirekten Einfluss auf den Katalysemechanismus hat das Aspartat 195. Es fixiert die Konformation des Argenins 137, welches eine Salzbrücke mit dem Diphosphat bildet und somit das Erkennen und die korrekte Positionierung des GPP gegenüber der *p*-Hydroxybenzoesäure gewährleistet. Weiterhin bindet das Aspartat 191 die *p*-Hydroxybenzoesäure und fungiert hierbei als Base,

um das intermediäre Phenolat stabilisieren zu können. Die Geranyleinheit des GPP befindet sich in einer hydrophoben Tasche und wird hauptsächlich von dem elektronenreichen Tryptophan 152 (W152) erkannt. Dieses ist optimal positioniert, um das intermediäre allylische Kation, welches sich nach der Diphosphatabstraktion gebildet hat, stabilisieren zu können.

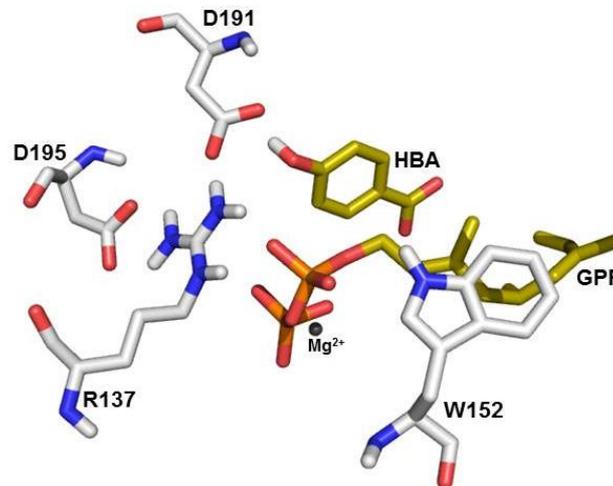


Abbildung 3.6: Das aktive Zentrum des UbiA-Modells mit der *p*-Hydroxybenzoesäure (HBA) und dem zweiten Substrat dem Geranyldiphosphat (GPP).

Um diese Annahmen zu bestärken, wurden *ab initio* 6-31-G^{***} LMP2 Kalkulationen durchgeführt. Die Interaktionsenergie zwischen einem Indol (als Modell für das Tryptophan) und dem Dimethylallylkation beträgt -85 kJ/mol. Weitere *ab initio* Berechnungen wurden mit Seitenketten ausgewählter Aminosäuren durchgeführt. Um den Einfluss von weiteren aromatischen Aminosäuren zu untersuchen, wurde die Interaktion zwischen dem Dimethylallylkation und Phenylalanin berechnet. Als Vertreter für ein S- bzw. O-Nukleophil wurde Methionin bzw. Serin gewählt. Damit ein maßgeblicher Einfluss von bestimmten funktionellen Gruppen bewertet werden kann, wurde eine Aminosäure ohne funktionelle Gruppe, Alanin, ebenfalls für die Berechnungen herangezogen. Die Ergebnisse sind Tabelle 3.2 zu entnehmen.

Tabelle 3.2: Berechnete Energien (kJ/mol) für die Interaktion zwischen dem Dimethylallylkation und den funktionellen Gruppen ausgewählter Aminosäuren.

Aminosäure	Tryptophan	Phenylalanin	Methionin	Serin	Alanin
Interaktionsenergie [kJ/mol]	-85	-56	-187	-82	-15

Die optimierten Strukturen der Interaktion zwischen dem Dimethylallylkation und Indol bzw. Methionin sind in der Abbildung 3.7 beispielhaft dargestellt.

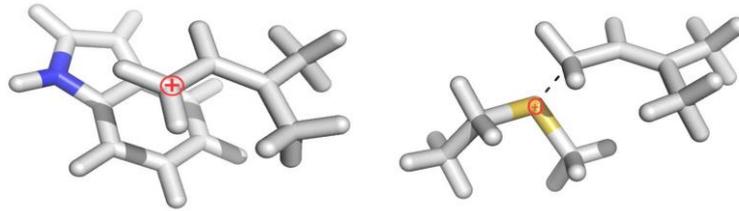


Abbildung 3.7: Optimierte Struktur der Interaktion zwischen dem Dimethylallylkation und dem Indol (links) und der Methioninseitenkette (rechts).

Diese Berechnungen wurden für die nachfolgenden Mutationsstudien als Rationale herangezogen. Es wurden UbiA-Enzyme mit den Mutationen W152F (Phenylalanin), W152M (Methionin), W152S (Serin) und W152A (Alanin) generiert und im Enzymassay via HPLC analysiert (Abbildung 3.8).

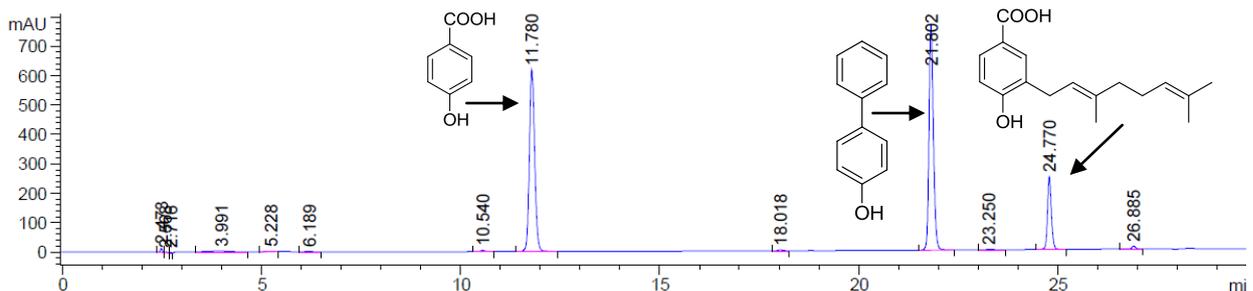


Abbildung 3.8: HPLC-Chromatogramm eines Umsatzes von Geranyldiphosphat und *p*-Hydroxybenzoesäure mit UbiA_W152M. In dieser Abbildung befindet sich das Signal des Substrats, der *p*-Hydroxybenzoesäure, bei einer Retentionszeit von 11,8 min. Nach 21,8 min ist der Peak des internen Standards, *p*-Hydroxybiphenyl, zu detektieren. Das Signal des finalen Produkts, die Geranylhydroxybenzoesäure, zeigt eine Retentionszeit von 24,8 min.

Der relative Umsatz wurde mit dem des Wildtyps verglichen. Als Maß für den Gesamtumsatz gilt die Fläche aller Signale, die im Chromatogramm auftreten. Die einzelnen Signalfächen werden durch die Fläche des internen Standards geteilt, und die Fläche des Wildtyps auf 100 % gesetzt. Die Mutanten W152F und W152A zeigen nur 4 % des Umsatzes. Der Austausch von Tryptophan an Position 152 gegen Methionin bzw. Serin bewirkt eine Umsatzsteigerung von 51 % bzw. 37 % gegenüber dem Umsatz des UbiA-Wildtyps (Abbildung 3.9).

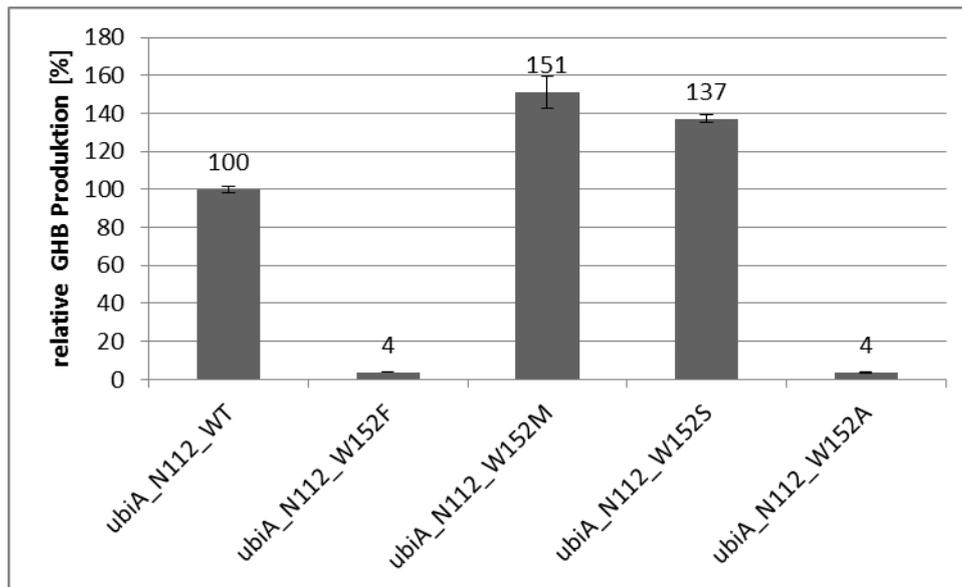


Abbildung 3.9: Gegenüberstellung der relativen Geranylhydroxybenzoesäure (GHB)-Produktion des UbiA-Wildtyps und der Mutanten.

3.3 Diskussion

Bis heute ist es nicht gelungen eine Kristallstruktur der membrangebundenen aromatischen Prenyltransferase UbiA zu erhalten. Anhand von Sekundärstrukturvergleichen konnte jedoch ein Modell postuliert werden. Dieses wurde durch verschiedene Mutationsstudien im aktiven Zentrum bestätigt.⁷ In der vorliegenden Arbeit wurde vorwiegend untersucht, ob aromatische Aminosäuren und im speziellen nukleophile Aminosäuren einen maßgeblichen Einfluss auf die Kationenstabilisierung und somit den Katalysemechanismus haben. Frühere thermodynamische PM3 Berechnungen konnten zeigen, dass der Prenyltransfer in der katalytischen Reaktion über die Bildung eines intermediären Kations verläuft, damit einem S_N1 -Mechanismus folgt und eine Aktivierungsbarriere von 260 kJ/mol zu überwinden ist.⁸ Das gebildete Kation ist stark elektrophil und muss daher von einem nukleophilen Angriff, z.B. von Wasser, geschützt werden, da sonst ein Reaktionsabbruch droht. Aromatische und nukleophile Aminosäuren im aktiven Zentrum scheinen hierbei essentiell für die Katalyse zu sein. Aufgrund von *ab initio* Berechnungen wurde das Tryptophan 152 gegen Phenylalanin, Methionin, Serin und Alanin ausgetauscht. Die experimentellen Ergebnisse stimmen im Wesentlichen gut mit den Berechnungen überein. Der vollständige Aktivitätsverlust der Mutante UbiA_W152A zeigt, dass W152 essentiell für die Katalyse ist. Nachdem der Diphosphatrest von der Geranyleinheit abgespalten ist, wird das entstehende Geranylkation durch Kation- π -Wechselwirkungen stabilisiert. Dieser Effekt wurde bereits in zahlreichen

Publikationen beschrieben.²¹⁻²⁴ Alle C-Atome des Indolrings sind sp^2 -hybridisiert und jedes p-Orbital überlappt mit seinen direkten Nachbarn. Die delokalisierten Elektronen bilden eine π -Wolke oberhalb und unterhalb des Ringes. Diese treten mit den delokalisierten π -Elektronen des Carbokations in Wechselwirkung, wobei der kationische Übergangszustand der Prenyleinheit stabilisiert wird (Abbildung 3.10).

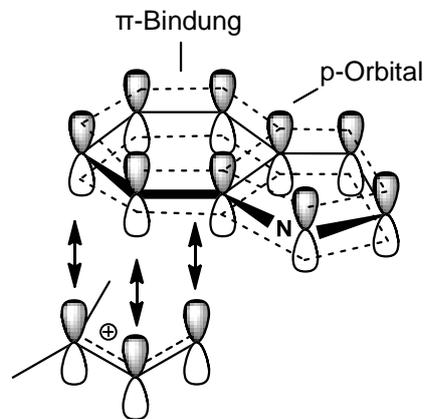


Abbildung 3.10: Molekülorbitalbild der Kation- π -Wechselwirkung zwischen Indol (als vereinfachte Darstellung des Tryptophans) und Dimethylallylkation (als vereinfachte Darstellung des Geranylkations).

Entgegen der *ab initio* Berechnung und der zuvor genannten Annahme, dass aromatische Aminosäuren durch Kation- π -Interaktion das intermediäre Kation stabilisieren, zeigt die Mutante UbiA_W152F einen fast vollständigen Aktivitätsverlust. Hierbei kann angenommen werden, dass Phenylalanin mit seinem Benzolring im aktiven Zentrum nicht optimal positioniert ist, um mit dem Geranylkation in Verbindung zu treten.

Bei dem Austausch von Tryptophan 152 durch die nukleophilen Aminosäuren Serin bzw. Methionin ist eine deutliche enzymatische Umsatzsteigerung zu beobachten. Wie die *ab initio* Berechnungen bereits vorausgesagt haben, stabilisieren diese Aminosäuren das Geranylkation gleichermaßen oder besser als die aromatischen Aminosäuren. Serin agiert in dieser enzymatischen Reaktion als O-Nukleophil. Weiterhin haben ZHOU und PETERS postuliert, dass eine Kationenstabilisierung ebenfalls elektrostatisch stattfinden kann.²⁵ Bei dem Austausch von Tryptophan 152 gegen Serin würde demnach die Hydroxylgruppe nicht primär als Base fungieren, sondern durch einen generierten Hydroxydipol einen elektrostatisch stabilisierenden Effekt auf das Kation ausüben (Abbildung 3.11). Dies kann jedoch nur funktionieren, wenn die Hydroxylgruppe gehindert ist, mit dem Kation zu reagieren (Suizidinhibierung), z. B. durch unpassende Distanzfixierung.

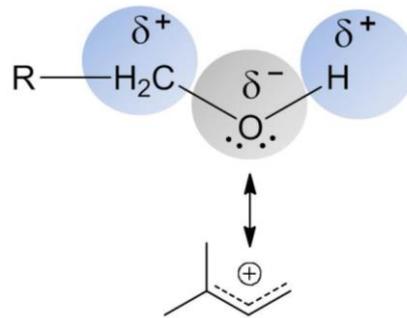
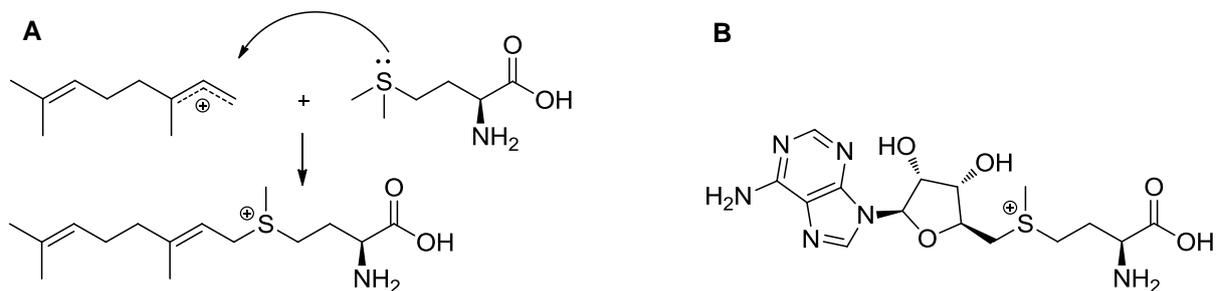


Abbildung 3.11: Kation-Dipol-Wechselwirkung zwischen der Hydroxylgruppe des Serins und dem Dimethylallylkation (als vereinfachte Darstellung des Geranylkatons).

Betrachtet man die W152M-Mutante ist anzunehmen, dass sich das Prenylkation nach der Diphosphatabstraktion dem Schwefelatom des Methionins mit seinen elektronenreichen p- und d-Orbitalen (Polarisations-Induktion) annähert. Hierbei bekommt die Stabilisierung einen immer stärkeren kovalenten Charakter bis hin zur Bildung eines Sulfoniumintermediates. Auf diese Weise erinnert der möglicherweise entstandene Methionin-Geranyl-Kation-Komplex stark an das hochreaktive S-Adenosylmethionin (SAM) (Schema 3.2).

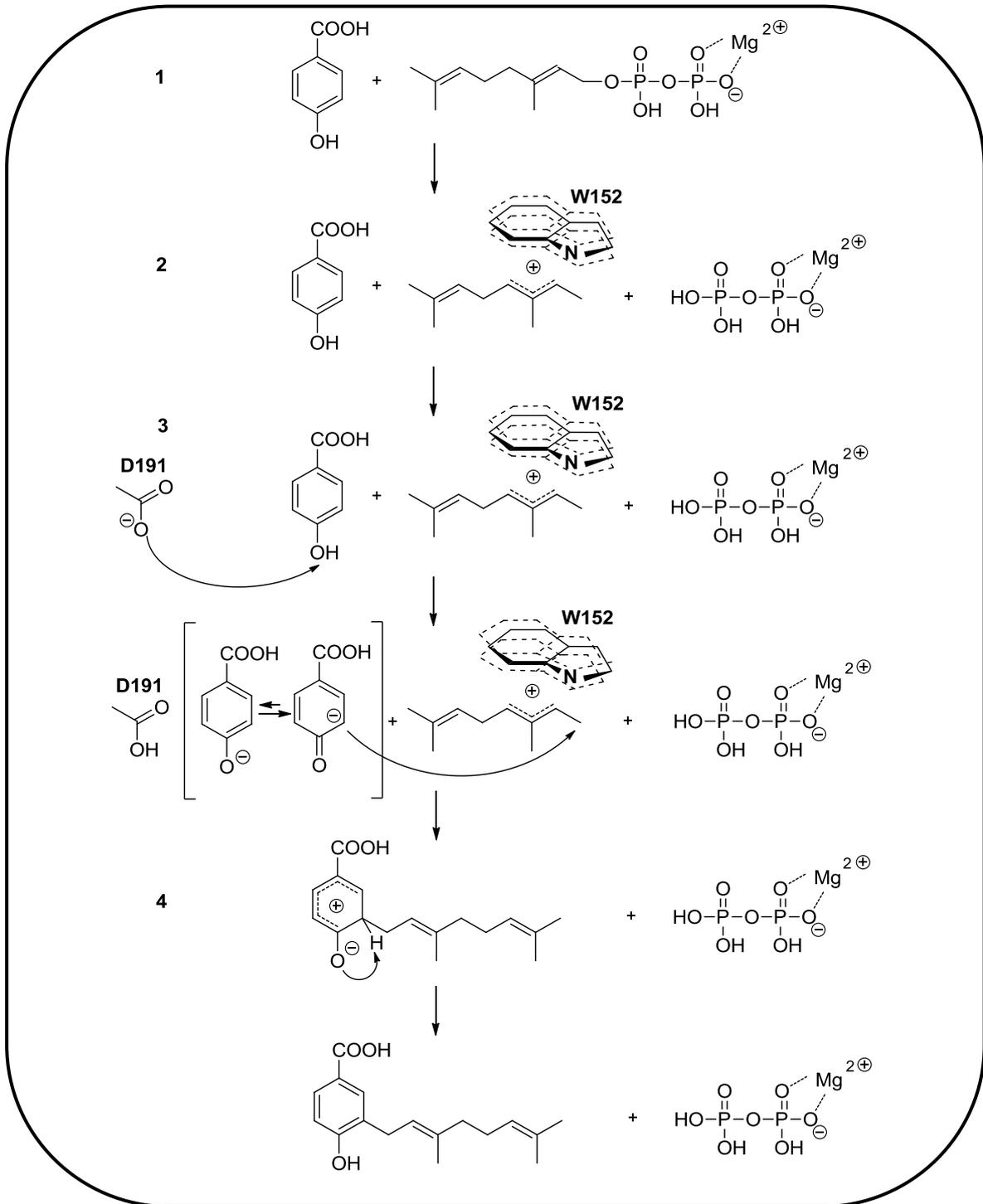


Schema 3.2: A: Mögliche Bildung eines Methionin-Geranyl-Kation-Komplexes, B: Struktur des S-Adenosylmethionin.

Damit stehen drei Möglichkeiten der Kationenstabilisierung zur Auswahl. Kation- π -Interaktion, elektrostatischer Effekt eines Hydroxydipols und durch Polarisations-Induktion bis hin zu reversibler nukleophiler Addition. Warum sich die Kationenstabilisierung via Kation- π -Interaktion evolutionär durchgesetzt hat, konnte noch nicht geklärt werden.

Zusammenfassend kann die enzymatische aromatische Prenylierung durch UbiA wie folgt postuliert werden (Schema 3.3): Initiierend wird das Diphosphat über Interaktion mit einem divalenten Metallion aktiviert (1), woraufhin das gebildete intermediäre Kation z.B. über Kation- π -Wechselwirkung stabilisiert wird (2). Das zweite Substrat, die *p*-Hydroxybenzoesäure, muss ebenfalls aktiviert werden. Dieses erfolgt durch einen Protonentransfer von der Hydroxylgruppe der Benzoesäure zu dem Aspartat 191 (3). Die

damit erhöhte negative Ladung der phenolischen Hydroxylgruppe erlaubt den abschließenden regiospezifischen Geranyl-kation-Transfer zu dem aromatischen Substrat (4).



Schema 3.3: Enzymatischen Prenylierung von *p*-Hydroxybenzoesäure.

Damit stellt sich nun die Frage, ob dieser postulierte Katalysemechanismus nur für UbiA zutrifft, oder allgemeine Gültigkeit bei aromatischen Prenyltransferasen erlangt.

YANG *et al.*²⁶ konnten analog für die aromatische Prenyltransferase NphB zeigen, dass die Prenylierung über einen S_N1 -Mechanismus abläuft. Das hierbei entstehende Carbokation

wird durch einen neuen π -Raum, bestehend aus Tyrosin 121, Tyrosin 216 und dem aromatischen Substrat 1,6-Dihydroxynaphthalen (1,6-DHN), stabilisiert. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Beobachtungen zu UbiA. Eine Kationstabilisierung über ein S-Nukleophil wird bei NphB jedoch nicht beschrieben. Auch einem Serin wird in der Katalyse von NphB eine Funktion zugesprochen. Hier fungiert es jedoch nicht als Kationenstabilisator, sondern fördert die Regioselektivität durch Wasserstoffbrückenbindungen mit einem weiteren Tyrosin und dem Substrat 1,6-DHN. Dabei findet bevorzugt eine 2-Prenylierung statt.

In der vorliegenden Arbeit konnte mithilfe von Mutationsanalysen die essentielle Rolle einer aromatischen Aminosäure im Katalysemechanismus der aromatischen Prenyltransferasen nachgewiesen werden. Die erhöhte relative Enzymaktivität wurde mittels HPLC analysiert und ausgewertet. Nach erfolgreicher Umklonierung konnte das UbiA-Protein erstmals mittels Immundetektion nachgewiesen und via LC-MS/MS auf Aminosäuresequenzebene identifiziert werden.

3.4 Referenzen

1. Young, I. G.; Leppik, R. A.; Hamilton, J. A.; Gibson, F. Biochemical and genetic studies on ubiquinone biosynthesis in *Escherichia coli* K-12:4-hydroxybenzoate octaprenyltransferase. *J Bacteriol.* **1972**, *110* (1), 18-25.
2. Nishimura, K.; Nakahigashi, K.; Inokuchi, H. Location of the ubiA gene on the physical map of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **1992**, *174* (17), 5762.
3. Heide, L.; Melzer, M.; Siebert, M.; Bechthold, A.; Schroder, J.; Severin, K. Clarification of the *Escherichia coli* genetic map in the 92-minute region containing the ubiCA operon and the plsB, dgk, lexA, and dinF genes. *J. Bacteriol.* **1993**, *175* (17), 5728-5729.
4. Nichols, B. P.; Green, J. M. Cloning and sequencing of *Escherichia coli* ubiC and purification of chorismate lyase. *J Bacteriol.* **1992**, *174* (16), 5309-5316.
5. Melzer, M.; Heide, L. Characterization of polyprenyldiphosphate: 4-hydroxybenzoate polyprenyltransferase from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, *1212* (1), 93-102.
6. Wessjohann, L. A.; Sontag, B. Prenylation of benzoic acid derivatives catalyzed by a transferase from *Escherichia coli* overproduction: Method development and substrate specificity. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 1697-1699.
7. Bräuer, L.; Brandt, W.; Schulze, D.; Zakharova, S.; Wessjohann, L. A structural model of the membrane-bound aromatic prenyltransferase UbiA from *E. coli*. *Chembiochem* **2008**, *9* (6), 982-992.
8. Bräuer, L.; Brandt, W.; Wessjohann, L. A. Modeling the *E. coli* 4-hydroxybenzoic acid oligoprenyltransferase (ubiA transferase) and characterization of potential active sites. *J Mol Model* **2004**, *10* (5-6), 317-327.
9. Wessjohann, L. A.; Sontag, B. Prenylierung von Benzoesäurederivaten, katalysiert durch eine Transferase aus *E. coli*-Überproduzenten: Verfahrensentwicklung und Substratspezifität. *Angew. Chem.* **1996**, *15*, 1815-1821.
10. Bräuer, L. Modelling- und Mutationsstudien an ausgewählten prenylierenden Enzymen. *Dissertation* **2006**, MLU Halle.
11. Yazaki, K.; Kunihiya, M.; Fujisaki, T.; Sato, F. Geranyl diphosphate:4-hydroxybenzoate geranyltransferase from *Lithospermum erythrorhizon*. Cloning and characterization of a ket enzyme in shikonin biosynthesis. *J Biol Chem* **2002**, *277* (8), 6240-6246.
12. Brandt, W.; Bräuer, L.; Günnewich, N.; Kufka, J.; Rausch, F.; Schulze, D.; Schulze, E.; Weber, R.; Zakharova, S.; Wessjohann, L. Molecular and structural basis of metabolic diversity mediated by prenyldiphosphate converting enzymes. *Phytochemistry* **2009**, *70* (15-16), 1758-1775.
13. Höfle, G.; Kunze, B. Biosynthesis of aurachins A-L in *Stigmatella aurantiaca*: a feeding study. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71* (11), 1843-1849.
14. Nickerson, M. L.; Kostihina, B. N.; Brandt, W.; Fredericks, W.; Xu, K. P.; Yu, F. S.; Gold, B.; Chodosh, J.; Goldberg, M.; Lu, d. W.; Yamada, M.; Tervo, T. M.;

- Grutzmacher, R.; Croasdale, C.; Hoeltzenbein, M.; Sutphin, J.; Malkowicz, S. B.; Wessjohann, L.; Kruth, H. S.; Dean, M.; Weiss, J. S. UBIAD1 mutation alters a mitochondrial prenyltransferase to cause Schnyder corneal dystrophy. *PLoS. One.* **2010**, *5* (5), e10760.
15. Schumacher, M. M.; Elsabrouty, R.; Seemann, J.; Jo, Y.; DeBose-Boyd, R. A. The prenyltransferase UBIAD1 is the target of geranylgeraniol in degradation of HMG CoA reductase. *Elife.* **2015**, *4*.
 16. Hirota, Y.; Nakagawa, K.; Sawada, N.; Okuda, N.; Suhara, Y.; Uchino, Y.; Kimoto, T.; Funahashi, N.; Kamao, M.; Tsugawa, N.; Okano, T. Functional characterization of the vitamin K2 biosynthetic enzyme UBIAD1. *PLoS. One.* **2015**, *10* (4), e0125737.
 17. Fredericks, W. J.; McGarvey, T.; Wang, H.; Lal, P.; Puthiyaveetil, R.; Tomaszewski, J.; Sepulveda, J.; Labelle, E.; Weiss, J. S.; Nickerson, M. L.; Kruth, H. S.; Brandt, W.; Wessjohann, L. A.; Malkowicz, S. B. The bladder tumor suppressor protein TERE1 (UBIAD1) modulates cell cholesterol: Implications for tumor progression. *DNA Cell Biol.* **2011**, *30* (11), 851-864.
 18. Arnold-Worner, N.; Goldblum, D.; Miserez, A. R.; Flammer, J.; Meyer, P. Clinical and pathological features of a non-crystalline form of Schnyder corneal dystrophy. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **2012**, *250* (8), 1241-1243.
 19. Du, C.; Li, Y.; Dai, L.; Gong, L.; Han, C. A mutation in the UBIAD1 gene in a han chinese family with Schnyder corneal dystrophy. *Mol. Vis.* **2011**, *17*, 2685-2692.
 20. Dyson, M. R.; Shadbolt, S. P.; Vincent, K. J.; Perera, R. L.; McCafferty, J. Production of soluble mammalian proteins in *Escherichia coli*: identification of protein features that correlate with successful expression. *BMC. Biotechnol.* **2004**, *4*, 32.
 21. Mecozzi, S.; West, A. P., Jr.; Dougherty, D. A. Cation-pi interactions in aromatics of biological and medicinal interest: electrostatic potential surfaces as a useful qualitative guide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **1996**, *93* (20), 10566-10571.
 22. Dougherty, D. A. Cation-pi interactions in chemistry and biology: a new view of benzene, Phe, Tyr, and Trp. *Sci.* **1996**, *271* (5246), 163-168.
 23. Ma, J. C.; Dougherty, D. A. The Cationminus signpi interaction. *Chem. Rev.* **1997**, *97* (5), 1303-1324.
 24. Mahadevi, A. S.; Sastry, G. N. Cation-pi interaction: its role and relevance in chemistry, biology, and material science. *Chem. Rev.* **2013**, *113* (3), 2100-2138.
 25. Zhou, K.; Peters, R. J. Electrostatic effects on (di)terpene synthase product outcome. *Chem. Commun. (Camb.)* **2011**, *47* (14), 4074-4080.
 26. Yang, Y.; Miao, Y.; Wang, B.; Cui, G.; Merz, K. M., Jr. Catalytic mechanism of aromatic prenylation by NphB. *Biochemistry* **2012**, *51* (12), 2606-2618.

4 Nachweis einer katalytischen Diade einer Monoterpensynthase

4.1 Die Limonensynthase aus *Cannabis sativa* L. (CsTPS1)

Mit seinen typisch handförmig gelappten Blättern gehört der gewöhnliche Hanf (*Cannabis sativa*) zu der Familie der Hanfgewächse (Cannabaceae). Er ist die älteste Nutz- und Zierpflanze. Neben dem nach wie vor umstrittenen Nutzen zur Rauschgiftgewinnung findet *Cannabis sativa* vor allem in der Textilindustrie als Faserhanf Verwendung. Zudem werden den Produkten des Sekundärstoffwechsels, wie den Cannabinoiden und Terpenoiden, große Bedeutung in der biotechnologischen, chemischen und pharmazeutischen Industrie zugesprochen.¹ Diese flüchtigen Substanzen befinden sich in speziellen Pflanzenhaaren, den Trichomen, auf Kelch- und Trageblättern der weiblichen Pflanze. Diese Verbindungen werden mittels spezieller Enzyme gebildet. Unser Hauptaugenmerk soll auf eine Monoterpensynthase, die Limonensynthase (CsTPS1), gerichtet werden. Die Limonensynthase ist ein Homodimer, welches eine *all*- α -helikale Sekundärstruktur aufweist (Abbildung 4.1) und ein DDxxD- sowie ein DTE-Motiv besitzt.

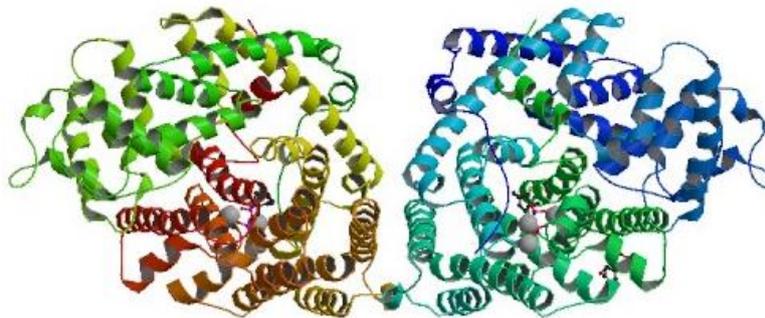


Abbildung 4.1: Modell der homodimeren Limonensynthase.

Wie die Namensgebung des Enzyms vermuten lässt, handelt es sich bei dem produzierten Hauptprodukt um (-)-Limonen. Als Nebenprodukte sind unter anderem α - und β -Pinen, Myrcen, Camphen und andere Monoterpene sowie Monoterpenalkohole zu finden. Das *CsTPS1*-Gen konnte in früheren Arbeiten aus glandulären Trichomzellen von *Cannabis sativa* über eine cDNA-Bank isoliert und nachfolgend erfolgreich exprimiert werden.^{2,3} Charakterisierungsexperimente ergaben, dass das pH-Optimum der rekombinanten CsTPS1 bei einem Wert von 6,5 liegt, das Temperaturoptimum bei 40°C. In Experimenten mit radioaktiv markiertem Substrat wurde ein K_m -Wert von 11,76 μM und ein K_{cat} von 0,13 s^{-1} ermittelt. Als natürliches Substrat wird Geranyldiphosphat (GPP) in einer Mg^{2+} -abhängigen Reaktion umgesetzt. Durch Homologiemodellierung konnte für die Limonensynthase ein Modell erhalten werden. Dieses diente als Grundlage für die Mutationsstudien.⁴

4.2 Ergebnisse

4.2.1 Reinigung der rekombinanten CsTPS1

In vorigen Arbeiten von Dr. N. Günnewich wurde die Limonensynthase (CsTPS1) aus *Cannabis sativa* kloniert und ein Reinigungsprotokoll etabliert.⁴ Der Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) wird mit dem Plasmid pET101/D-TOPO[®] chemotransformiert. Durch Zugabe von 1 mM IPTG wird die Expression des Zielproteins veranlasst. Nach Beendigung der heterologen Expression werden die Zellen geerntet und mittels Ultraschallstab aufgeschlossen. Die Reinigung des Zielproteins erfolgt mittels Metallionenaffinitätschromatographie. Um die erhaltene Proteinlösung zu entsalzen und zeitgleich umzupuffern wird eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt. Die einzelnen Reinigungsschritte werden über eine SDS-PAGE verfolgt (Abbildung 4.2).

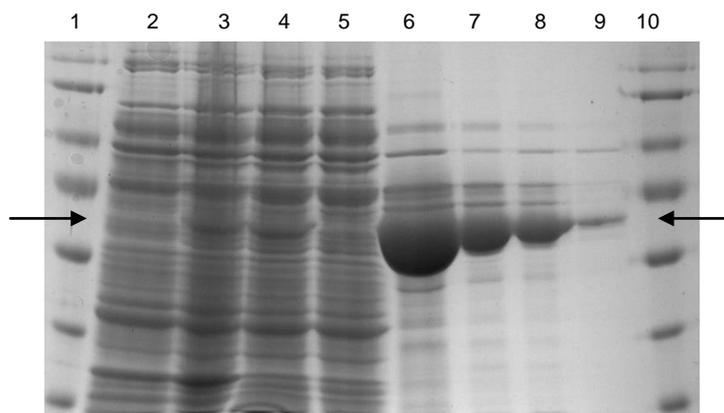


Abbildung 4.2: SDS-PAGE einer CsTPS1-Reinigung. Das gewünschte Zielprotein ist mit Pfeilen zwischen den Größenmarkern 55 kDa und 70 kDa gekennzeichnet. Es wurden folgende Fraktionen aufgetragen: 1: Proteinstandard (Banden entsprechen 170, 130, 100, 70, 55, 40, und 35 kDa), 2: vor Induktion, 3: nach Induktion, 4: Rohlysate, 5: Überstand nach Bindung an Talon[®]-Matrix, 6: eluierte Fraktion von der Talon[®]-Matrix, 7, 8 und 9: eluierte Fraktionen nach Größenausschlusschromatographie, 10: Proteinstandard.

Die Expression der rekombinanten Limonensynthase ist deutlich nach der Induktion (3) zu erkennen. Auch im Rohlysate (4) und in dem Überstand vor (5) und nach (6) dem Binden an die Talon[®]-Matrix ist die entsprechende Proteinbande, neben vielen weiteren Proteinbanden, zu erkennen. Erst nach Elution (7, 8 und 9) reichert sich die CsTPS1-Proteinbande zwischen den Größenmarkern 55 kDa und 70 kDa an. Die durchschnittliche Ausbeute an CsTPS1 lag bei 1,5 mg/L Flüssigkultur.

4.2.2 Mutationsstudien an CsTPS1

Bis heute wurde die Limonensynthase aus *Cannabis sativa* nicht kristallisiert. Um dennoch Einblicke in das aktive Zentrum dieser Monoterpensynthase zu erhalten, wurde ein 3D-Modell generiert. Aufgrund einer Sequenzidentität von 46 % und einer annähernd identischen Sekundärstruktur diente die (+)-Bornyldiphosphatsynthase aus *Salvia officinalis* (PDB-Eintrag: 1N21) als Grundlage für das CsTPS1-3D-Modell.⁵ Anhand dieses Modells konnte spezifischen Aminosäuren eine spezielle Funktion, wie z. B. katalytische Aktivität, Substrat- oder Produktselektivität, zugesprochen werden (Abbildung 4.3). Die Funktion dieser Aminosäuren wurde mittels zielgerichteter Mutagenese analysiert.

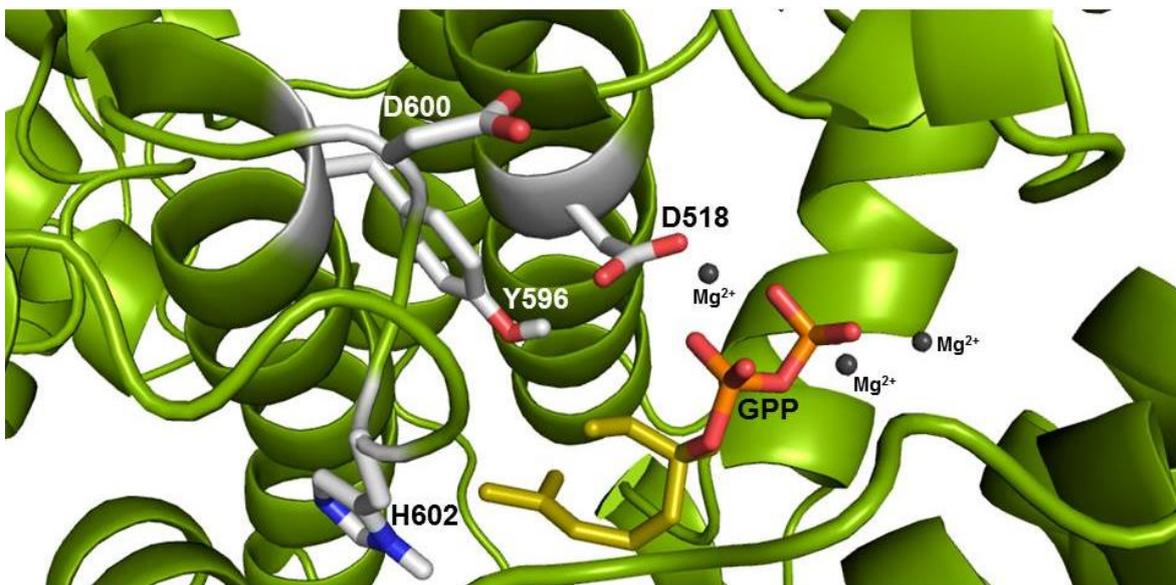
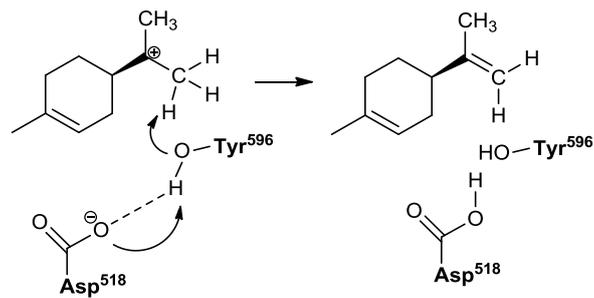


Abbildung 4.3: Modell des aktiven Zentrums der Limonensynthase CsTPS1 inklusive seines Polymerrückgrates.

Wie bereits im Abschnitt 1.3.3 detailliert erläutert, wird Limonen final durch Protonenabstraktion gebildet. Als Protonenakzeptor können hierbei basische Aminosäuren fungieren. Erste Arbeiten ziehen zwei Aminosäuren in Betracht, das Histidin 602 und das Tyrosin 596.^{4,6} In der vorliegenden Arbeit wurde die Mutante Y596A generiert und analysiert. Weiterhin wurden das Aspartat 518 und das Aspartat 600 gegen Alanin ausgetauscht. Diese Aspartate könnten ebenfalls am Protonentransfer und damit an einer katalytischen Diade beteiligt sein (Schema 4.1). Um den potentiellen Einfluss der Hydroxylgruppe zu untersuchen, wurden die genannten Aspartate durch Asparagin ausgetauscht (D518N: vorliegende Arbeit, D600N: Diplomarbeit B. Weigel⁶).



Schema 4.1: Protonentransfer innerhalb der postulierten katalytischen Diade zur finalen Limonenformation.

4.2.2.1 Sekundärstrukturanalysen

Dem Aspartat 600 kann entsprechend computergestützten Berechnungen von Felix Rausch mit dem Programm YASARA eine weitere Funktion zu gesprochen werden. Es befindet sich in einer Schleifenstruktur am Anfang des aktiven Zentrums (Abbildung 4.3), wobei hier durch Substratbindung eine Konformationsänderung möglich ist. So könnte das Aspartat 600 maßgeblich an der Stabilisierung der Schleifenstruktur und damit für die gesamte Proteinstabilisierung verantwortlich sein. Abbildung 4.4 zeigt die prozentuale Verteilung der Sekundärstrukturelemente der Limonensynthase des Wildtyps und seiner Mutanten. Es ist zu erkennen, dass sich die D600-Mutante deutlich in der Sekundärstruktur vom Wildtyp unterscheidet. Dieser Sachverhalt unterstreicht die Annahme, dass das Aspartat 600 maßgeblich an der Stabilisierung der Schleifenstruktur beteiligt sein kann.

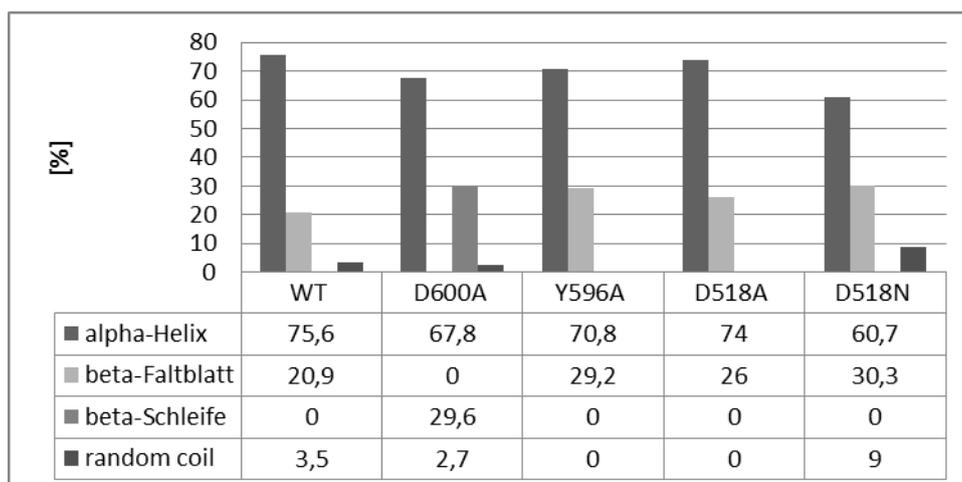


Abbildung 4.4: Prozentuale Verteilung der Sekundärstrukturanteile der Limonensynthase des Wildtyps und seiner Mutanten. Die Ergebnisse wurde mittels CD-(Circulardichroismus-) Spektroskopie ermittelt. Die CD-Spektren sind dem Anhang der Abbildung 8.8 zu entnehmen.

4.2.2.2 Produktspektren

Um den aktivitätsrelevanten Einfluss der postulierten Aminosäuren zu untersuchen, wurde der relative Umsatz von GPP der Mutanten mit dem des Wildtyps verglichen. Als Maß für den Gesamtumsatz galt die Integration der Fläche aller Signale im Totalionenstrom-Modus (TIC), die im GC/MS-Chromatogramm auftraten. Die einzelnen Signalfächen wurden durch die Fläche des internen Standards geteilt, der Wildtyp auf 100 % gesetzt. Bei dieser promiskuitiven Enzymkatalyse wird das natürliche Substrat GPP der Limonensynthese in eine Vielzahl verschiedener Monoterpenoide umgewandelt (Abbildung 4.5). Neben sieben aliphatischen Monoterpenen (m/z 136) konnten bei der GC/MS-Analyse fünf Hydratisierungsprodukte (m/z 154) mithilfe der NIST-Datenbank sowie entsprechender Vergleichsstandards identifiziert werden.

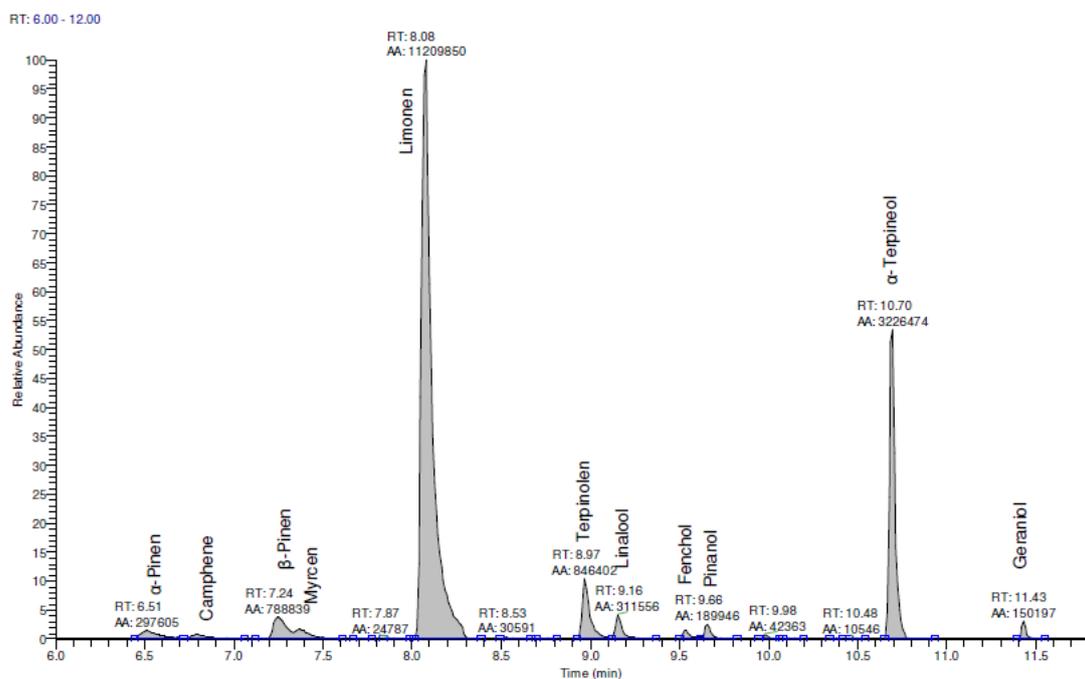


Abbildung 4.5: GC/MS-Chromatogramm eines Umsatzes von GPP mit CsTPS1.

Mit 51% stellt das namensgebende Limonen das Hauptprodukt der enzymatischen Umwandlung von GPP dar. Die aliphatischen sowie die hydratisierten Nebenprodukte treten mit einem Gesamtanteil von ca. 50 % auf (Abbildung 4.6).

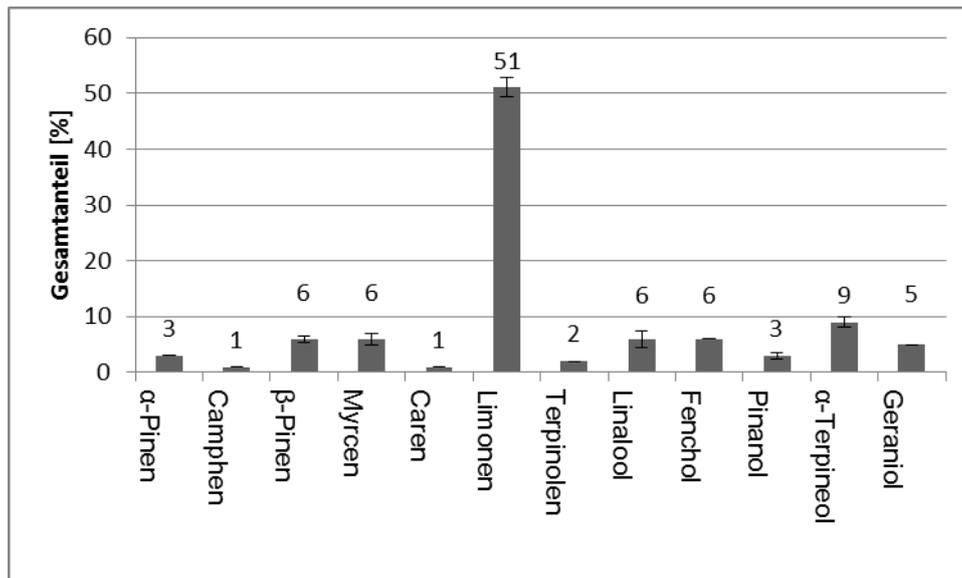


Abbildung 4.6: Prozentuale Produktverteilung der enzymatischen Umwandlung von GPP katalysiert durch die Limonensynthase. Es wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

Vergleichend zu dem Produktspektrum des Wildtyps der Limonensynthase wurden die Mutanten entsprechend mittels GC/MS analysiert. Tabelle 4.1 zeigt die prozentualen Anteile der gebildeten Monoterpene in der Reaktion mit dem Wildtyp der Limonensynthase und den genannten Mutanten. Das Produktspektrum der generierten Mutanten unterscheidet sich maßgeblich von dem des Wildtyps. Eine deutliche Minderung der Limonenbildung ist bei den Mutanten D600A sowie D518N mit 7 bzw. 15 % zu erkennen. Die Mutanten Y596A und D518A bilden keine Limonen. Das Hauptprodukt dieser Reaktionen stellt das Linalool mit bis zu 57 % des Gesamtumsatzes dar.

Tabelle 4.1: Prozentualer Anteil der gebildeten Monoterpene durch CsTPS1 und seiner Mutanten. Dargestellt sind die Mittelwerte von Dreifachbestimmungen.

Produkt [%]	WT	Y596A	D518N	D518A	D600A
α-Pinen	3	-	-	-	-
Camphen	1	-	-	-	-
β-Pinen	6	-	-	-	-
Myrcen	6	-	4	-	-
Caren	1	15	17	10	13
Limonen	51	-	15	-	7
Terpinolen	2	-	-	-	-
Linalool	6	51	39	57	50
Fenchol	6	-	-	-	-
Pinanol	3	-	-	-	-
α-Terpineol	9	18	15	21	18
Geraniol	5	16	11	12	12

Um zu untersuchen, ob es sich um eine enzymkatalysierte Umwandlung von GPP zu Linalool handelt, wurde eine chirale GC-Analyse von Versuchsansätzen mit und ohne Enzym durchgeführt (Anhang Abbildung 8.2). Es konnte gezeigt werden, dass sowohl in der Reaktion mit Enzym als auch ohne immer das Racemat von Linalool gebildet wird. Damit lässt sich darauf schließen, dass das Linalool hauptsächlich durch nichtenzymatische Hydrolyse entsteht. Herr Weigel konnte in seiner Diplomarbeit zeigen, dass ebenfalls das α -Terpineol ein nichtenzymatisches Hydrolyseprodukt darstellt.⁶ Werden diese Produktanteile vom Gesamtumsatz subtrahiert, kann der relative Produktumsatz vom Wildtyp mit dem der Mutanten verglichen werden (Abbildung 4.7).

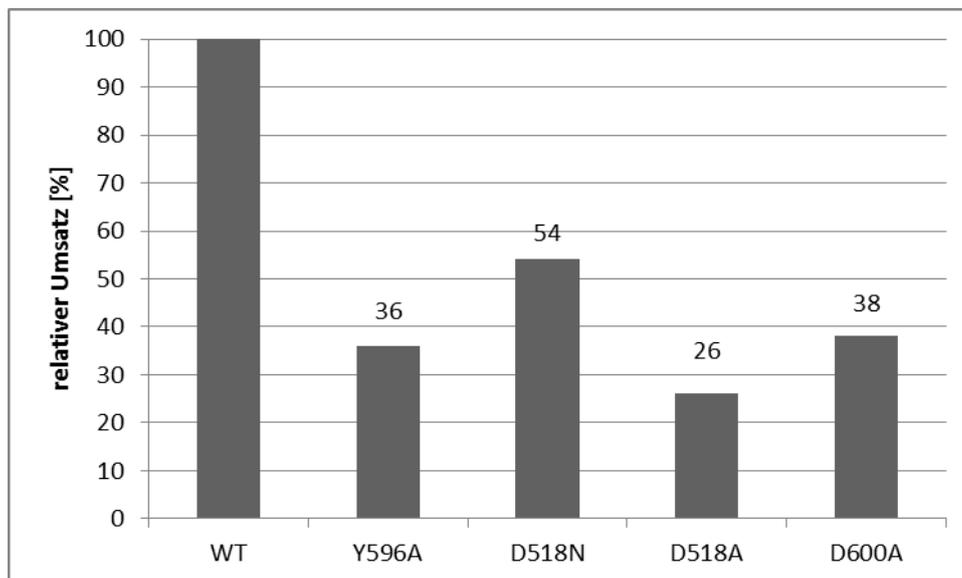


Abbildung 4.7: Relativer Gesamtumsatz der Limonensynthase und ihrer Mutanten. Der Umsatz des Wildtypenzym wurde auf 100 % definiert

Die Mutanten Y596A und D600A zeigen einen relativen Produktumsatz von 36 bzw. 38 %. Mit 54 % erreicht die Mutante D518N annähernd die Hälfte des Umsatzes des Wildtyps, wobei der Austausch gegen ein Alanin an dieser Position nur noch einen Produktumsatz von 26 % aufweist.

4.2.2.3 Enzymkinetik

Die Bestimmung von Enzymkinetiken ist essentiell für das Verstehen einer enzymatisch katalysierten Reaktion. Es gibt zahlreiche Methoden zur Analyse kinetischer Größen. Das weitverbreitetste Experiment zur kinetischen Untersuchung von Terpensynthasen ist ein diskontinuierlicher Versuch mit radioaktiv markiertem Substrat. In vorigen Arbeiten wurden die kinetischen Parameter der CsTPS1 auf diese Weise ermittelt.^{2,3} Da jedoch zunehmend

von der Verwendung radioaktiv markierter Substrate abgesehen werden soll, wurde in dieser Arbeit die NMR-Spektroskopie zur Bestimmung von Enzymkinetiken herangezogen. Diese Technik bietet den Vorteil, dass die Messungen in homogener Lösung stattfinden, so dass man direkt die Ab- bzw. Zunahme von Substrat und Produkt beobachten kann.

Alle NMR Experimente wurden bei 30°C an einem 600 MHz NMR-Spektrometer durchgeführt. Vor Beginn der Messungen wurde der NMR-Magnet *geschimmed*, unter Verwendung einer Proteinprobe jedoch ohne Substrat (0,2 µM CsTPS1, DSS (interner Standard), CsTPS1-Probenpuffer). Nachdem das Spektrometer *gematched* und *getuned* wurde, wurde die Probe entnommen. Die Versuchsproben wurden wie im Kapitel 5.3.1.2 beschrieben vorbereitet. Direkt vor dem Messen wurde die Lösung in ein 5 mm Ø NMR-Röhrchen überführt und das Enzym hinzugegeben. In einem Zeitraum von bis zu 4 h wurden 30 Messungen durchgeführt. Die Aquisitionszeit betrug 2,7 sec mit einer Relaxationsverzögerung von 2 sec.

Die Auswertung der aufgenommenen Spektren fand mit *ACD/Labs10* statt. Die FID (*free induction decay*) Dateien wurden einem Nullabgleich unterzogen und die Basislinie korrigiert. Die Signale wurden mit Hilfe der der Integrationsfunktion integriert. Abbildung 4.8 zeigt ein aufgenommenes ¹H-NMR Spektrum der enzymatischen Umsetzung des Geranyldiphosphates sowie die graphische Auswertung der Enzymreaktionen (erstellt mit *GraphPad PRISM®*).

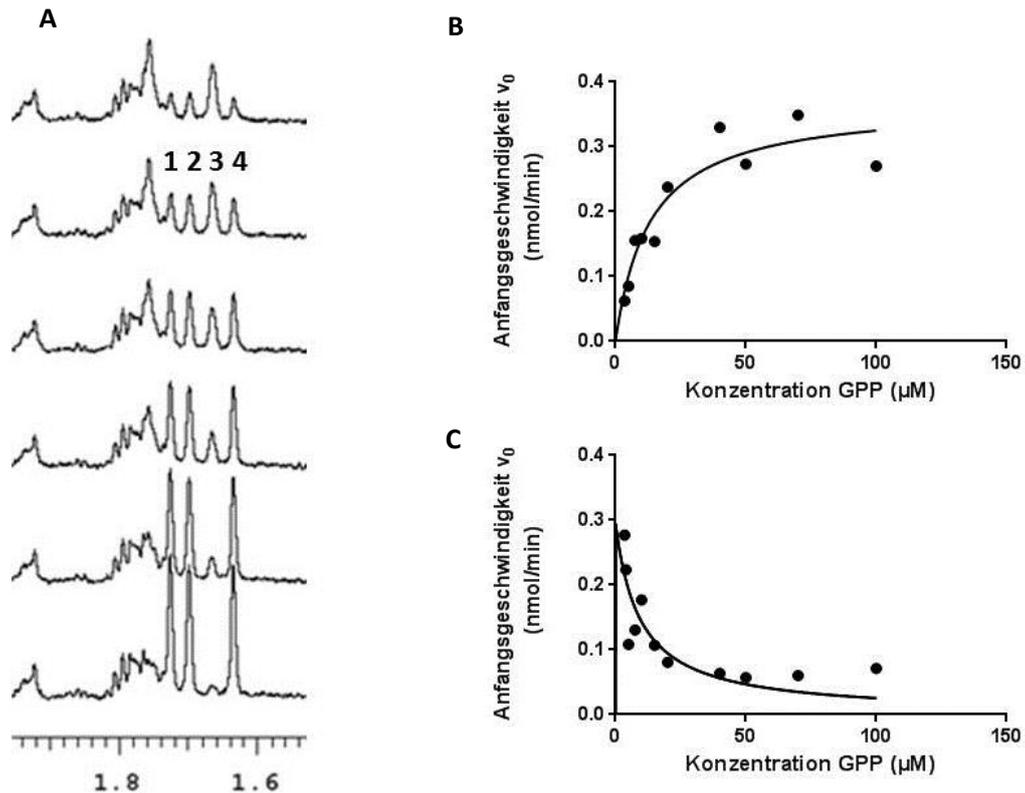


Abbildung 4.8: NMR basierte Enzymkinetik. A: ^1H -Spektren der Enzymreaktion. Signal 1, 2 und 3 sind den Methylgruppen des GPPs (Substrat) zuzuordnen. Signal 4 entspricht der Methylgruppe des Limonens (Produkt). B: Kinetik der Limonensynthese nach Michaelis-Menten. C: Substrat-Inhibierung der D518N Mutante der Limonensynthase.

Nach Michaelis-Menten konnten die kinetischen Parameter des CsTPS1 Wildtyps bestimmt werden (Tabelle 4.2). Für die D518N Mutante wurde die K_i Konstante von $9,393 \mu\text{M}$ bestimmt. Die Auswertung fand mit dem Programm *GraphPad Prism*[®] statt.

Tabelle 4.2: Kinetische Konstanten der Limonensynthase (WT), erhalten mithilfe von NMR-Experimenten.

K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m [$(\mu\text{M} \cdot \text{s})^{-1}$]
$13,26 \pm 4$	0,074	$5,58 \cdot 10^{-3}$

4.3 Diskussion

Bis heute wurde keine Röntgenstruktur der Limonensynthase aus *Cannabis sativa* generiert. Um Einblicke in den Katalysemechanismus zu bekommen, wurde in vorigen Arbeiten ein 3D-Modell, basierend auf der Bornyldiphosphatsynthase aus *Salvia officinalis* (PDB Eintrag: 1N21), erstellt (PDB Eintrag: 2DK0). Beide Monoterpensynthasen zeigen eine Sequenzidentität von 46% und identische Sekundärstrukturelemente.⁴ Nachfolgend ist es der Arbeitsgruppe um CROTEAU gelungen eine Röntgenstruktur der Limonensynthase aus *Mentha spicata* zu generieren (PDB Eintrag: 2ONH).⁷

Von den genannten Röntgenstrukturen ist bekannt, dass drei Magnesiumionen für das Positionieren und Aktivieren der Diphosphateinheit des Substrats verantwortlich sind. Diese Magnesiumionen werden in der CsTPS1 von den Aspartaten 374 und 378 sowie der Glutaminsäure 527 gebunden (Abbildung 4.9).

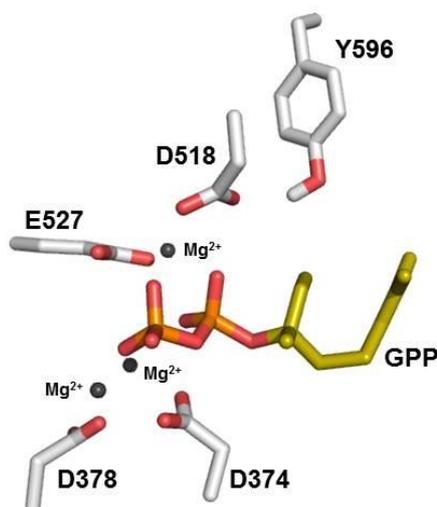


Abbildung 4.9: Modell des aktiven Zentrums der Limonensynthase. Dargestellt sind die Aminosäuren, welche maßgeblich an der Fixierung der Magnesiumionen beteiligt sind, sowie die Aminosäuren, die eine katalytische Diade bilden können.

Der Bildung des finalen Produktes Limonen, geht eine Zyklisierungsreaktion inklusive einer Protonenabstraktion voraus. Kurze Distanzen zwischen den Atomen sorgen für eine optimale Stereochemie am C₃-Atom des GPP. Damit wird die Entstehung von 4S- α -Terpinylkations forciert und die konkurrierende Bildung von anderen Enantiomeren gehindert (Schema 4.2 A). Die kationische Isopropylgruppe des Terpinylkations zeigt eine coplanare Orientierung zu der Seitenkette des Tryptophan 346, unterstützt durch Kation- π -Wechselwirkungen. Damit wird die eigentlich energetisch ungünstigere Trennung der Diphosphatesterbindung unter Bildung von separaten Ionenpaaren begünstigt.⁸ Das gebildete Terpinylkation wird nachfolgend durch das Arginin 337 stabilisiert, so dass eine

Reformation der kovalenten Bindung mit dem negativ geladenen Diphosphatrest verhindert wird (Abbildung 4.10).

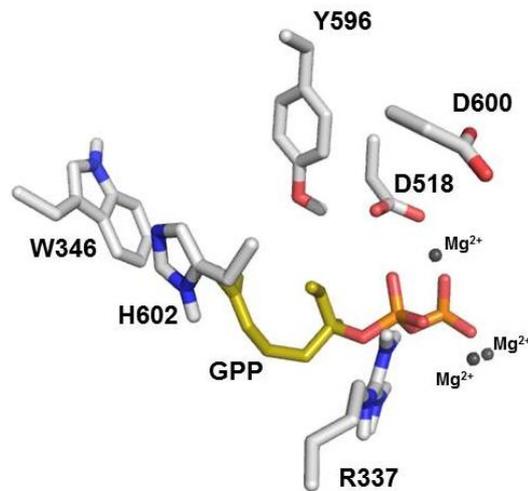
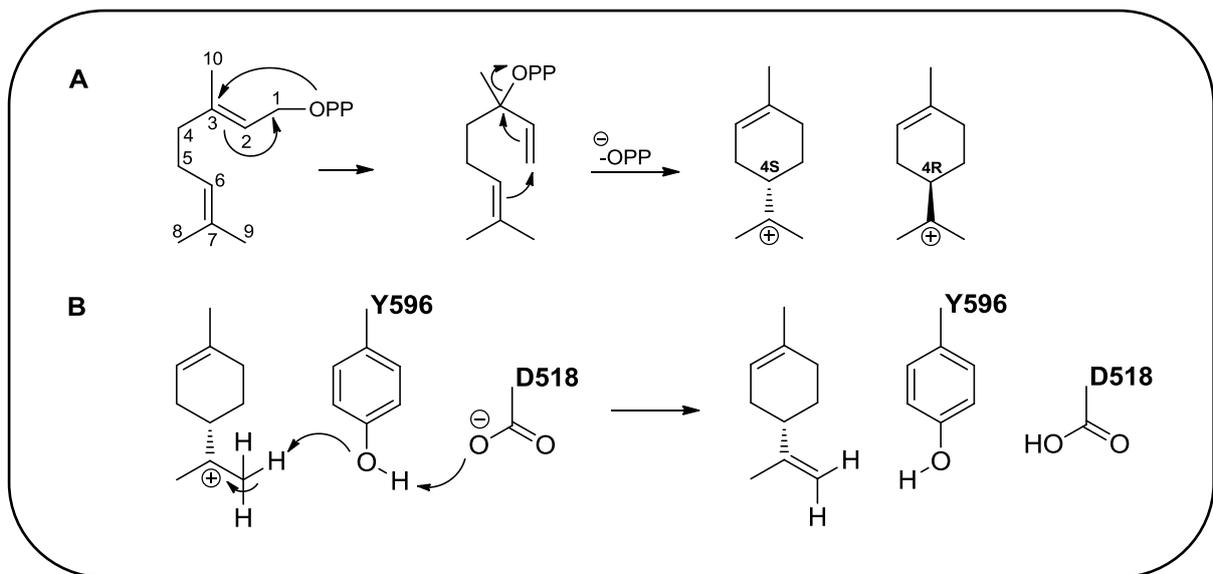


Abbildung 4.10: Modell des aktiven Zentrums der CsTPS1. Dargestellt sind die Aminosäuren, welche aktiv an der Limonenbildung beteiligt sein könnten.

Um nun Limonen bilden zu können, ist eine Protonenabstraktion am C₉ des Terpinylkations von Nöten. Hier wird eine katalytische Diade aus Tyrosin und Aspartat postuliert (Schema 4.2 B). Das terminale Proton der Prenylkationeinheit liegt nah am Hydroxyl-Sauerstoffatom des Tyrosins 596, welches selbst eine Wasserstoffbrücke zum Aspartat 518 bilden kann. Dieser Protonentransfer resultiert in der Entstehung eines Phenolat-Anions des Tyrosins 596, welches daraufhin weiterhin ein Proton vom 4S- α -Terpinylkation abstrahiert. Die Reaktion der Limonenbildung ist abgeschlossen. Der postulierte Reaktionsmechanismus wird durch die Mutationsstudien dieser Arbeit gestützt. Die CsTPS1-Mutante Y596A zeigt keine Limonenproduktion. Es ist ein annähernd vollständiger Aktivitätsverlust zu verzeichnen. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass das Tyrosin 596 essentiell für die Katalyse ist. Den zweiten putativen Aktionspartner der katalytischen Diade soll das Aspartat 518 darstellen. Auch hier unterstützen die Ergebnisse dieser Arbeit diese Annahme. Wird das Aspartat gegen ein Alanin ausgetauscht, ist kein Protonenakzeptor mehr zugegen und es wird kein Limonen gebildet. Eine Mutation an Stelle des Aspartat 518 zu Asparagin zeigt hingegen eine geringe Bildung des Limonens. Hier könnte der Protonentransfer durch die funktionelle Amidgruppe zu einem gewissen Anteil gewährleistet werden. Das zuvor diskutierte Histidin 602, als Bestandteil der katalytischen Diade, scheint unwahrscheinlich. Laut Modell (Abbildung 4.3) befindet sich dieses zu weit vom Tyrosin 596 entfernt, um an einem Protonentransfer beteiligt sein zu können.



Schema 4.2: A: Mechanismus der α -Terpinylkation Bildung. B: Bildung von (-)-Limonen über einen Protonentransfer vom C_{8/9}-Atom des Terpinylkations zum Tyrosin 596 weiter zum Aspartat 518.

Die durchgeführten Sekundärstrukturanalysen bestätigen ebenfalls, dass die generierten Mutanten dieselbe Sekundärstruktur aufweisen wie der Wildtyp. Demnach kann angenommen werden, dass die Mutanten Y596A und D518A durch Ausbleiben des Protonentransfers die Limonenbildung hindern und nicht die Sekundärstruktur des Proteins verändert wird. Die Funktion der postulierten katalytischen Diade kommt zum Erliegen, womit die essentielle Bedeutung von Tyrosin 596 und Aspartat 518 bewiesen ist. Anders sieht die Sekundärstrukturanalyse der CsTPS1-Mutante D600A aus. Hier zeigt sich deutlich, dass durch die besagte Mutation eine strukturelle Veränderung im Enzym stattgefunden hat. Laut 3D-Modell soll sich das Aspartat 600 in einer Schleifenstruktur außerhalb des aktiven Zentrums befinden (Abbildung 4.3). Im Modell kann beobachtet werden, dass bei Substratbindung eine Konformationsänderung im Enzym stattfindet. Damit könnte dem Aspartat 600 die Funktion eines molekularen Schalters zugesprochen werden. Durch die Mutation einer anionischen Aminosäure zu einer neutralen, kann keine Salzbrücke mehr gebildet werden und die Schleifenstruktur ist beschädigt. Diese Hypothese würde einen Hinweis auf die stark reduzierte Aktivität der CsTPS1-Mutante D600A geben. Im Rahmen der Diplomarbeit von Herrn Weigel konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der CsTPS1-Mutante D600N zwar stark gemindert, jedoch eine vergleichbare Produktverteilung wie im Wildtyp erzeugt.⁶ Demnach scheint die funktionelle Amidgruppe des Asparagins anteilig die Schleifenstruktur der Limonensynthase gewährleisten zu können. Mit diesen Mutationsstudien kann exemplarisch gezeigt werden, dass die Enzyme aufgrund ihrer räumlichen Struktur nicht nur als passive Katalysatoren, sondern durchaus aktiv an der Katalysereaktion beteiligt sind.⁹ Aliphatische und aromatische Aminosäuren stabilisieren das Carbokation. Saure und basische Aminosäuren begünstigen den Protonentransfer.¹⁰

Weiterhin erlaubt die Orientierung der Aminosäurereste den Enzymen die Reaktion über einen spezifischen Bildungsweg ablaufen zu lassen und zeitgleich den Wassereintritt in das aktive Zentrum zu kontrollieren.^{11,12}

Die enzymkinetischen Messungen der CsTPS1 wurden in der vorliegenden Arbeit erstmals mittels ¹H-NMR Spektroskopie analysiert. Der Vorteil dieser Methode ist die Messung in homogener Lösung. Hierbei kann die Reaktion direkt *in situ* beobachtet werden, ohne das Substrat radioaktiv zu markieren. Weiterhin ist die Anzahl der zu messenden Proben stark reduziert. Die Konzentration des Enzyms bleibt unverändert, wobei unterschiedliche Substratkonzentrationen in der Reaktion eingesetzt werden. Die Änderung der Substratkonzentration als Funktion über die Zeit stellt eine simple und effiziente Methode dar, um kinetische Parameter mit einer minimalen Anzahl von Experimenten zu erhalten.¹³ Tabelle 4.3 zeigt kinetische Parameter der Limonensynthase erhalten durch verschiedene Messmethoden. In den einführenden Arbeiten zur Charakterisierung der CsTPS1 von GÜNNEWICH wurde die Enzymkinetik über radioaktiv markiertes GPP analysiert.^{2,3} Die nachfolgende Diplomarbeit von Herrn Weigel führte erstmals kinetische Untersuchungen an der CsTPS1 mittels isothermaler Titrationskalorimetrie (ITC) durch.⁶ Hierbei wird die Wärmeabgabe gemessen, die während der Wechselwirkung zwischen Enzym und Substrat freigesetzt wird. Vergleicht man die kinetischen Parameter, erhalten über die unterschiedlichen Messvarianten, ist zu erkennen, dass die K_m und k_{cat} Werte annähernd vergleichbar sind. Damit kann gezeigt werden, dass die ¹H-NMR-Spektroskopie durchaus als effiziente Methode für enzymkinetische Messungen genutzt werden kann.

Tabelle 4.3: Gegenüberstellung kinetischer Parameter der Limonensynthase (WT) erhalten über unterschiedliche Messmethoden (1-³H-GPP: radioaktiv markiertes Substrat, ITC: isothermale Titrationskalorimetrie, ¹H-NMR: ¹H-Kernspinresonanzspektroskopie).

Methode	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m [$(\mu\text{M}\cdot\text{s})^{-1}$]
1- ³ H-GPP	11,76 ± 2,75	0,13	11,05 * 10 ⁻³
ITC	15,4 ± 0,23	0,092	5,99 * 10 ⁻³
¹ H-NMR	13,26 ± 4	0,074	5,58 * 10 ⁻³

4.4 Referenzen

1. Kusari, P.; Spitteller, M.; Kayser, O.; Kusari, S. Recent advances in research on *Cannabis sativa* L. endophytes and their prospect for the pharmaceutical industry. In *Microbial diversity and biotechnology in food security*, **2014**; 3-15.
2. Günnewich, N.; Page, J. E.; Köllner, T. G.; Degenhardt, J.; Kutchan, T. M. Functional expression and characterization of trichome-specific (-)-limonene synthase and (+)-pinene synthase from *Cannabis sativa*. *Natural Communications* **2009**, *2*, 223-232.
3. Günnewich, N. Dissertation. Expression and characterization of terpene synthases from *Cannabis sativa* L. and *Salvia sclarea* L. **2008**.
4. Bräuer, L. Modellierung- und Mutationsstudien an ausgewählten prenylierenden Enzymen. *Dissertation* **2006**, MLU Halle.
5. Whittington, D. A.; Wise, M. L.; Urbansky, M.; Coates, R. M.; Croteau, R. B.; Christianson, D. W. Bornyl diphosphate synthase: structure and strategy for carbocation manipulation by a terpenoid cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **2002**, *99* (24), 15375-15380.
6. Weigel, B.. Biotransformationen mit *Cannabis sativa* Monoterpensynthasen. *Diplomarbeit* **2011**, MLU Halle.
7. Hyatt, D. C.; Youn, B.; Zhao, Y.; Santhamma, B.; Coates, R. M.; Croteau, R. B.; Kang, C. Structure of limonene synthase, a simple model for terpenoid cyclase catalysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **2007**, *104* (13), 5360-5365.
8. Brandt, W.; Bräuer, L.; Günnewich, N.; Kufka, J.; Rausch, F.; Schulze, D.; Schulze, E.; Weber, R.; Zakharova, S.; Wessjohann, L. Molecular and structural basis of metabolic diversity mediated by prenyldiphosphate converting enzymes. *Phytochemistry* **2009**, *70* (15-16), 1758-1775.
9. Miller, D. J.; Allemann, R. K. Sesquiterpene synthases: passive catalysts or active players? *Nat. Prod. Rep.* **2012**, *29* (1), 60-71.
10. Srividya, N.; Davis, E. M.; Croteau, R. B.; Lange, B. M. Functional analysis of (4S)-limonene synthase mutants reveals determinants of catalytic outcome in a model monoterpene synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **2015**, *112* (11), 3332-3337.
11. Major, D. T.; Weitman, M. Electrostatically guided dynamics--the root of fidelity in a promiscuous terpene synthase? *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (47), 19454-19462.
12. Major, D. T.; Freud, Y.; Weitman, M. Catalytic control in terpenoid cyclases: multiscale modeling of thermodynamic, kinetic, and dynamic effects. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *21*, 25-33.
13. Exnowitz, F.; Meyer, B.; Hackl, T. NMR for direct determination of $K_{(m)}$ and $V_{(max)}$ of enzyme reactions based on the Lambert W function-analysis of progress curves. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1824* (3), 443-449.

5. Materialien und Methoden

5.1 Materialien

5.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Alle verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien sind mit Typ- und Herstellerangaben im Anhang aufgelistet (Tabelle 8.1).

5.1.2 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden in der höchsten, erhältlichen Reinheitsstufe bezogen. Eine detaillierte Auflistung aller verwendeten Chemikalien und deren Herstellerfirmen befinden sich im Anhang (Tabelle 8.2). Das für alle Reaktionen, sowie zur Herstellung von Medien und Puffern benutzte Reinstwasser entstammt einer *MilliQ biocel* - Anlage (*Millipore, Billerica, USA*).

5.1.3 Enzyme

Die verwendeten Enzyme *Pfu* DNA Polymerase (2,5 U/ μ L), *DreamTaq*[™] DNA Polymerase (5 U/ μ L) und *FastDigest*[®] *DpnI* wurden von *Fermentas* bezogen. Das Lysozym aus Hühnereiweiß stammt von *Sigma Aldrich*.

5.1.4 Antikörper

Alle verwendeten Antikörper sind der Tabelle 5.1.1 zu entnehmen.

Tabelle 5.1.1: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Antikörper (Ak). Angegeben ist jeweils der Name des Primär- bzw. des Sekundärantikörpers, der Wirtsorganismus für die Herstellung des Antikörpers und die jeweilige Verdünnung des Antikörpers für die Anwendung im Western-Blot.

Antikörper	produziert in	Verdünnung
<i>Primärer Ak</i>		
α-His	Maus	1 : 3000
α-MBP	Maus	1 µg/mL
<i>Sekundärer Ak</i>		
Goat Anti-Mouse (für α-His)	Maus	1 : 10000
Goat Anti-Mouse (für α-MBP)	Maus	1 : 4000

5.1.5 Bakterienstämme

Alle verwendeten *E. coli* Bakterienstämme wurden von *Invitrogen* bezogen und sind der Tabelle 5.1.2 zu entnehmen.

Tabelle 5.1.2: Verwendete Bakterienstämme mit entsprechendem Genotyp.

Bakterienstamm	Genotyp
<i>E. coli</i> TOP10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ(<i>ara-leu</i>) 7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i> λ-
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F- <i>ompT hsdSB</i> (rB-mB-) <i>gal dcm</i> (DE3)

5.1.6 Plasmide

Die nachfolgende Tabelle zeigt eine Übersicht der verwendeten Vektoren zur Herstellung neuer Konstrukte.

Tabelle 5.1.3: Verwendete Plasmide. Neben der Plasmidbezeichnung sind die Eigenschaften und die Herkunft angegeben.

Plasmid	Fusionspeptid	Fusions-Tag	Selektionsmarker	Hersteller
pET101/D-TOPO®	C-terminal	V5, 6xHis	Ampicillin	Invitrogen™
pDEST-N112-MBP	N-terminal	MBP, 10xHis	Ampicillin	M.R. Dyson ¹

5.1.7 Oligonukleotide

Alle aufgeführten Oligonukleotide wurden von den Firmen *biomers.net* oder *Eurofins MWG Operon* bezogen. Die korrespondierenden Schmelztemperaturen (T_m in °C) sind Herstellerangaben. Die Nachsilben "for" und „rev“ entsprechen dabei den vorwärts bzw. rückwärts orientierten Oligonukleotiden. Die entsprechenden Sequenzen sind den Tabellen 5.1.4 – 5.1.6 zu entnehmen.

Tabelle 5.1.4: Oligonukleotide für UbiA-Mutationsstudien.

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')	T_m
ubiA_W152A_for	CGTTTGGCGCGTCGATTCCAATGGCTTTTGCCGCTGT	75
ubiA_W152A_rev	ACAGCGGCAAAAGCCATTGGAATCGACGCGCCAAACG	75
ubiA_W152F_for	CGTTTGGCTTCTCGATTCCAATGGC	65
ubiA_W152F_rev	GCCATTGGAATCGAGAAGCCAAACG	65
ubiA_W152M_for	CGTTTGGCATGTTCGATTCCAATGGCTTTTGCCGCTGT	73
ubiA_W152M_rev	ACAGCGGCAAAAGCCATTGGAATCGACATGCCAAACG	73
ubiA_W152S_for	GCCATTGGAATCGACGAGCCAAACG	68
ubiA_W152S_rev	GCCATTGGAATCGACATGCCAAACG	68

Tabelle 5.1.5: Oligonukleotide für CsTPS1-Mutationsstudien.

Bezeichnung	Sequenz (5` - 3`)	T _m
CsTPS1_D518N_for	CGACTTGCAAATGATCTAGG	55
CsTPS1_D518N_rev	CCTAGATCATTGCAAGTCG	55
CsTPS1_D600N_for	CCAGTATGGCAATGGACATGC	60
CsTPS1_D600N_rev	GCATGTCCATTGCCATACTGG	60
CsTPS1_Y595A_for	GAGCGTCACAATTCATAGCCCAGTATGGC	66
CsTPS1_Y595A_rev	GCCATACGTGGCTATGAATTGTGACGCTC	66
CsTPS1_D518A_for	CGACTTGCAGCTGATCTAGG	50
CsTPS1_D518A_rev	CCTAGATCAGCTGCAAGTCG	50

Tabelle 5.1.6: Sonstige Oligonukleotide. Oligonukleotide mit der Bezeichnung „ubiA_TOPO_for bzw. -_rev“ dienen der Umklonierung von UbiA; die Oligonukleotide mit dem Suffix „seq“ werden zur sequenziellen Überprüfung der genspezifischen Mutationen verwendet; die T7-Oligonukleotide finden bei Sequenzierungen Gebrauch.

Bezeichnung	Sequenz (5` - 3`)	T _m
ubiA_TOPO_for	CACCATGGAGTGGAGTCTGACGC	66
ubiA_TOPO_rev	TCCTCAGAAATGCCAGTAACTCATTGCCAGC	68
ubiA_W152mut_seq	CGATGACCATTCTGTTGTCG	51
CsTPS1sdm_seq	GTGAATCATGCTTTGGAGATG	56
CsTPS1_Y959mut_seq	GCTTCTGAAGATGAAGCTCGTGAG	56
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	
T7_term	CTAGTTATTGCTCAGCGGT	

5.1.8 Puffer und Lösungen

5.1.8.1 Gelelektrophorese / Western Blot

Puffer / Lösung	Zusammensetzung
50 x TAE-Puffer	2 M Tris 0,1 M EDTA 1 M Essigsäure pH 8,0
10 x SDS-PAGE Laufpuffer	1 % (w/v) SDS 250 mM Tris 2 M Glycin
5 x SDS-PAGE Probenpuffer	10 % (w/v) SDS 10 mM β -Mercaptoethanol 20 % (v/v) Glycerin 0,2 M Tris HCl 0,05 % (w/v) Bromphenolblau
Coomassie-Färbelösung	80 mg/L Coomassie-Brilliant Blue G-250 35 mM HCl
10 x Transfer-Puffer	25 mM Tris HCl 150 mM Glycin 10 % (v/v) Methanol
10 x TBST	200 mM Tris HCl 1,5 M NaCl 1 % (v/v) Tween 20

5.1.8.2 Proteinreinigung

Puffer / Lösung	Zusammensetzung
CsTPS1 Lysispuffer	50 mM Tris HCl 500 mM NaCl 2,5 mM Imidazol 10 mM β -Mercaptoethanol 10 % (v/v) Glycerin 1 % (v/v) Tween 20 pH 7 → Zugabe von Lysozym [750 μ g/mL] direkt vor Gebrauch
CsTPS1 Waschpuffer	50 mM Tris HCl 500 mM NaCl 2,5 mM Imidazol 10 mM β -Mercaptoethanol 10 % (v/v) Glycerin pH 7
CsTPS1 Elutionspuffer	50 mM Tris HCl 500 mM NaCl 250 mM Imidazol 10 mM β -Mercaptoethanol 10 % (v/v) Glycerin pH 7
CsTPS1 Probenpuffer	10 mM MOPSO 1 mM 1,4-DTT 20 mM $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ 10 % (v/v) Glycerin pH 7
UbiA Puffer B ₁	50 mM Tris HCl 10 mM 1,4-DTT pH 7,8

Puffer / Lösung	Zusammensetzung
UbiA Puffer B ₂	50 mM Tris HCl 2 mM 1,4-DTT pH 7,8
Entfärberlösung	100 mM NH ₄ HCO ₃ 30 % (v/v) Acetonitril
Reduzierlösung	100 mM NH ₄ HCO ₃ 10 mM 1,4-DTT
Alkylierlösung	100 mM NH ₄ HCO ₃ 54 mM Iodoacetamid
Extraktionslösung	35 % (v/v) Acetonitril 65 % (v/v) H ₂ O 0,4 % (v/v) TFA
Verdaulösung	50 mM NH ₄ HCO ₃ 5 % (v/v) Acetonitril

5.2 Methoden

5.2.1 Molekularbiologische Methoden

5.2.1.1 Stammhaltung

Bei 4°C ist die Lagerung der Bakterien auf geeigneten Agarplatten, verschlossen mit Parafilm, bis zu drei Wochen möglich. Für eine längere Konservierung wurden Glycerinkulturen angefertigt. Hierfür werden die Übernachtskulturen mit Glycerin (Endkonzentration 20 %) versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

5.2.1.2 Kultivierung von *Escherichia coli* (*E. coli*)

Zur Übernachtkultivierung der *E. coli* Bakterien wurde das Vollmedium *lysogeny broth* (LB) verwendet.²

LB-Medium: 1 % (w/v) Trypton/Pepton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) NaCl gelöst in deionisiertem Wasser, mit NaOH-Lösung auf pH 7,0 eingestellt. Den Festmedien wurde entsprechend 1,5 % (w/v) Agar zugesetzt.

Für die Anzucht von Übernachtkulturen in Flüssigmedien werden Kultivierröhrchen mit 5 mL LB-Medium und entsprechendem Antibiotikum befüllt. Mittels eines autoklavierten Zahnstochers wird Zellmaterial vom gewünschten Klon oder von Glycerinkulturen in das vorbereitete Reaktionsgefäß überführt und über Nacht bei 37°C und 200 Upm inkubiert.

5.2.1.3 Hitzeschock-Transformation in *E. coli* Zellen

Zunächst werden chemisch kompetente *E. coli* Zellen auf Eis aufgetaut und mit der zu transformierenden DNA (2 µL Plasmid-DNA) gemischt. Der Reaktionsansatz wird für 30 min auf Eis gestellt und anschließend für 40 sec bei 42°C im Wasserbad transformiert. Nach diesem Hitzeschock wird das Reaktionsgefäß erneut für 2 min auf Eis gestellt. Für Transformation der *E. coli* Zellen wird das Komplexmedium *super optimal broth with catabolite repression* (SOC) der Firma *Invitrogen* verwendet.³

SOC-Medium: 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 2 % (w/v) Trypton/Pepton, 20 mM Glucose, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ in deionisiertem Wasser mit einem pH-Wert 7. Das verwendete Medium ist Bestandteil des *One Shot*[®] TOP10 Kits von *Invitrogen*.

Nach Zugabe von 250 µL SOC-Medium wird der Transformationsansatz eine Stunde bei 37°C und 200 Upm inkubiert. Zur Positiv-Selektion der transformierten Zellen wird die Zellsuspension auf ampicillinhaltige Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

5.2.1.4 Plasmidpräparation mittels *QIAprep Spin Miniprep Kit* (QIAGEN)

Plasmidhaltige *E.coli* Zellen werden wie in Kapitel 5.2.1.2 beschrieben, angezogen. Für die Isolierung der DNA wird die Plasmidpräparation nach Herstellerangaben durchgeführt. Hierfür werden die Zellen der Übernachtskultur für 3 min bei 13000 Upm abzentrifugiert und lysiert. Das Lysat wird mittels Zentrifugation von Proteinen und Zelltrümmern getrennt und auf die *QIAprep Spin Column* überführt. Mittels Kieselgelmembran werden genomische DNA und RNA abgetrennt und die reine Plasmid-DNA mit 50 μL *Aqua dest.* eluiert.

5.2.1.5 Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung der DNA-Lösung erfolgt über die Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die gemessene Nukleinsäure-Lösung soll im linearen Bereich (0,1 - 1) liegen. Zur Bestimmung der Konzentration wird auf 2 μL Nukleinsäure-Lösung 68 μL *Aqua dest.* gegeben und im Photometer vermessen. Als Referenz dienen 70 μL *Aqua dest.* Eine $OD_{260\text{nm}}$ von 1 entspricht dabei in etwa einer dsDNA-Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, wobei der Extinktionsquotient $E_{260\text{ nm}}/E_{280\text{ nm}}$ als Maß für die Reinheit der DNA gilt. Ein Verhältnis von 1,8 weist dabei auf eine reine DNA-Lösung hin.

Formel 5.1: Bestimmung der Konzentration von dsDNA. VF = Verdünnungsfaktor

$$c \left[\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right] = OD_{260} \times VF \times \frac{50\mu\text{g}}{\text{mL}}$$

5.2.1.6 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die Plasmid-DNA wird aus einer Übernachtskultur isoliert (Kapitel 5.2.1.4) und die Sequenzierung erfolgt durch *Eurofins MWG Operon*. Als Sequenzierungs-Oligonukleotide dienen dabei gen- oder vektorspezifische Oligonukleotide (Sequenzen siehe Kapitel 5.1.7).

5.2.1.7 Polymerasekettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR)

Bei der Polymerasekettenreaktion werden DNA-Fragmente vervielfältigt. Diese Methode wird zum einen zum Einfügen von Punktmutationen (Kapitel 5.2.1.7.1) und zum anderen zur schnellen Überprüfung von rekombinanten Klonen (Kapitel 5.2.1.7.2) genutzt.

5.2.1.7.1 Zielgerichtete Mutagenese

Durch Amplifikation zweier komplementärer Oligonukleotiden, welche die gewünschte Mutation enthalten, wird das Plasmid zielgerichtet mittels PCR mutiert. Nachfolgend werden die verschiedenen Mutationsansätze einem *DpnI*-Verdau unterzogen. *DpnI* verdaut die maternalen, methylierten Stränge, wobei gewährleistet werden kann, dass der nachfolgende Transformationsansatz nur amplifizierte Tochterstränge mit der gewünschten Mutation enthält.

PCR-Ansatz zur Mutagenese

10 x <i>Pfu</i> DNA Polymerase Puffer mit MgSO ₄	5 µL
dNTP Mix (je 10 mM)	1 µL
Vorwärts-Oligonukleotide (10 pmol/µL)	1 µL
Rückwärts-Oligonukleotide (10 pmol/µL)	1 µL
DNA <i>Template</i>	1 µL
<i>Pfu</i> DNA Polymerase (2 – 3 U/µL)	1 µL
<i>Aqua dest.</i>	ad 50 µL

	Temperatur	Zeit	Zyklen
Anfängliche Denaturierung	95°C	2 min	1
Denaturierung	95°C	1 min	35
Oligonukleotidhybridisierung	T _m	30 sec	
Elongation	72°C	2 min / 1 kb	
Finale Elongation	72°C	5 min	1

Das PCR-Produkt wird daraufhin mit 1 µL *DpnI* versetzt, 5 min bei 37°C, nachfolgend 5 min bei 80°C inkubiert und 3 µL der PCR-Reaktion transformiert.

5.2.1.7.2 Kolonie-PCR

Diese Methode wird zum schnellen Nachweis von Plasmid-DNA in transformierten Bakterien durchgeführt. Hierbei dient das Koloniematerial direkt als DNA-Vorlage, welche entsprechend mit genspezifischen Oligonukleotiden amplifiziert wird. Nach Ablauf der Reaktion werden die Fragmente mittels Agarosegelelektrophorese untersucht (Kapitel 5.2.1.9). Zudem wird das Koloniematerial einzeln auf einer mit Nummern unterteilten Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Jeder Kolonie ist somit eine Nummer zugeordnet. Bei positiven Kolonien können, zur weiteren Analyse, von dieser Agarplatte Übernachtkulturen angezogen werden.

Ansatz für die Kolonie-PCR

10 x <i>DreamTaq</i> TM Puffer	1 µL
dNTP Mix (je 10 mM)	1 µL
Vorwärts-Oligonukleotide (10 pmol/µL)	0,1 µL
Rückwärts-Oligonukleotide (10 pmol/µL)	0,1 µL
<i>DreamTaq</i> TM Polymerase	0,5 µL
<i>Aqua dest.</i>	ad 20 µL
DNA-Vorlage: Koloniematerial	

	Temperatur	Zeit	Zyklen
Anfängliche Denaturierung	95°C	2 min	1
Denaturierung	95°C	30 s	30
Oligonukleotidhybridisierung	T _m - 5°C	30 s	
Elongation	72°C	1 min / 1 kb	
Finale Elongation	72°C	7 min	1

5.2.1.8 Klonierungsstrategien

5.2.1.8.1 Klonierung mittels TOPO[®]-Klonierungs-Technologie

Bei der TOPO[®]-Klonierungsstrategie handelt es sich um eine schnelle und effiziente Methode zur gerichteten Restriktionsenzym-unabhängigen Insertion eines PCR-Produkts in einen Plasmidvektor. Sie basiert auf der enzymatischen Aktivität der Topoisomerase I aus dem *Vaccinia* Virus, der sowohl DNA spalten, als auch ligieren kann. Zunächst bindet die

Topoisomerase an eine definierte Stelle der doppelsträngigen DNA und spaltet das Phosphodiester-Rückgrat eines DNA-Stranges. Hierdurch wird ein einzelsträngiger 3'-Überhang erzeugt, welcher komplementär zu dem einzuführenden PCR-Produkt ist. Dieses PCR-Produkt wird über PCR mit dem entsprechenden Überhang hergestellt. Die Topoisomerase kann nun das *Insert* und den Vektor miteinander verknüpfen. Mit Hilfe dieser Reaktion kann ein sogenannter Eingangsvektors (*entry vector*) generiert werden. Dieser dient als Ausgangsvektor zur Klonierung eines bestimmten DNA-Fragments in verschiedene Zielvektoren (*destination vector*) des Gateway™-Systems. Die TOPO®-Klonierungsreaktion wird nach Angaben des Herstellers (*Invitrogen*) durchgeführt.

5.2.1.8.2 Klonierung mittels Gateway™-Technologie

Die Gateway™-Technologie erlaubt den Transfer von DNA-Fragmenten zwischen verschiedenen Klonierungsvektoren ohne den Gebrauch von Restriktionsenzymen und Ligasen. Die Grundlage dieser Methode stellt das sequenzspezifische Rekombinationssystem des Bakteriophagen λ . Dieser Bakterienvirus kann während des lysogenen Zyklus in das bakterielle Genom integrieren. Für diese Integration werden zwei homologe DNA-Sequenzen, die sogenannten *attachment sites*, der Phagen (*attP*) und der Bakterien (*attB*) benötigt. Zunächst muss das zu exprimierende Zielgen mit der Erkennungssequenz (*attB*) modifiziert werden. Im nächsten Schritt wird das im Zielvektor enthaltene *ccdB* Gen gegen das DNA-Fragment ausgetauscht. Bei dem *ccdB* Gen handelt es sich um ein Suizidgen, welches die Gyrase hemmt. Somit können nach erfolgter Transformation nur Bakterien wachsen, welche ein Expressionsplasmid enthalten. Das *ccdB* Gen enthält an beiden Seiten die *attP*-Verbindungsstelle. Diese Stelle korrespondiert mit der *attB*-Erkennungssequenz des Zielgens. In dem so erzeugten Eingangsklon werden damit *attL*-Sequenzen generiert. Als Nebenprodukt wird das mit den *attR*-Stellen flankierte Selbstmordgen erhalten. Der finale Schritt besteht aus der Reaktion zwischen dem Eingangsklon und dem Zielvektor, welcher das von den *attR*-Stellen flankierte *ccdB* Gen enthält. Hier wird das *Insert* über Rekombination zwischen den *att*-Stellen des Eingangsklons (*attL*) und des Zielvektors (*attR*) in den Zielvektor integriert. Hierbei werden im Expressionsvektor erneut die *attB*-Seiten generiert. Da der Zielvektor eine andere Antibiotikaresistenz als der Eingangsklon besitzt und als Nebenprodukt erneut ein *ccdB* tragendes Plasmid generiert wird, wachsen nur die gewünschten Transformanten selektiv. Die Gateway™-Reaktion wird nach Angaben des Herstellers (*Invitrogen*) durchgeführt.

5.2.1.9 DNA-Agarosegelelektrophorese

Zur größenabhängigen Trennung und Analyse von Nukleinsäuren wird die Agarosegelelektrophorese eingesetzt. Die Durchführung erfolgt in horizontalen Flachbettapparaturen. Dazu wird 1-2 % (w/v) Agarose in 1x TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst und nach Abkühlen mit 0,002 % (v/v) einer Ethidiumbromidlösung (10 mg/mL) versetzt. Die noch flüssige Agaroselösung wird in die Gelapparatur gegossen, mit einem Kamm zur Taschenbildung versehen und dort bis zum Aushärten belassen. Vor dem Auftragen der DNA-Proben werden diese mit 0,2 Volumen Ladepuffer versetzt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt bei konstanter Spannung von 100V bis die Bromphenolblau-Bande etwa ein Drittel des Gels durchlaufen hat. Nach Beendigung der Elektrophorese wird die DNA mit Ethidiumbromid nachgewiesen. Aufgrund der interkalierenden Wirkung des Ethidiumbromids, kann die Nukleinsäuren auf einem UV-Transilluminator bei einer Wellenlänge von 312 nm sichtbar gemacht und fotografiert werden.

5.2.2 Biochemische Methoden

5.2.2.1 Proteinexpression und Zellernte

Für die *E. coli* Kultivierung im Schüttelkolben wird 1 L LB-Medium mit Ampicillin (Endkonzentration 100 µg/mL) versetzt und mit einer 1:20 Verdünnung einer Übernachtskultur angeimpft. Die Inkubation erfolgt bei 37°C und 200 Upm. Nach Erreichen einer optischen Dichte von ~0,6 bei 600 nm wird die Expression des Zielproteins mit Zugabe von 1 M IPTG-Lösung induziert. Nach ca. 20 h werden die Zellen geerntet. Dazu wird die Kultur für 10 min bei 4°C und 10000 Upm zentrifugiert. Das erhaltene Bakterienpellet wird einem Zellaufschluss unterzogen oder bei -80°C gelagert.

5.2.2.2 Zellaufschluss mittels Ultraschall

Um das Zielprotein aus den Zellen freizusetzen, wird das Pellet in 20 mL CsTPS1 Lysispuffer suspendiert und eine Stunde unter Schütteln auf Eis inkubiert. Unter Eiskühlung wird das Lysat mit Ultraschall bei 70 % Puls 90 s behandelt. Anschließend wird erneut 20 min bei 4°C und 10000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wird nachfolgend weiter aufbereitet.

5.2.2.3 Proteinreinigung

5.2.2.3.1 Proteinreinigung (CsTPS1) mittels Metallaffinitätschromatographie

Das Protein CsTPS1 wird mit Hilfe des Expressionsvektors pET101/D-TOPO[®], an dessen C-Terminus sich ein poly-Histidin-Tag befindet, in *E. coli* exprimiert. Die Reinigung mit dem TALON[®] Metallaffinitäts-Resin ist eine immobilisierte Metallaffinitätschromatographie (IMAC), wobei das divalente Cobalt-Kation die poly-Histidine spezifisch binden kann. Zu Beginn der Reinigung werden 2 mL der TALON[®]-Suspension zweimal mit 10 mL CsTPS1-Waschpuffer equilibriert. Nachfolgend wird das TALON[®]-Harz mit dem Bakterienlysate (Kapitel 5.2.2.2) für eine Stunde unter Eiskühlung auf einem Plattformschüttler inkubiert. Ungebundene Proteine werden anschließend durch zweimaliges Waschen mit CsTPS1-Waschpuffer entfernt. Die TALON[®]-Suspension wird danach in eine leere Gravitationssäule überführt. Die Elution des Proteins erfolgt mit einem CsTPS1-Elutionspuffer durch erhöhte Imidazol-Konzentration. Imidazol konkurriert mit den Histidinresten um die Bindung zu den Metallkationen. Die Entsalzung der konzentrierten Proteinlösung erfolgt mittels PD-10 Säulen nach Herstellerangaben.

5.2.2.3.2 Proteinreinigung membrangebundener Enzyme (UbiA)

Das Bakterienpellet (Kapitel 5.2.2.1) wird in 10 mL UbiA Puffer B₁ suspendiert und wie in Kapitel 5.2.2.2 beschrieben mit Ultraschall behandelt. Die aufgeschlossene Zellsuspension wird daraufhin 20 min bei 4°C und 10000 Upm zentrifugiert. Die erhaltene klare Lösung wird nachfolgend eine Stunde bei 4°C und 40000 Upm im Vakuum ultrazentrifugiert. Das farblose gallertartige Pellet enthält die Membranfraktion, die anschließend in 10 mL UbiA Puffer B₂ suspendiert wird.

5.2.2.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

SDS ist ein anionisches Detergens, welches effizient an Proteine bindet und die Eigenladung der Proteine maskiert. Zudem denaturiert es die Proteine und verhindert Protein-Protein-Wechselwirkungen. Somit ist eine Auftrennung der SDS-Protein-Komplexe im elektrischen Feld in einem porösen Polyacrylamidgel nach ihrem Molekulargewicht möglich. Vorbereitend werden die Proben 1 : 5 mit 5 x SDS-PAGE Probenpuffer versetzt und 5 min auf 95°C

erhitzt. Durch das im Probenpuffer enthaltene SDS und β -Mercaptoethanol werden Tertiär- und Sekundärstrukturen zerstört. Nach der Probenvorbereitung werden die Gele gegossen. Ein diskontinuierliches System aus zwei Gelen nach LAEMMLI fand Anwendung⁴. Trenn- und Sammelgel unterscheiden sich in Bezug auf den pH-Wert, die Ionenstärke und die Porengröße. Das gegossene Gel wird daraufhin in die mit 1 x SDS-PAGE Laufpuffer gefüllte Gelkammer gestellt, mit 20 μ L der Proben und 5 μ L des Protein-Markers beladen. Nach Anlegen von 80 V im Sammelgel und 120 V im Trenngel wandert der SDS-Protein-Komplex im elektrischen Feld zum Pluspol durch das Gel. Nach Beendigung der Elektrophorese wird das Gel aus der Kammer genommen, das Sammelgel abgetrennt und das Trenngel dreimal mit Wasser gewaschen, bevor es mit der Coomassie-Lösung gefärbt wird.

Lösung	Tenngel (10%ig)	Sammelgel (5%ig)
<i>Aqua dest.</i>	4,8 mL	3,645 mL
40 % Acrylamid	2,5 mL	0,625 mL
Tris (1,5 M; pH 8,8)	2,5 mL	/
Tris (1 M; pH 6,8)	/	0,630 mL
10 % SDS	100 μ L	50 μ L
10 % APS	100 μ L	50 μ L
TEMED	10 μ L	5 μ L

5.2.2.5 Coomassie-Färbung⁵

Das gewaschene Proteingel wird mit Coomassie-Färbelösung ca. 10 s bei 360 Watt in der Mikrowelle erhitzt und nachfolgend 15-30 min auf einem Plattformschüttler inkubiert. Daraufhin wird das gefärbte Gel dreimal mit Wasser gewaschen und über Nacht entfärbt.

5.2.2.6 Western-Blot

Beim Western-Blot handelt es sich um ein Verfahren zum selektiven Visualisieren von Proteinen in einem Proteingemisch. Beginnend wird das Proteom mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteinbanden werden danach für den Western Blot aus dem Gel auf eine feste Nitrozellulose-Trägermembran transferiert. Dieser Übergang erfolgt über die negative Ladung der SDS-Proteinkomplexe im Elektrotrot. Aufgrund hydrophober Wechselwirkungen bleiben die Proteine an der Membranoberfläche haften und sind für die Antikörperbindung zur Detektion zugänglich.

Der durchgeführte Western-Blot erfolgte nach der „*semi-dry*“ Methode. Hierfür wird eine Lage *Whatman*-Papier mit Transferpuffer angefeuchtet und auf die Metallplatte der Blotting-Kammer gelegt. Das SDS-Gel wird daraufhin mit Transferpuffer gespült und auf dem *Whatman*-Papier platziert. Die Transfermembran wird auf die entsprechende Gelgröße zurechtgeschnitten und nachfolgend auf das SDS-Gel gelegt. Luftblasen werden durch Rollen mit einem Glasstab entfernt. Ein weiteres Blatt Filtrierpapier wird mit Transferpuffer angefeuchtet und anschließend auf die Membran gelegt. Die Blotting-Kammer wird daraufhin verschlossen. Der Transfer erfolgt bei $0,8 \text{ mA} / \text{cm}^2_{\text{Membran}}$ für 1 h. Die auf der Membran immobilisierten Proteine können mittels Immunodetektion nachgewiesen werden. Hierfür müssen zuvor freie Bindungsstellen auf der Membran mit Blockierlösung (5 % (w/v) Milchpulver in 1 x TBST) für 90 min auf einem Rollenmischer behandelt werden, damit der verwendete Antikörper nicht unspezifisch auf der Membran bindet. Daraufhin wird die Membran mit verdünnter Antikörperlösung (Kapitel 5.1.4) über Nacht bei 4°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Hierbei bildet sich ein Antigen-Antikörper-Komplex, indem der primäre Antikörper an das spezifische Epitop im nachzuweisenden Protein bindet. Nach 3 x 10 min waschen mit 1 x TBST wird die zweite Antikörperlösung auf die Membran gegeben und 1 h bei Raumtemperatur auf dem Rollenmischer inkubiert. Dieser Meerrettich-Peroxidase- (HRP) konjugierte Sekundär-Antikörper ist gegen die F_c -Domäne des Primär-Antikörpers gerichtet und bindet an diese. Nach erneutem Waschen findet die Visualisierung statt. Hierfür wird die Membran 5 min mit einer ECL (*enhanced chemiluminescence*)-Substratlösung (*Amersham ECL Plus™ Western Blotting Detection Reagents*) inkubiert. Die HRP katalysiert die Oxidation von Luminol, wobei durch Auflegen eines Röntgenfilms mittels Chemilumineszenz das Protein detektiert werden kann. Die Entwicklung des Röntgenfilms erfolgt in einem speziellen Entwicklergerät der Firma *Protec Medizintechnik*.

5.2.2.7 Tryptischer *In-Gel*-Verdau

Vor der massenspektrometrischen Analyse von Proteinen, werden diese einem *In-Gel*-Verdau unterzogen. Dieser besteht im Wesentlichen aus vier Arbeitsschritten: Entfärbung, Reduktion, Alkylierung und Extraktion. Wurde das zu analysierende Proteom mittels SDS-PAGE aufgetrennt, muss die entsprechende Proteinbande aus dem Gel herausgeschnitten werden. Um störende Chemikalien aus der Probe zu entfernen, wird das Gelstück mehrfach gewaschen und entfärbt. Danach folgt eine Reduktion und Alkylierung von Cysteinen. Zur maximalen Entfaltung des Proteins, spaltet das Reagenz Dithiothreitol (DTT) vorhandene Disulfidbrücken. Hierfür wird das vakuumgetrocknete Gelstück 30 min bei 50°C in 20 µL Reduktionslösung inkubiert. Weiterhin folgt eine Carboxymethylierung der Cysteine, indem

die SH-Gruppen durch Iodoacetamid irreversibel alkyliert werden. Dieser Alkylierungsschritt wird 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln mit 20 μL Alkylierlösung durchgeführt. Nach mehreren Waschschritten folgt der tryptische Verdau. Hierbei wird das Protein enzymatisch in definierte Peptide gespalten. Die Protease Trypsin trennt C-terminal die Peptidbindungen zwischen Lysin und Arginin. Dieser tryptische *In-Gel*-Verdau erfolgt in 20 μL Trypsin-Lösung über Nacht bei Raumtemperatur. Nach diesem proteolytischen Verdau müssen die Peptide aus dem Gel extrahiert werden. Hierfür wird das Gelstück in 20 μL Extraktionslösung 40 min bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Die herausgelösten Peptide befinden sich nun im Überstand, welcher nachfolgend in ein 1,5 mL Gefäß überführt wird. Dieser Extraktionsschritt wird einmal wiederholt. Nachfolgend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird daraufhin in 0,1 % (v/v) Trifluoressigsäure (TFA) in H_2O aufgenommen und anschließend massenspektrometrisch untersucht.

5.2.2.8 Proteinbestimmung nach Bradford⁶

Diese photometrische Methode zur quantitativen Bestimmung von Proteinen beruht auf der Bindung des Farbstoffes *Coomassie Brilliant Blue* G-250 an Proteine in saurer Lösung. Der ungebundene rote Triphenylmethanfarbstoff hat sein Absorptionsmaximum bei 465 nm. Durch die Bindung von Proteinen wird der Farbstoff blau und sein Absorptionsmaximum verschiebt sich auf 595 nm. Es werden 200 μL *Roti[®]-Quant* Konzentrat zu 800 μL einer verdünnten Proteinlösung gegeben und die Extinktion bei 595 nm photometrisch bestimmt. Als Referenz dient der Probenpuffer. Anhand einer BSA-Konzentrationsreihe wird mittels Regression eine Kalibriergerade erstellt und darüber der Proteingehalt der Proben ermittelt.

Formel 5.2: Bestimmung der Proteinkonzentration. VF = Verdünnungsfaktor

$$c \left[\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right] = \frac{OD_{595\text{nm}}}{\text{Steigung der Geraden}} \cdot 50 \text{ (VF)}$$

5.2.2.9 Bestimmung der Protein-Sekundärstruktur mittels Circular dichroismus- (CD) Spektroskopie

CD-Untersuchungen im Fern-UV (170 – 250 nm) liefern Informationen zur Sekundärstruktur (α -Helix, β -Faltblatt, β -turn, *random coil*) von Proteinen. Hierbei werden die unterschiedlichen Absorptionen von links- und rechts-zirkular polarisiertem Licht einer optisch aktiven Substanz (dem Protein) gemessen.

Die Aufnahme der CD-Spektren erfolgt an einem Spektrometer in Quarzglasküvetten mit einer Schichtdicke von 0,1 mm und bei einer Proteinkonzentration von 0,08 mg/mL.

5.2.3 Analytische Methoden

5.2.3.1 Kernresonanzspektroskopie (*nuclear magnetic resonance spectroscopy*, NMR)

Die NMR-Spektroskopie basiert auf dem magnetischen Moment verschiedener Atomkerne. Dieses kann in einem äußeren Magnetfeld nur bestimmte Orientierungen einnehmen. Die Anzahl der Orientierungen werden durch die Kernspinquantenzahl I beschrieben. Es existieren zu jeder Kernspinquantenzahl $2I + 1$ Orientierungen, wobei jeder Orientierung eine magnetische Kernspinquantenzahl m_I zugeordnet ist. Erst in einem homogenen magnetischen Feld entstehen Energiedifferenzen zwischen den Zuständen (Zeemann-Effekt). Diese Kernresonanz-Effekte beruhen auf Anregung von Übergängen zwischen diesen Zuständen. Die dafür benötigte Energie wird durch Einstrahlen von elektromagnetischen Wellen eines zweiten homogenen Magnetfeldes eingebracht. Tritt der Kernresonanz-Effekt auf, ändert sich die Stromstärke im Wechselfeld, welche gemessen wird. Die Resonanzfrequenz bestimmter Kernsorten hängt von der Kernumgebung ab. Jeder Atomkern wird von Elektronen umgeben. Diese zeigen in einem externen Magnetfeld unterschiedliche Magnetisierbarkeiten. Hierbei entsteht in der Elektronenhülle ein Magnetfeld, welches dem externen entgegen gerichtet ist, wobei das Magnetfeld am Atomkern abgeschwächt wird. Man spricht von einem „effektiven Magnetfeld“. Die Frequenz der für den Übergang notwendigen Strahlung ist somit kleiner als im Falle eines „freien“ Atomkerns. Diese Differenz wird als chemische Verschiebung bezeichnet und in *ppm* (*parts per million*) angegeben. Im Rahmen dieser Arbeit wurden eindimensionale NMR-Experimente zur Vermessung von ^{31}P und ^1H Kernen durchgeführt.

5.2.3.1.1 Nachweis der Hydrolyse von allylischen Diphosphaten mittels ^{31}P -NMR-Spektroskopie

Für alle Versuche wurden 250 mM DMAPP in D_2O verwendet. pH-Werte, Metallsalze, Inkubationszeiten und weitere Zusätze variierten je nach untersuchter Fragestellung und sind den Tabellen 2.2 – 2.8 zu entnehmen. Die Proben wurden mit dem 400-MHz-NMR-Spektrometer *Varian MERCURY-VX 400* vermessen. Der Resonanzpuls wurde bei ^{31}P -Messungen auf 161 MHz und bei ^1H -Messungen auf 399 MHz gesetzt.

5.2.3.1.2 Bestimmung der katalytischen Aktivität einer Monoterpensynthese mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie

Alle Messungen wurden am 600-MHz-NMR-Spektrometer (*Varian*) durchgeführt. Als interner Standard wurde 2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonsäure (DSS, als Natriumsalz) verwendet. Um die kinetischen Größen K_m und k_{cat} bestimmen zu können, wurde die Enzymreaktion mit unterschiedlichen Substratkonzentrationen durchgeführt und in bestimmten Zeitintervallen vermessen. Wasser- und Glycerinsignale wurden bei den Messungen unterdrückt.

Reaktionsansatz

0,2 μM	Enzymlösung
3,5 μM – 100 μM	GPP
3,5 μM – 100 μM	DSS
CsTPS1 Probenpuffer	ad 750 μL

Substrat, interner Standard und Probenpuffer werden gemischt und auf 30°C temperiert. Direkt vor dem Vermessen wird das Enzym zugegeben.

5.2.3.2 HPLC-Analyse der enzymatischen Umsetzung von *p*-Geranylhydroxybenzoesäure

Die HPLC (*high performance liquid chromatography*) ist eine analytische Methode, mit der eher nicht flüchtige Substanzen analysiert werden. Bei diesem chromatographischen Trennverfahren wird die zu analysierende Substanz zusammen mit einem Laufmittel, der mobilen Phase, durch eine Trennsäule gepumpt, welche die stationäre Phase enthält. In der vorliegenden Arbeit wurde das Trennprinzip der Umkehrphasenchromatographie verwendet. Hier findet eine unpolare stationäre Phase Anwendung. Diese wird durch Reaktion von Silan mit Silicagel hergestellt. Die Silane werden zuvor mit langkettigen Kohlenwasserstoffe substituiert. Damit wird die Polarität umgekehrt – die zuvor polare Oberfläche des Silicagels wird mit einer unpolaren Schicht aus Alkanen überzogen. Für die hier beschriebenen Untersuchungen wurde eine RP18-Säule (LiChrospher 100, 5 μm , *endcapped*) verwendet. Die Detektion erfolgte mittels UV-Absorption.

Zusammensetzung des Enzym-Assays (100 μ L)

10 μ L	DMSO
10 μ L	50 mM MgCl ₂ in H ₂ O
10 μ L	10 mM <i>p</i> -Hydroxybenzoesäure in 50 mM Tris-HCl (pH 7,8)
10 μ L	20 mM GPP in 50 mM Tris-HCl (pH 7,8)
10 μ L	50 mM Tris-HCl (pH 7,8)
50 μ L	Membranfraktion

Der Reaktionsansatz wird für 2 h bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 2 μ L einer Ameisensäurelösung wird die Reaktion gestoppt und anschließend die wässrige Phase mit 500 μ L Ethylacetat extrahiert. Zur besseren Phasentrennung wird bei maximaler Geschwindigkeit (14000 Upm) für 3 min mit einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Die organische Phase wird abgetrennt und im Stickstoffstrom zur Trockne eingengt. Der Rückstand wird in 100 μ L Methanol mit 500 μ M *p*-Hydroxybiphenyl als internen Standard aufgenommen und mittels HPLC untersucht.

HPLC-Bedingungen

Laufmittel	Methanol und 0,1 % (v/v) Ameisensäure
Gradient	2 % Methanol \rightarrow 25 min (linearer Gradient) \rightarrow 100 % Methanol (5 min)
Flussrate	1 mL/min
Druck	125 bar
UV-Detektion	254 nm
Injektionsvolumen	5 μ L

5.2.3.3 Auftrennung und Nachweis von Terpenen mittels Gaschromatographie und Massenspektrometrie (GC/MS)

Die Gaschromatographie ist eine Analysemethode zur Auftrennung von Gemischen in einzelne Komponenten. Die zu analysierenden Substanzen müssen jedoch gasförmig oder unzersetzt verdampfbar sein. Bei dieser chromatographischen Methode wird ein Inertgas, wie Stickstoff oder Helium, als mobile Phase verwendet. Dieses Trägergas wird durch eine Trennsäule geleitet, welche mit der stationären Phase, meist Polyorganosiloxane, ausgekleidet ist. Diese befindet sich in einem temperierbaren GC-Ofen, welcher auf eine konstante Temperatur eingestellt ist (isotherm) oder einen Temperaturgradienten durchlaufen kann. Über einen beheizbaren Injektor wird das zu verdampfende Stoffgemisch

in den Gasstrom eingebracht. Unterschiedliche physiko-chemische Wechselwirkungen der einzelnen Komponenten mit der stationären Phase führen zu unterschiedlichen Mobilitäten, so dass auch komplexe Stoffgemische in ihre einzelnen Komponenten aufgetrennt werden können. Nach dem Eluieren der Substanzen von der Chromatographiesäule werden diese in dem nachgeschalteten Massenspektrometer ionisiert. In dieser Arbeit wurde hierfür die Elektronenstoßionisation (*electron impact*, EI) verwendet, wobei aus den zu untersuchenden Substanzen durch beschleunigte Elektronen ein Elektron herausgeschlagen wird. Das entstehende Radikalkation zerfällt in kleinere Fragmente, welche meist charakteristisch für die zu jeweiligen Substanzen sind.

Der Reaktionsansatz zum Nachweis von enzymatisch gebildeten Monoterpenen wurde in einem Volumen von 500 µL durchgeführt. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von 1 µM Enzymlösung zu 2 mM GPP in Probenpuffer gestartet und schnellst möglich mit 200 µL Hexan mit 50 µM Naphthalin als interner Standard überschichtet. Die Inkubation erfolgt für 3 h bei 30°C. Mittels Vortexen für 30 s werden die Produkte extrahiert. Um eine bessere Phasentrennung zu erlangen, wird für 3 min bei 14000 Upm zentrifugiert. Nachfolgend wird die organische Phase abgenommen und mittels GC/MS analysiert. Die GC/MS-Analyse erfolgte an einem Trace2000/Voyager GC/MS unter Verwendung einer Arylen-ZB-5MS-Säule (Zebron, 30 m x 0,25 mm, 0,25 µm Filmdicke): Elektronen Ionisierung 70 eV, Injektortemperatur 220°C, Quellentemperatur 200°C, Interfacetemperatur 300°C, Trägergas Helium, Flussrate 1 mL/min, Injektion *splitless*. Das Programm für die Säulentemperatur wurde wie folgt gewählt: 40°C für 1 min, dann Temperaturanstieg auf 230°C mit einer Heizrate von 10°C/min, gefolgt von einem Temperaturanstieg auf 300°C mit einer Heizrate von 25°C/min (7 min konstant bei 300°C). Zur Identifizierung der gebildeten Produkte wurden die Retentionszeiten und Massenspektren von entsprechenden Standards miteinander verglichen. Zudem wurde die Spektroskopie-Datenbank *National Institute of Standards and Technology* (NIST) vergleichend herangezogen.

5.3 Referenzen

1. Dyson, M. R.; Shadbolt, S. P.; Vincent, K. J.; Perera, R. L.; McCafferty, J. Production of soluble mammalian proteins in *Escherichia coli*: identification of protein features that correlate with successful expression. *BMC. Biotechnol.* **2004**, *4*, 32.
2. Bertani, G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **1951**, *62* (3), 293-300.
3. Hanahan, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **1983**, *166* (4), 557-580.
4. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227* (5259), 680-685.
5. Fazekas de St, G. S.; Webster, R. G.; Datyner, A. Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips. *Biochim. Biophys. Acta* **1963**, *71*, 377-391.
6. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248-254.

6. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschreibt Untersuchungen zum Mechanismus der initialen Diphosphataktivierung sowie die Aufklärung funktional spezifischer Aminosäuren während der Katalyse von Prenyltransferasen und -synthasen.

Hydrolyseexperimente im enzymfreien System mit DMAPP geben Einblicke in den Mechanismus der Diphosphataktivierung. Verschiedene Einflüsse, wie Temperatur, Protonierungsgrad und Metallkomplexierung wurden mittels ^{31}P -NMR-Spektroskopie analysiert. Im metallfreien System ist erst nach Energiezufuhr, in Form von Wärme, eine Hydrolyse zu verzeichnen. Durch Zusatz von Metallionen wird die Aktivierungsenergie herabgesetzt, so dass die Hydrolyse bereits bei Raumtemperatur stattfindet. Die Koordination von Metallionen bewirkt eine Verlängerung der C–O-Bindung im DMAPP und überführt so das Diphosphat in eine gute Abgangsgruppe. Weiterhin kann eine verstärkte Hydrolyserate bei höheren Protonierungsgraden des DMAPPs detektiert werden. Zum einen wird die C–O-Bindung verlängert und damit geschwächt, zum anderen generiert ein elektrophiler Angriff auf das Sauerstoffatom der C–O-Bindung eine positive Teilladung am Kohlenstoffatom, und erhöht damit dessen Elektrophilie. Niedrige pH-Werte begünstigen also die Hydrolyse.

Basierend auf *ab initio* Berechnungen und durch zielgerichtete Mutagenese konnte die essentielle Rolle aromatischer Aminosäuren und Methionin während der Katalyse der membrangebundenen Oligoprenyltransferase UbiA belegt werden. Kation- π - bzw. Methionin-Wechselwirkung stabilisieren das intermediäre Kation und ermöglichen so den Prenyltransfer. Erstmals konnte die UbiA-Expression über Immunodetektion nachgewiesen werden. Hierfür wurde *ubiA* in den Vektor pDEST_N112 kloniert, da dieser durch sein Maltose bindendes Protein die Detektion des UbiA-Konstruktes mittels Western-Blot ermöglicht.

Eine katalytische Diade der Limonensynthase aus *Cannabis sativa* (CsTPS1) konnte über Mutagenesestudien postuliert werden. Das Tyrosin 596 sowie das Aspartat 518 können hierbei für den intermediären Protonentransfer während der Katalyse verantwortlich sein. Der Einfluss der Mutationen auf die Produktverteilung wurde mittels GC/MS analysiert. Erstmals wurden die kinetischen Konstanten der CsTPS1 mittels ^1H -NMR Spektroskopie ermittelt. Die ermittelten Werte decken sich mit denen früherer Untersuchungen unter Verwendung anderer Methoden. Die ^1H -NMR-Spektroskopie ist somit eine effiziente Methode für enzymkinetische Bestimmungen.

7. Abstract

The formation of terpenoids by prenylating enzymes is of high relevance for secondary metabolism in plants. The important class of terpenoid natural products finds applications as flavors, fragrances, feed and food supplements and pharmaceuticals. The isolation of some prenylated compounds from natural sources is inefficient and does not cover the enormous worldwide need. Moreover the chemical syntheses are complicated and yield can be moderate. Therefore the use of enzymes as biocatalysts and the understanding of the mechanism of terpene formation by prenyl transferring enzymes becomes more and more crucial. This thesis deals with the elucidation of the initial activation of diphosphates and the role of essential amino acids during the catalysis by terpene transferases and synthases.

The hydrolysis of DMAPP in an enzyme free system is monitored by ^{31}P -NMR analysis. Temperature, metal ions and pH value influence the activation of diphosphates. In absence of metal ions the hydrolysis of DMAPP is detectable only after heating. By addition of salts the reaction proceeds at room temperature. The coordination of metal ions results in an elongation, i. e. weakening, of the C–O bond to support the cleavage of the diphosphate from the prenyl unit. The same effect is caused by strongly acidic conditions.

Based on *ab initio* calculations the functional role of aromatic amino acids and methionine in the catalysis of *p*-hydroxybenzoic acid oligoprenyltransferase (UbiA) from *E. coli* was investigated by site directed mutagenesis. Cation- π or cation-methionine interactions may play a crucial role by stabilization of the intermediate prenyl cation to support the product formation.

Furthermore a catalytic diad consisting of tyrosine and aspartate was identified as essential for the intermediate proton transfer in the limonene synthase from *Cannabis sativa*. Moreover it was possible to determine the catalytic parameters of this monoterpene synthase by ^1H -NMR analysis. The data obtained by this experiment are comparable with kinetic constants determined by other methods.

All presented results contribute to the understanding of the catalytic mechanism of prenylating enzymes.

8. Anhang

Tabelle 8.1: Verwendete Geräte bzw. Verbrauchsmaterialien mit Typ- und Herstellerangaben.

Geräte / Verbrauchsmaterialien	Typ (Hersteller)
Autoklav	Varioklav® Dampfsterilisator (H+P Labortechnik)
CD- Spektrometer	J-810 (Jasco Inc.)
Elektrophoresegeräte	Standard Power Pack P25 (Biometra) Horizontale Elektrophorese Systeme (Biometra) Compact XS/S Compact M Casting System Compact Minigel-Twin (Biometra)
Entsalzungssäule	PD-10 Säulen (GE Healthcare)
GC-MS	Trace 2000 / Voyager (ThermoQuest Finnigan)
HPLC (inkl. Quaternäre Pumpe, Autosampler, Säulenofen, DAD)	Agilent 1100
Kulturröhrchen	Röhre 13 mL, 100 x 16 mm, PP (Sarstedt)
Magnetrührer	MR 3001 K (Heidolph)
NMR	Varian MERCURY-VX 400 Varian INOVA 600
Petrischalen	Schale 94/16 L.Mg.ON steril (Greiner bio-one)
pH-Meter	FiveGo™ FG2 (Mettler Toledo)
Photometer	BioPhotometer plus (Eppendorf)
Pipetten	Eppendorf Reference (Eppendorf)
Pipettenspitzen	Sarstedt
Reaktionsgefäße	Röhre 50 mL, 114 x 28 mm, PP (Sarstedt) Röhre 15 mL, 120 x 17 mm, PP (Sarstedt) SafeSeal Reagiergefäß 2 mL, PP (Sarstedt) Multiply®-Pro Gefäß 0,2 mL, PP (Sarstedt) Reagiergefäß 1,5 mL (Sarstedt)
Röntgenfilm	CL-XPosure Film 18 x 24 cm (Thermo)

	Scientific)
Röntgenfilmentwickler	Optimax Typ TR (Protec Medizintechnik)
Schüttelgeräte	Vortex Genie® 2 G560E (Scientific Industries, Inc.) Polymax 1040 (Heidolph) Multitron (HT Infors) Innova 4000 (new Brunswick Scientific)
Sterile Arbeitsbank	Hera Safe (Thermo Scientific)
TALON® Gravitationssäule	TALON 2 mL Disposable Gravity Column (Clontech)
<i>Thermocycler</i>	TProfessional Basic Gradient (Biometra)
Ultraschallgerät	Bandelin Sonopuls
Waagen	TE 1502S (Sartorius) TE 214S (Sartorius)
Wasserbad	Einhängethermostat A100 (LAUDA) Bad 011 (LAUDA)
Wärmeblock	ThermoStat plus 1,5 mL (Eppendorf)
<i>Western Blot</i>	Semidry Blotting Apparatus (FisherBiotech)
Zentrifugen	Avanti J-25, Rotor JA 10 (Beckmann) Le-50, Rotor Ti 70 (Beckmann) Mikro 120 (Hettich) SpeedVac Concentrator 5301 (Eppendorf) 5810R, Rotor A-4-62 sowie FL 113 (Eppendorf)

Tabelle 8.2: Verwendete Chemikalien mit Herstellerangaben.

Chemikalie	Hersteller
10x <i>Pfu</i> Puffer mit 20 mM MgSO ₄	Fermentas (St. Leon-Rot)
10x FastDigest [®] Puffer	Fermentas (St. Leon-Rot)
10x DreamTaq [™] Puffer	Fermentas (St. Leon-Rot)
6x DNA Ladepuffer	Fermentas (St. Leon-Rot)
Acrylamid/Bisacrylamid	Merck (Darmstadt)
Agar	Roth (Karlsruhe)
Agarose zur Elektrophorese	Roth (Karlsruhe)
Ammoniumperoxodisulfat	Roth (Karlsruhe)
Ampicillin, Na-Salz	Roth (Karlsruhe)
Coomassie Brilliant Blue G-250	Roth (Karlsruhe)
Dithiothreitol	Sigma (Steinheim)
Dimethylallyldiphosphat (DMAPP)	hauseigene Synthese
dNTP-Mix (je 10 mM)	Fermentas (St. Leon-Rot)
Ethidiumbromid (10 mL/mg)	VWR (Poole; England)
Ethylacetat, destilliert	VWR (Poole, England)
Farnesyldiphosphat (FPP)	hauseigene Synthese
GC-Alkanstandards (C ₄ -C ₂₀)	Sigma-Aldrich (USA)
GeneRuler [™] 1kb DNA Ladder	Fermentas (St. Leon-Rot)
Glycerin	Roth (Karlsruhe)
Geranyldiphosphat (GPP)	hauseigene Synthese
Hefeextrakt	Roth (Karlsruhe)
Hepes	Roth (Karlsruhe)
Imidazol	Roth (Karlsruhe)
Isopropanol	Merck (Darmstadt)
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Roth (Karlsruhe)
K ₂ HPO ₄	Merck (Darmstadt)
Kanamycin	Roth (Karlsruhe)
KH ₂ PO ₄	Merck (Darmstadt)
MeOH	Roth (Karlsruhe)
β-Mercaptoethanol	Roth (Karlsruhe)
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	Roth (Karlsruhe)
MOPSO	Sigma-Aldrich (USA)
N ₂	Air Liquide (Düsseldorf)

NaCl	Roth (Karlsruhe)
NaOH	Roth (Karlsruhe)
Naphthalin	Sigma-Aldrich (USA)
NatriumLaurylsulfat (SDS)	Roth (Karlsruhe)
<i>n</i> -Heptan, HPLC Grade	Roth (Karlsruhe)
<i>n</i> -Hexan, GC Ultra Grade	Roth (Karlsruhe)
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Fermentas (St. Leon-Rot)
Roti-Quant® (Bradfordreagenz)	Roth (Karlsruhe)
Salzsäure (37%), rauchend	Roth (Karlsruhe)
TALON® Metal Affinity Resin	Clontech (Mountain View; USA)
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth (Karlsruhe)
TRIS	Roth (Karlsruhe)
TRIS-Hydrochlorid	Roth (Karlsruhe)
Trypton/Pepton	Roth (Karlsruhe)
Tween® 20	Sigma (Steinheim)
Valenzen	Sigma (Steinheim)

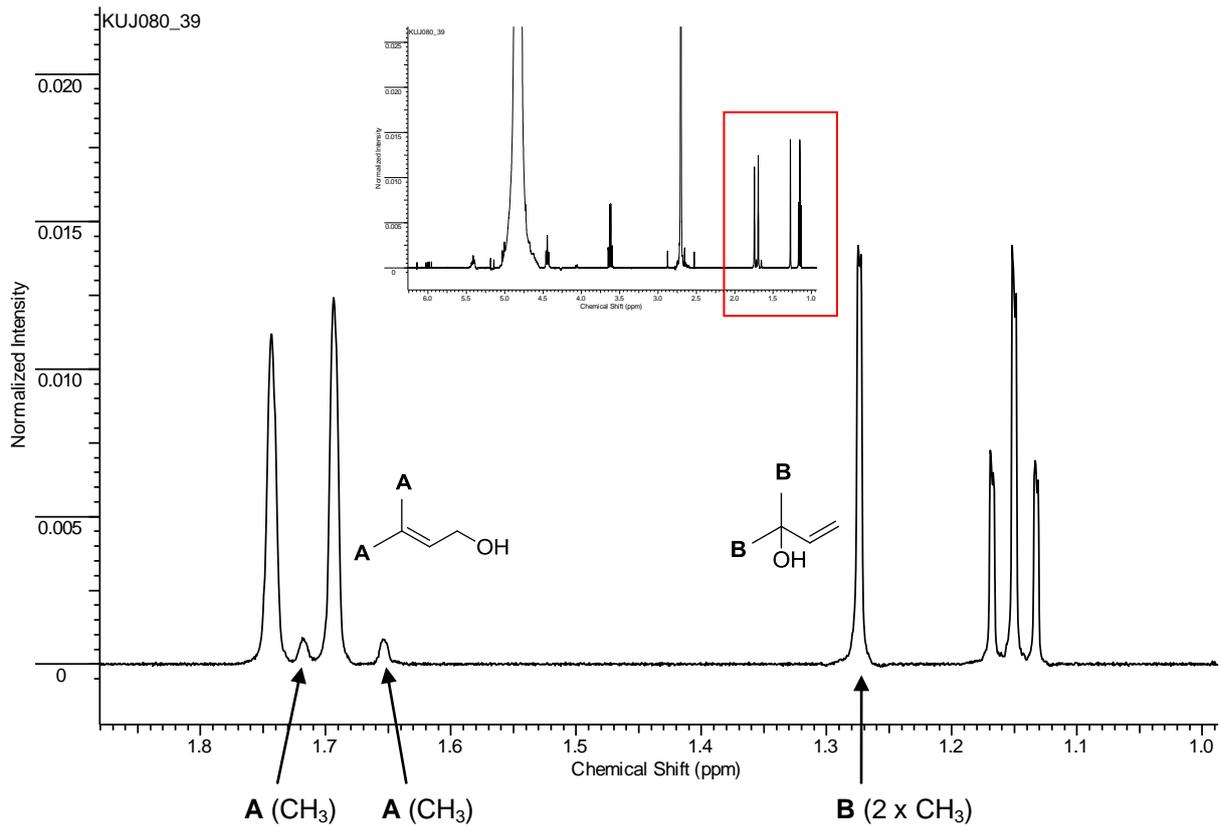


Abbildung 8.1: ¹H-NMR-Spektrum von 250 mM DMAPP gelöst in D₂O. Nach Wärmezufuhr sind zwei Produkte entstanden. Links: Prenol. Rechts: 2-Methylbut-3-en-2-ol.

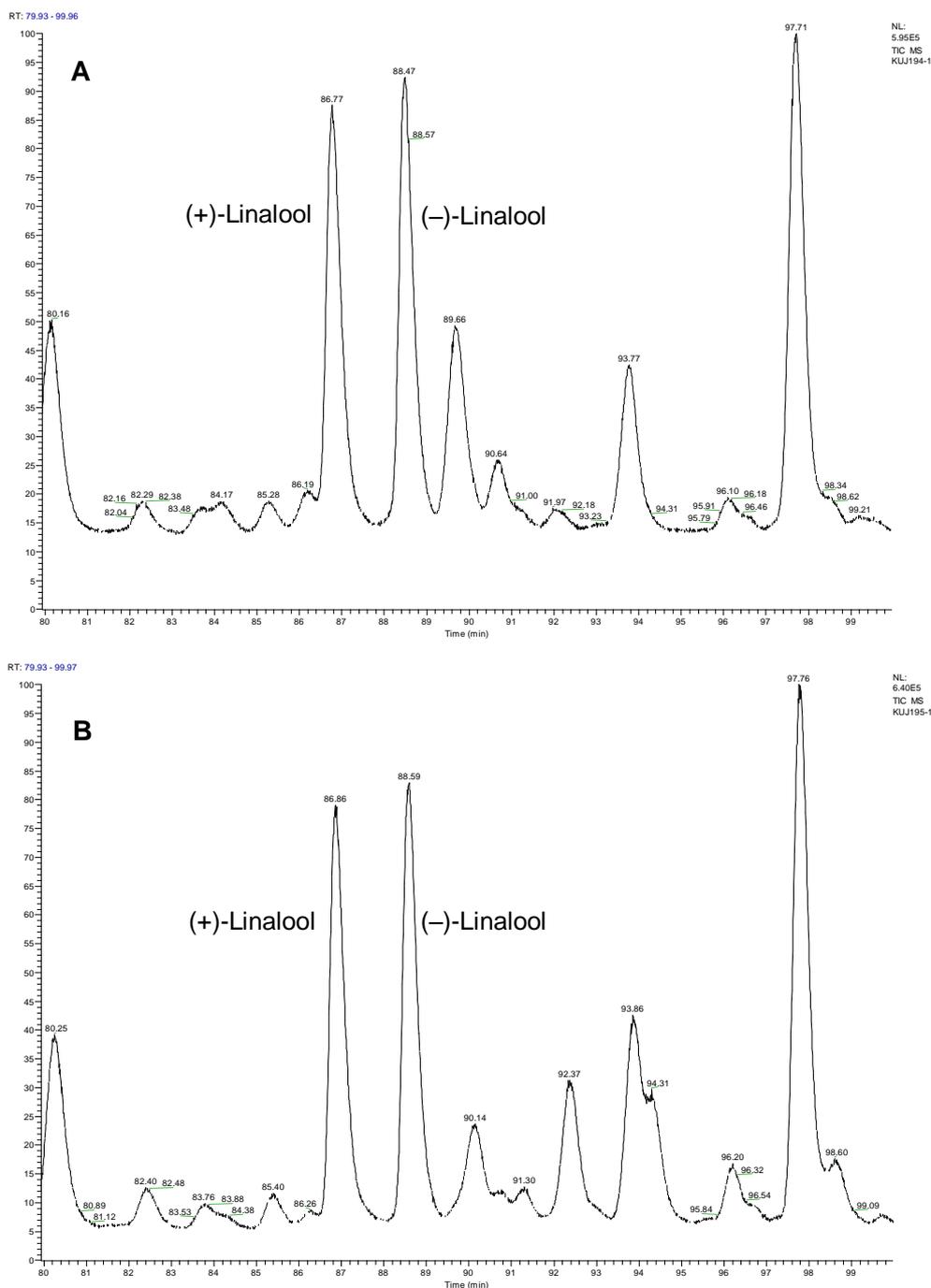


Abbildung 8.2: Chirale GC-Spektren zum Nachweis des Linalool-Racematen. A: Reaktion mit Enzym (CsTPS1), B: Reaktion ohne Enzym.

Die chirale GC/MS-Analyse erfolgte an einem Trace2000/Voyager GC/MS (ThermoQuest Finnigan) unter Verwendung einer LIPODEX E Säule (MACHERY-NAGEL, 25 m x 0.25 mm): Elektronenionisierung 70 eV, Quellentemperatur 200°C; Injektortemperatur 220°C, Interfacetemperatur 200°C, Trägergas Helium, Flussrate 1mL/min, Injektion *splitless*. Das Programm für die Säulentemperatur wurde wie folgt gewählt: 40°C für 40 min, dann Temperaturanstieg auf 70°C mit einer Heizrate von 0,5°C/min.

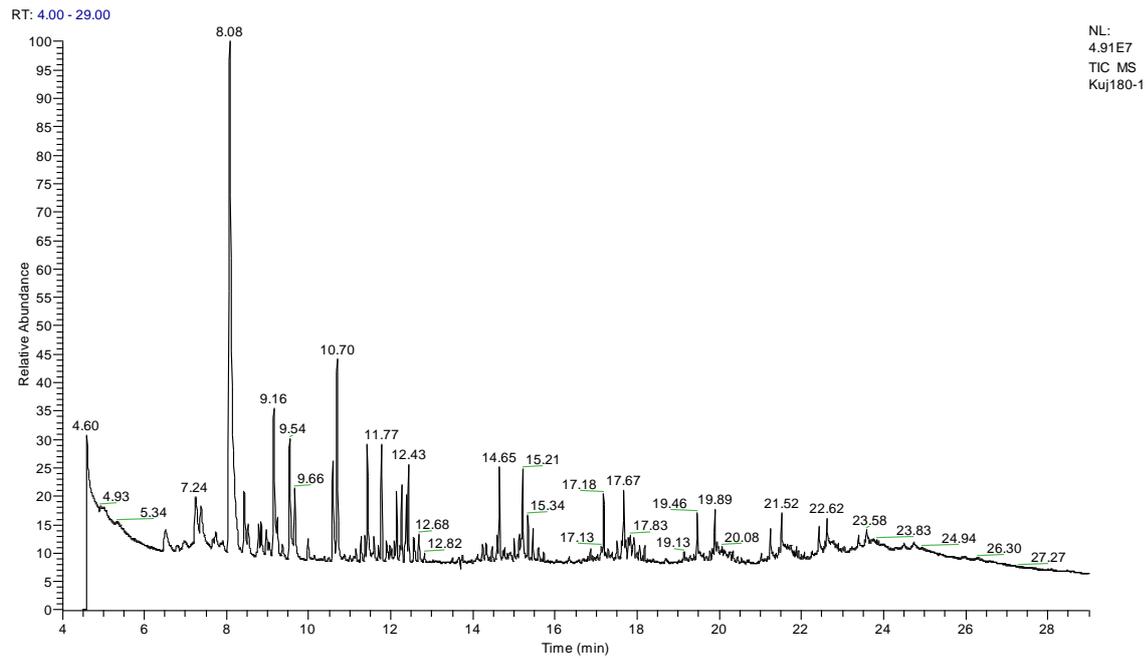


Abbildung 8.3: GC/MS-Chromatogramm (TIC) eines Umsatzes von GPP mit CsTPS1_WT.

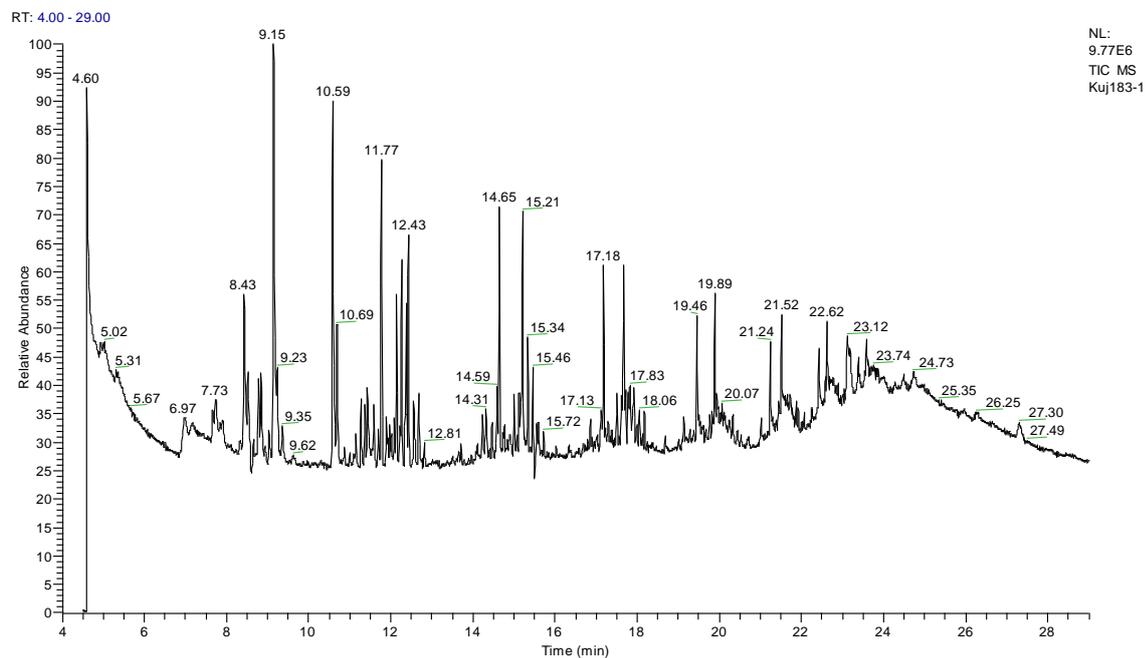


Abbildung 8.4: GC/MS-Chromatogramm (TIC) eines Umsatzes von GPP mit CsTPS1_Y596A.

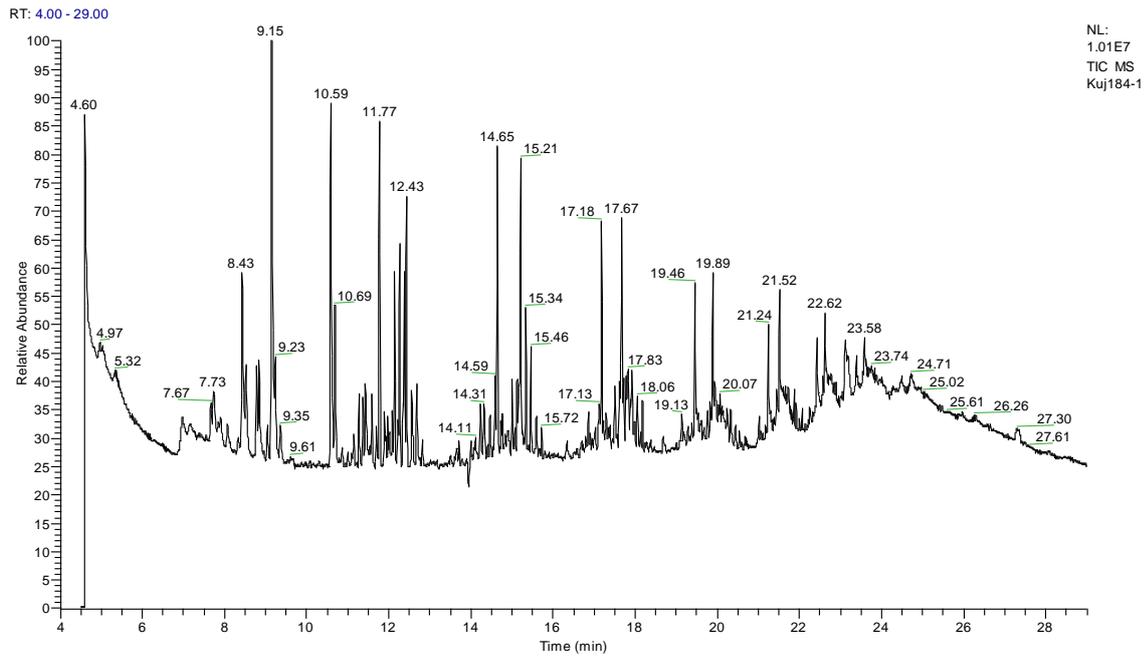


Abbildung 8.5: GC/MS-Chromatogramm (TIC) eines Umsatzes von GPP mit CsTPS1_D600A

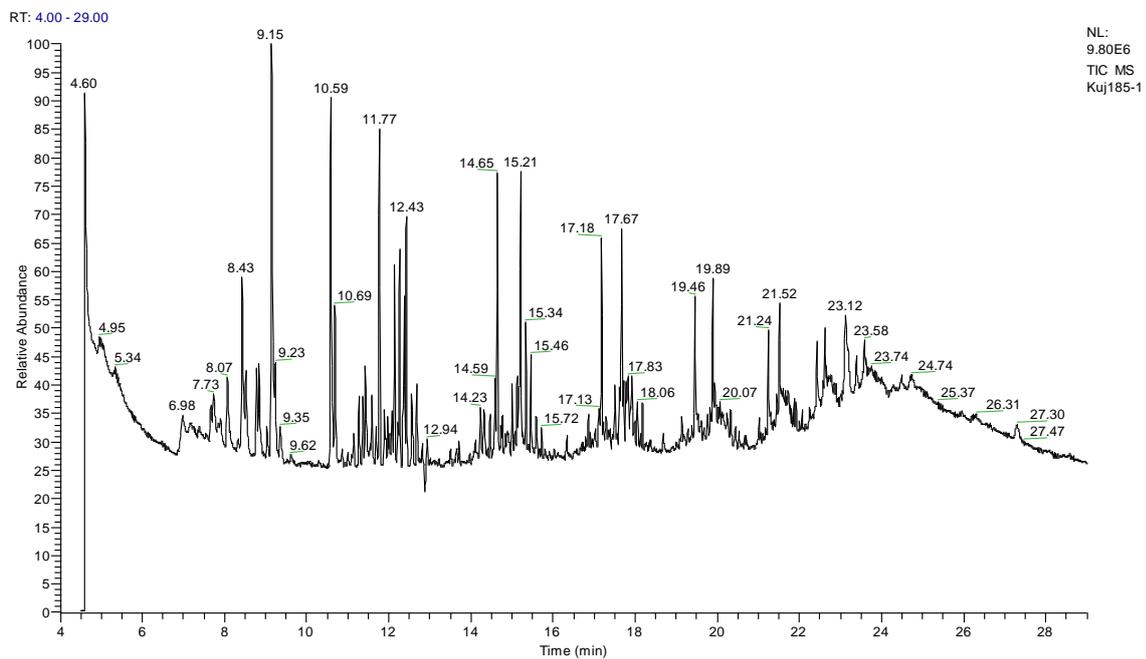


Abbildung 8.6: GC/MS-Chromatogramm (TIC) eines Umsatzes von GPP mit CsTPS1_D518N.

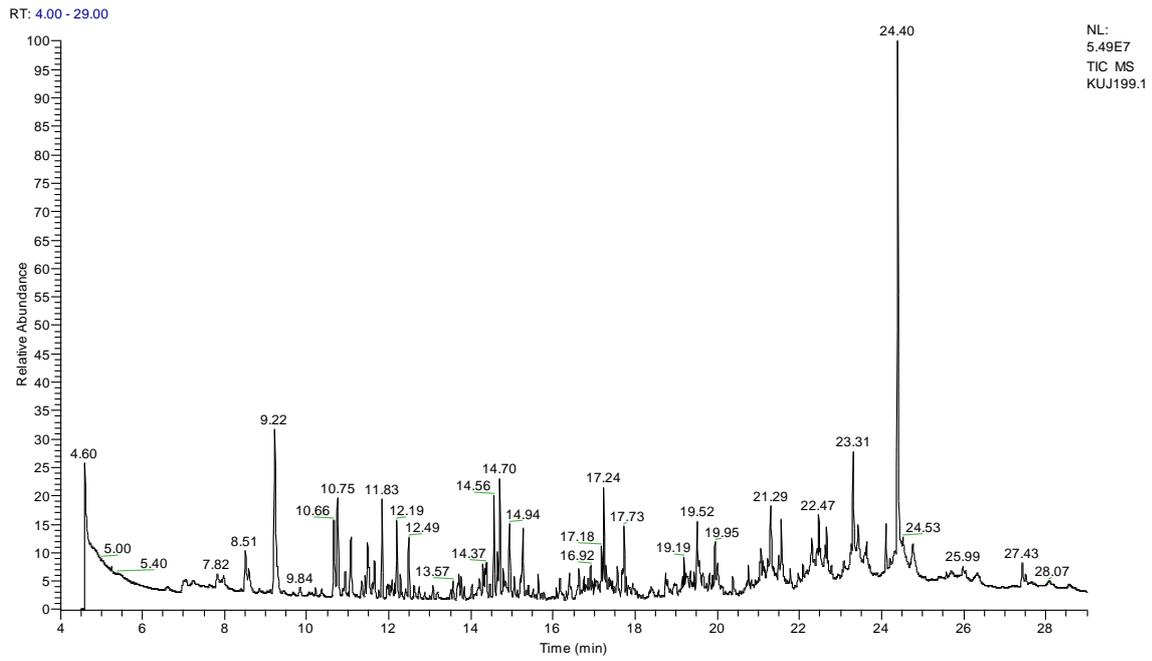


Abbildung 8.7: GC/MS-Chromatogramm (TIC) eines Umsatzes von GPP mit CsTPS1_D518A.

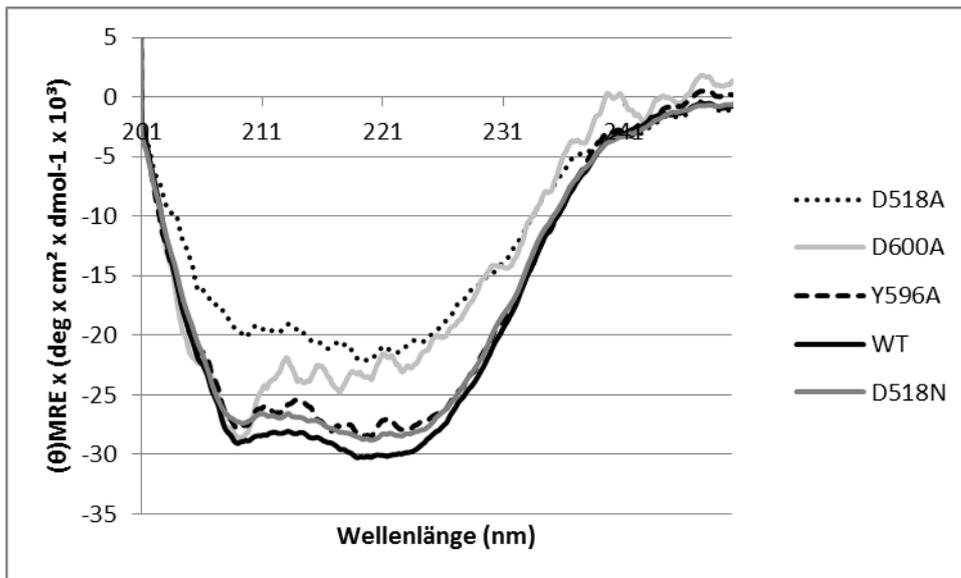


Abbildung 8.8: Darstellung der CD-Spektren des Wildtyp-Enzyms im Vergleich zu den Varianten. Die Strukturvorhersage erfolgte durch das Program K2D3.

>CsTPS1_Aminosäuresequenz

MCTVVDNPSSTITNNSDRRSANYGPPiWSFDFVQSLPIQYKGESYTSRLNKLEKDVKRMLIG
 VENSLAQLLELIDTIQRLGISYRFENEIISILKEKFTNNNDNPNPNYDLYATALQFRLLRQYGFEV
 PQEIFNNFKNHKTGEFKANISNDIMGALGLYEASFHGKKGESILEEARIFTTKCLKKYKLMSS
 SNNNNMTLISLLVNHALEMPLQWRITRSEAKWFIEEIYERKQDMNPTLLEFAKLDFNMLQST
 YQEELKVLRSRWWKDSKLGEKLPFVRDRLVECFLWQVGVRFEFQFSYFRIMDTKLYVLLTIID
 DMHDIYGTLEELQLFTNALQRWDLKELDKLPDYMKTAFYFTYNFTNELAFDVLQEHGFVHIE
 YFKKLMVELCKHHLQEAKWFYSGYKPTLQEYVENGWLSVGGQVILMHAYFAFTNPVTKEAL
 ECLKDGHPNIVRHASIILRLADDLGTLSDELKRGDVPKSIQCYMHDTGASEDEAREHIKYLISE
 SWKEMNNEDGNINSFFSNEFVQVCQNLGRASQFIYQYGDGHASQNNLSKERVGLIITPIPM
 KGELNSKLEGKPIPPELLGLDSTRTGHHHHHH*

>UbiA_Aminosäuresequenz

MEWSLTQNKLLAFHRLMRTDKPIGALLLLWPTLWALWVATPGVPQLWILAVFVAGVWLMRA
 AGCVVNDYADRFKFDGHVKRTANRPLPSGAVTEKEARALFVVLVLISFLLVLTNTMTILLSIAA
 LALAWVYPPFMKRYTHLPQVVLGAAFGWSIPMAFAAVSESVPLSCWLMFLANILWAVAYDTQ
 YAMVDRDDDVKIGIKSTAILFGQYDKLIIGILQIGVLALMAIIGELNGLGWGYYSILVAGALF
 VYQQKLIANREREACFKAFMNNNYVGLVFLGLAMSYWHF*

Abbildung 8.9: Aminosäuresequenzen der verwendeten Enzyme. *, Stopcodon.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Julia Kufka
 akademischer Grad: Diplom Biologin
 Geburtsdatum: 27.11.1982
 Geburtsort: Salzgitter
 Geschlecht: Weiblich
 Staatsangehörigkeit: Deutsch

bei CSL Behring GmbH, Marburg	Berufliche Tätigkeit
Quality Assurance Operation, Stability Manager	2012 - 2014
Production, Validation Manager	Seit 2014

am Leibniz Institut für Pflanzenbiochemie, Halle/Saale	Promotion
Abteilung Natur- und Wirkstoffchemie	2007 - 2011
Thema: Modifizierung von prenylierenden Enzymen	

an der Technischen Universität Braunschweig	Hochschulbildung
Diplom-Biologie	2003 – 2007
Hauptfach: Pflanzenbiologie	
Nebenfächer: Zellbiologie, Biochemie	
Diplomarbeit: Klonierung und Expression von Gibberellin-Rezeptoren aus <i>Curcubita maxima</i> L.	
Note: sehr gut	
Pharmazie	2002 – 2003

Gymnasium in Salzgitter, Abitur Note: 2.3	Schulbildung 1996 – 2002
--	------------------------------------

Konferenzen

- „Biocatalysis“, Puerto Morelos, Mexiko
Kurzvortrag und Poster: New aspects of the catalytic mechanism of prenyl transferases
 Dezember 2010
- „38. Doktorandenworkshop“, Halle/Saale, Deutschland
Vortrag: Neue Einblicke in den Katalysemechanismus prenylierender Enzyme
 Oktober 2009
- „5th Plant Science Student Conference“, Halle/Saale, Deutschland
Vortrag: New insights in the catalytic mechanism of prenylating enzymes
 Juni 2009
- „Protein Design and Evolution for Biocatalysis“, Sant Feliu Guixols, Spanien
Poster: Mechanistic Studies and Modification of Prenylating Enzymes
 Oktober 2008

Veröffentlichungen

- Wessjohann L., Vogt T., **Kufka J.**, Klein R.,
Biospektrum 2012, 1, 22 – 25.
- Brandt W., Bräuer L., Günnewich N., **Kufka J.**, Rausch F.,
 Schulze D., Schulze E., Weber R., Zakharova S.,
 Wessjohann L., *Phytochemistry* 2009, 70, 1758 – 1775.
- Wessjohann L., Zakharova S., Schulze D., **Kufka J.**, Weber R.,
 Bräuer L., Brandt W., *Chimia* 2009, 63, 340 – 344.

Julia Kufka

Lahntal, den 13.05.2016

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Ludger A. Wessjohann danke ich für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis und für die Betreuung meiner Arbeit. Gemeinsam sind wir die ersten Schritte gegangen, die molekularbiologische Ausrichtung der Abteilung zu etablieren. Hierbei wurde mir stets Vertrauen entgegengebracht, welches mich in meinem Handeln fortwährend bestärkt und geprägt hat.

Eine wissenschaftliche Arbeit ist nie das Werk einer einzelnen Person, deshalb möchte ich mich bei allen Kollegen bedanken, die mir die Erstellung meiner Dissertation ermöglicht haben. Frau Dr. Andrea Porzel danke ich für die Vermessung unzähliger NMR Proben. Zu jeder Zeit stand Sie mir mit ihrem unerschöpflichen Fundus an Wissen zur NMR Analyse bei Seite. Gudrun Hahn, Christine Kuhnt und Anja Ehrlich danke ich für die Unterstützung bei GC/MS- und HPLC-Messungen. Für Ausflüge in die weiten Sphären der Computerchemie danke ich Herrn PD Dr. Wolfgang Brandt. Seine Computer-Modelling Analysen waren oft der Grundstein für viele fruchtbare Denkanstöße. Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Jeanette Keim. Stetige Unterstützungen theoretischer und praktischer Natur waren selbstverständlich.

Die Promotionszeit am IPB in Halle war durch das außerordentliche freundliche Arbeitsklima in der Abteilung Natur- und Wirkstoffchemie geprägt und Freundschaften sind gewachsen. Der ganzen „IPB aktuell – Crew“ möchte ich für die schönen Stunden während und nach der Arbeitszeit danken. Hierbei auch ein großer Dank an MUJKUJKEJ!

Meinem lieben Lebensgefährten Rainer danke ich für die unermüdliche Geduld und Unterstützung in allen Lebenslagen.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie. Ich möchte mich für den stetigen Rückhalt bedanken und dafür, dass sie mich auf meinen Lebensweg mit immerwährendem Zuspruch, selbstloser Hilfsbereitschaft und Liebe begleitet haben. Vielen Dank!

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, darüber, dass ich, Julia Kufka, die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Julia Kufka

Lahntal, den 13.05.2016