

Biokatalytische Umsetzung von natürlichen und artifiziellen Prenyldiphosphaten

Dissertation

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

Naturwissenschaftlichen Fakultät I - Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg
am Fachbereich Pharmazie

vorgelegt

von Frau Dipl.-Biol. Jeanette Keim
geboren am 15.09.1984 in Zeitz

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum zwischen Februar 2010 und Dezember 2013 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: 25.03.2014

Verteidigt am: 06.11.2014

Gutachter:

1. Professor Dr. Jörg Degenhardt
2. Professor Dr. Ludger A. Wessjohann
3. Professor Dr. Ludger Beerhues

Ein Gelehrter in seinem Laboratorium ist nicht nur ein Techniker, er steht auch vor den Naturgesetzen wie ein Kind vor der Märchenwelt.

Marie Curie (1867-1934)

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VIII
TABELLENVERZEICHNIS	XI
FORMELVERZEICHNIS	XIII
1 EINLEITUNG UND ZIELSTELLUNG	1
2 THEORETISCHER TEIL	2
2.1 TERPENE UND TERPENOIDE	2
2.2 ISOPRENOIDSTOFFWECHSEL	3
2.2.1 Mevalonatweg (MVA-Weg)	6
2.2.2 Methylerythritolphosphatweg (MEP-Weg)	6
2.3 PRENYLIERENDE ENZYME	7
2.3.1 Terpenzyklasen (-synthasen)	9
2.3.2 Mittelketten-Prenyltransferasen	14
2.3.3 Langketten-Prenyltransferasen	17
3 ANALYSE DES REAKTIONSMECHANISMUS DER UNDECAPRENYLDIPHOSPHATSYNTHASE AUS <i>ESCHERICHIA COLI</i> (EcUPPS)	19
3.1 EINLEITUNG	19
3.2 ERGEBNISSE UND DISKUSSION	22
3.2.1 Rekombinante Herstellung und Reinigung der EcUPPS	22
3.2.2 Mutagenesestudien zur Aufklärung des Katalysemechanismus der EcUPPS	23
3.2.3 Analyse der Sekundärstruktur	30
3.3 SCHLUSSFOLGERUNG	32
4 ARTIFIZIELLE STARTERSUBSTRATE DER UNDECAPRENYLDIPHOSPHATSYNTHASE AUS <i>ESCHERICHIA COLI</i> (EcUPPS)	34
4.1 EINLEITUNG	34
4.2 ERGEBNISSE UND DISKUSSION	38
4.2.1 Kinetische Untersuchung von Prenyldiphosphatanaloga	38
4.2.2 Massenspektrometrische Untersuchung der Produktkettenlänge	42

4.2.3	Anwendung von MANT-O-GPP als Fluoreszenzmarker in der HPLC.....	42
4.2.3.1	Emissionsspektrum von MANT-O-GPP.....	43
4.2.3.2	HPLC-Analyse mit MANT-O-GPP	44
4.3	SCHLUSSFOLGERUNG.....	45
5	ARTIFIZIELLE ELONGATIONSSUBSTRATE ZWEIER MITTELKETTEN-CPTs	47
5.1	EINLEITUNG	47
5.2	ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	51
5.2.1	Rekombinante Herstellung und Reinigung der EcUPPS und ThkCPT	51
5.2.2	Analyse artifizierter Elongationssubstrate der EcUPPS.....	52
5.2.3	Analyse artifizierter Elongationssubstrate der Thermococcus kodakaraensis cis-Prenyltransferase (ThkCPT)	58
5.2.1	Mutagenesestudien zur Umsetzung artifizierter Elongationssubstrate mit der EcUPPS	64
5.3	SCHLUSSFOLGERUNG.....	67
6	UMSETZUNG VON ARTIFIZIELLEN PRENYLDIPHOSPHATEN MIT EINER TERPENZYKLASE	69
6.1	EINLEITUNG	69
6.2	ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	73
6.2.1	Rekombinante Herstellung und Reinigung der TEAS	73
6.2.2	Synthetische Prenyldiphosphate als Substrate der TEAS.....	74
6.2.3	Strukturaufklärung des Oxagermacrenderivates 61a	82
6.3	SCHLUSSFOLGERUNG.....	85
7	MATERIALIEN UND METHODEN	87
7.1	MATERIALIEN	87
7.1.1	LaboraAusstattung, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	87
7.1.2	Software.....	87
7.1.3	Proteine.....	88
7.1.4	Oligonukleotide	88
7.1.5	Plasmide	89
7.1.6	Escherichia coli Stämme.....	90
7.1.7	Kulturmedien.....	90
7.2	MIKROBIOLOGISCHE METHODEN	91
7.2.1	Stammhaltung und Kultivierung der Bakterienstämme	91
7.3	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	92
7.3.1	Polymerasekettenreaktion (PCR)	92
7.3.1.1	Ortsgerichtete Mutagenese	92

7.3.1.2	Kolonie-PCR	92
7.3.2	Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i>	93
7.3.3	Transformation von Plasmid-DNA in <i>E. coli</i>	93
7.3.4	DNA-Konzentrationsbestimmung	93
7.3.5	Agarosegelelektrophorese	93
7.3.6	Sequenzierung von Plasmid-DNA	94
7.4	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN.....	94
7.4.1	Rekombinante Proteinherstellung.....	94
7.4.2	Zellaufschluss	94
7.4.3	Proteinreinigung mittels Immobilisierter Metallchelat- Affinitätschromatographie (IMAC).....	95
7.4.3.1	Reinigung der EcUPPS mittels Co-IMAC	95
7.4.3.2	Reinigung der ThkCPT mittels Ni-IMAC	95
7.4.3.3	Reinigung der TEAS mittels Ni-IMAC	96
7.4.4	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	96
7.4.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	97
7.5	ANALYTISCHE METHODEN.....	97
7.5.1	Mikrotiterplatten-Phosphatdetektionsassay	97
7.5.1.1	Bestimmung von Substratkinetiken der EcUPPS und ThkCPT.....	98
7.5.1.2	Bestimmung der Substratkinetiken artifizierlicher Substrate	98
7.5.1.3	Bestimmung der Substratkinetiken der EcUPPS-Varianten.....	99
7.5.1.4	Bestimmung der Substratkinetik der TEAS	99
7.5.1.5	Berechnung von Umsatzraten und kinetischen Parametern	99
7.5.2	Bestimmung des Produktspektrums der EcUPPS und ThkCPT	100
7.5.3	Dünnschichtchromatographische Methode zur ersten Kettenlängenbestimmung	101
7.5.4	Bestimmung des TEAS Produktspektrums.....	101
7.5.5	Enzymatischer Umsatz im präparativen Maßstab	102
7.5.6	HPLC-Analytik.....	102
7.5.6.1	HPLC-Analytik der Polyprenole mit FPP als Startersubstrat.....	102
7.5.6.2	HPLC-Analytik der Polyprenole mit MANT-O-GPP als Startersubstrat.....	103
7.5.6.3	MANT-O-Geraniol-Kalibriergerade	103
7.5.7	LC/MS-Analyse.....	104
7.5.8	GC/MS-Analyse	105
7.5.8.1	GC/EI-MS-Analyse der EcUPPS-Produkte mit BPP und CI-BPP	105
7.5.8.2	GC/EI-MS-Analyse der TEAS Produkte	105
7.5.9	UV/VIS Spektroskopie	106
7.5.10	Fluoreszenzspektroskopie	107
7.5.11	Circulardichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie)	107
7.5.12	Polarimetrie.....	108
7.5.13	Kernmagnetische Resonanzspektroskopie	108

8	ZUSAMMENFASSUNG	109
9	ABSTRACT	111
10	LITERATURVERZEICHNIS	113
11	ANHANG	123
	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....	XIV
	DANKSAGUNG.....	XV
	LEBENS LAUF	XVI

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
ber.	berechnet
BPP	But-3-enyldiphosphat
Br-BPP	3-Brombut-3-enyldiphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
BuOH	1-Butanol
CD	Circulardichroismus Spektroskopie
CF ₃ -BPP	3-(Trifluormethyl)but-3-enyldiphosphat
Cl-BPP	3-Chlorbut-3-enyldiphosphat
CoA	Coenzym A
CMK	CPP-ME-Kinase
CMS	CPP-ME-Synthase
CPP-ME	3-Methyl-D-erythritol-cytidyl-diphosphat
CPP-MEP	4-Diphosphocytidyl-2-methyl-D-erythritol-2-phosphat
CPT	<i>cis</i> -Prenyltransferase
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMAPP	Dimethylallyldiphosphat
DPP	Decaprenyldiphosphat
DPPS	DPP-Synthase
DXP	1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat
DXR	DXP-Reduktase
DXS	DXP-Synthase
EcUPPS	<i>Escherichia coli</i> Undecaprenyldiphosphatsynthase
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EI	Elektronenstoßionisierung
ESI	Elektrosprayionisierung
FARM	<i>first-aspartate-rich-motif</i>
Fd	Ferredoxin
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
FPP	Farnesyldiphosphat
FPPS	FPP-Synthase
GC	Gaschromatographie
GFPP	Geranylfarnesyldiphosphatsynthase
GFPPS	GFPPS-Synthase
GGPP	Geranylgeranyldiphosphat
GGPPS	GGPPS-Synthase

GPP	Geranyldiphosphat
GPPS	GPP-Synthase
HDR	HMBPP-Reduktase
HDS	HMBPP-Synthase
HepPP	Heptaprenyldiphosphat
HepPPS	HepPP-Synthase
HexPP	Hexaprenyldiphosphat
HexPPS	HexPP-Synthase
HMBC	heteronukleare Korrelationsspektroskopie über mehrere Bindungen
HMBPP	Hydroxy-2-methyl-2-(<i>E</i>)-butenyl-4-diphosphat
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HSQC	heteronukleare Korrelationsspektroskopie über eine Bindung
(+/-) I-Effekt	(positiver/negativer) induktiver Effekt
IDI	IPP:DMAPP-Isomerase
IMAC	Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IPP	Isopentenylidiphosphat
LB	Luria-Bertani
LC	Flüssigkeitschromatographie
LM	Laufmittel
(+/-) M-Effekt	(positiver/negativer) mesomerer Effekt
MANT-O-GPP	(2 <i>E</i> ,6 <i>E</i>)-3,7-Dimethyl-8-[(<i>N</i> -methylantranoyl)oxy]octa-2,6-dienyldiphosphat
MANT-O-	(2 <i>E</i> ,6 <i>E</i>)-3,7-Dimethyl-8-[(<i>N</i> -methylantranoyl)oxy]octa-2,6-dienol
MCS	Methylerythritolcyclo-diphosphat-synthase
MDL	<i>method detection limit</i>
MEcPP	2-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclo-diphosphat
MeOH	Methanol
MEP	3-Methyl-D-erythritol-4-phosphat
MPD	Mevalonat-5-diphosphat-decarboxylase
MS	Massenspektrometrie
MVA	Mevalonat
MVP	Mevalonat-5-phosphat
MVPP	Mevalonat-5-diphosphat
NADP	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (reduzierte Form)
NMR	Kernmagnetische Resonanz
NPP	Nerolidyldiphosphat
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
OPP	Octaprenyldiphosphat
OPPS	OPP-Synthase

PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
Ph-BPP	3-Phenylbut-3-enyldiphosphat
PMK	Phosphomevalonatkinase
PT	Prenyltransferase
Ras	<i>rat sarcoma</i>
RFU	relative Fluoreszenzeinheiten
RP	<i>reversed phase</i>
SARM	<i>second-aspartate-rich-motif</i>
SDS	Natriumlaurylsulfat
SPP	Solanesyldiphosphat
SPPS	SPP-Synthase
SV	Säulenvolumen
TB	<i>Terrific Broth</i>
TEAS	<i>Nicotiana tabacum 5-epi-Aristolochensynthase</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TIC	<i>total ion current</i>
ThkCPT	<i>Thermococcus kodakaraensis cis-Prenyltransferase</i>
TPT	<i>trans-Prenyltransferase</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UPP	Undecaprenyldiphosphat
UPPS	Undecaprenyldiphosphatsynthase
UV	Ultraviolett
VIS	sichtbares Licht
WT	Wildtyp

Abbildungsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau einer Isopreneinheit (C_5H_8).....	3
Abbildung 2: MVA- und MEP-Weg in Pflanzen.....	5
Abbildung 3: Überblick der Reaktionen katalysiert durch Prenyldiphosphat- konvertierende Enzyme	8
Abbildung 4: Vermuteter evolutionärer Zusammenhang der Terpensynthasen nach dem Prinzip des modularen Aufbaus und Einteilung der Terpenzyklasen in Klasse I und II.....	9
Abbildung 5: Frühe Schritte der Zyklisierung von FPP zu verschiedenen Sesquiterpenen	13
Abbildung 6: Klassifizierung der Prenyltransferasen	15
Abbildung 7: Zwei mögliche Wege der IPP-Kondensation an das allylische Substrat.....	16
Abbildung 8: Darstellung des EcUPPS-Dimers	19
Abbildung 9: Genereller Reaktionsmechanismus der EcUPPS	20
Abbildung 10: Vergleich der offenen und geschlossen Form der EcUPPS.....	21
Abbildung 11: Coomassie-Brilliantblau G250-gefärbtes SDS-PAGE-Gel der EcUPPS-Reinigung.	22
Abbildung 12: Coomassie-Brilliantblau G250-gefärbtes SDS-PAGE-Gel der entsalzten Proteinfractionen unterschiedlicher EcUPPS-Varianten.....	23
Abbildung 13: Prinzip des Mikrotiterplatten-Phosphatdetektionsassays	24
Abbildung 14: HPLC-Chromatogramm der Produkte der EcUPPS-WT mit MANT-O- GPP und IPP nach Diphosphathydrolyse	26
Abbildung 15: Ausschnitt aus dem Modell der EcUPPS	27
Abbildung 16: Gesamtproduktbildung der verschiedenen EcUPPS-Varianten bestimmt über HPLC	28
Abbildung 17: Relativer Anteil an α -Helizes und β -Faltblattstrukturen der EcUPPS- Varianten	31
Abbildung 18: Postulierter Katalysemechanismus der EcUPPS mit der katalytischen Diade N74-E73.	33
Abbildung 19: Literaturbekannte allylische Substrate von Kurzketten- Prenyldiphosphatsynthasen und Mittelketten-Prenyldiphosphatsynthasen	35
Abbildung 20: Literaturbekannte allylische Prenyldiphosphatanaloga, die von den getesteten Kurzketten-Prenyldiphosphatsynthasen und Mittelketten- Prenyldiphosphatsynthasen nicht als Substrat akzeptiert werden.....	36
Abbildung 21: Artificielle Startersubstrate der EcUPPS	38
Abbildung 22: Reaktionsschema der Enzymreaktion von MANT-O-GPP und IPP.....	43
Abbildung 23: Emissionsspektren von MANT-O-GPP	44

Abbildung 24: HPLC-Analyse unterschiedlicher Konzentrationen von MANT-O-Geraniol.....	44
Abbildung 25: HPLC-Chromatogramm der Produkte einer EcUPPS-Reaktion mit MANT-O-GPP oder FPP.....	45
Abbildung 26: Coomassie-Brilliantblau G250-gefärbtes SDS-PAGE-Gel der ThkCPT-Reinigung	52
Abbildung 27: Bestimmung kinetischer Parameter der EcUPPS mit FPP und den homoallylischen Substraten IPP, BPP, CI-BPP und Br-BPP	53
Abbildung 28: HPLC-Chromatogramm der Produkte der EcUPPS mit MANT-O-GPP und den Elongationssubstraten IPP, BPP, CI-BPP und Br-BPP	55
Abbildung 29: DC-Analyse der EcUPPS-Produkte mit FPP als Startersubstrat und BPP sowie CI-BPP und Br-BPP.....	56
Abbildung 30: GC/EI-MS Analyse der EcUPPS-Assays mit FPP als Startersubstrat und den Elongationssubstraten BPP und CI-BPP	57
Abbildung 31: Bestimmung kinetischer Parameter der ThkCPT mit FPP und den homoallylischen Substraten IPP, BPP, CI-BPP und Br-BPP bei 22 °C	59
Abbildung 32: HPLC-Chromatogramm der Produkte der ThkCPT mit MANT-O-GPP und den Elongationssubstraten IPP, BPP, CI-BPP und Br-BPP bei 65 °C.....	60
Abbildung 33: HPLC-Chromatogramm der Produkte der ThkCPT mit MANT-O-GPP und den Elongationssubstraten IPP, BPP, CI-BPP und Br-BPP bei 25 °C.....	61
Abbildung 34: DC-Analyse der ThkCPT-Produkte mit FPP als Startersubstrat und BPP sowie CI-BPP und Br-BPP.....	62
Abbildung 35: Modell des katalytischen Zentrums der EcUPPS (EcUPPS_2) mit den Substraten FPP und einer überlagerten Darstellung der Elongationssubstrate IPP, BPP, CI-BPP und Br-BPP	64
Abbildung 36: Gesamtproduktbildung der EcUPPS-Varianten mit MANT-O-GPP und den homoallylischen Substraten BPP, CI-BPP oder Br-BPP bestimmt über HPLC.....	66
Abbildung 37: Biosynthese von Capsidiol in Tabak.....	70
Abbildung 38: Tertiärstruktur der TEAS.....	70
Abbildung 39: Reaktionsmechanismus der TEAS	71
Abbildung 40: Zyklisierungsformen während der Katalyse der TEAS über den transoiden oder cisoiden Weg	72
Abbildung 41: Coomassie-Brilliantblau G250-gefärbtes SDS-PAGE-Gel der TEAS-Reinigung	74
Abbildung 42: Synthetische und natürliche Prenyldiphosphate, die als Substrate der TEAS getestet wurden.....	75
Abbildung 43: GC/EI-MS-Chromatogramme (TIC) der TEAS-Enzymassays mit den Substraten GPP, FPP, 61 , 62 , 70 , 71 , 75 und 76	76
Abbildung 44: Enzymatische Produkte, die bei Umsetzung von GPP mit der TEAS nachgewiesen wurden.....	77
Abbildung 45: Enzymatische Produkte, die bei Umsetzung von Substrat 61 und Substrat 76 mit der TEAS nachgewiesen wurden.....	78

Abbildung 46: Enzymatische Produkte, die bei Umsetzung von Substrat 70 , 71 und 75 mit der TEAS nachgewiesen wurden	79
Abbildung 47: Vermutlicher Bildungsmechanismus von linearen und zyklischen Monoterpenen durch die TEAS.....	80
Abbildung 48: Postulierte Reaktionsmechanismen der TEAS mit den Substraten 61 , 70 , 71 , 75 und 76	81
Abbildung 49: Ausgewählte HSQC- und HMBC-Korrelationen von 61a	83
Abbildung 50: Vergleich der EI-MS-Spektren von 61a und Germacren A.....	84
Abbildung 51: Hauptprodukte der Umsetzung von Substrat 61 , 70 , 71 , 75 und 76 mit der TEAS.....	86

Abbildungsverzeichnis Anhang

Abbildung A 1: Aminosäuresequenzen der verwendeten Enzyme	132
Abbildung A 2: DC-Analyse der EcUPPS- und ThkCPT-Enzymreaktionen mit FPP als Startersubstrat und Ph-BPP sowie CF ₃ -BPP als Elongationssubstrat	133
Abbildung A 3: ¹ H-NMR-Spektrum von Produkt 61a in CDCl ₃	147
Abbildung A 4: ¹³ C-NMR-Spektrum von Produkt 61a in CDCl ₃	147
Abbildung A 5: gHMBC-Spektrum von Produkt 61a in CDCl ₃	148
Abbildung A 6: gHSQC-Spektrum von Produkt 61a in CDCl ₃	148

Tabellenverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ausgewählte Terpensynthesen und deren Klassifizierung nach der Proteinstruktur in die Terpenoidsynthese Klasse I oder Klasse II.....	11
Tabelle 2: Proteinausbeute der EcUPPS-Varianten.	23
Tabelle 3: Vergleich kinetischer Parameter der EcUPPS bestimmt mittels radioaktiv markiertem IPP oder MTP-Phosphatdetektionsassay.....	25
Tabelle 4: Bestimmung der kinetischen Parameter der EcUPPS-Varianten mittels Phosphatdetektionsassay für die Substrate FPP und IPP.....	27
Tabelle 5: LC/ESI-MS Analyse der Produkte der EcUPPS-Reaktion mit IPP und MANT-O-GPP für das WT-Enzym und EcUPPS-Varianten.	29
Tabelle 6: Kinetischer Parameter der EcUPPS mit artifiziellen Startersubstraten und IPP.	40
Tabelle 7: Literaturbekannte homoallylische Substrate von Kurzketten-PTs und Mittelketten-PTs sowie literaturbekannte homoallylische Prenyldiphosphatanaloga, die von den getesteten Kurzketten-PT und Mittelketten-PTs nicht als Substrat akzeptiert werden.....	48
Tabelle 8: Induktive (I) und Mesomere Effekte (M) ausgelöst durch verschiedene C3-Substituenten an BPP sowie Atomradien der Substituenten.	54
Tabelle 9: LC/ESI-MS Analyse der MANT-O-GPP-Produkte der EcUPPS mit IPP, BPP, Cl-BPP und Br-BPP.....	58
Tabelle 10: LC/ESI-MS Analyse der MANT-O-GPP-Produkte der ThkCPT mit IPP, BPP, Cl-BPP und Br-BPP bei 65 °C-Assaytemperatur.	63
Tabelle 11: Bestimmung der kinetischen Parameter der EcUPPS-Varianten mittels Phosphatdetektionsassay für die Substrate FPP und IPP.....	65
Tabelle 12: Produktverteilung bei Umsatz verschiedener allylischer Diphosphat-Substrate durch die TEAS.	75
Tabelle 13: Zusammenfassung der Bestimmungen kinetischer Parameter der TEAS mit natürlichen und artifiziellen Substraten	77
Tabelle 14: ¹ H- und ¹³ C-NMR Daten des TEAS-Produktes 61a	82
Tabelle 15: Verwendete Software	87
Tabelle 16: Verwendete Oligonukleotide für ortsgerichtete Mutagenesen und Sequenzierungen.	88

Tabellenverzeichnis Anhang

Tabelle A 1: Labor- und Verbrauchsmaterialien	123
Tabelle A 2: Verwendete Chemikalien.	125
Tabelle A 3: Liste der verwendeten Prenyldiphosphate.....	127
Tabelle A 4: Proteinkonzentrationsbestimmung der EcUPPS-Varianten über UV/VIS-Spektroskopie bei 280 nm	129
Tabelle A 5: Produktanalyse der EcUPPS Assays mit artifiziellen und natürlichen Startersubstraten sowie IPP als Elongationssubstrat mittels LC/ESI-MS.	130
Tabelle A 6: GC/EI-MS-Chromatogramm (TIC) der Produkte einer TEAS-Reaktion mit dazugehörigen EI-Spektren der einzelnen Produkte mit Substrat 61	134
Tabelle A 7: GC/EI-MS-Chromatogramm (TIC) der Produkte einer TEAS-Reaktion mit dazugehörigen EI-Spektren der einzelnen Produkte mit Substrat 62	135
Tabelle A 8: GC/EI-MS-Chromatogramm (TIC) der Produkte einer TEAS-Reaktion mit dazugehörigen EI-Spektren der einzelnen Produkte mit Substrat 70	137
Tabelle A 9: GC/EI-MS-Chromatogramm (TIC) der Produkte einer TEAS-Reaktion mit dazugehörigen EI-Spektren der einzelnen Produkte mit Substrat 71	138
Tabelle A 10: GC/EI-MS-Chromatogramm (TIC) der Produkte einer TEAS-Reaktion mit dazugehörigen EI-Spektren der einzelnen Produkte mit Substrat 75	139
Tabelle A 11: GC/EI-MS-Chromatogramm (TIC) der Produkte einer TEAS-Reaktion mit dazugehörigen EI-Spektren der einzelnen Produkte mit Substrat 76	140
Tabelle A 12: GC/EI-MS-Chromatogramm (TIC) der Produkte einer TEAS-Reaktion mit dazugehörigen EI-Spektren der einzelnen Produkte mit Substrat GPP	142
Tabelle A 13: GC/EI-MS-Chromatogramm (TIC) der Produkte einer TEAS-Reaktion mit dazugehörigen EI-Spektren der einzelnen Produkte mit Substrat FPP	145

Formelverzeichnis

Gleichung 1: Bestimmung der Proteinkonzentration anhand einer BSA-Standardkurve	97
Gleichung 2: Berechnung der Umsatzraten	99
Gleichung 3: Nicht-lineare Regression nach der Hill-Gleichung.....	100
Gleichung 4: Berechnung der Wechselzahl k_{cat}	100
Gleichung 5: Berechnung relativer Produktanteile eines TEAS-Umsatzes	102
Gleichung 6: Berechnung der Gesamtproduktbildung	103
Gleichung 7: MANT-O-Geraniol-Kalibriergerade	104
Gleichung 8: Berechnung der kritischen Konzentration x_c	104
Gleichung 9: Berechnung der unteren Nachweisgrenze der HPLC-Methode für MANT-O-Geraniol	104
Gleichung 10: Berechnung der Kováts-Retentionsindizes.	106
Gleichung 11: Berechnung der Proteinkonzentration basierend auf dem Lambert-Beerschen Gesetz.....	106
Gleichung 12: Berechnung der durchschnittlichen Elliptizität pro Aminosäure	107
Gleichung 13: Berechnung der spezifischen optischen Rotation.	108

1 Einleitung und Zielstellung

Die chemische Synthese von komplexen, niedermolekularen Kohlenstoffverbindungen ist oft schwierig und mit hohem finanziellem sowie zeitlichem Aufwand verbunden. Die enzymatische Synthese von Feinchemikalien zur Anwendung im Forschungs- und Entwicklungsbereich sowie für Additive in der Lebensmittel- und Duftstoffindustrie gewinnt deshalb zunehmend an Bedeutung.^[1] Aus diesem Grund sind vor allem alkylierende Enzyme von großer Bedeutung, die chemisch anspruchsvolle C-C-Verknüpfungen katalysieren können. Neben dem Methyltransfer sind hierbei vor allem prenylierende Enzyme von großem Interesse. Letztere werden dabei in Terpensynthesen und Prenyltransferasen eingeteilt. Beide Enzymklassen verwenden Oligomere des Isopentenylidiphosphats (IPP) oder dessen Isomers Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) als Substrat zur Synthese komplexer Kohlenstoffverbindungen. Terpensynthesen katalysieren eine intramolekulare Reaktion des Prenyldiphosphat-Substrates, während Prenyltransferasen eine Übertragung der Prenylkette entweder auf ein aromatisches Substrat (aromatische Prenyltransferasen), auf Cysteinreste von Proteinen (Proteinprenyltransferasen) oder auf ein weiteres Prenyldiphosphat (Polyprenyldiphosphatsynthasen) forcieren.

Zielstellung der vorliegenden Arbeit war die Erforschung des Katalysemechanismus von *cis*-Prenyldiphosphatsynthasen am Beispiel der *E. coli* Undecaprenyldiphosphatsynthase (EcUPPS). Zusätzlich sollte durch die Auslotung des Substratspektrums der EcUPPS und der ThkCPT (*Thermococcus kodakaraensis cis*-Prenyltransferase) eine Verbesserung der Analytik von Polyprenyldiphosphaten sowie zusätzlich eine Kettenverlängerung mit artifiziellen Prenyldiphosphaten erreicht werden. Dies würde zukünftig die enzymatische Synthese von alternativen Gummiressourcen eröffnen.

Als zweiter Schwerpunkt dieser Arbeit wird die Umsetzung synthetischer Prenyldiphosphate mit der 5-*epi*-Aristolochensynthase (TEAS) beschrieben. Durch die Biosynthese neuartiger Sesquiterpene wurde Wissen über den enzymatischen Zyklisierungsmechanismus erlangt, um zukünftig gezielt artifizielle Terpene als Additive für die Geruchs- und Lebensmittelindustrie zu biosynthetisieren.

2 Theoretischer Teil

2.1 Terpene und Terpenoide

Terpene und Terpenoide sind eine vielfältige Gruppe von Naturstoffen, die in Pflanzen, Tieren, Bakterien und Pilzen vorkommen. Terpene sind unsubstituierte Kohlenwasserstoffe, die sich von 2-Methylbutadien (Isopren) ableiten lassen (Abbildung 1). Die Einteilung der Terpene erfolgt nach Anzahl der Isopreneinheiten in Hemi- (C_5), Mono- (C_{10}), Sesqui- (C_{15}), Di- (C_{20}), Sester- (C_{25}), Tri- (C_{30} , Carotinoide), Sesquar- (C_{35}), Tetra- (C_{40} , Steroide) und Polyterpene ($C_{>40}$).^[2] Terpene gehören zur Stoffklasse der Lipide, die in Fettsäuren und deren Derivate, fettlösliche Vitamine, Steroide sowie Terpene unterteilt wird.^[3] Naturstoffe verschiedener biosynthetischer Herkunft, die eine Prenylierung enthalten, werden als Meroterpene bezeichnet. Terpenoide unterscheiden sich von Terpenen durch den Einbau weiterer funktioneller Gruppen. Als Primär- und Sekundärmetaboliten erfüllen Vertreter beider Klassen wichtige biologische Funktionen. So sind zum Beispiel Gibberelline, Sterole und Carotinoide Terpene des Primärstoffwechsels, die für essentielle Funktionen wie Wachstumskontrolle, Regulation der Membranpermeabilität und Schutz vor Photooxidation zuständig sind.^[4] Aber auch in Form von Sekundärmetaboliten spielen sie eine entscheidende Rolle als wahrnehmbare Signale intra- und interspezifischer Kommunikation.^[5,6] Wegen ihres oft angenehmen Duftes werden flüchtige Terpene und Terpenoide in der Geruchs- und Geschmackstoffindustrie verwendet. Menthol und Limonen sind beispielsweise die wohl bekanntesten Monoterpen(oide), die für den Geschmack und den Geruch von Minze bzw. Zitrone verantwortlich sind.^[7,8] Die beeindruckende Bioaktivität von Terpenoiden führt zu der immer stärkeren Erforschung dieser Stoffklasse. Eines der bekanntesten Krebstherapeutika, Paclitaxel (Taxol[®]), ist zum Beispiel in der Medizin sehr bedeutungsvoll. Die Gewinnung des Medikamentes aus der Rinde der pazifischen Eibe (*Taxus brevifolia*) ist sehr aufwendig und führte zur Zerstörung großer Eibenbestände. Deshalb wird Paclitaxel heute semisynthetisch aus einem Vorläufer des Wirkstoffes synthetisiert, der in den nachwachsenden Blättern der Pflanze zu finden ist.^[9] Von großer kommerzieller Bedeutung ist das bisher potenteste Antimalariamittel Artemisinin aus dem einjährigen Beifuß *Artemisia annua*. Die große Nachfrage nach diesem wirkungsvollen Sesquiterpen wird durch Isolierung aus dem entsprechenden Pflanzenmaterial sowie aus Zellkulturen bedient.^[10] Obwohl beide Medikamente seit über 50 Jahren stark erforscht werden, konnte noch keine geeignete, rein enzymatisch-biotechnologische Synthesestrategie entwickelt werden.^[11,12] Die schlechte Wasserlöslichkeit und die oft

toxische Wirkung größerer Mengen der Terpene auf prokaryontische Wirte erschweren eine biotechnologische Produktion zusätzlich.^[4]

Auch hochmolekulare Polyisoprene gehören in die Naturstoffklasse der Terpene. Polyisoprenoidsynthasen können die Bildung von Terpenen mit über 5000 Kohlenstoffatomen realisieren, wie im Fall der Kautschuk-Synthase (*Rubber-Synthase*).^[13,14] Durch Vulkanisieren entsteht ein sehr elastischer und widerstandsfähiger Kautschuk, der Anwendung in vielen Bereichen der Gummiherstellung findet (Autoreifen, Gummihandschuhe, Luftballons, Latexkleidung, u.v.m.). Gewonnen wird der natürliche Kautschuk hauptsächlich aus dem Kautschukbaum *Hevea brasiliensis*. Bestrebungen, größere Mengen Milchsaft (Latex) aus dem russischen Löwenzahn *Taraxacum kok-saghyz* zu gewinnen, sind heute Grundlage umfangreicher Forschungsbemühungen, denn besonders das vermehrte Auftreten von Allergien macht die Verwendung des Kautschuks aus *Hevea brasiliensis* immer schwieriger.^[15,16]

Die chemische Synthese ist ebenfalls in der Lage, hochmolekulare *cis*-Polyisoprene zu generieren. Dabei steht vor allem die Synthese von 1,4-*cis*-Polybutadien im Vordergrund. Über Polymerisation von 1,3-Butadienmonomeren entsteht so ein sehr widerstandsfähiger Gummi, der hauptsächlich bei der Herstellung von Reifen und anderen elastischen Produkten verarbeitet wird.

2.2 Isoprenoidstoffwechsel

Wie bereits angedeutet leiten sich all diese komplexen und chemisch schwer zugänglichen Verbindungen von Isopren ab (Abbildung 1). Leopold Ruzicka formulierte dazu erstmals die biogenetische Isoprenregel, die die Summenformel der Terpene $(C_5H_8)_n$ verbunden mit der Biosynthese der Verbindungen beschreibt.^[17] Die Verknüpfung der Isoprenmonomere kann dabei regelmäßig über eine Kopf-Schwanz-Verknüpfung erfolgen oder unregelmäßig über eine Kopf-Kopf- oder Schwanz-Schwanz-Verknüpfung.

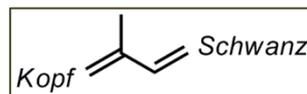


Abbildung 1: Aufbau einer Isopreneinheit (C_5H_8).

Zentraler Ausgangspunkt für die Synthese von Terpenen sind Acetyl-CoA (C_2 -Baustein) sowie der C_3 -Baustein Pyruvat. Aus diesen universellen Bausteinen werden die Vorläufer aller Terpene synthetisiert, Isopentenylidiphosphat (IPP) und dessen Isomer Dimethylallyldiphosphat (DMAPP).^[3] Der bekannteste Biosyntheseweg dieser C_5 -Verbindungen, der Mevalonat-Weg (MVA-Weg) (Abbildung 2), wurde 1956 mit der

Entdeckung von Mevalonat bekannt.^[18,19] Er war lange der einzige bekannte Isoprenoidstoffwechselweg und kommt universell in Bakterien, Pilzen, Pflanzen und Tieren vor. Die Entdeckung des Methyl-D-erythritol-4-phosphat-Weges (MEP-Weg) 1999 durch mehrere Forschungsgruppen um Rohmer und Arigoni, eröffnete eine weitere biosynthetische Route zur Bildung von Terpenen, die allerdings nur in Bakterien und Pflanzen zu finden ist (Abbildung 2).^[20,21] Während der MVA-Weg im Zytosol lokalisiert ist, wird die Synthese über den MEP-Weg in Pflanzen in den Plastiden bewerkstelligt. Die Biosynthese der Isoprenoide wurde in zahlreichen Reviews beschrieben und ist noch heute aktuelles Forschungsthema.^[6,20,22,23]

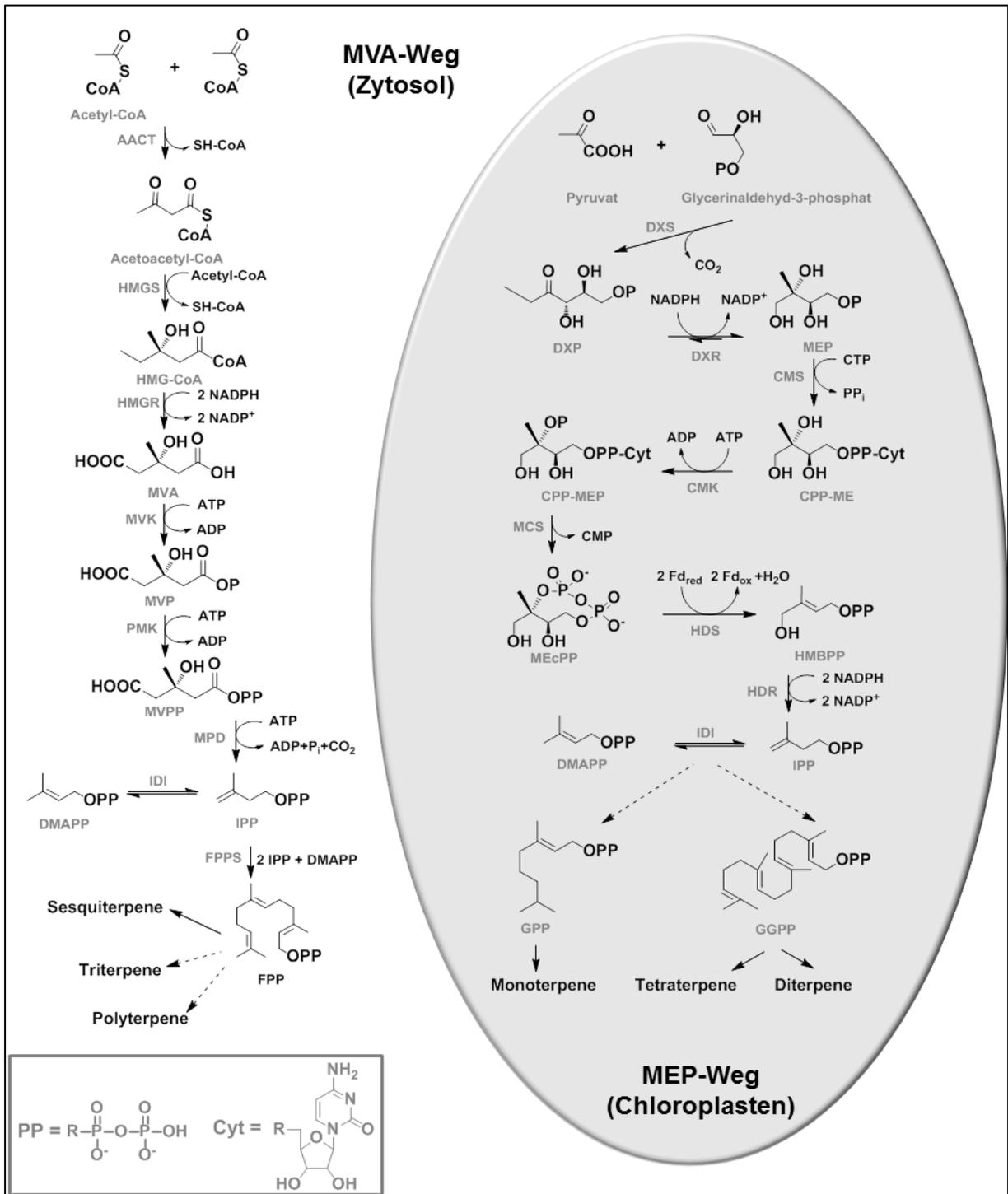


Abbildung 2: MVA- und MEP-Weg in Pflanzen. Links: Mevalonat-Weg (MVA), Rechts: Methyl-D-erythritol-4-phosphat-Weg (MEP).

AACT, Acetoacetyl-CoA-Thiolase; **ADP**, Adenosindiphosphat; **ATP**, Adenosintriphosphat **CoA**, Coenzym A; **CMK**, CPP-ME-Kinase; **CMS**, CPP-ME-Synthase; **CPP-ME**, 3-Methyl-D-erythritol-cytidyl-diphosphat; **CPP-MEP**, 4-Diphosphocytidyl-2-methyl-D-erythritol-2-phosphat; **DMAPP**, Dimethylallyldiphosphat; **DXP**, 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat; **DXR**, DXP-Reductoisomerase; **DXS**, DXP-Synthase; **Fd**, Ferredoxin **FPP**, Farnesylidiphosphat; **FPPS**, Farnesylidiphosphatsynthase; **GPP**, Geranylidiphosphat; **GGPP**, Geranylgeranylidiphosphat; **HDR**, HMBPP-Reduktase; **HDS**, HMBPP-Synthase; **HMBPP**, Hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphat; **HMG-CoA**, 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA; **HMGR**, HMG-CoA-Reduktase; **HMGS**, HMG-CoA-Synthase; **IDI**, IPP:DMAPP-Isomerase; **IPP**, Isopentenylidiphosphat; **MCS**, Methylerythritolcyclo-diphosphatsynthase; **MEcPP**, 2-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclo-diphosphat; **MEP**, 3-Methyl-D-erythritol-4-phosphat; **MPD**, MVPP-Decarboxylase; **MVA**, Mevalonat; **MVK**, Mevalonatkinase; **MVP**, Mevalonat-5-phosphat; **MVPP**, Mevalonat-5-diphosphat; **NADP**, Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat; **PMK**, Phosphomevalonatkinase.

2.2.1 Mevalonatweg (MVA-Weg)

Der MVA-Weg beginnt mit der Kondensation zweier Acetyl-CoA zu dem C₄-Intermediat Acetoacetyl-CoA (Abbildung 2). Katalysiert wird diese Reaktion von der Acetoacetyl-CoA-Thiolase. Die Anlagerung eines weiteren Moleküls Acetyl-CoA führt zur Synthese von 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA (HMG-CoA) mit Hilfe der HMGS (HMG-CoA-Synthase). Unter NADPH-Verbrauch wird HMG-CoA zu Mevalonat (MVA) reduziert. Anschließende Phosphorylierung durch die Mevalonatkinase lässt unter ATP-Verbrauch Mevalonat-5-phosphat (MVP) entstehen, welches erneut unter ATP-Verbrauch durch die Phosphomevalonatkinase (PMK) zu Mevalonat-5-diphosphat (MVPP) umgewandelt wird. Die Decarboxylierung des C₆-Bausteins MVPP mit Hilfe der Mevalonat-5-diphosphat-Decarboxylase (MPD) lässt die C₅-Verbindung IPP als Vorläufer aller Terpene entstehen. Die IPP:DMAPP-Isomerase (IDI) katalysiert die Umwandlung von IPP in DMAPP. Das allylische Diphosphat dient anschließend der Farnesyldiphosphatsynthese (FPPS) als Startersubstrat um mit der Anlagerung von zwei Einheiten IPP, Farnesyldiphosphat (FPP) zu synthetisieren. FPP wird zur Biosynthese aller Sesquiterpene sowie zur Synthese von Tri- und Polyterpenen benötigt.

2.2.2 Methylerythritolphosphatweg (MEP-Weg)

Die alternative Biosyntheseroute der Isoprenoide beginnt mit der decarboxylierenden Verknüpfung von Pyruvat mit Glycerinaldehyd-3-phosphat zu 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat (DXP) mit Hilfe der DXP-Synthase (DXS) (Abbildung 2). Die DXP-Reduktase (DXR) reduziert im Folgeschritt DXP zu 3-Methyl-D-erythritol-4-phosphat (MEP). Unter Diphosphatspaltung wird anschließend Cytidyldiphosphat an MEP geknüpft, es entsteht 3-Methyl-D-erythritol-cytidyl-diphosphat (CPP-ME) katalysiert durch die CPP-ME-Synthase (CMS). Eine ATP-abhängige Phosphorylierung der C2-Hydroxylgruppe von CPP-ME mittels CPP-ME-Kinase (CMK) resultiert in der Bildung von 4-Diphosphocytidyl-2-methyl-D-erythritol-2-phosphat (CPP-MEP) welches durch die Methylerythritolcyclodiphosphatsynthase (MCS) zu 2-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat (MEcPP) zyklisiert wird. Die Hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphatsynthase (HDS) katalysiert die Ringöffnung des zyklischen Diphosphates und die C3-reduktive Dehydrierung von MEcPP zu Hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphat (HMBPP). Den finalen Syntheseschritt zu Isopentenylidiphosphat (IPP) katalysiert die HMBPP-Reduktase (HDR) unter Verbrauch zweier Reduktionsäquivalente. Die IPP:DMAPP-Isomerase (IDI) vermittelt die Isomerisierung von IPP zu DMAPP. Durch Kondensation von DMAPP und IPP entsteht

mit Hilfe der Geranyldiphosphatsynthase (GPPS) der Vorläufer aller Monoterpene, das Geranyldiphosphat (GPP). Geranylgeranyldiphosphat (GGPP) wird durch Verknüpfung von DMAPP mit drei Molekülen IPP biosynthetisiert und ist Ausgangsstoff für Di- und Tetraterpene. Da der MEP-Weg nur in Pflanzen und Bakterien vorkommt, sind die Enzyme des Stoffwechselweges interessante Angriffspunkte für die Erforschung von Inhibitoren, die mögliche humanpathogene Bakterien adressieren könnten.^[24–27]

2.3 Prenylierende Enzyme

Terpene und (Mero-) Terpenoide sind mit über 70 000 bekannten Verbindungen eine der strukturell vielfältigsten Klasse der Sekundärmetaboliten.^[1] Hinsichtlich der Art des Produktes unterscheidet man dabei die enzymatische Synthese der oft geruchs- und geschmacksintensiven Terpene, die über intramolekulare Zyklisierung eines Prenylkations verläuft, von der intermolekularen Prenylierung, die zu linearen Polyprenyldiphosphaten (Polyprenyltransferasen (Poly-PT)), zu prenylierten aromatischen Produkten (aromatische Prenyltransferasen (aromatische PT)) oder modifizierten Proteinen (Protein-Prenyltransferasen (Protein-PT)) führt (Abbildung 3).

Terpenzyklasen werden nach der Anzahl an Isopreneinheiten des Produktes in Mono- (C_{10}), Sesqui- (C_{15}), Di- (C_{20}) und Triterpenzyklasen (C_{30}) unterteilt. Die Zyklisierung des Substrates erfolgt nach Abspaltung der Diphosphatfunktion über die Bildung eines Prenylkations.^[28] Das Carbeniumion greift eine intramolekulare Doppelbindung an. Methyl- und Protonen-*shifts*, weitere Zyklisierungen, Deprotonierung und erneute Protonierung sowie Wagner-Meerwein-Umlagerungen führen zu der Vielfalt an zyklischen Terpengrundgerüsten. Daher zeichnen sich Terpenzyklasereaktionen häufig durch die Entstehung mehrerer Produkte aus.^[29,30]

Proteine können durch Proteinprenyltransferasen modifiziert werden (Abbildung 3). Die Prenylierung von Proteinen erfolgt über eine Thioetherbrücke an C-terminalen Cysteinresten und ermöglicht hydrophilen Proteinen die Anlagerung an Membranen.^[31] Die Modifizierung erfolgt an einer sogenannten Ca_1a_2X -Box. Dabei sind „ a_1a_2 “ aliphatische Aminosäuren, während Aminosäure „X“ bestimmt, ob ein Farnesyl- oder Geranylgeranylrest angehängt wird.^[32] In der Krebstherapie besonders interessant ist die Prenylierung von Proteinen der Ras-Superfamilie. Da prenylierte Ras-Proteine (G-Proteine) vor allem an der Zellzykluskontrolle beteiligt sind, wird dieser Stoffwechselweg in Tumorzellen hochreguliert um Zellproliferation, Invasion und Metastasierung zu begünstigen. Man nennt sie daher auch Proto-Onkogene.^[32,33]

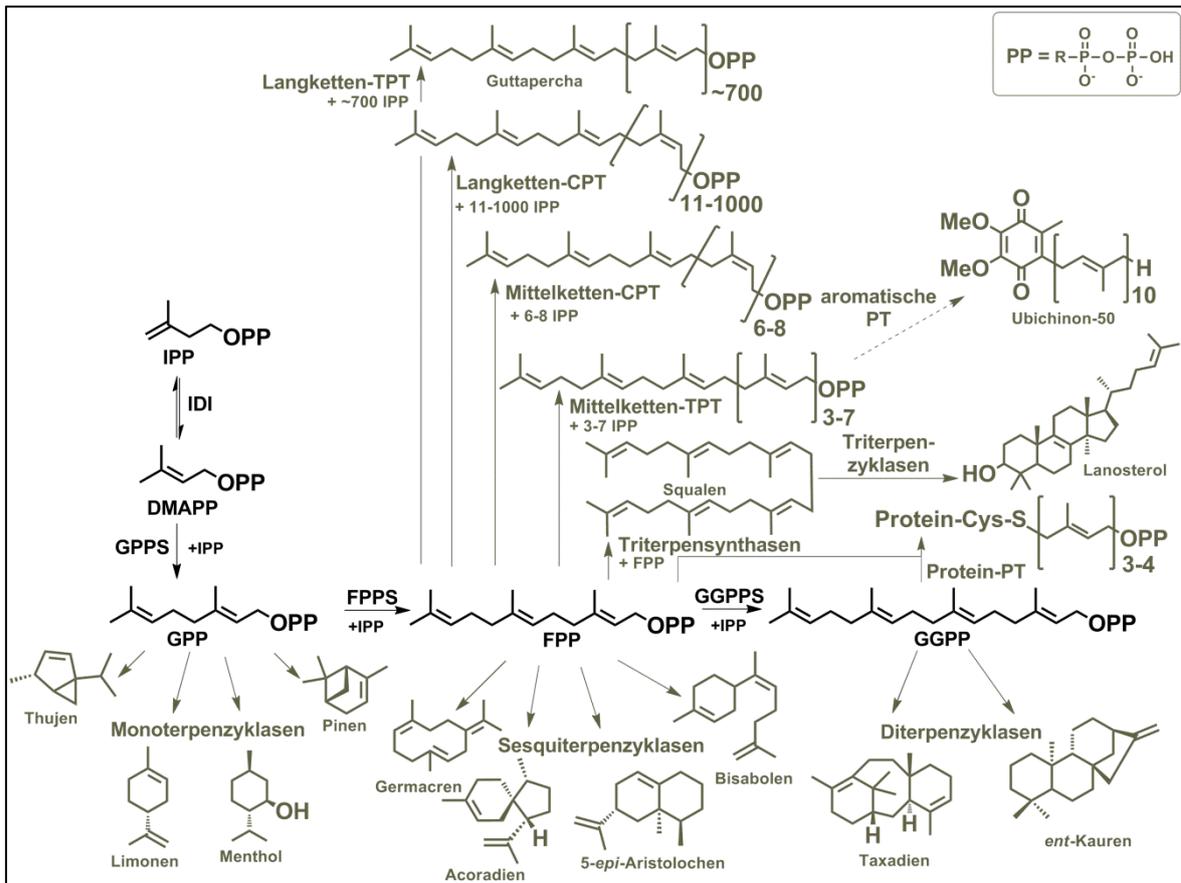


Abbildung 3: Überblick der Reaktionen katalysiert durch Prenyldiphosphat-konvertierende Enzyme.

CPT, *cis*-Prenyltransferase; **DMAPP**, Dimethylallyldiphosphat; **FPP**, Farnesylpyrophosphat; **FPPS**, FPP-Synthase; **IPP**, Isopentenylpyrophosphat; **GGPP**, Geranylgeranylpyrophosphat; **GGPPS**, GGPP-Synthase; **GPP**, Geranylpyrophosphat; **GPPS**, GPP-Synthase; **IDI**, IPP:DMAPP-Isomerase; **PT**, Prenyltransferase; **TPT**, *trans*-Prenyltransferase.

Neben den Proteinprenyltransferasen katalysieren aromatische PTs die Übertragung eines Prenylrestes auf einen Nichtprenyl-Akzeptor (Abbildung 3). Dabei sind C-, O- oder N-Prenylierungen möglich.^[34–36] Coenzym Q-10 (Ubichinon-50), welches im Stoffwechsel über C-Prenylierung eines Aromaten synthetisiert wird, ist als Elektronentransporter an der Atmungskette beteiligt und erfüllt essentielle Funktionen in der Zelle.^[37,38] Im Sekundärmetabolismus sind Prenylierungen von Indolen oder Alkaloiden bekannt, wobei sich die biologische Wirkung meist nach der Prenylierung verstärkt.^[39] Aromatische PTs können entweder membrangebundene oder lösliche Enzyme sein.^[39] Während membrangebundene aromatische PTs ein aspartatreiches DDXXDXXXD-Motiv besitzen und damit eine Mg^{2+} -abhängige Katalyse stattfindet, sind lösliche aromatische PTs nicht zwangsläufig abhängig von divalenten Metallionen und enthalten keine konservierte aspartatreiche Region.^[39] Letztere zeichnen sich durch einen gemeinsamen Faltungstyp, dem β/α -Fass, aus.^[40] Damit werden aromatische PTs dieses Faltungstyps (α - β - β - α) auch als ABBA-PTs bezeichnet.

Prenyltransferasen (oder auch Prenyldiphosphatsynthasen) übertragen Prenyldiphosphate auf allylische Prenyldiphosphataktzeptoren (Abbildung 3). Sie werden unterteilt in *cis*- (CPT) und *trans*-Prenyltransferasen (TPT), je nachdem welche Konfiguration die neu geknüpften Doppelbindungen der Produkte aufweisen.^[13] Bei den TPTs unterscheidet man Kurz-, Mittel- und Langketten-TPTs. Kurzketten-TPTs synthetisieren Produkte, die bis zu 25 Kohlenstoffatome enthalten. Mittelketten-TPTs können drei bis sieben IPP-Moleküle mit dem allylischen Startersubstrat FPP verknüpfen. Große Polymere synthetisiert die Langketten-TPT, deren Produkt Guttapercha darstellt, ein sehr widerstandsfähiges *trans*-Isomer des Polyisoprens.^[41] Die Einteilung der CPTs erfolgt in ähnlicher Weise, in Kurzketten- (bis C₂₀), Mittelketten- (C₂₅-C₅₅) und Langketten-*cis*-Prenyltransferasen (Kautschuksynthasen^[42], Dehydrodolichyldiphosphatsynthasen^[43]).^[44]

Im Folgenden wird detaillierter auf Terpenzyklen sowie Mittel- und Langketten-PTs eingegangen. Prenyltransferasen, die eine Übertragung auf Aromaten und Proteine katalysieren, sind nicht Thema dieser Arbeit. Gelungene Zusammenfassungen dieser Arbeitsgebiete stehen in verschiedenen Journalen zur Verfügung.^[31,45–50]

2.3.1 Terpenzyklen (-synthasen)

Die Terpenoidsynthasen können nach ihrer Tertiärstruktur in zwei Klassen unterteilt werden und folgen hinsichtlich ihres modularen Aufbaus einer Kombination aus drei verschiedenen Domänen (α , β , γ) (Abbildung 4).^[2,51–53]

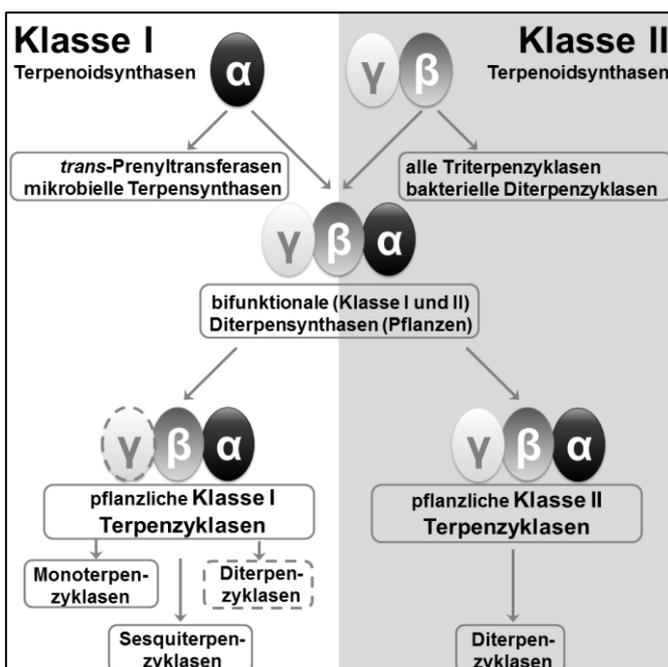


Abbildung 4: Vermuteter evolutionärer Zusammenhang der Terpensynthasen nach dem Prinzip des modularen Aufbaus und Einteilung der Terpenzyklen in Klasse I und II (modifiziert nach Gao et al., 2012^[2] und Christianson, 2006^[52]).

Man unterscheidet Klasse I Terpenoidsynthasen (Mono- und Sesquiterpensynthasen) von den Klasse II Terpenoidsynthasen (Triterpensynthasen) (Abbildung 4).^[2,51] Diterpensynthasen können sowohl dem Klasse I als auch dem Klasse II Mechanismus folgen.^[2] Ausgangsstoffe der zyklischen Terpene sind GPP (Monoterpene), FPP (Sesquiterpene), GGPP (Diterpene) oder Squalen (Triterpene). Gemeinsam ist der Synthese aller zyklischen Terpene die Bildung eines Prenylkations an dem azyklischen, achiralen Prenylsubstrat. Durch den nukleophilen Angriff einer Doppelbindung des Substrates kann ein Ringschluss ausgelöst werden, der zur Bildung multizyklischer, multichiraler Kohlenwasserstoffe führt.^[54]

Klasse I Terpenoidsynthasen besitzen eine α -Bündelstruktur und folgen einem ionisierungsabhängigen Mechanismus. Die enzymatische Hydrolyse des Diphosphates wird unterstützt durch einen trinuklearen Metallcluster und führt zur Bildung eines Diphosphatanions und eines (resonanzstabilisierten) Carbokations. Die Zyklisierung und die damit verbundene Entstehung einer neuen C-C-Bindung wird ausgelöst durch den intramolekularen nukleophilen Angriff einer Doppelbindung an das Carbokation.^[2] Genutzt wird dieser Reaktionstyp zum einen zur enzymatischen Synthese azyklischer Prenyldiphosphate unterschiedlichster Länge, durch *trans*-Prenyltransferasen (-elongasen), als auch für anschließende Zyklisierungs- und/oder Umlagerungsreaktionen durch Terpensynthasen (-zyklasen) (Abbildung 4).^[2] *trans*-Prenyltransferasen sowie Sesquiterpensynthasen aus Pilzen und Bakterien sind dabei monomodular aus einer α -Domäne aufgebaut.^[55] Mono- und Sesquiterpensynthasen (-zyklasen) aus Pflanzen bestehen jedoch zumeist aus einer $\beta\alpha$ -Bidomäne, wobei häufig nur die α -Untereinheit katalytisch aktiv ist.^[2] Evolutionär scheinen pflanzliche Klasse I Terpenzyklasen aus den bifunktionalen Diterpenzyklasen durch Verlust der γ -Untereinheit hervorgegangen zu sein (Abbildung 4).^[53,56] Pflanzliche Klasse I Terpenzyklasen und mikrobielle Terpensynthasen nutzen zwei aspartatreiche Regionen, DDXXD/E und (N,D)DXX(S,T)XXE (NSE/DTE), zur Komplexierung eines dreifachen Magnesiumclusters.^[52] Diese aspartatreichen Regionen sind auch in *trans*-Prenyltransferasen zu finden. Beide Bereiche sind als DDXXD-Motiv ausgeprägt und werden als FAR- (*first-aspartate-rich*-Motiv) und SAR-Motiv (*second-aspartate-rich*-Motiv) bezeichnet.^[52] Evolutionär betrachtet scheinen die metallionenbindenden Bereiche der Terpenzyklasen aus dem SAR- und FAR-Motiv der *trans*-Prenyltransferasen hervorgegangen zu sein wobei FARM in das NSE/DTE-Motiv divergiert ist.^[2]

Pflanzliche Sesquiterpensynthasen gehören zu den Klasse I Terpenoidsynthasen, enthalten somit ein DDXXD/E sowie NSE/DTE-Motiv und komplexieren, genau wie TPT's

drei Magnesium- (oder Mangan-) Ionen zur Orientierung der Diphosphatfunktion des Substrates sowie zur hydrolytischen Spaltung des Diphosphates von dem Substrat FPP.^[28,57] Nach erfolgreicher Kristallisation zweier Sesquiterpensynthasen^[58,59] wurde die Homologie dieser Enzyme zu TPT's erkannt und damit verbunden die erste Definition der (Klasse I) Terpenoidsynthasen geprägt. Neben der Kristallisation von fünf Sesquiterpensynthasen aus Bakterien und Pilzen^[58,60–63], konnten bisher drei pflanzliche Sesquiterpensynthasen strukturell aufgeklärt werden (PDB-Codes: 5EAS, 3G4F, 3SAE).^[59,64,65] Dabei konnte für die 5-*epi*-Aristolochensynthase (TEAS)^[59] aus Tabak (*Nicotiana tabacum*) und die (+)-D-Cadinensynthase^[64] aus Baumwolle (*Gossypium arboreum*) eine $\beta\alpha$ -Domänenstruktur gefunden werden, während die α -Bisabolensynthase aus *Abies grandis* eine zusätzliche, funktionslose γ -Domäne enthält, die vermutlich ein Relikt der Evolution darstellt (Tabelle 1).^[65]

Tabelle 1: Ausgewählte Terpensynthasen und deren Klassifizierung nach der Proteinstruktur in die Terpenoidsynthase Klasse I oder Klasse II. Dargestellt sind vorhandene strukturelle Terpenoidsynthase-Domänen (+) sowie nicht vorhandene Domänen (-) von Beispielen bekannter Terpenzyklasen. Ist eine Terpenoidsynthase-Domäne vorhanden, aber katalytisch inaktiv, ist diese durch Klammern markiert.

Terpenoidsynthase- klasse nach Proteinstruktur	Enzym	Terpenoid- synthase- Domäne			Terpensynthaseklasse nach Produkt
		α	β	γ	
I	Bornyldiphosphatsynthase ^[66] <i>Salvia officinalis</i>	+	(+)	-	Monoterpensynthase
I	α -Bisabolensynthase ^[65] <i>Abies grandis</i>	+	(+)	(+)	Sesquiterpensynthase
I	5- <i>epi</i> -Aristolochensynthase ^[59] <i>Nicotiana tabacum</i>	+	(+)	-	Sesquiterpensynthase
I	(+)-D-Cadinensynthase ^[64] <i>Gossypium arboreum</i>	+	(+)	-	Sesquiterpensynthase
I	Taxadiensynthase ^[56] <i>Taxus brevifolia</i>	+	(+)	(+)	Diterpensynthase
I, II	Abietadiensynthase ^[67] <i>Abies grandis</i>	+	+	(+)	Diterpensynthase
II	<i>ent</i> -Copalyldiphosphatsynthase ^[68,69] <i>Arabidopsis thaliana</i>	(+)	+	(+)	Diterpensynthase
II	Oxidosqualenzyklase ^[70] <i>Homo sapiens</i>	-	+	(+)	Triterpensynthase
II	Squalen-Hopen-Zyklase ^[71] <i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	-	+	(+)	Triterpensynthase

Sehr erstaunlich ist die Vielfalt an Sesquiterpengrundgerüsten, die diese Enzyme entstehen lassen. Heute wird angenommen, dass die Architektur des katalytischen Zentrums den Zyklisierungsweg des Substrates determiniert.^[72] Das Enzym stabilisiert über aromatische und aliphatische Aminosäuren die gebildeten Carbokationenintermediate sowie Übergangszustände und ermöglicht so die Bildung eines bestimmten Produktes.^[28] Die enzymatische Kontrolle der Produktbildung führt

durch Stabilisierung verschiedenster Kationen zu einer enormen Diversität an Sesquiterpengrundgerüsten, die beispielhaft in Abbildung 5 dargestellt sind. Nach Abspaltung der Diphosphatgruppe von (*E,E*)-FPP entsteht ein (*E*)-Farnesylkation, welches entweder durch einen C1-C10-Ringschluss (a) zum Germacrenylkation^[59] zyklisiert oder durch einen C1-C11-Ringschluss (b) in das Humulykation^[73] umgewandelt wird. Eine optionale zweite Zyklisierung des Germacrenylkations und weitere Umlagerungsreaktionen mit Protonenübergängen resultieren in der Bildung von z.B. (-)-Germacren A^[74], Aristolochen^[60], 5-*epi*-Aristolochen^[59], Premnaspriodien^[75] oder δ -Selinen^[76]. Die enzymatische Umwandlung des Humulykations lässt Pentalenen^[58] oder Presilphiperfolan-8 β -ol^[73] entstehen. Greift das Diphosphatanion erneut an dem entstandenen Carbokation in 3-Position an, entsteht Nerolidyldiphosphat (NPP). Das Diphosphat wird erneut abgespalten, so dass ein Nerolidylkation entsteht. Eine C1-C6-Zyklisierung (c) führt zur Bildung des α -Bisabolykation wodurch *epi*-Isozizaen^[63], Amorpha-4,11-dien^[77], (*S*)- β -Macrocarpen^[78], Trichodien^[62] oder (*E*)- α -Bergamoten^[79] entstehen. Zyklisiert das Nerolidylkation über die Positionen C1-C10 entsteht das Helminthogermacrenylkation (d). Allein durch seine *cis*-Konfiguration an Doppelbindung C2-C3, im Vergleich zu dem *trans*-konfigurierten Germacrenylkation (a), wird die Bildung unterschiedlicher Produkte ausgelöst, wie z.B. δ -Cadinen^[80], (+)-T-Muurolo^[81], *epi*-Cubenol^[82] oder (+)-^[83] und (-)-Germacren D^[84]. Das Humulykation bewirkt zudem die Bildung von γ -Humulen (e)^[76]. Aber auch lineare Sesquiterpene können nach Abspaltung des Diphosphates sowohl aus dem (*E*)-Farnesylkation als auch ausgehend von dem Nerolidylkation enzymatisch gebildet werden. Eine direkte Protonenabstraktion von FPP oder NPP durch Farnesensynthasen führt zur Bildung von α - oder β -Farnesen.^[85,86]

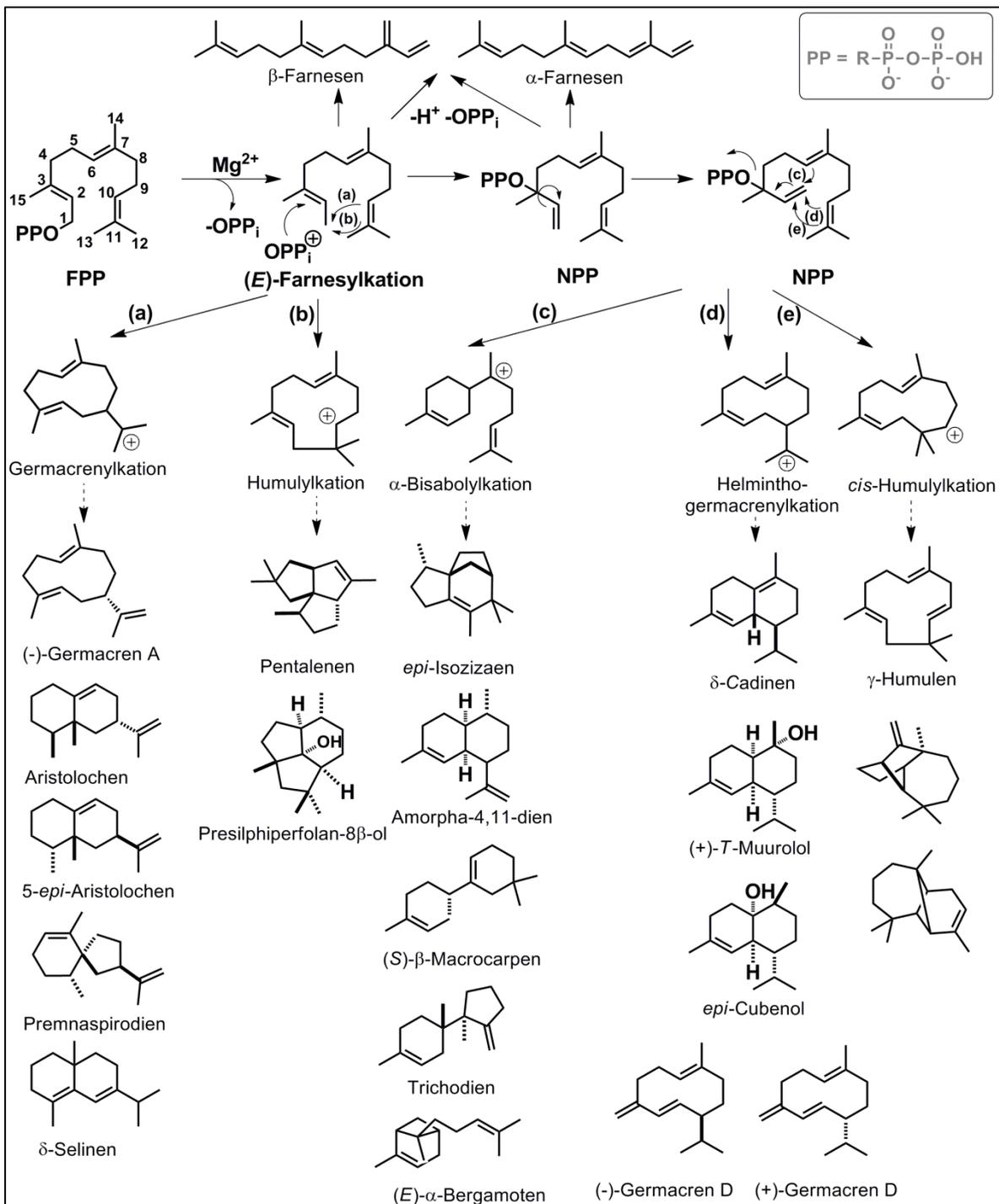


Abbildung 5: Frühe Schritte der Zyklisierung von FPP zu verschiedenen Sesquiterpenen. Sesquiterpensynthasen zyklisieren Farnesyldiphosphat (FPP) oder dessen Isomer Nerolidyldiphosphat (NPP) über diverse Carbokationenintermediate. Diese Carbokationenintermediate sind Ausgangspunkt für verschiedene Zyklisierungswege (a-e), die unter anderem zu den dargestellten Produkten führen. Die Abspaltung eines H^+ und OPP_i von FPP oder NPP durch Farnesensynthasen führt zur Synthese linearer Farnesene (Modifiziert nach Miller, 2012^[28])

Klasse II Terpenoidsynthasen haben im Gegensatz zu den Klasse I Terpenoidsynthasen eine doppelte α -Fass-Struktur und verfolgen einen Protonierungs-initiierten Mechanismus, bei dem das zentrale Aspartat eines DXDD-Motivs als Säure zur Protonierung des Substrates dient und damit zur Carbokationenbildung

führt.^[56,87] Dieser Reaktionsmechanismus wird von Triterpenzyklasen (z.B. Oxidosqualenzyklase^[70], Squalen-Hopen-Zyklase^[71]) sowie bakteriellen und einigen pflanzlichen Diterpensynthasen (z.B.: Taxadiensynthese^[56]) genutzt. Die Synthese der Triterpene beginnt mit der Epoxidierung von Squalen, so dass nach anschließender Protonierung des Epoxids im Folgeschritt ein Carbokation entsteht, welches durch eine elektrophile Addition an eine Doppelbindung den ersten Ringschluss auslöst.^[88] So entstehen z.B.: (Phyto-) Hormone (Brassinolide, Lanosterol), Membransterole (β -Sitosterol) und Saponine (glykosylierte Triterpene).^[88,89]

Mit der Aufklärung der Kristallstruktur der Abietadiensynthese aus *Abies grandis*, der Küstentanne, wurde der mögliche Scheitelpunkt der pflanzlichen Terpenzyklaseevolution aufgeklärt.^[67] Dieses Enzym enthält eine katalytisch aktive Klasse II Terpenoidsynthase $\gamma\beta$ -Domäne, die aus GGPP über einen protonierungsabhängigen Schritt Copolydiphosphat synthetisiert (Abbildung 4, Tabelle 1). Dieses wird anschließend von der aktiven α -Domäne des Proteins, welches zur Klasse I-Terpenoidsynthasesuperfamilie gehört, zu Abietadien umgesetzt.^[67] Ein weiteres Beispiel für eine Klasse II Terpenoidsynthase stellt die Taxadiensynthese aus *Taxus brevifolia* dar (Tabelle 1). Sie besteht, genau wie die Abietadiensynthese, aus einer $\gamma\beta\alpha$ -Domänenstruktur.^[56] Ein DXDD-Motiv ist aber nicht vorhanden. Das Enzym ist Magnesiumabhängig und nur die α -Domäne ist katalytisch aktiv, so dass die Taxadiensynthese einer Klasse I Reaktion folgt.^[56]

2.3.2 Mittelketten-Prenyltransferasen

Zu den Mittelketten-Prenyltransferasen gehören Enzyme, die aus einem homoallylischen Prenyldiphosphatdonor (IPP) durch konsekutive Kondensation an den allylischen Prenylakzeptor (GPP, FPP, GGPP) lineare Polyprenyldiphosphate mit einer Kettenlänge von C_{25} - C_{55} synthetisieren (Abbildung 6). Geranylarnesylprenyldiphosphatsynthasen (GFPPS) synthetisieren C_{25} all-*trans*-Polyprenyldiphosphate, die gemeinsam mit GGPP, dem Produkt der Geranylgeranyldiphosphatsynthese (GGPPS) über eine Etherbrücke verknüpft Lipide in Archaeobakterien bilden.^[90] Das Octaprenylprodukt der Octaprenyldiphosphatsynthese (OPPS) bildet die Seitenkette des Ubichinons in *Escherichia coli*.^[91] Verschiedene *cis*-Prenyltransferasen, so auch die Solanesyldiphosphatsynthese (SPPS), die Decaprenyldiphosphatsynthese (DPPS), die Hepta- (HepPPS) und die Hexaprenyldiphosphatsynthese (HexPPS) katalysieren die Bildung von C_{45} -, C_{50} -, C_{35} - bzw. C_{30} -Seitenketten von Ubichinonen in unterschiedlichen Spezies.^[92] Das C_{55} -Produkt der Undecaprenyldiphosphatsynthasen (UPPS) dient als lipidischer Überträger in der Peptidoglycanbiosynthese der bakteriellen Zellwand.^[93]

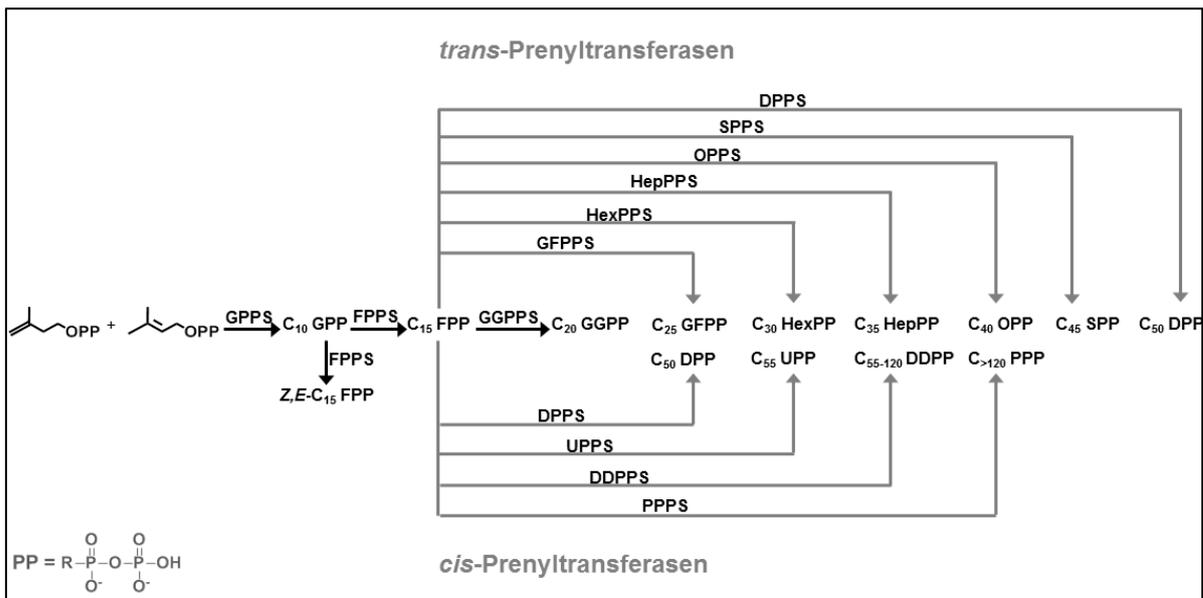


Abbildung 6: Klassifizierung der Prenyltransferasen.

GPPS, Geranyldiphosphatsynthase, FPPS, Farnesyldiphosphatsynthase, GGPPS, Geranylgeranyldiphosphatsynthase, GFPPS, Geranylfarnesyldiphosphatsynthase, HexPPS, Hexaprenyldiphosphatsynthase; HepPPS, Heptaprenyldiphosphatsynthase, OPPS, Octaprenyldiphosphatsynthase, SPPS, Solanesyldiphosphatsynthase, DPPS, Decaprenyldiphosphatsynthase; UPPS, Undecaprenyldiphosphatsynthase, DDPPS, Dehydrodolichyldiphosphatsynthase; PPPS, Polyprenyldiphosphatsynthase (modifiziert nach Liang *et al.*, 2002^[94])

Mittelketten-Prenyldiphosphatsynthasen sind gut untersucht und auch die Kristallisation einiger Enzyme ist gelungen.^[95-108] Sie werden in *cis*- und *trans*-Prenyltransferasen, nach der Konformation der neu gebildeten Doppelbindung des Produktes, unterschieden.^[109] Obwohl beide Enzymklassen ähnliche Produkte synthetisieren, unterscheiden sie sich grundlegend in Primär- als auch Tertiärstruktur.^[44] *Trans*-Prenyltransferasen enthalten zwei DDXXD-Motive (SARM und FARM) innerhalb von zwei der sieben konservierten Bereiche, welche typisch sind für Terpenoidsynthasen der Klasse I.^[44] Bei *cis*-Prenyltransferasen dagegen sind fünf konservierte Bereiche zuzuordnen.^[44] Sie enthalten keine aspartatreichen Regionen, so dass die Bindung der homoallylischen Diphosphatgruppe wohl eher über konservierte Argininreste erfolgt.^[110] Die Komplexierung von Magnesium, welches für die Katalyse notwendig ist, erfolgt jedoch auch über saure Aminosäuren.^[96,97] Die Tertiärstruktur von *cis*-Prenyltransferasen unterscheidet sich von den bisher bekannten Faltungsformen der Klasse I und II Terpenoidsynthasen und damit auch von den *trans*-Prenyltransferasen. Schon die Kristallisation der ersten *cis*-Prenyltransferase (*Micrococcus luteus* B-P 26 UPPS) zeigte eine Struktur aus parallelen β -Faltblättern, die eine Art inneren Kern bilden, umringt von α -Helizes.^[97] Nach Aufklärung der Kristallstruktur der *Escherichia coli* Undecaprenyldiphosphatsynthase (EcUPPS), die denselben Faltungstyp aufweist, wurde deutlich, dass sich *cis*-Prenyltransferasen evolutionär wahrscheinlich unabhängig von den

trans-Prenyltransferasen entwickelt haben.^[44,111] Obwohl beide Enzymgruppen ähnliche Reaktionen katalysieren, scheint der Reaktionsverlauf unterschiedlich zu sein.^[109] Die Kondensation von IPP kann über zwei verschiedene Mechanismen erfolgen (Abbildung 7). Im Fall des sequenziellen Ionisierungs-Kondensations-Eliminierungs-Mechanismus wird das allylische Substrat initial ionisiert und das Diphosphat abgespalten, bevor der nukleophile Angriff der IPP-Doppelbindung an das Carbokations erfolgt. Die Eliminierung eines Protons an C2 des Produktintermediates führt anschließend zur Bildung einer neuen Doppelbindung (S_N1 -ähnlicher Mechanismus).^[112] Im Gegensatz dazu steht der konzertierte Kondensations-Eliminierungs-Mechanismus. Hier erfolgt die Ionisierung des allylischen Substrates und die Kondensation von IPP gleichzeitig (S_N2 -ähnlicher Mechanismus).^[99]

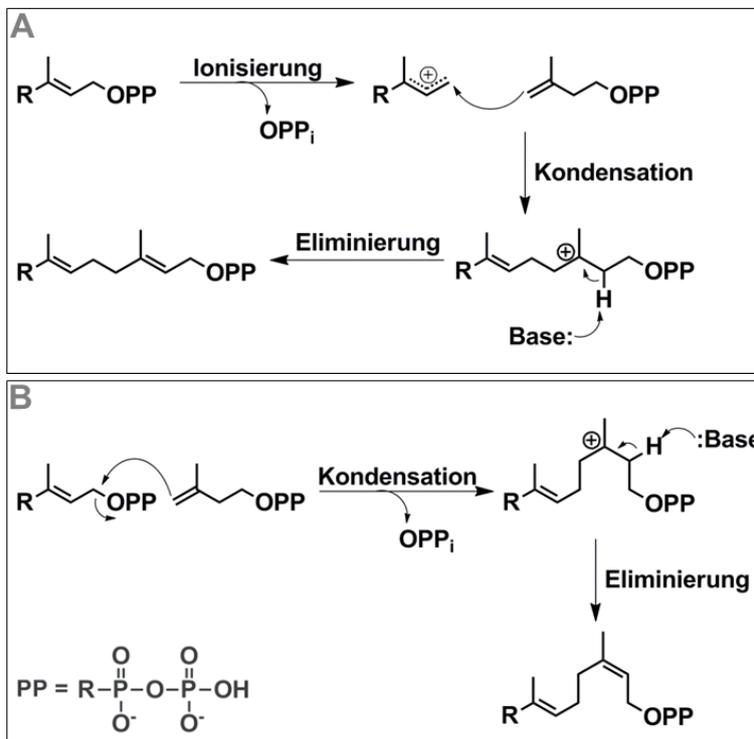


Abbildung 7: Zwei mögliche Wege der IPP-Kondensation an das allylische Substrat (modifiziert nach Teng und Liang, 2012^[113]). A, Sequenzieller Mechanismus; B, konzertierter Mechanismus.

Mit 3-Brombut-3-enyldiphosphat (Br-BPP) als homoallylisches Substrat wurde mit einer *trans*-Prenyltransferase (Octaprenyldiphosphatsynthase, OPSS) die Bildung von Farnesol aus FPP beobachtet, was die Bildung eines Carbokations voraussetzt (sequenzieller Mechanismus). Durch das elektronenziehende Brom wird jedoch die Reaktionsgeschwindigkeit herabgesetzt. Wird ein Kation gebildet, würde dies durch den Angriff von Wasser, in Farnesol umgewandelt. Im Fall der EcUPPS entsteht kein Farnesol, da es sich wahrscheinlich um einen konzertierten Mechanismus handelt.^[109] Lu *et al.* belegten die Theorie besser mit einem fluorierten FPP-Derivat (2-Fluor-FPP), welches zur Produktbildung mit der EcUPPS führte, während die getestete OPSS keine

Reaktion mit diesem Substrat zeigte.^[112] Die Carbokationenbildung, die für die OPPS-Reaktion notwendig ist, wird wahrscheinlich durch Fluor verhindert. Diese Ergebnisse unterstützen die Theorie, dass zumindest die Reaktion der EcUPPS einen assoziativen Übergangszustand enthält, während die OPPS einen dissoziativen Übergangszustand verwendet.^[112] Etwas unklar ist bis heute die Restriktion der Produktkettenlänge. Das Modell dazu geht davon aus, dass Aminosäurereste (Leucin) am Boden der hydrophoben, aktiven Tasche zum Kettenabbruch führen.^[102,111]

2.3.3 Langketten-Prenyltransferasen

Vor allem die Langketten-Prenyldiphosphatsynthasen sind in den letzten Jahren in den Fokus der Forschung gerückt, da diese grundlegend an der Synthese des Naturkautschuks beteiligt sind.^[15,16,114] Zunehmende Allergien^[115] gegen Naturkautschukprodukte erfordern die Suche nach Alternativen.^[15,16,116] Die Synthese der langkettigen Polyisoprene erfolgt in sogenannten Latizifern (Kautschukpartikeln) und wird von mehreren beteiligten Proteinen realisiert.^[14,117,118] So ist die *in vitro* Synthese von natürlichem Kautschuk sehr schwierig und bis heute noch nicht gelungen.^[119] Besonders die Kettenlänge des Naturpolymers wurde in *in vitro*-Versuchen noch nicht erreicht.^[16,42,120] Zudem sind Kautschuksynthasen membrangebundene Enzyme.^[14] Eine Reinigung ist damit sehr schwierig und homogenes Protein kann nur in sehr geringen Mengen erhalten werden. Die meisten Untersuchungen wurden bisher an gereinigten Latizifern von *Hevea brasiliensis* und *Taraxacum kok-saghyz* (Russischer Löwenzahn) durchgeführt, da hier die vorhandenen Helferproteine die *in vitro* Synthese unterstützen können.^[16,121] Aber auch andere Pflanzen sowie Pilze (Gattung *Lactarius*) enthalten Milchsaft und nachweislich auch Poly-*cis*-isoprene.^[116,122–125] Meist ist allerdings die Qualität des Kautschuks entscheidend, der von dem Molekulargewicht des Polymers, dessen Verzweigung, dem Gel-Gehalt (Anteil an unlöslichem, vernetztem Kautschuk) sowie anderen Komponenten abhängig ist.^[115]

Die Biosynthese von Naturkautschuk erfolgt mit Hilfe der Kautschukpartikel. Die Kautschuksynthese ist mit diesen Latizifern assoziiert und synthetisiert aus einem allylischen Startersubstrat (z.B.: (*E,E*)-FPP) und dem Elongationssubstrat IPP ein *cis*-Polyisoprenyldiphosphat mit einem Molekulargewicht von bis zu 10^6 g mol^{-1} (Abbildung 3).^[115] Die Produktintermediate diffundieren nach jedem Verlängerungsschritt aus dem Enzym und werden erneut gebunden.^[126] Es handelt sich wahrscheinlich um eine lebende Polymerisation (Polymerisation ohne Abbruchreaktion), bei der die Bildung eines Carbokations am allylischen Substrat die Kettenverlängerung auslöst.^[127] Die bekannten

Kautschuksynthasen sind von zweiwertigen Metallionen abhängig und enthalten die fünf konservierten Bereiche der *cis*-Prenyltransferasefamilie. Strukturell sind sie jedoch nicht charakterisiert, da bisher keine Kristallisation möglich war.^[15,42,120] Guttapercha, das *trans*-Isomer des Kautschuks, ist wenig beschrieben. Die Pflanzen *Palaquium gutta*, *Eucommia ulmoides*, *Euonymus europaeus* und *Couma macrocarpa* synthetisieren dieses Polymer, ein Enzym ist jedoch nicht bekannt.^[128]

Zu den Langketten-*cis*-Prenyldiphosphatsynthasen gehören auch die Dehydrodolichyldiphosphatsynthasen (DDPPS). In Eukaryonten stellen sie das homologe Protein der bakteriellen UPPS dar.^[94] Sie sind verantwortlich für die Bildung von C₅₅-C₁₂₀-Dolicholen, die über ihre Rolle als lipidischer Überträger in der Glycoproteinbiosynthese hinaus auch an der Synthese von Zellmembranen beteiligt sind.^[129,130]

3 Analyse des Reaktionsmechanismus der Undecaprenyldiphosphatsynthase aus *Escherichia coli* (EcUPPS)

3.1 Einleitung

Die Undecaprenyldiphosphatsynthase aus *Escherichia coli* (EcUPPS; EC-Nummer: 2.5.1.31) gehört zu den Mittelketten-*cis*-Prenyltransferasen und katalysiert die Kondensation von acht IPP-Molekülen an das allylische Substrat FPP.^[111] Undecaprenyldiphosphat, das Produkt der EcUPPS, spielt eine essentielle Rolle als lipidischer Überträger in der Synthese von Peptidoglykanen der bakteriellen Zellwand.^[131] Die Charakterisierung des Proteins gelang bereits 1985^[132], während eine Kristallisation erstmals Ko *et al.* 2001 gelang.^[111] Die EcUPPS tritt als Dimer auf, Untereinheit A und B. Jedes Monomer (~ 29 kDa, 253 Aminosäuren) besteht aus sechs parallelen β -Faltblättern, welche von sieben α -Helizes umringt sind (Abbildung 8).^[111] Die α -Helizes α_1 und α_2 bilden zusammen mit β -Faltblatt β_A bis β_D einen hydrophoben Tunnel, der das synthetisierte Produktpolymer aufnimmt. Die Substratbindungsstellen für das allylische Startersubstrat FPP und das homoallylische Elongationssubstrat IPP befinden sich nahe dem Ende von β_A .^[95,111]

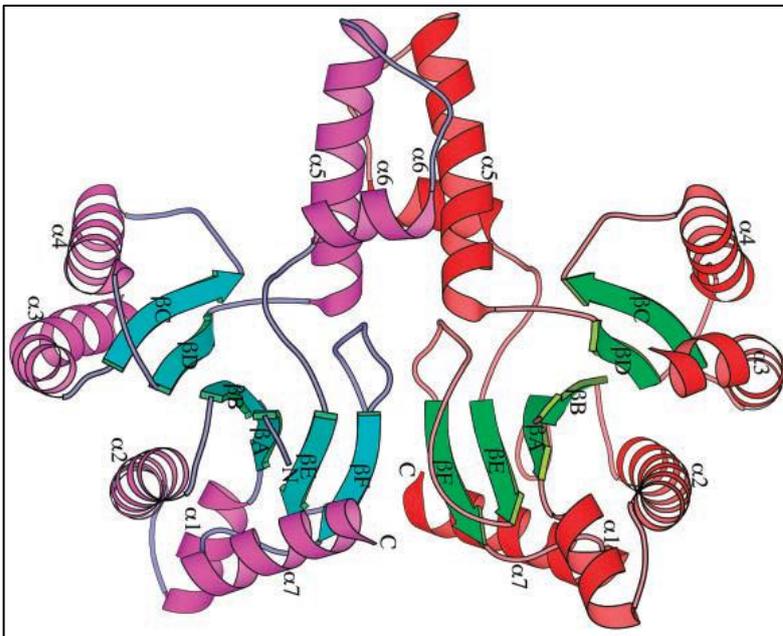


Abbildung 8: Darstellung des EcUPPS-Dimers. Die sieben α -Helizes und β -Faltblätter der Untereinheit A sind in rot bzw. grün abgebildet, die der Untereinheit B sind in magenta bzw. cyan dargestellt.^[111]

Ein Überblick über den vermuteten Mechanismus der EcUPPS-Enzymreaktion ist in Abbildung 9 dargestellt. IPP bindet zunächst magnesiumabhängig in der Enzymtasche. Anschließend wird das Magnesiumion zu dem Diphosphat von FPP transferiert. Das

Magnesium unterstützt als Lewisäure die enzyminduzierte Dissoziation des Diphosphates von FPP. Konzertiert greift nun die Doppelbindung von IPP an FPP an (Abbildung 9a). Eine katalytische Base abstrahiert das H_S-Protons des kondensierenden IPPs. Dadurch entsteht eine neue Doppelbindung in *cis*-Konfiguration (Abbildung 9b). Die Kondensation erfolgt in der Bindetasche von IPP, so dass das um fünf Kohlenstoffeinheiten verlängerte Reaktionsprodukt von der S2- (IPP-Bindungsstelle) zur S1-Bindungsstelle (FPP-Bindungsstelle) wandern muss (Abbildung 9c). Dies wird vermutlich durch R77 unterstützt.^[99] Nun kann ein weiteres Elongationssubstrat (IPP) an der S2-Bindungsstelle aufgenommen werden und der katalytische Zyklus startet erneut. Die EcUPPS kann diesen Mechanismus sieben- bis neunmal durchlaufen bis der Kettenabbruch aufgrund einer Termination durch L137 beendet wird und das Produkt entlassen werden kann.^[111] Es handelt sich hierbei wahrscheinlich um einen konzertierten Reaktionsmechanismus, d. h. es entsteht kein isoliertes kationisches Intermediat wie es beim Katalysemechanismus von Terpenzyklasen und *trans*-Prenyltransferasen angenommen wird.^[112,113,133]

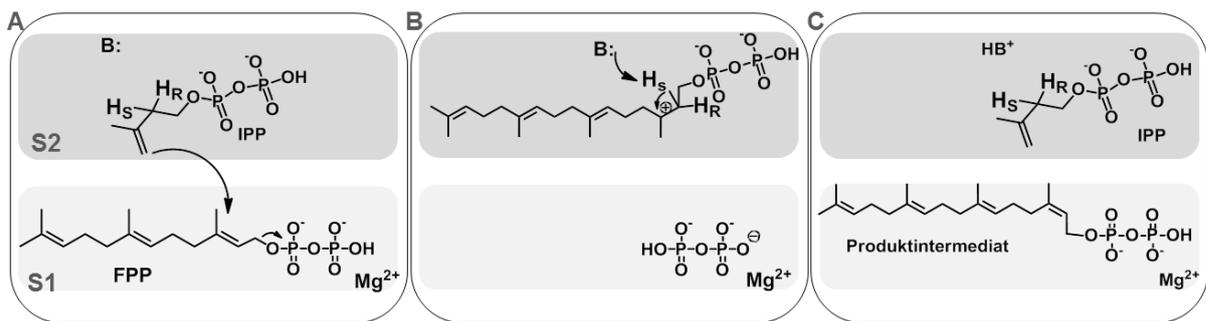


Abbildung 9: Genereller Reaktionsmechanismus der EcUPPS (A-C). Bilderläuterungen sind dem Text zu entnehmen. S1, FPP-Bindungsstelle; S2, IPP-Bindungsstelle; B: allgemeine Base.

Es stellt sich jedoch die Frage, welche Aminosäure als potentielle Base fungiert, also das H_S-Proton des Intermediates akzeptiert und damit maßgeblich die Produktbildung forciert. Kristallstrukturanalysen weisen auf S71 als katalytische Base hin.^[99] Dementsprechend konnte für die Variante S71A ein Aktivitätsverlust (4,4 % Restaktivität gegenüber dem Wildtyp-Enzym) und eine deutliche Veränderung der kinetischen Parameter (30fach erhöhter K_m-Wert (IPP) im Vergleich zum Wildtyp-Enzym) nachgewiesen werden.^[111] Strukturell konnte für S71 keine perfekte Orientierung ermittelt werden, um als Base zu fungieren. Da die aktive Tasche jedoch in einer sehr flexiblen Region lokalisiert ist, könnte eine 120°-Drehung die Aminosäure in eine geeignete Position bringen.^[99] N74 ist ein weiterer möglicher Protonenakzeptor, da die räumliche Nähe des Carbonylsauerstoffs der Amidfunktion in der Kristallstruktur zum C2 von IPP ebenfalls eine Funktion in der Katalyse ermöglicht.^[99] Hier konnte für die Alaninvariante von N74 eine Restaktivität von

1 % im Vergleich zu dem Wildtyp gemessen werden, während die K_m -Werte für beide Substrate unverändert blieben.^[111] Dennoch könnte auch das Lösungsmittel H_2O oder das Diphosphat der Substrate selbst als Protonenakzeptor fungieren.

Die EcUPPS wurde mehrfach erfolgreich kristallisiert. Somit konnten seit 2001 vierundzwanzig Kristallstrukturen erhalten werden. Das Apoenzym ohne Substrate wurde von Cao 2011 publiziert und zeigt die offene Form der EcUPPS, während eine Konformationsänderung des Enzyms bei Substratbindung zur geschlossenen, katalytisch aktiven EcUPPS führt (Abbildung 10).^[134] Eindeutig ist das Schließen der aktiven Tasche bei Substratbindung zu sehen, indem zwei Helizes aufeinander zu wandern.^[113]

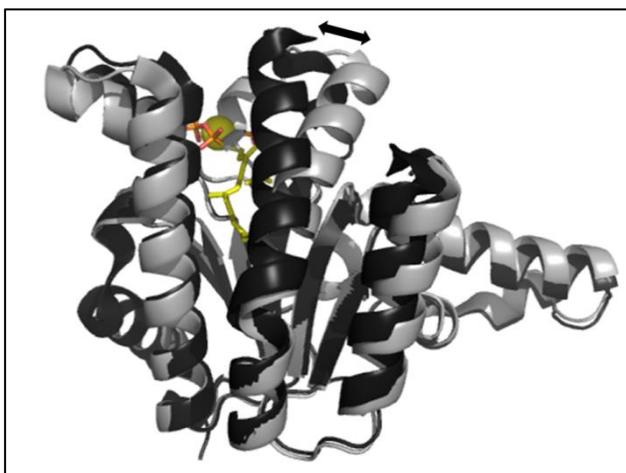


Abbildung 10: Vergleich der offenen (PDB-code: 3QAS, grau) und geschlossenen Form (PDB-Code: 1X08, schwarz) der EcUPPS mit Mg^{2+} , IPP und dem Substratanalogon Farnesylthiodiphosphat. Dargestellt ist nur ein Monomer des eigentlich dimeren Enzyms. Der schwarze Pfeil kennzeichnet die Delokalisation der Helix, die bei Substratbindung zur geschlossenen EcUPPS führt. Abbildung erstellt mit PyMOL 1.5.x.

Aufgrund geringer Elektronendichten war es bisher nicht möglich eine Kristallstruktur zu erhalten, die besonders im Bereich der Substratbindetaschen eine eindeutige Orientierung der Substrate und der katalytischen Aminosäurereste zeigt. Dies ist in der hohen Flexibilität der Schleifenstrukturen begründet, welche das aktive Zentrum bilden. So gibt es bisher keine Kristallstruktur, die zwei Substratanaloga enthält, die den natürlichen Substraten IPP und FPP nahe kommen. Zwar konnte die EcUPPS-Variante D26A mit IPP und dem FPP-Analogon Farnesylthiodiphosphat co-kristallisiert werden, jedoch sind vor allem für IPP nur Bruchstücke in der Kristallstruktur erkennbar.^[99] Die Kristallisation der EcUPPS mit nur einem Substrat konnte jedoch realisiert werden. Weiterhin war die Kristallisation der EcUPPS mit verschiedensten Bisphosphonat-Inhibitoren sehr erfolgreich, welche pharmakologisch zur Inhibierung der Farnesyldiphosphatsynthese angewendet werden (z.B. Fosamax, Zometa).^[98,108]

Da der Reaktionsmechanismus bisher nicht im Detail geklärt werden konnte, war für diese Arbeit zunächst ein tieferer Einblick in den Katalysemechanismus grundlegend. Sollen artifizielle Elongationssubstrate von *cis*-Prenyltransferasen akzeptiert werden, muss geklärt werden, welche Aminosäurereste essentiell an der Katalyse beteiligt sind. Nur so

wird es möglich in Folgearbeiten, über rationales Enzymredesign, die Kettenverlängerung zu beeinflussen.

3.2 Ergebnisse und Diskussion

3.2.1 Rekombinante Herstellung und Reinigung der EcUPPS

Die heterologe Expression des EcUPPS-Gens (Aminosäuresequenz im Anhang, Abbildung A 1) erfolgte in dem Vektor pET11b mit dem *Escherichia coli* Expressionsstamm BL21(DE3) (siehe Abschnitt 7.4.3.1). Dieser Vektor besitzt ein T7-Expressionssystem, welches eine über Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induzierbare heterologe Proteinherstellung zulässt. Der N-terminale His₆-Tag ermöglicht die Reinigung des Zielproteins über immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC). Zusätzlich vermittelt pET11b eine Ampicillin-Resistenz, die eine Selektion transformierter Klone ermöglicht. Zur Unterstützung der Proteinfaltung wurde ein Hitzeschockprotein (GroESL) co-exprimiert.^[135] Die Reinigung erfolgte über Co²⁺-vermittelte IMAC. Die Proteinreinigung wurde anschließend über SDS-PAGE kontrolliert (Abbildung 11).

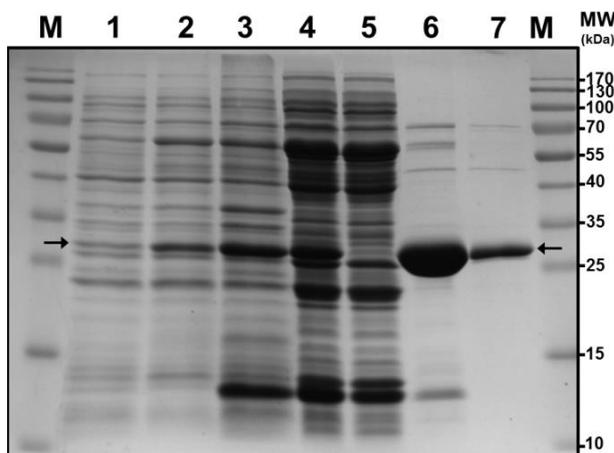


Abbildung 11: Coomassie-Brilliantblau G250-gefärbtes SDS-PAGE-Gel der EcUPPS-Reinigung. Das Zielprotein ist mit Pfeilen markiert und eluiert bei ~ 29 kDa. M, Proteingrößenstandard; 1, vor Induktion mit IPTG; 2, nach Induktion mit IPTG; 3, lösliche Proteinfraction; 4, unlösliche Proteinfraction; 5, nicht-gebundene Proteine der IMAC; 6, eluierte IMAC-Proteinfraction; 7, entsalzte Proteinfraction.

Deutlich erkennbar ist die Induktion der Biosynthese des Zielproteins (Abbildung 11, (2)). Nach erfolgter Zellyse wurden die löslichen Proteine (3) von den unlöslichen Proteinen (4) getrennt. Nachdem die His₆-EcUPPS an das IMAC-Material gebunden war, konnten unerwünschte Proteine des Expressionswirts (5) ausgewaschen werden. Anschließende Waschschrte und Elution der EcUPPS (6) mit Imidazol-haltigem Puffer und eine anschließende Entsalzung über Größenausschlusschromatographie an Sephadex™ G-25 führten zu chromatographisch homogenem Zielprotein (7). Die durchschnittliche Ausbeute an EcUPPS lag bei 2,3 mg L⁻¹ Kultur (Tabelle 2).

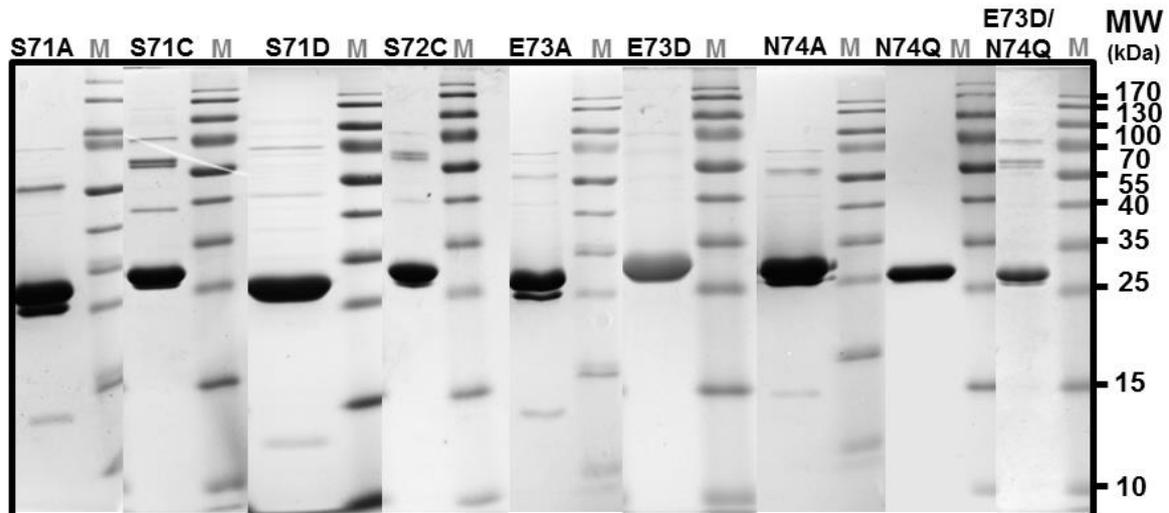


Abbildung 12: Coomassie-Brilliantblau G250-gefärbtes SDS-PAGE-Gel der entsalzten Proteinfraktionen unterschiedlicher EcUPPS-Varianten nach Metallaffinitätschromatographie.

Varianten der EcUPPS konnten nach diesem Protokoll (siehe Abschnitt 7.4.3.1) ebenfalls gereinigt werden und wurden mittels SDS-PAGE auf Reinheit überprüft (Abbildung 12). Für die entsprechenden Varianten konnten Proteinausbeuten zwischen 4 mg und 17 mg pro Liter Flüssigkultur erhalten werden (Tabelle 2).

Tabelle 2: Proteinausbeute der EcUPPS-Varianten. Die angegebene Konzentration bezieht sich auf 1 L Flüssigkultur. WT, Wildtyp			
EcUPPS-Variante	Proteinausbeute (mg L⁻¹ Kultur)	EcUPPS-Variante	Proteinausbeute (mg L⁻¹ Kultur)
WT	2,3	E73A	11,8
S71A	14,6	E73D	11,2
S71C	13,4	N74A	16,6
S71D	8,1	N74Q	4,1
S72C	6,8	E73D/N74Q	6,1

3.2.2 Mutagenesestudien zur Aufklärung des Katalysemechanismus der EcUPPS

Mit den nachfolgend beschriebenen Mutagenesestudien wurde gezielt versucht, die an der Katalyse beteiligten Aminosäuren zu identifizieren. Besonders interessant war hierbei die Identifizierung der allgemeinen Base, die essentiell für die Produktbildung ist. Aufgrund der unvollständigen Auflösung der Kristallstruktur der EcUPPS im Bereich des aktiven Zentrums, war es notwendig auf Basis der publizierten Kristallstrukturen, ein Modell der EcUPPS zu erhalten, welches im katalytischen Bereich sinnvolle und zuverlässige Aminosäureorientierungen aufweist. Auf Grundlage der Kristallstruktur der EcUPPS-Variante D26A (PDB-Code: 1X08) wurde von PD Dr. Wolfgang Brandt ein

aussagekräftiges Modell der EcUPPS erstellt. Da keine der bisherigen Kristallstrukturen beide Substrate oder Substratanaloga enthält, wurden vor der Generierung der Modelle FPP sowie IPP in die Substratbindungstasche der geschlossenen Form des Enzyms modelliert. Erstellte wurden vier Modelle, die mit verschiedenen Methoden (Ramachandran-Plot, ProSA, Swissmodel Q-Mean) hinsichtlich nativen Faltungsverhaltens untersucht wurden. Das Modell EcUPPS_2 war dabei das am besten bewertete und wurde für diese Arbeit verwendet. Die Homologiemodelle wurden mit YASARA (Version 12.11.25) und MOE (Version 2012.10) erstellt.

Katalytische Parameter des Wildtyps sowie dessen Varianten wurden mit einem Mikrotiterplatten-Phosphatdetektionsassay (MTP-Phosphatdetektionsassay) erhalten (Abschnitt 7.5.1, Abbildung 13).^[136,137] Erstmals konnte mit der Etablierung dieses Assays die Bestimmung enzymkinetischer Parameter von prenylierenden Enzymen unabhängig von radioaktiv markierten Substraten realisiert werden.

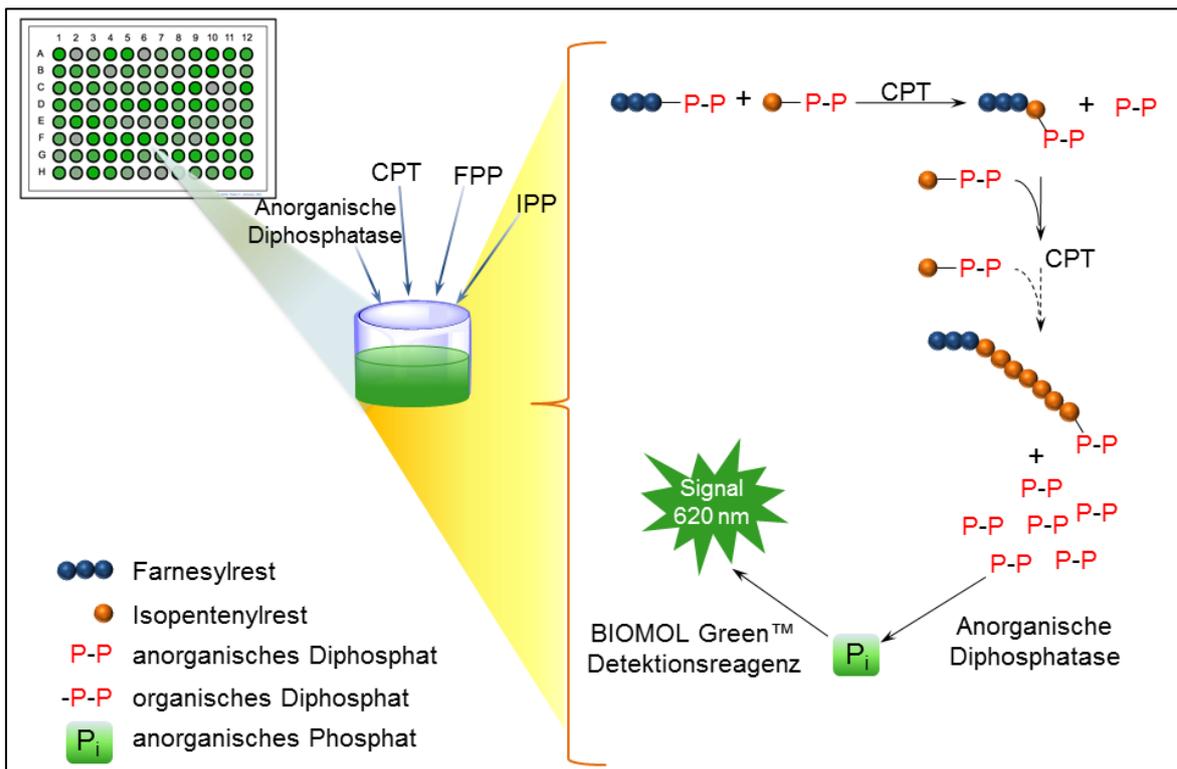


Abbildung 13: Prinzip des Mikrotiterplatten-Phosphatdetektionsassays. Während der Enzymreaktion prenylierender Enzyme wird durch die konsekutive Kondensation von einem homoallylischen Prenyldiphosphat (z.B.: IPP) an das allylische Substrat (z.B.: FPP), anorganisches Diphosphat frei. Dieses wird anschließend von der Anorganischen Diphosphatase in anorganisches Monophosphat gespalten. Nach erfolgter Katalyse wird die Enzymreaktion durch Zugabe des sauren Detektionsreagenzes BIOMOL Green™ gestoppt und die Phosphatthydrolyse in Form der Absorption bei 620 nm gemessen.

Dieser Assay beruht auf der Malachitgrün-Färbung von anorganischem Phosphat.^[137] Während der Reaktion einer Prenyltransferase wird sukzessive Diphosphat freigesetzt, welches von einer anorganischen Diphosphatase in Monophosphat gespalten wird. Das Monophosphat kann nach erfolgter Enzymreaktion mit dem Reagenz BIOMOL-Green™ detektiert werden. P_i bildet in Gegenwart des Reagenzes eine Heteropolysäure mit Molybdat, welche durch Malachitgrün komplexiert wird und zu einer Farbänderung der Lösung von gelb nach grün führt. Da bisher alle publizierten katalytischen Parameter auf radioaktiv-markierten Substraten basieren, wurden die mit Hilfe des MTP-Assays erhaltenen kinetischen Daten mit den publizierten Daten verglichen (Tabelle 3). Die Unterschiede in den bestimmten Parametern sind dabei auf das unterschiedliche Assaysystem zurückzuführen, liegen jedoch in derselben Größenordnung. Mit Hilfe des MTP-Phosphatdetektionsassays kann der Umsatz unabhängig von der Art des Substrates detektiert werden. Dies war besonders wichtig für die Analyse der Umsetzung von Substratanaloga (Kapitel 4, 5 und 6).

Tabelle 3: Vergleich kinetischer Parameter der EcUPPS bestimmt mittels radioaktiv markiertem IPP ^[99,111] oder MTP-Phosphatdetektionsassay.			
Assay	K_m (FPP) (μM)	K_m (IPP) (μM)	k_{cat} (s^{-1})
MTP-Phosphatdetektionsassay	1,8 ± 0,1	6,5 ± 0,4	0,5 ± 0,01
Umsetzung von [¹⁴ C] IPP	0,4 ± 0,1	4,1 ± 0,3	2,5 ± 0,1

Die Gesamtproduktbildung aller Varianten wurde mittels HPLC bestimmt (Abbildung 16, siehe Abschnitt 4.2.3). Hierzu wurde das fluoreszierende allylische Substrat (2*E*,6*E*)-8-*O*-(*N*-Methyl-2-aminobenzoyl)-3,7-dimethyl-2,6-octandien-1-diphosphat (MANT-*O*-GPP, **23**) verwendet um die Produkte der EcUPPS-Enzymreaktionen nachzuweisen (Abbildung 14).^[138] So konnte über die Substratabnahme indirekt die Gesamtproduktmenge im Vergleich zu einer Kontrollprobe mit denaturiertem Enzym bestimmt werden (Abbildung 14, siehe Abschnitt 7.5.6.2). Die Assays wurden über Nacht inkubiert, um unabhängig von der Reaktionsgeschwindigkeit eine erschöpfende Produktbildung zu ermöglichen. Die Kettenlänge der einzelnen Produkte wurde über LC/ESI-MS bestimmt (siehe Abschnitt 7.5.7, Anhang, Tabelle A 5). Diese Analysen zeigten, dass die Produktkettenlängen unabhängig vom verwendeten allylischen Substrat sind, da sowohl die Verwendung von FPP als auch von MANT-*O*-GPP sieben bis neun IPP-Kondensationen ermöglicht (siehe Abschnitt 4.2.2).

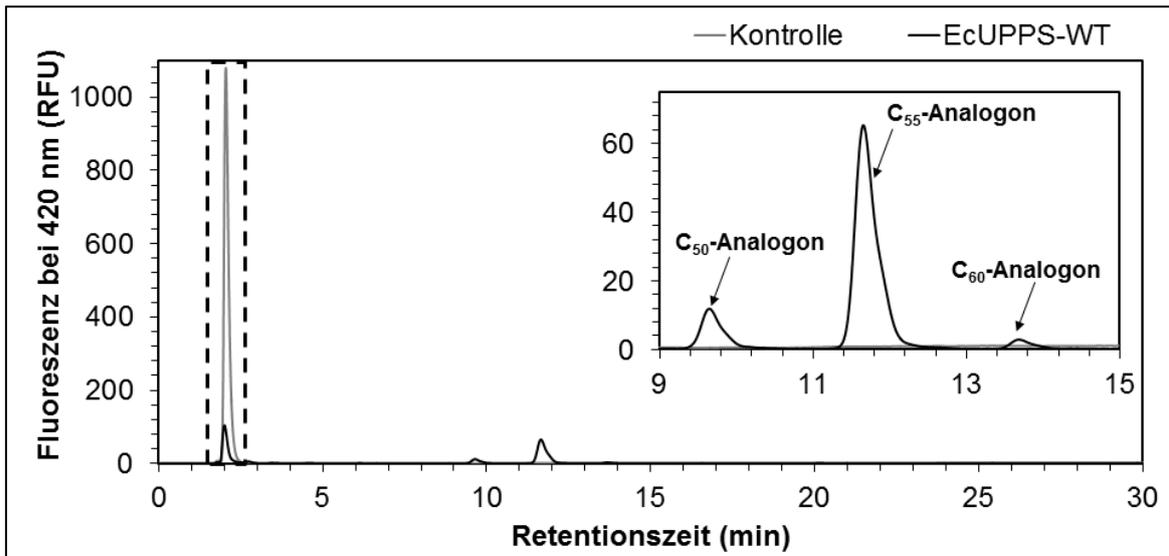


Abbildung 14: HPLC-Chromatogramm der Produkte der EcUPPS-WT mit MANT-O-GPP und IPP nach Diphosphathydrolyse. Die Detektion der Emission bei 420 nm erfolgte über Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 352 nm. In gestrichelten Linien ist das Signal von MANT-O-Geraniol markiert, dessen Fläche für die Berechnung der Gesamtproduktbildung verwendet wurde. Die Kontrollreaktion erfolgte mit denaturiertem Enzym. In dem Ausschnitt ist der Retentionsbereich der Produkte vergrößert. RFU, relative Fluoreszenzeinheiten, WT, Wildtyp.

In Tabelle 4 sind die Ergebnisse der kinetischen Messungen der verschiedenen EcUPPS-Varianten dargestellt. Relative k_{cat} -Werte beziehen sich dabei auf den k_{cat} -Wert des Wildtyp-Enzyms.

Betrachtet man nun das aktive Zentrum der EcUPPS (Abbildung 15), wird eine katalytische Diade aus N74 und E73 möglich. Das H_{S} -Proton von IPP, welches nach der Kondensation des Farnesylrestes abstrahiert werden muss, liegt zwar mit 4,9 Å zu weit entfernt von der Carboxamidgruppe von N74, jedoch muss dieses Proton erst beim Durchlaufen des Übergangszustands abstrahiert werden, der in Abbildung 9b dargestellt ist. Durch die Kondensation von IPP an das allylische Substrat entsteht eine neue C-C-Bindung (Übergangszustand), die durch Abstraktion des H_{S} -Protons in der Bildung einer *cis*-Doppelbindung resultiert. Die genaue Position der Atome im Übergangszustand ist bislang unklar. Eine geringfügige Positionsänderung im Übergangszustand im Vergleich zu derjenigen im frisch gebundenen Substrat (IPP) könnte das H_{S} -Proton in eine geeignete Lage für eine Protonenabstraktion bringen. Das Proton könnte anschließend über den Amidrest von N74 zur Carboxylfunktion von E73 transferiert werden (Abbildung 15). S71 scheint dagegen das α -Phosphat von IPP zu stabilisieren, da die Bildung einer Wasserstoffbrücke hinsichtlich des Abstands möglich ist. Um nachzuweisen, ob die vermutete katalytische Diade tatsächlich vorhanden ist, wurden ortsgerichtete

Mutagenesen durchgeführt. S71 wurde mittels ortsgerichteter Mutagenese als potentieller Kandidat für die Phosphatstabilisierung von IPP geprüft.

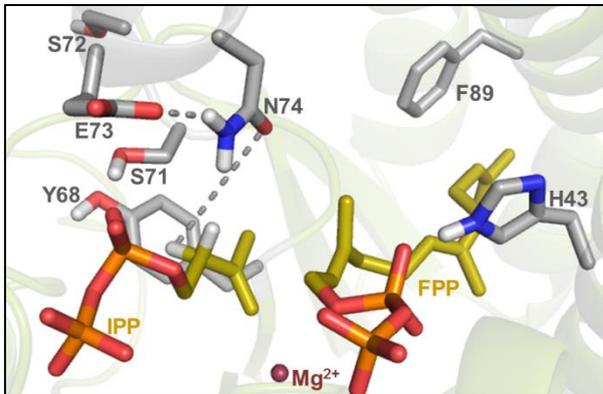


Abbildung 15: Ausschnitt aus dem Modell der EcUPPS (EcUPPS_2) mit den natürlichen Substraten IPP und FPP und dem Cofaktor Mg^{2+} . Hervorgehoben sind die Aminosäuren, die in dieser Arbeit über ortsgerichtete Mutagenese verändert wurden. Gestrichelte Linien deuten vermutete Protonenübergänge vom Substrat über eine potentielle katalytische Diade aus N74 und E73 an. Abstand H_{β} -Proton von IPP zu N74-Carbonylsauerstoff: 4,9 Å; Abstand N74-Aminogruppe zu E73-Carboxylfunktion: 2,0 Å. IPP, Isopentenylidiphosphat; FPP, Farnesylidiphosphat. Abbildung und Abstandsmessung mit PyMOL 1.5.x.

Betrachtet man zunächst nur die EcUPPS-N74A-Variante ist hier ein kompletter Aktivitätsverlust zu beobachten (Tabelle 4). Ko *et al.* konnten durch Verwendung radioaktiv markierter Substrate jedoch eine Aktivität von 1 % im Vergleich zum WT bestimmen.^[111] Der Austausch N74A sollte die Funktionalität des Aminosäurerests als potentielle katalytische Base verhindern, um die essentielle katalytische Rolle dieser Aminosäure zu prüfen.

Tabelle 4: Bestimmung der kinetischen Parameter der EcUPPS-Varianten mittels Phosphatdetektionsassay für die Substrate FPP und IPP. Die Kurvenregression erfolgte nach dem Hill-Modell. nd, nicht detektiert.

EcUPPS-Variante	K_m (FPP) μM	relativer k_{cat} (%)	K_m (IPP) μM	relativer k_{cat} (%)
Wildtyp	$1,8 \pm 0,1$	100 ($0,5 s^{-1}$)	$6,6 \pm 0,4$	100 ($0,42 s^{-1}$)
S71A	$3,6 \pm 0,3$	14	$44,3 \pm 4,5$	12
S71C	$9,2 \pm 2,1$	1	$49,1 \pm 10,9$	1
S71D	$0,4 \pm 0,2$	0,04	$7,0 \pm 2,2$	0,03
S72C	$4,6 \pm 0,5$	92	$18,8 \pm 2,4$	90
E73A	$4,5 \pm 0,4$	14	$18,8 \pm 1,3$	14
E73D	$3,9 \pm 0,4$	35	$19,7 \pm 2,7$	35
N74A	nd	nd	nd	nd
N74Q	$2,2 \pm 0,3$	2	$23,1 \pm 5,1$	4
E73D/N74Q	$2,3 \pm 0,6$	8	$13,0 \pm 1,2$	7

Der Austausch gegen Glutamin, eine Aminosäure gleicher Funktionalität mit einer zusätzlichen CH_2 -Gruppe, resultiert in einer Variante mit 2-4 % Aktivität. Der K_m -Wert von N74Q bleibt für FPP gleich, während für IPP eine 3,5fache Erhöhung zu beobachten ist.

Sterische Effekte oder auch ungünstige Abstände für eine potentielle Protonenübertragung könnten bei der entsprechenden Variante zu geringerer Aktivität führen. Während N74A keinerlei Produktbildung aufweist, zeigt N74Q denselben Umsatz wie der WT (Abbildung 16).

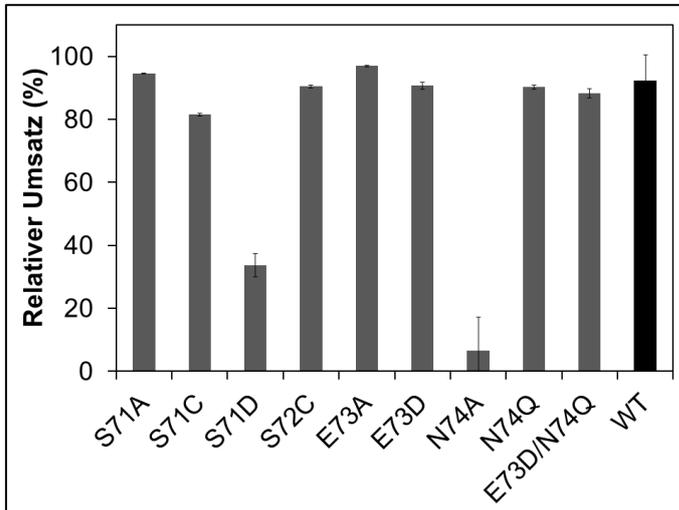


Abbildung 16: Gesamtproduktbildung der verschiedenen EcUPPS-Varianten bestimmt über HPLC. Der relative Umsatz wurde bestimmt durch die Abnahme des MANT-O-Geraniol-Signals im Vergleich zu einer Kontrolle mit denaturiertem Enzym.

Die Produktkettenlängen der N74Q-Enzymvariante, die über LC/ESI-MS bestimmt wurden, entsprechen dabei denen des Wildtyp-Enzyms (Tabelle 5).

E73, als potentieller Protonenakzeptor der katalytischen Diade, wurde über eine Alanin- und Aspartatvariante geprüft. Mit einer Restaktivität von 14 % und einem ähnlichen K_m -Wert wie der WT zeigt E73A eine moderate Katalyse (Tabelle 4). Möglicherweise wird die Funktion von E73 als potentieller Protonenakzeptor durch eine benachbarte Aminosäure oder das Lösungsmittel H_2O ersetzt. Der Austausch von E73 gegen ein Aspartat sollte nun die Funktionalität der Variante wiederherstellen. Mit einer Aktivitätssteigerung um 20 % im Vergleich zu E73A konnte mit der Variante E73D ein eindeutiger Hinweis erbracht werden, dass die Carboxylfunktion an dieser Stelle eine Rolle spielen muss. Die Mutation zu Aspartat hat zusätzlich die Verkürzung der Aminosäurefunktion um eine Methylengruppe zur Folge, wodurch die Abstände für eine Protonenübertragung suboptimal sind. Die Doppelvariante E73D/N74Q erhält die Funktionalität beider Aminosäuren und ist mit 7-8 % aktiver als N74Q (2-4 %) allein. Die Verdopplung der Aktivität der Zweifachvariante im Vergleich zu N74Q, sowie die leicht gesteigerte Affinität zu IPP (K_m (IPP) 13 μ M) im Vergleich zu N74Q (K_m (IPP) 23 μ M) und E73D (K_m (IPP) 20 μ M), deuten darauf hin, dass E73D/N74Q, trotz ungünstiger Abstände für Protonenübertragungen, die Funktionalität als katalytische Diade einnehmen kann. Die Gesamtproduktbildung sowie die Produktkettenlängen der beschriebenen Varianten entsprechen dem Wildtyplevel (Abbildung 16, Tabelle 5).

Tabelle 5. LC/ESI-MS Analyse der Produkte der EcUPPS-Reaktion mit IPP und MANT-O-GPP für das WT-Enzym und EcUPPS-Varianten. Wenn nicht anders angegeben, sind die m/z-Verhältnisse bezogen auf $[M+Na]^+$. m/z, Masse-zu Ladungsverhältnis; RT, Retentionszeit (min).

EcUPPS-Variante	7	8	9
	IPP-Elongationen m/z	IPP-Elongationen m/z	IPP-Elongationen m/z
WT	802,4 (RT 8,77)	870,5 (RT 10,94)	938,7 (RT 13,27)
S71A	-	870,8 (RT 11,74)	938,7 (RT 13,99)
S71C	802,5 (RT 8,77)	870,7 (RT 11,09)	-
S71D	802,5 (RT 8,79)	870,4 (RT 10,84)	-
S72C	-	870,7 RT (11,01)	954,8 $[M+K]^+$ (RT 13,28)
E73A	-	870,6 (RT 11,76)	938,7 (RT 13,97)
E73D	-	870,6 (RT 11,72)	938,3 (RT 14,08)
N74A	-	-	-
N74Q	-	870,7 (RT 12,14)	-
E73D/N74Q	818,5 $[M+K]^+$ (RT 9,59)	886,6 $[M+K]^+$ (RT 11,70)	954,2 $[M+K]^+$ (RT 14,00)

S71 ist nach dem erstellten Modell (EcUPPS_2, Abbildung 15) in geeigneter Position um das α -Phosphat von IPP zu stabilisieren und damit die Positionierung des Substrates in der aktiven Tasche zu unterstützen. Zur Prüfung dieser Hypothese wurde eine S71A-Variante der EcUPPS hergestellt. Die Variante S71A ist mit 14 % Restaktivität noch immer aktiv, jedoch ist eine starke Erhöhung des K_m -Wertes für IPP um das 7fache zu verzeichnen, während der K_m -Wert für FPP ähnlich dem des Wildtyps ist. Eine Wasserstoffbrücke im aktiven Zentrum dieser Variante kann nicht ausgebildet werden, so dass IPP offensichtlich nicht geeignet positioniert werden kann, was zu einem erhöhten K_m -Wert führt. Ähnliche Ergebnisse zeigten Guo *et al.* 2005.^[99] Sie wiesen 4,4 % Restaktivität der S71A-Variante und einen 10fach erhöhten K_m -Wert für IPP nach. Die Autoren deuteten die Ergebnisse jedoch als Indiz für die Rolle von S71 als katalytische Base. Allerdings wäre zu erwarten, dass ein Funktionsverlust des entscheidenden Protonenakzeptors zu einem völligen Aktivitätsverlust führen würde, wie er in dieser Arbeit für die Variante N74A gezeigt werden konnte.

Um weiter der Hypothese nachzugehen, ob S71 maßgeblich an der Phosphatstabilisierung von IPP beteiligt ist, wurde eine Cysteinvariante hergestellt. Cystein besitzt anstatt der Hydroxylfunktion eine Thiolgruppe, die prinzipiell eine deutlich schwächere Wasserstoffbrücke ausbilden könnte und dem Serin strukturell sehr ähnlich ist. Die Ergebnisse in Tabelle 4 zeigen jedoch, dass S71C mit einer Restaktivität von 1 % eine noch zusätzlich verschlechterte Aktivität im Vergleich zu S71A aufweist, wobei der K_m -Wert von IPP mehr als 7fach erhöht und damit die Affinität zu IPP stark verringert ist. Möglich wäre, dass das Cystein mit der Doppelbindung von IPP reagiert und damit eine Inaktivierung des Enzyms erfolgt. Dies kann jedoch nahezu ausgeschlossen werden, da die Gesamtproduktmenge nach längerer Reaktionszeit als auch die Kettenlängenverteilung der gebildeten Produkte auf Wildtypniveau liegen (Abbildung 16, Tabelle 5). Würde sich die S71C-Variante durch Reaktion mit dem Substrat selbst inaktivieren, sollte zum einen die Produktbildung insgesamt stark inhibiert und zum anderen die Produktkettenlängen stark verkürzt sein. Beides ist nicht der Fall (Abbildung 16, Tabelle 5).

Mutiert man S71 zu Aspartat, erzielt man einen fast völligen Aktivitätsverlust, obwohl auch hier die Möglichkeit einer Wasserstoffbrücke zum α -Phosphat theoretisch bestehen bleibt. Erstaunlicherweise ist der K_m -Wert entsprechend dem des Wildtyp-Enzyms. Möglicherweise ist die Ausbildung der Wasserstoffbrücke zum Substrat möglich und der starke Aktivitätsverlust auf den sehr hydrophilen Charakter des Aspartats zurückzuführen, so dass die Umgebung zu stark beeinflusst wird und dadurch die Katalyse gestört ist.

S72 liegt im Enzymmodell der EcUPPS nicht in direkter Umgebung zum aktiven Zentrum, so dass eine Beteiligung dieser Aminosäure an der Katalyse unwahrscheinlich ist. Dementsprechend konnte für S72C eine relative Aktivität von ca. 90 % des Wildtyps gemessen werden, wobei die K_m -Werte für beide Substrate leicht erhöht waren. Eine Rolle von S72 in der Katalyse ist damit tatsächlich ausgeschlossen.

3.2.3 Analyse der Sekundärstruktur

Die Analyse der Sekundärstruktur der EcUPPS und derer Varianten erfolgte durch CD-Spektroskopie. Unterschiede im Substratumsatz von Enzymvarianten können auf der einen Seite aufgrund der neuen Funktionalität der eingeführten Punktmutation entstehen, oder auf der anderen Seite durch falsche Proteinfaltung ausgelöst sein. Um Faltungsprobleme zu ermitteln, wurden CD-Spektren aller EcUPPS-Varianten aufgenommen. Zur Dekonvolution der Spektren in die relativen Anteile an α -Helix- und β -Faltblattstrukturen im Fern-UV-Bereich wurde das Programm K2D3 verwendet.^[139]

Bioinformatische Berechnungen der Sekundärstruktur anhand der Kristallstruktur 3QAS ergaben 38 % α -helikale Bereiche und 11 % β -Faltblattstrukturen. Die Sekundärstrukturanalyse auf Grundlage der CD-spektroskopischen Daten ist in Übereinstimmung mit der bioinformatischen Abschätzung und ergab für das Wildtyp-Enzym einen Anteil von 39 % α -Helizes und 15 % β -Faltblattstrukturen (Abbildung 17). Die Varianten der EcUPPS zeigen überwiegend keine starken Änderungen der Sekundärstruktur. Die Normalisierung der Spektren erfolgte dabei durch Berechnung der durchschnittlichen Elliptizität pro Aminosäure (Θ_{MRE}), so dass die Intensität der Elliptizität unterschiedlicher Varianten nicht konzentrationsabhängig ist. Lediglich S71D, E73D/N74Q und N74A scheinen eine veränderte Sekundärstruktur hervorzurufen. Die relativen Anteile α -helikaler Strukturen sind bei diesen Varianten um 20-30 % geringer als bei dem Wildtyp. Besonders im Fall von S71D fällt eine Erhöhung anderer Strukturmerkmale, wie *Random Coil* oder *Loop*-Regionen, auf. Die strukturelle Veränderung ist deutlich an den beispielhaft dargestellten CD-Spektren in Abbildung 17B erkennbar. Während das CD-Signal von S72C ähnlich dem des Wildtyp-Enzyms verläuft, ist das Signal von S71D in Richtung der Nulllinie stark verschoben. Die stark eingeschränkte katalytische Aktivität von S71D könnte deshalb zusätzlich auf Problemen bei der Proteinfaltung beruhen. Faltungsunterschiede zeigen sich in geringerem Maß ebenso bei den Varianten E73D/N74Q und N74A. Obwohl E73D/N74Q nicht nativ gefaltet zu sein scheint (Abbildung 17A) ist katalytische Aktivität als auch Produktbildung nachweisbar (Tabelle 4, Abbildung 16). Die Sekundärstrukturanalyse ergibt ähnliche Ergebnisse für die N74A-Variante. Diese Variante zeigt bei den Aktivitätsmessungen keinen Substratumsatz. Die Fehlfaltung könnte deshalb ein zusätzlicher Grund für die verminderte Aktivität sein. Komplet inaktiv sollte N74A jedoch nicht allein aufgrund von Faltungsproblemen sein, da E73D/N74Q dasselbe Sekundärstrukturprofil zeigt, jedoch mit 7-8 % relativer Aktivität funktionsfähig ist.

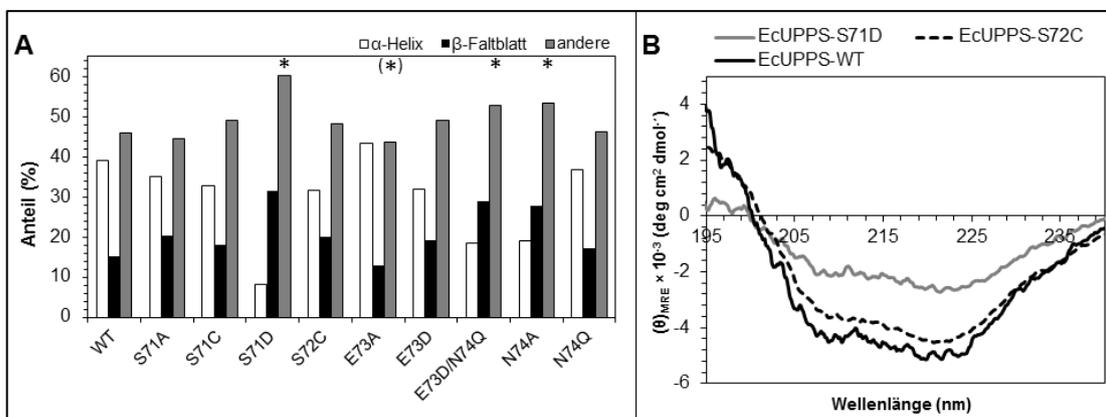


Abbildung 17: Relativer Anteil an α -Helizes und β -Faltblattstrukturen der EcUPPS-Varianten (A). Die Strukturvorhersage erfolgte durch K2D3. Beispielhaft sind die CD-Spektren des Wildtyp-Enzyms im Vergleich zu den Varianten S71D und S72D dargestellt (B). *, Varianten mit veränderter Sekundärstrukturverteilung.

3.3 Schlussfolgerung

Obwohl eine Vielzahl an Kristallstrukturen der EcUPPS existieren und ein sehr gutes Verständnis über die Kinetik der Enzymreaktion besteht, ist die molekulare Ursache der Produktbildung nur ansatzweise verstanden. So wurde anhand von Kristallstrukturen zwar ein Mechanismus postuliert, aber nicht final untersucht.^[99,111] Es konnte gezeigt werden, dass die Reaktion der EcUPPS einem konzertierten Mechanismus folgt, ohne Bildung eines stabilen kationischen Intermediates.^[112] In dieser Arbeit wird eine katalytische Diade aus N74 und E73 postuliert und mit Hilfe ortsgerichteter Mutagenesen untersucht. Von Guo *et al.* wurde S71 als allgemeine Base vorgeschlagen.^[99] Nimmt man S71 als katalytische Base an, kann davon auszugehen werden, dass S71A keinerlei Aktivität besitzen würde. Mit 12 % Restaktivität ist S71A jedoch moderat aktiv. Die stark erhöhten K_m -Werte der S71-Varianten für IPP deuten eher eine Rolle dieser Aminosäure bei der IPP-Bindung an. Zudem ist die Orientierung von S71 in dem Modell EcUPPS_2 optimal, um eine Wasserstoffbrücke zu dem α -Phosphat von IPP zu bilden. S71D lässt Grund zu der Annahme, dass die Funktion als Wasserstoffbrückenakzeptor wiederhergestellt werden konnte, obwohl diese Variante nicht optimal gefaltet ist. N74 konnte hingegen als potentielle katalytische Base bestätigt werden. Für die Variante N74A konnte weder Aktivität, noch Produktbildung nachgewiesen werden. Besonders dieser Funktionsverlust spricht für die Schlüsselrolle von N74 während der Katalyse. Der komplette Aktivitätsverlust von N74A sollte nicht allein auf Faltungsunterschiede zurückführbar sein, da Varianten mit vergleichbaren Ergebnissen der Sekundärstrukturvorhersage nachweislich aktiv sind (E73D/N74Q, S71D). Zudem wurde gezeigt, dass der konservative Austausch N74Q auch in Kombination mit der Mutation E73D aktiv ist. Der Aktivitätsverlust aller N74-Varianten im Vergleich zum WT bestätigt die essentielle Funktion dieses spezifischen Aminosäurerestes. E73 als potentieller Protonenakzeptor in der postulierten Diade konnte weiter bestätigt werden. Die gesteigerte Aktivität von E73D im Vergleich zur Alanin-Variante unterstreicht die vermutlich wichtige Funktion der Carboxylgruppe während der Katalyse.

Basierend auf den Mutagenesestudien kann das in Abbildung 18 dargestellte detaillierte Modell des Katalysemechanismus postuliert werden. IPP bindet magnesiumabhängig an die S2-Bindungsstelle und wird über eine Wasserstoffbrückenbindung am α -Phosphat von S71 positioniert, während FPP magnesiumunabhängig an die S1-Bindungsstelle bindet. Mg^{2+} unterstützt nach Delokalisation dort die Hydrolyse des Diphosphates von FPP (Abbildung 18a). Die Doppelbindung von IPP greift zeitgleich an FPP an, während N74 als katalytische Base das H_δ -Proton des Intermediates abstrahiert und vermutlich über E73 weiterleitet (Abbildung 18b). Die Protonenübertragung wird nach dem postulierten Modell

über eine Amid-Imidsäure-Tautomerie von N74 ermöglicht. Nach der Protonenabstraktion vom Übergangszustand entsteht eine *cis*-Doppelbindung und das um fünf Kohlenstoffatome verlängerte Produktintermediat wird zur S1-Bindungsstelle transferiert. Anschließend kann ein weiteres Mg^{2+} -IPP an die S2-Bindungsstelle anlagern und die Kettenverlängerungsreaktion startet erneut (Abbildung 18c).

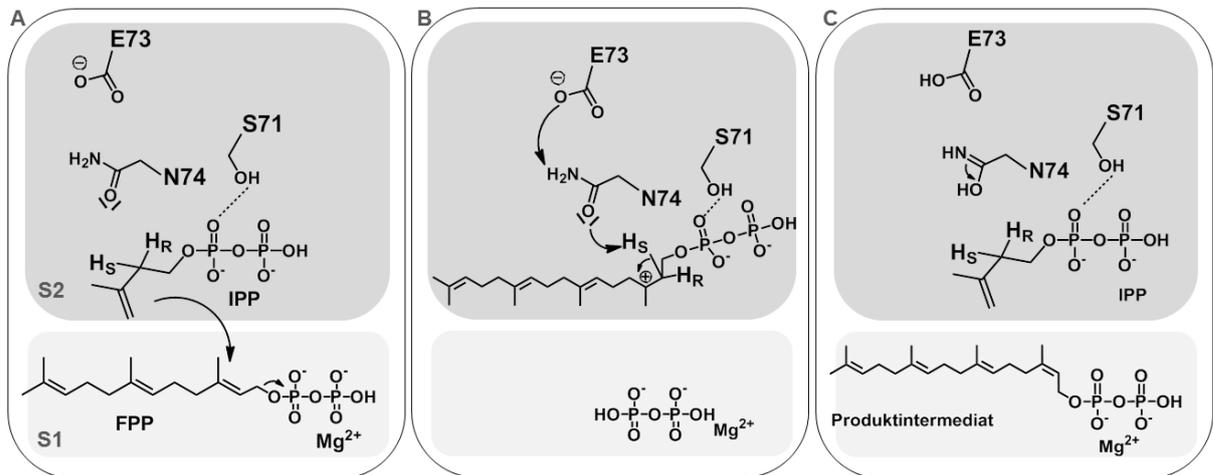


Abbildung 18: Postulierter Katalysemechanismus der EcUPPS mit der katalytischen Diade N74-E73. S71 stabilisiert das α -Phosphat von IPP (A-C). S1, FPP-Bindungsstelle; S2, IPP-Bindungsstelle.

4 Artificielle Startersubstrate der Undecaprenyldiphosphatsynthase aus *Escherichia coli* (EcUPPS)

4.1 Einleitung

Substratanaloga werden hauptsächlich genutzt, um die Reaktionsmechanismen von Enzymen zu klären, das Substratspektrum auszuloten oder bei Prenyltransferasen die Eigenschaften der synthetisierten Produktpolymere zu verändern, um eine verbesserte Analytik der Produkte zu ermöglichen.

Besonders an Farnesyldiphosphatsynthasen (FPPS) wurden vermehrt Studien mit artifiziellen Substraten durchgeführt. So konnte nachgewiesen werden, dass sowohl methoxylierte (**12**), propoxylierte (**14**) und acetoxylierte (**13**) Verbindungen als Substrate eingesetzt werden können (Abbildung 19).^[140] Die Synthese verschiedener DMAPP-Analoga mit Variation der Methylgruppen (**4-8**) zeigte eine große Toleranz der FPPS aus menschlicher Leber gegenüber einer Verlängerung der C3-Methylgruppe, wobei ein Wegfall dieser funktionell wichtigen Gruppe einen völligen Verlust der Aktivität bedingt (**28, 29, 31**) (Abbildung 20).^[141] Grundsätzlich konnte im Fall dieser FPPS, DMAPP als Minimalsubstrat nachgewiesen werden (**30**).^[141] *trans*-3,4,4-Trimethyl-2-pentenylidiphosphat (**34**) und *cis*-3,4,4-Trimethyl-2-pentenylidiphosphat (**33**) wurden von der FPPS nicht als Substrat erkannt.^[141] Hierbei sind sterische Effekte wahrscheinlich.

Dagegen wurde mit der Bildung von 6-Fluor-FPP aus den Substraten 2-Fluor-GPP (**10**) und IPP mit der FPPS aus Schweineleber ein kationisches Intermediat während der Substratkondensation nachgewiesen (Abbildung 19).^[142] Die um den Faktor von $8,4 \cdot 10^{-4}$ verringerte Geschwindigkeit dieser Reaktion weist darauf hin, dass der katalytische Schritt der enzymatischen Synthese stark beeinflusst ist.^[142] Diese Hypothese konnte durch zusätzliche Studien zur Solvolyse von Geranylmethansulfonaten (2-Fluor-geranylmethansulfonat und Geranylmethansulfonat) gestützt werden. Dieser Reaktion liegt eindeutig ein S_N1 -Mechanismus zugrunde.^[142] So konnte für die FPPS (*trans*-PT) aus Schweineleber erstmals ein sequenzieller Reaktionsmechanismus (Ionisierungs-Kondensations-Eliminierungsmechanismus) nachgewiesen werden.^[142] Auch anhand der Reaktion mit 3-Chlor-DMAPP (3-CI-DMAPP, **1**) konnte der dissoziative, elektrophile Alkylierungsmechanismus von FPPSs gezeigt werden (Abbildung 19).^[143] Wahrscheinlich konkurriert der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der C-O-Bindungsspaltung mit der internen DMAPP-Rückbildung, so dass die

Reaktionsgeschwindigkeit mit 3-Cl-DMAPP ~ 200fach verringert ist.^[143] Ähnliche Ergebnisse wurden mit (*Z*)- (**2**) und (*E*)-3-CF₃-DMAPP (**3**) als allylisches Substrat erzielt und bestätigen zusätzlich die ionisierungsabhängige Kondensationsreaktion (Abbildung 19).^[144]

Neben diesen Studien wurde auch die Umsetzung der Substrate **9**, **11-14** und **17** beschrieben, die mit (*Z*)- als auch (*E*)-FPPs durchgeführt wurden (Abbildung 19).^[140,145]

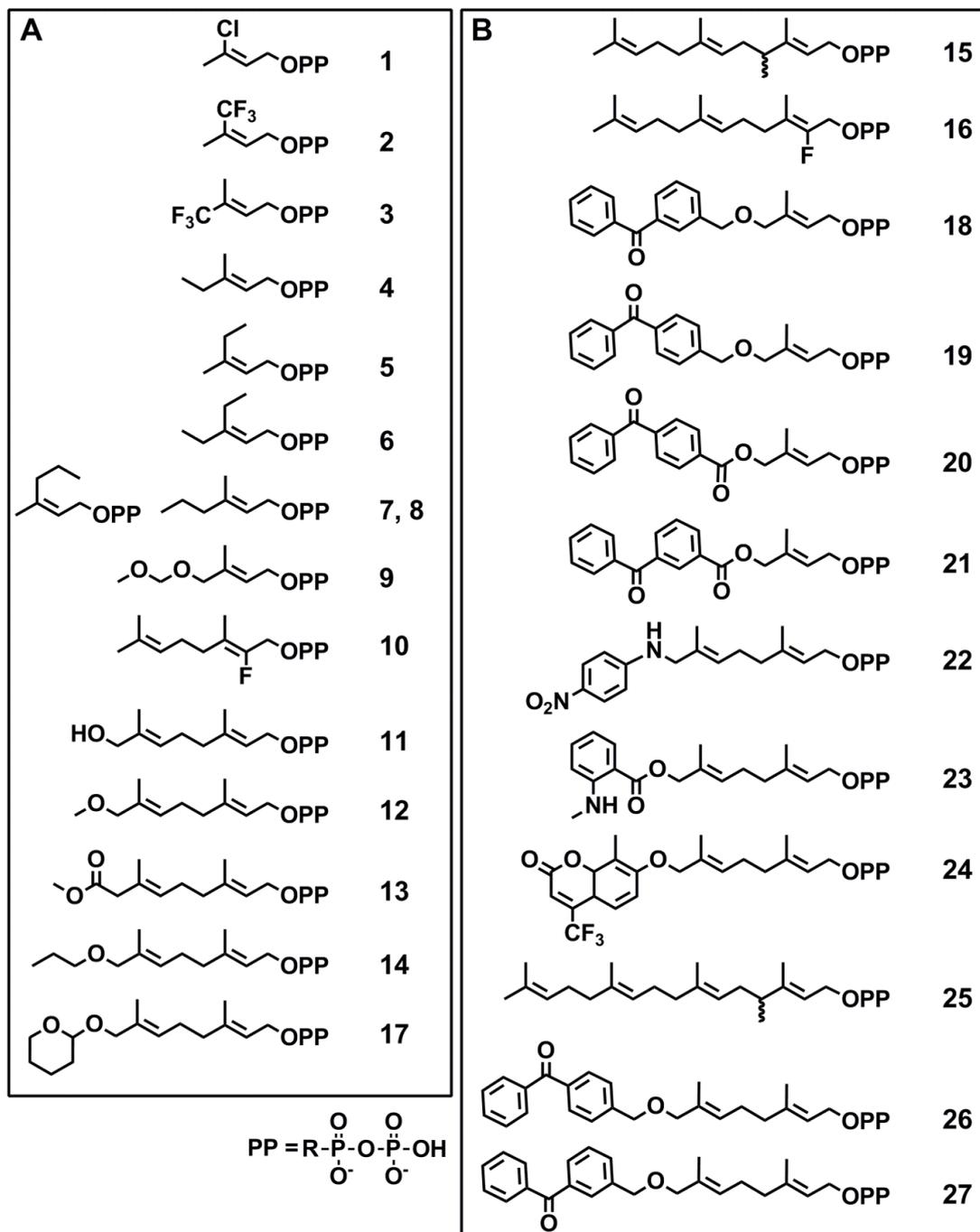


Abbildung 19: Literaturbekannte allylische Substrate von Kurzketten-Prenyldiphosphatsynthesen (A) und Mittelketten-Prenyldiphosphatsynthesen (B).

Ein am C2 halogeniertes Startersubstrat (**16**) kann auch als Substrat von Mittelketten-CPTs dienen (Abbildung 19).^[112] Besonders im Fall der EcUPPS ist im Gegensatz zur FPPS keine Änderung des Produktspektrums zu beobachten.^[112] Zusätzlich wurde gezeigt, dass die Geschwindigkeitskonstanten der IPP-Kondensation an FPP und 2-Fluor-FPP ähnlich sind.^[112] Damit konnte bestätigt werden, dass *cis*-Prenyltransferasen, wie die EcUPPS, wahrscheinlich einem konzertierten Reaktionsmechanismus folgen.^[112] Artificielle Substrate, die zusätzlich eine Methylgruppe an C4 des allylischen Substrates tragen, wurden mit der *Bacillus subtilis* UPPS getestet.^[146] Dabei zeigte sich, dass besonders mit Substraten, die eine (*Z*)-Konfiguration an C2 aufwiesen (**40**) keine Kettenverlängerung initiiert werden konnte, wobei mit (*E*)-konfigurierten Substraten (**15**, **25**) ein – wenn auch geringer – Umsatz gezeigt werden konnte (Abbildung 19, Abbildung 20).^[146] Sterische Effekte sind vermutlich die Ursache für diese geringe Akzeptanz von 4-Methyl-prenyldiphosphaten.^[146]

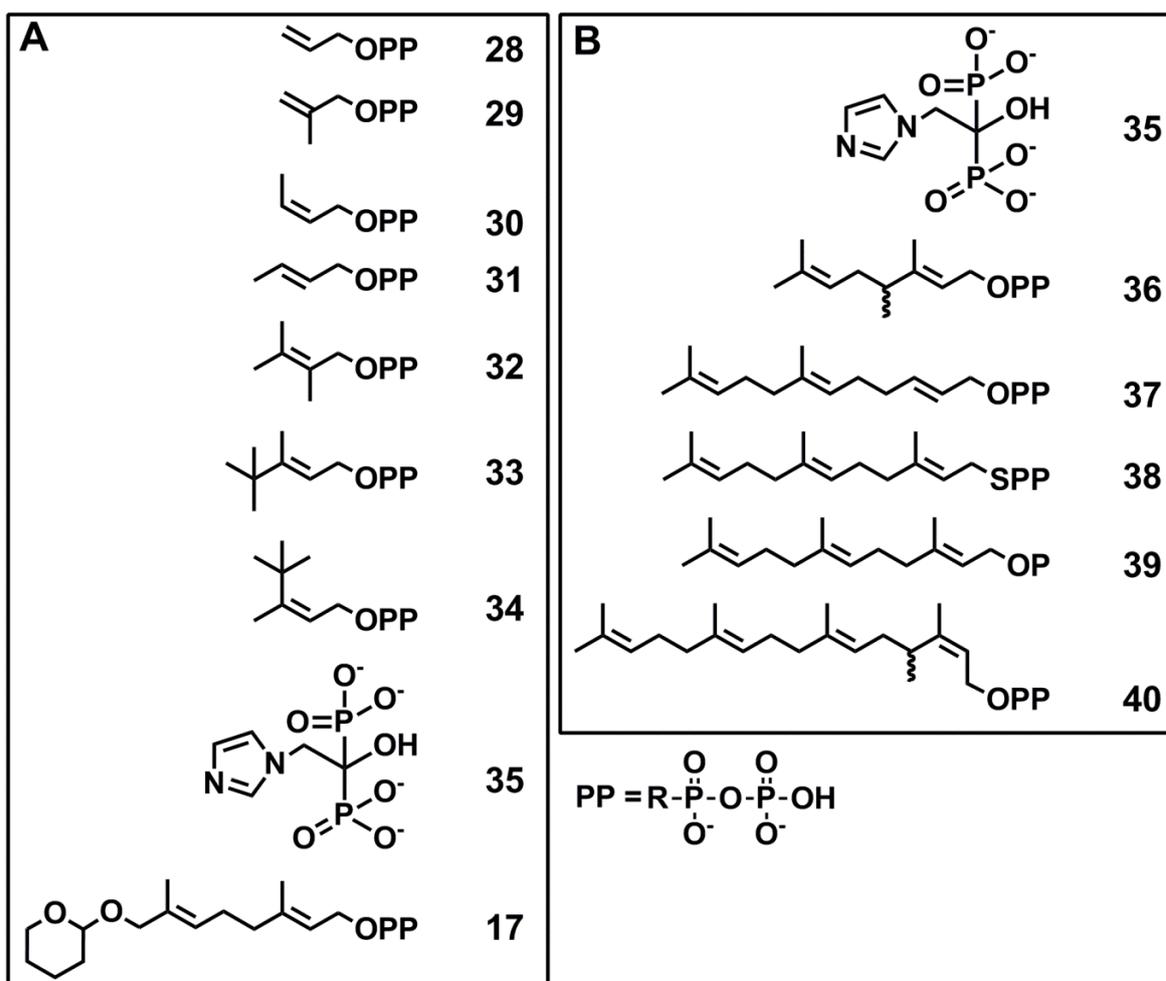


Abbildung 20: Literaturbekannte allylische Prenyldiphosphatanaloga, die von den getesteten Kurzketten-Prenyldiphosphatsynthasen (A) und Mittelketten-Prenyldiphosphatsynthasen (B) nicht als Substrat akzeptiert werden.

Veränderungen am Substrat, die den terminalen Teil des Allylrestes betreffen, haben wenig Einfluss auf die Substraterkennung von UPPSs und scheinen gut toleriert zu werden.^[138,145] Es konnte zusätzlich gezeigt werden, dass die Produktkettenlänge nicht wesentlich vom Startersubstrat abhängig ist.^[93,138] Dies ermöglichte eine Einführung von Fluorophoren, deren Umsetzungen stark zur Aufklärung der Reaktionskinetik der EcUPPS beigetragen haben.^[138,147] Substrat **24** konnte so die Vermutung bestätigen, dass die Bindung von FPP an die Substratbindungstasche sehr schnell abläuft.^[147] Da allerdings nur eine Verlängerung mit IPP möglich war, konnte die Kettenverlängerungsreaktion erst mit der Synthese von Substrat **23** analysiert werden (Abbildung 19).^[138] Die Erhöhung der Fluoreszenzintensität mit zunehmender Kettenlänge ermöglicht zusätzlich die direkte Messung von Reaktionskinetiken.^[138] *Para*-Nitroanilin-GPP (**22**) konnte zur Detektion der EcUPPS-Enzymprodukte bei 395 nm verwendet werden.^[148]

Die Initiierung der Kautschuksynthese mit gewaschenen Latizifern von *Ficus elastica*, *Hevea brasiliensis* und *Parthenium argentatum* konnte mit photoaktiven Benzophenonderivaten (**18-21**, **26**, **27**) erfolgen (Abbildung 19).^[149] Dadurch könnte ein *Labeling* von unbekanntem Kautschuksynthesen erfolgen.^[149]

Allylische Prenyldiphosphatanaloga, die nicht als Substrat erkannt werden, sind in Abbildung 20 dargestellt. Anhand der Strukturen der Verbindungen konnten einige Strukturelemente identifiziert werden, die für deren Umsatz unumgänglich sind. So ist vor allem die Diphosphatgruppe ein entscheidendes Strukturmerkmal. Wird ein Prenylmonophosphat (**39**) oder ein Prenylbisphosphonat (**35**) als Startersubstrat verwendet, kann keine Reaktion stattfinden.^[133,150] Auch eine Thioesterbindung (**38**) zwischen Phosphat und Prenylrest verhindert die Kondensation zum Polyprenylprodukt.^[151] Ein weiteres wichtiges Kriterium scheint die Anwesenheit der Methylgruppe am C3 des Prenyldiphosphates zu sein (**37**).^[152,153] Anhand zweier *trans*-Prenyltransferasen (Hexa- und Heptaprenyldiphosphatsynthase) wurde gezeigt, dass dieses Strukturmerkmal essentiell für die Kettenverlängerung ist.^[152] Auch eine zusätzliche Methylgruppe an C4 des Startersubstrates (besonders wenn die C2-Doppelbindung (*Z*)-konfiguriert ist), oder sehr kurz-kettige Startersubstrate können von UPPS-Enzymen nicht oder nur langsam umgesetzt werden (**36**, **40**).^[146]

In der vorliegenden Arbeit soll das Substratspektrum der EcUPPS mit verschiedenen artifiziellen Prenyldiphosphaten ausgelotet werden. Zum einen bestand der Anspruch, die Detektion der Produkte durch Verwendung eines fluoreszenzmarkierten allylischen Substrates zu verbessern, da dies zu einer sensitiven und selektiven Detektion der

enzymatischen Produkte führt. Zum anderen sollte der Einfluss von Heteroatomen innerhalb der Prenylkette untersucht werden.

4.2 Ergebnisse und Diskussion

4.2.1 Kinetische Untersuchung von Prenyldiphosphatanaloga

Das Substratspektrum der EcUPPS wurde anhand der Umsetzung natürlicher und artifizierlicher Prenyldiphosphate getestet. Die Substratsynthese erfolgte maßgeblich durch Dr. Roman Weber.^[154] In Abbildung 21 sind alle getesteten artifizierlichen Substratanaloga dargestellt, die als potentielle Startereinheit für die EcUPPS getestet wurden.

Struktur	Nr.	rel. $k_{\text{cat}} K_{\text{m}}^{-1}$ (%)	Struktur	Nr.
	E,E-FPP	100		66
	Z,E-FPP	90		67
	53	89		68
	GGPP	76		69
	54	60		70
	55	34		71
	56	33		72
	57	22		DMAPP
	58	13		
	59	9		
	60	8		
	61	6		
	62	4		
	23	4		
	63	4		
	64	3		
	65	2		
	GPP	2		

$$\text{PP} = \text{R}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}^-}{\text{P}}}-\text{O}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}^-}{\text{P}}}-\text{OH}$$

Abbildung 21: Artifizierliche Startersubstrate der EcUPPS geordnet nach relativer katalytischer Effizienz ($k_{\text{cat}} K_{\text{m}}^{-1}$ in %) in Bezug zur Umsetzung des natürlichen Substrats FPP mit IPP (100 %).

Die Einführung von Heteroatomen innerhalb der Prenylkette sollte den Einfluss von hydrophoben Wechselwirkungen und π - π -Interaktionen prüfen. Schwefel ($\chi_{AR} = 2,5$) wurde aufgrund der identischen Elektronegativität im Vergleich zu Kohlenstoff ($\chi_{AR} = 2,5$) ausgewählt. Substrate mit einer Schwefelinsertion sollten demnach ähnlich gut erkannt werden wie FPP, falls hydrophobe Wechselwirkungen und π - π -Interaktionen bei der Substraterkennung relevant sind. Sauerstoff ist dagegen mit $\chi_{AR} = 3,5$ elektronegativer als Schwefel und zieht Elektronen aus der Bindung zu seinem Nachbaratom. Ist Sauerstoff in der Umgebung einer Doppelbindung wird diese elektronenärmer und somit werden π - π -Wechselwirkungen beeinflusst. Um im Anschluss an die enzymatische Produktsynthese eine Möglichkeit zur chemischen Derivatisierung zu ermöglichen, wurden zudem Substrate mit Alkinfunktion synthetisiert (**62**, **72**). Allylische Substrate, die aromatische Ringsysteme enthalten, könnten eine selektive und sensitive Detektion der Produkte ermöglichen.

Achtzehn Prenyldiphosphate wurden von der EcUPPS als allylisches Substrat erkannt und mit IPP als Elongationssubstrat zu Polyprenyldiphosphaten der erwarteten Kettenlänge polymerisiert (Tabelle 6). Weitere acht Substrate wurden nicht als Startersubstrat erkannt und führten nicht zu Produktbildung mit der EcUPPS (Abbildung 21). Mit Hilfe des MTP-Phosphatdetektionsassays (siehe Abschnitt 3.2.2 und 7.5.1.2) wurden Umsatzkurven für die verschiedenen Substrate bestimmt. Dabei konnten die in Tabelle 6 dargestellten kinetischen Parameter für die getesteten Substrate gemessen werden. Die maximalen Geschwindigkeiten (v_{max}) der Enzymreaktion mit den unterschiedlichen Substraten variieren stark (Tabelle 6). Um die Substrate untereinander zu vergleichen wurde daher die katalytische Effizienz $k_{cat} K_m^{-1}$ bestimmt, die als Maß für die Substratspezifität gilt (Abbildung 21, Tabelle 6).^[155]

Alle getesteten Substrate liegen mit ihren K_m -Werten im μ M-Bereich. Sowohl aromatische Substituenten wie Phenyle (**53**, MANT-O-GPP (**23**)), Furane (**55**, **59**) oder Thiophene (**60**, **63**, **64**) sowie verzweigte Alkylketten (**58**) wurden als Ersatz der terminalen Prenyleinheit innerhalb des Substrates geduldet. Zudem zeigen Substrate mit Heteroatomen, die sich mehr als fünf C-Atome vom Diphosphat entfernt befinden, Umsatz, wenn auch im Fall einer Sauerstoffinsertion mit sehr geringer Aktivität. Vor allem Prenyldiphosphate, die dem natürlichen Substrat FPP sehr ähneln, werden mit ähnlicher Effizienz umgesetzt. Erstaunlich ist hierbei, dass (*Z,E*)-FPP trotz anderer Stereochemie nahezu genauso gut als Substrat erkannt wird wie (*E,E*)-FPP. Anzunehmen wäre jedoch, dass die Orientierung in der aktiven Tasche durch eine unterschiedliche Doppelbindungskonfiguration eine

andere ist. Scheinbar hat die Konfiguration der C2-Doppelbindung nur wenig Einfluss auf den Umsatz. Im Gegensatz dazu sinkt die katalytische Effizienz mit GPP um 98 %, da die Substraterkennung stark gehemmt zu sein scheint ($K_m(\text{GPP}) = 49 \mu\text{M}$). Das Fehlen der terminalen Prenyleinheit im Vergleich zu FPP scheint einen starken Einfluss auf die Substraterkennung zu haben. Erstaunlicherweise sind die K_m -Werte von kurzkettigen Substraten mit einem terminalen aromatischen Fünfring (**55**, **60**) niedriger als der von GPP. Substrat **55** wird ähnlich gut konvertiert wie FPP, besitzt jedoch eine dreifach niedrigere Reaktionsgeschwindigkeit. Die Substraterkennung ist wahrscheinlich über den Furan- bzw. Thiophenring gegeben (π - π -Wechselwirkungen). Der entscheidende Einfluss einer elektronenreichen terminalen Prenyleinheit wird zusätzlich an Substrat **53** deutlich, bei dem die ω -Prenyleinheit durch einen Phenylring ersetzt ist. Verbindung **53** wird ähnlich gut umgesetzt und besitzt dieselbe Affinität zur EcUPPS wie FPP.

Tabelle 6: Kinetischer Parameter der EcUPPS mit artifizierten Startersubstraten und IPP. Rel. $k_{\text{cat}} K_m^{-1}$: dunkelgrau, >50 %; hellgrau, 10-50 %; weiß, <10 %. Rel. $k_{\text{cat}} K_m^{-1}$, relative katalytische Effizienz im Vergleich zu dem natürlichen Substrat FPP (100 %).

Substrat	K_m (μM)	V_{max} (nkcat mg^{-1})	k_{cat} (s^{-1})	$k_{\text{cat}} K_m^{-1}$ ($\text{s}^{-1} \text{mM}^{-1}$)	rel. $k_{\text{cat}} K_m^{-1}$ (%)
FPP	$1,8 \pm 0,1$	$17,9 \pm 0,4$	0,5	292	100
(Z,E)-FPP	$1,5 \pm 0,2$	$12,8 \pm 0,6$	0,4	262	90
53	$2,1 \pm 0,2$	$18,5 \pm 0,7$	0,5	260	89
GGPP	$1,9 \pm 0,1$	$14,9 \pm 0,3$	0,4	223	76
54	$2,5 \pm 0,1$	$14,9 \pm 0,2$	0,4	176	60
55	$1,8 \pm 0,2$	$6,1 \pm 0,2$	0,2	98	34
56	$4,2 \pm 0,2$	$13,7 \pm 0,3$	0,4	96	33
57	$5,1 \pm 0,6$	$11,5 \pm 0,5$	0,3	64	22
58	$10,7 \pm 1,5$	$14,4 \pm 0,8$	0,4	39	13
59	$38,0 \pm 5,0$	$33,6 \pm 2,1$	1,0	26	9
60	$11,6 \pm 2,6$	$8,9 \pm 0,6$	0,3	22	8
61	$4,8 \pm 1,0$	$2,9 \pm 0,2$	0,1	18	6
62	$6,4 \pm 1,1$	$2,9 \pm 0,2$	0,1	13	4
MANT-O-GPP (23)	$5,6 \pm 0,8$	$1,9 \pm 0,1$	0,1	11	4
63	$9,1 \pm 1,3$	$3,5 \pm 0,2$	0,1	11	4
64	$61,1 \pm 12,8$	$18,1 \pm 1,5$	0,5	9	3
65	$32,1 \pm 4,6$	$6,3 \pm 0,3$	0,2	6	2
GPP	$48,8 \pm 8,3$	$11,3 \pm 0,7$	0,3	7	2

Der Vergleich des sauerstoffhaltigen Substrats **65** mit dem schwefelhaltigen Substrat **57** unterstreicht zusätzlich, dass veränderte Elektronendichteverhältnisse innerhalb der terminalen Prenylgruppe die Substraterkennung stören. Sauerstoff kann die Bindung in der lipophilen Tasche stören, entweder durch seine p-Orbitale oder er verringert die

Elektronendichte der ω -Doppelbindung, so dass die Affinität der EcUPPS zu Substrat **65** stark abnimmt (Tabelle 6). Schwefel dagegen hat eine ähnliche Elektronegativität wie Kohlenstoff. Die Elektronendichteverhältnisse bleiben damit nahezu unverändert und die Affinität der EcUPPS zu Substrat **57** ähnelt derjenigen von FPP. Eine verringerte Aktivität (ein Dreißigstel der Affinität im Vergleich zu FPP) zeigen hauptsächlich sterisch anspruchsvolle Substrate, die voluminöser sind als das natürliche Substrat und zusätzlich Heteroatome in (oder an) der ω -Prenyleinheit besitzen (**59**, **64**, **65**). Die Substraterkennung wird hier durch die modifizierte Prenylkette erschwert und ist zusätzlich durch Heteroatome gestört, die hydrophobe Interaktionen und π - π -Wechselwirkungen erschweren.

Die Substrate **23**, **61**, **62** und **63** besitzen im Vergleich zu FPP einen geringfügig (3-5fach) erhöhten K_m -Wert. Die Reaktionsgeschwindigkeit der enzymatischen Reaktion ist außerdem um den Faktor 10 verringert, so dass die relative katalytische Effizienz (rel. $k_{\text{cat}} K_m^{-1}$) 20fach niedriger ist als mit FPP. Sterische Effekte sind wahrscheinlich die Ursache langsamer Reaktionsgeschwindigkeiten, da das Startersubstrat während der Kettenverlängerung mehrfach zwischen der S1- zur S2-Bindungsstelle wandern muss. Passt das Startersubstrat nicht optimal in den Substratkanal oder sind durch Sauerstoffinsertion die Elektronendichten verringert, kann die Reaktionsgeschwindigkeit negativ beeinflusst sein. Offensichtlich sind π - π -Interaktionen der ω -Doppelbindung mit aromatischen Aminosäuren der Substratbindungstasche entscheidend an der Substratbindung beteiligt.

Betrachtet man die strukturellen Eigenschaften der umgesetzten Substrate im Vergleich zu den nicht akzeptierten Substraten, werden zwei Eigenschaften deutlich, die den Substratumsatz mit der EcUPPS erschweren (Abbildung 21). Zum einen Schwefelatome in der Nähe des Diphosphates (**66**, **67**, **70**, **71**) und zum anderen eine kurze Kettenlänge (**72**, DMAPP). Betrachtet man vergleichend das sauerstoffhaltige Substrat **61** zu Verbindung **67**, welche nicht als Substrat erkannt wird, scheint eine Sauerstoffinsertion in der Diphosphat-nahen Prenyleinheit den Substratumsatz zu fördern. Möglicherweise zieht der Sauerstoff Elektronen aus der Bindung zwischen Diphosphat und Prenylkette, so dass die Abgangsgruppe leichter abgespalten wird.

Auch mit den Substraten **54**, **56** sowie GGPP besitzt die EcUPPS eine hohe katalytische Effizienz. Die Steigerung der Kettenlänge des Startersubstrats führt im Fall von GGPP nur zu einem geringfügigen Aktivitätsverlust, wie auch die Längen- und Konformationseinflüsse von **54** bzw. **56** sich wenig auswirken.

MANT-O-GPP (**23**) kann, trotz relativ schlechter katalytischer Effizienz, als Substrat genutzt werden. Es ermöglicht eine Fluoreszenzdetektion der enzymatischen Produkte und konnte in weiteren Versuchen erfolgreich zur Entwicklung eines fluoreszenzbasierten HPLC-Assays angewendet werden (Abschnitte 3.2.2, 5.2.2, 5.2.3).

4.2.2 Massenspektrometrische Untersuchung der Produktkettenlänge

Um zu untersuchen, ob das Startersubstrat die gebildeten Produktkettenlängen beeinflusst, wurden LC/ESI-MS Untersuchungen durchgeführt. Hierzu wurden die zu den Alkoholen hydrolysierten Produkte des EcUPPS-Assays (Abschnitt 7.5.2) analysiert. Dabei fiel auf, dass die Prenylalkohole bevorzugt als Natrium- und Kaliumaddukte auftreten. In Tabelle A 5 im Anhang sind die IPP-Elongationsschritte dargestellt, die in Abhängigkeit von der Länge des allylischen Substrates zu den identifizierten Produktalkoholen geführt haben. So sind zum Beispiel zur Bildung des Undecaprenols (C₅₅) mit FPP als Startereinheit acht IPP-Kondensationen notwendig, während mit GGPP als allylisches Substrat sieben IPP-Anlagerungen detektiert wurden.

Die Verwendung verschiedenster Substrate führte hauptsächlich zur Bildung der C₅₅-Produktanaloga, da die Architektur des Produktkanals die Produktkettenlänge bestimmt. Somit wird die Verwendung von unterschiedlichen Startersubstraten möglich, die die Biosynthese von modifizierten Produkten zulässt. Dies erlaubt, das Fluoreszenzsubstrat MANT-O-GPP in der Produktanalytik anzuwenden, da die entstehenden Produkte in ihren Kettenlängen der natürlichen Produktverteilung (mit (*E,E*)-FPP als Startereinheit) entsprechen (siehe Abschnitte 3.2.2, 4.2.3, 5.2.2, 5.2.3).

Lediglich die Substrate **55** und **59** werden hauptsächlich zum C₆₅-Produktanalogon umgesetzt. Gemeinsam ist beiden Substraten der Furanring, der das Substrat terminiert und sterisch wenig anspruchsvoll ist oder besser ins Taschenende inseriert, so dass weitere Verlängerungen bis zum C₆₅-Produkt möglich sind.

4.2.3 Anwendung von MANT-O-GPP als Fluoreszenzmarker in der HPLC

Das fluoreszente FPP-Analogon (2*E*,6*E*)-3,7-Dimethyl-8-[(*N*-methylantranoyl)oxy]octa-2,6-dien-1-diphosphat (MANT-O-GPP, **23**) wurde bereits zur Bestimmung kinetischer Parameter der EcUPPS verwendet.^[138] Da Fluoreszenz eine noch sensitivere Methode zur Detektion darstellt, bestand für diese Arbeit der Anspruch, das Substratanalogon MANT-O-GPP für HPLC-Messungen anzuwenden. Die Synthese von MANT-O-GPP

erfolgte durch Dr. Tula Beck am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie nach der publizierten Synthese von Teng *et al.*^[138] In Abbildung 22 ist das Prinzip des MANT-O-GPP-HPLC-Assays zur Produktanalytik dargestellt. Unter Verwendung des allylischen Substrates MANT-O-GPP und einem homoallylischen Substrat (z.B. IPP) erfolgt die enzymatische Reaktion (z.B. durch die EcUPPS) zu dem fluoreszenten Polyprenyldiphosphat. Die Diphosphatfunktion wird anschließend mit Hilfe einer sauren Phosphatase aus Kartoffel hydrolysiert und die korrespondierenden Produktalkohole über Fluoreszenzmessung an einer HPLC-Anlage analysiert (siehe Abschnitte 7.5.2 und 7.5.6).

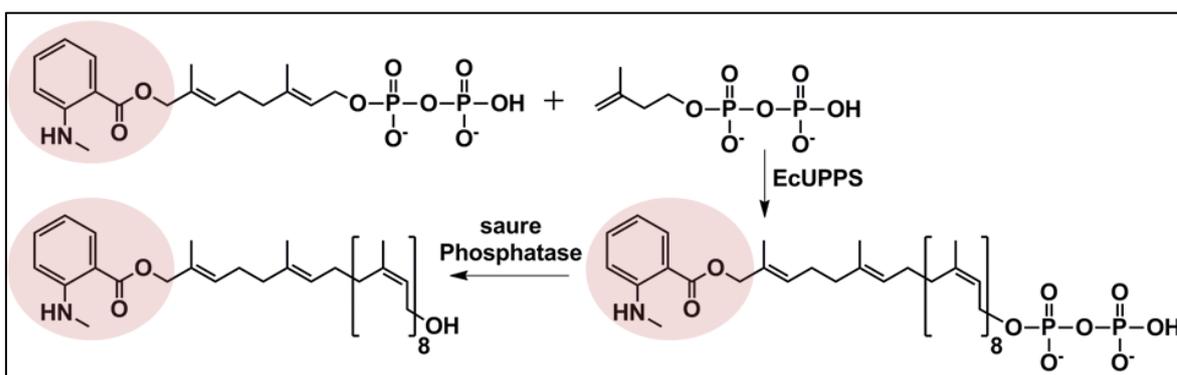


Abbildung 22: Reaktionsschema der Enzymreaktion von MANT-O-GPP und IPP, die zur Bildung des fluoreszenzmarkierten UPP-Produktanalogons führt.

4.2.3.1 Emissionsspektrum von MANT-O-GPP

Um zu bestimmen, ob das Fluoreszenzverhalten von MANT-O-GPP auch auf dessen Hydrolyseprodukt MANT-O-Geraniol zutrifft, wurden Fluoreszenzspektren einer MANT-O-GPP-Lösung in Wasser, Assaypuffer ohne Triton, Assaypuffer (unter Zusatz von Triton X-100, DTT und/oder EcUPPS) aufgenommen und mit Fluoreszenzspektren von MANT-O-Geraniol in organischen Lösungsmitteln (HPLC-Lösungsmittelgemische sowie *n*-Hexan) verglichen. In Abbildung 23 ist erkennbar, dass die Anregung des Fluorophors bei 352 nm ein Emissionsmaximum bei 420 nm in organischem Lösungsmittel zur Folge hat. Die Detektion der Fluoreszenz während der HPLC-Messungen erfolgte deshalb bei 420 nm mit einer Anregungswellenlänge von 352 nm.

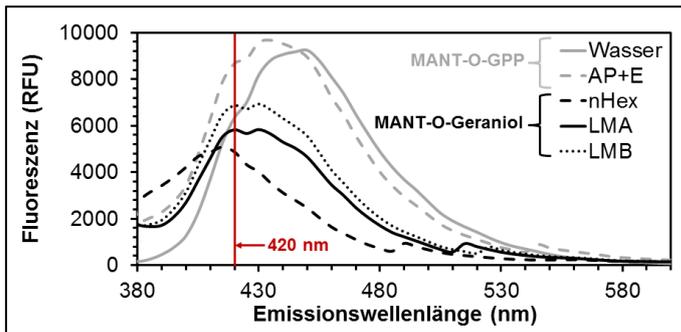


Abbildung 23: Emissionsspektren von MANT-O-GPP (**23**) in Wasser und Assaypuffer mit EcUPPS (AP+E) sowie von MANT-O-Geraniol in organischen Lösungsmitteln (*n*-Hexan (*n*Hex), HPLC-Laufmittel A (LMA), HPLC-Laufmittel B (LMB)) bei einer Anregungswellenlänge von 352 nm. RFU, Relative Fluoreszenzeinheiten.

4.2.3.2 HPLC-Analyse mit MANT-O-GPP

Um HPLC-Messungen in einem linearen Messbereich aufzunehmen und um eine indirekte Quantifizierung der Produktbildung vornehmen zu können, muss eine Kalibriergerade der zu quantifizierenden Verbindung bereitstehen. In diesem Fall wurde eine indirekte Quantifizierung des Hydrolyseprodukts des Substrates, MANT-O-Geraniol durchgeführt. Eine serielle Verdünnungsreihe von MANT-O-Geraniol in *n*-Hexan wurde mittels HPLC analysiert (Abbildung 24). Der lineare Messbereich, in dem eine Quantifizierung in dem verwendeten Setup (siehe Kapitel 7.5.6.3) möglich ist, befindet sich zwischen 0 und 3,8 mg L⁻¹ MANT-O-Geraniol. Die Intensität des MANT-O-Geraniol-Peaks beträgt in diesem Messbereich 0-10⁷ relative Fluoreszenzeinheiten (RFU).

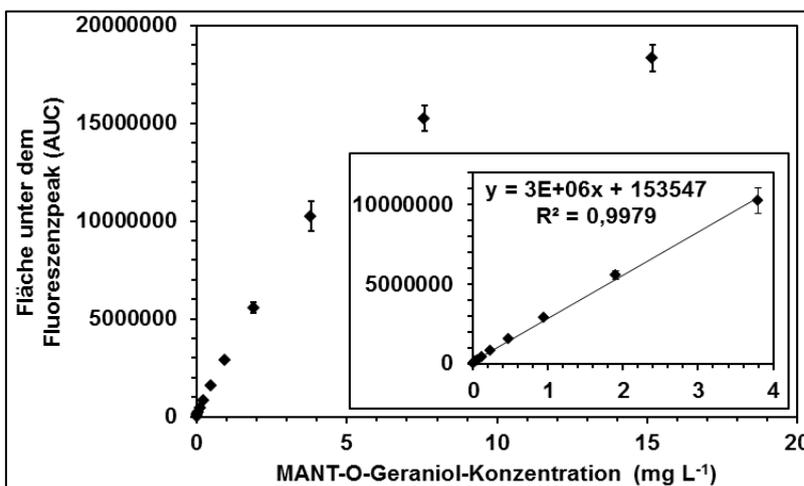


Abbildung 24: HPLC-Analyse unterschiedlicher Konzentrationen von MANT-O-Geraniol (0-100 pmol). Der lineare Messbereich (Ausschnitt) befindet sich zwischen 0-3,8 mg L⁻¹ MANT-O-Geraniol und 0-10⁷ RFU. Die lineare Regression erfolgte mit Microsoft Excel 2010. RFU, relative Fluoreszenzeinheiten.

Auch mit dem alternativen Fluoreszenzsubstrat MANT-O-GPP kann eine erfolgreiche Trennung der Produkte erreicht werden. In Abbildung 25 ist das HPLC-Chromatogramm von Enzymassays der EcUPPS mit FPP und MANT-O-GPP als Startersubstrat sowie IPP als homoallylische Verlängerungseinheit nach der Diphosphatspaltung dargestellt. Deutlich ist eine gesteigerte Intensität der Produktsignale erkennbar, die durch den fluoreszierenden MANT-Fluorophor erreicht wird. Damit ist es möglich, selbst geringe Produktmengen (untere Nachweisgrenze der HPLC-Methode für MANT-O-Geraniol

(MDL) = $11,6 \mu\text{g L}^{-1}$, $\approx 38,4 \text{ nM}$) selektiv und sehr sensitiv zu identifizieren. Dies ist besonders wichtig, um den Substratumsatz artifizierender homoallylischer Substrate nachzuweisen, der erwartungsgemäß um ein vielfaches geringer ist als der Umsatz des natürlichen Substrats IPP. Auch die selektive Detektion der Enzymprodukte über diesen Fluorophor stellt einen Vorteil dar, da Assaybestandteile wie Triton X-100, die durch Absorptionmessungen bei 210 nm sichtbar bleiben, nicht mehr detektiert werden. Dadurch wird eine indirekte Quantifizierung der Produktmenge über die Substratabnahme möglich.

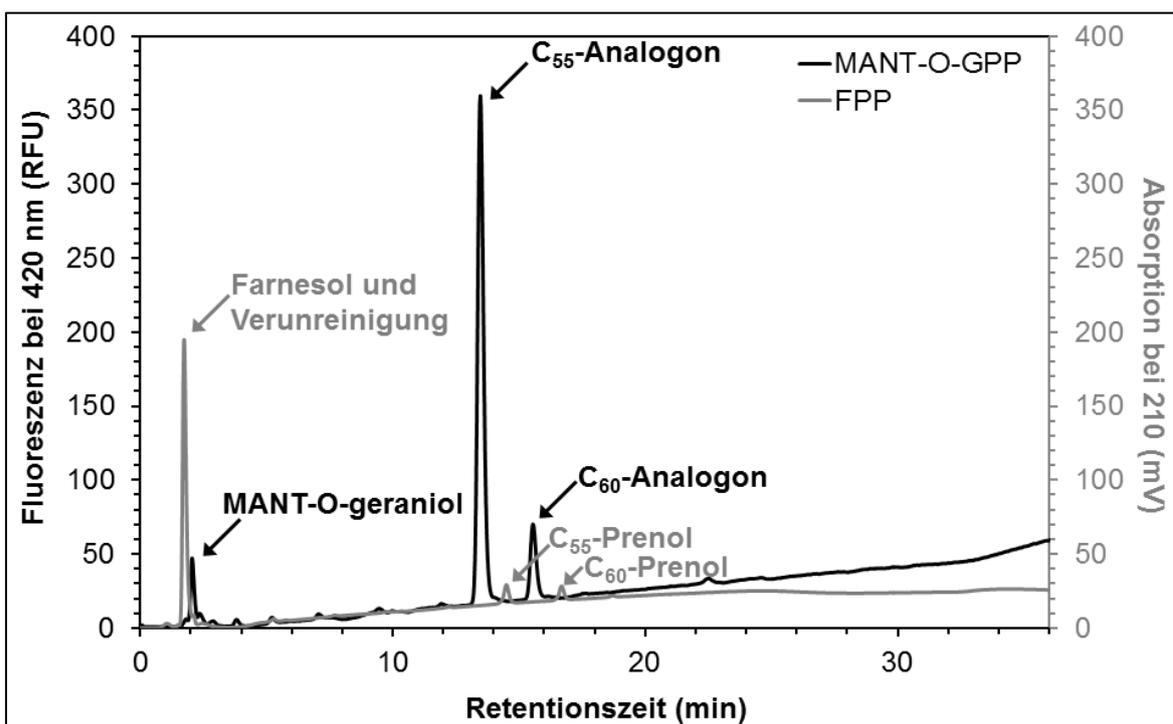


Abbildung 25: HPLC-Chromatogramm der Produkte einer EcUPPS-Reaktion mit MANT-O-GPP (schwarz) oder FPP (grau) und dem Elongationssubstrat IPP. Nach Hydrolyse der Diphosphate erfolgte die Detektion der Polyprenole bei 210 nm (FPP) oder über Fluoreszenz mit einer Anregungswellenlänge von 352 nm und Messung der Emission bei 420 nm.

4.3 Schlussfolgerung

Teng *et al.* zeigten 2011, dass das fluoreszierende MANT-O-GPP (**23**) als Substrat der EcUPPS dient und sogar zur kontinuierlichen Messung kinetischer Parameter verwendet werden kann, da die Emissionsfluoreszenzintensität bei 420 nm während der Kettenverlängerung ansteigt.^[138] Dieses Wissen konnte in der vorliegenden Arbeit genutzt werden um eine sehr selektive und sensitive Analysemethode von Polyprenolen über HPLC zu entwickeln, die es ermöglicht Produkte im nanomolaren Bereich eindeutig zu identifizieren. Weiterhin wiesen die Erkenntnisse darauf hin, dass *cis*-Prenyltransferasen sehr liberal gegenüber Veränderungen innerhalb des Startersubstrates sind. In dieser

Arbeit wurden deshalb 21 synthetische und 5 natürlich vorkommende Prenyldiphosphate als potentielle Startersubstrate der EcUPPS getestet. Dabei sollten Substrate, die Heteroatome innerhalb der Prenylkette enthalten über den Mechanismus der Substraterkennung Aufschluss geben. Substrate mit aromatischen Ringsystemen und Alkinfunktionen wurden gewählt, um neben mechanistischen Studien deren Anwendbarkeit zur besseren Detektion der Produkte zu testen. Die K_m -Werte der 18 getesteten Substanzen liegen im μM -Bereich, wobei die katalytische Effizienz variiert (Tabelle 6). Substrate, die sterisch anspruchsvoll sind und zusätzlich Heteroatome in der ω -Prenyleinheit enthalten weisen durchweg verringerte Aktivitäten und Umsatzraten auf (**23**, **59**, **62**, **64**, **65**). Diese Ergebnisse weisen auf eine entscheidende Beteiligung der ω -Prenyleinheit bei der Substraterkennung hin, die möglicherweise über π - π -Wechselwirkungen und/oder hydrophobe Interaktion erfolgt. Zusätzlich kann die erhöhte Kettenlänge negative Auswirkungen haben. Außerdem konnte gezeigt werden, dass der Einbau von Schwefelatomen nahe der Diphosphatgruppe keinen Substratumsatz zulässt (**66**, **67**, **70**, **71**). Möglicherweise ist hier der vergrößerte Atomradius von Schwefel (104 – 105 pm) im Vergleich zu Kohlenstoff (76 - 77,2 pm) die Ursache. Bedeutend ist zusätzlich die minimale Kettenlänge der Prenyleinheit. Vor allem zu kurze Substanzen wie DMAPP oder Verbindung **72** werden nicht als Substrat erkannt.

Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene Veränderungen innerhalb der Startereinheit möglich sind. Neben phenolischen Substraten sind Prenyldiphosphate mit Alkinfunktion, Furanringen, Thiophenen oder verzweigten Alkanketten geeignete Substrate. Werden oben genannte Kriterien berücksichtigt, können so gezielt anwendungsspezifische Substrate synthetisiert werden, deren Derivatisierung eine verbesserte Analytik zulässt und damit die Charakterisierung von Prenyltransferasen vereinfacht.

Zukünftig sollte versucht werden die Analytik der Polyprenole zu verbessern. Eine Möglichkeit wäre die Umstellung der stationären Phase der HPLC-Methode auf eine RP2- oder RP4-Phase. Dies ermöglicht die Änderung des Laufmittelsystems, welches momentan keine optimale Ionisierung der zu detektierenden Produkte in der nachfolgenden massenspektrometrischen Untersuchung zulässt.

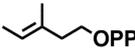
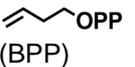
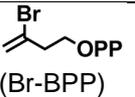
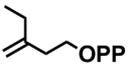
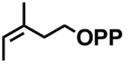
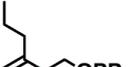
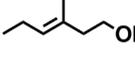
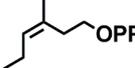
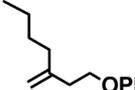
5 Artificielle Elongationssubstrate zweier Mittelketten-CPTs

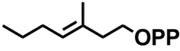
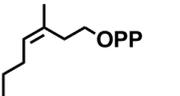
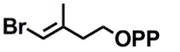
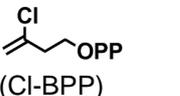
5.1 Einleitung

Mittelketten-CPTs, wie die *E. coli* Undecaprenyldiphosphatsynthase (EcUPPS), katalysieren die konsekutive Kondensation von IPP an das allylische Substrat FPP (siehe Kapitel 3). Die EcUPPS ist sehr gut untersucht und der Mechanismus der Enzymreaktion ist teilweise geklärt. Aus dem hyperthermophilen Archaeon *Thermococcus kodakaraensis* wurde eine *cis*-Prenyltransferase (ThkCPT, EC-Nummer: 2.5.1.87) isoliert, die bei einem Temperaturoptimum von 60-70 °C *cis*-Polyisoprendiphosphate mit einer Kettenlänge von 65-70 Kohlenstoffatomen synthetisiert.^[156] Die ThkCPT ist besonders interessant, da ihre Temperaturstabilität Reaktionsbedingungen ermöglicht, die mit der EcUPPS nicht möglich wären. Zudem besitzt dieses Enzym ein abweichendes Reaktionsverhalten und Produktspektrum zu den bisher bekannten CPTs. Als allylische Substrate bevorzugt die ThkCPT GPP und FPP, ist jedoch auch mit DMAPP aktiv.^[156] Die Kettenverlängerung erfolgt mit IPP. Anders als andere bekannte dimere Mittelketten-CPTs scheint die ThkCPT (264 Aminosäuren, ~ 31 kDa) nativ als Tetramer vorzuliegen.^[156] Mit der EcUPPS und der ThkCPT konnten zwei sehr diverse Enzyme in dieser Arbeit untersucht werden. Beide Enzyme sind zudem attraktive Kandidaten, um artificielle homoallylische Elongationssubstrate für CPT-Reaktionen zu analysieren.

Generell führt eine Variation der Struktur des universellen Elongationssubstrates IPP zu starken Einschränkungen der Enzymaktivität von Prenyltransferasen und der Möglichkeit einer Kettenverlängerung. In Tabelle 7 sind literaturbekannte homoallylische Substrate von PTs sowie Prenyldiphosphate, die nicht als Substrat der getesteten PTs dienen, dargestellt. So konnte gezeigt werden, dass schon bei Substitution der C3-Methylgruppe durch eine Ethylgruppe (**43**) während der Katalyse der UPPS aus *Bacillus subtilis* keine Kettenverlängerung stattfindet, während ein einmaliges Durchlaufen des Katalysezyklus mit der *Bacillus stearothermophilus* FPPS bzw. *B. subtilis* HepPPS beobachtet wurde.^[152,157] Die zweifache Kondensation der Prenyleinheit des Substrats **43** an FPP gelang dagegen mit der UPPS aus *Micrococcus luteus*^[158] und mit der HexPPS von *M. luteus*.^[152,153] Mit Zunahme der Länge der C3-Alkylierung des Elongationssubstrates (3-Propyl-BPP, **45**; 3-Butyl-BPP, **48**) wird der Umsatz dieser Substrate durch Mittelketten-PTs erschwert.^[153,157,158] Eine Kondensation der Prenyleinheit von Substrat **48** an DMAPP konnte nur noch durch die thermostabile FPPS aus *B. stearothermophilus* katalysiert werden.^[157] Aus diesen Daten wird ersichtlich, dass die ionisierungsabhängigen

trans-Prenyltransferasen (TPT) scheinbar toleranter gegenüber einer Expansion der C3-Alkylierung des homoallylischen Substrates sind, als die *cis*-Prenyltransferasen (CPT).

Tabelle 7: Literaturbekannte homoallylische Substrate von Kurzketten-PTs und Mittelketten-PTs sowie literaturbekannte homoallylische Prenyldiphosphatanaloga, die von den getesteten Kurzketten-PT und Mittelketten-PTs nicht als Substrat akzeptiert werden.			
homoallylisches Substrat	Umsatz durch Mittelketten-PTs (Anzahl der Elongationen)	Umsatz durch Kurzketten-PTs (Anzahl der Elongationen)	Kein Umsatz durch genannte PTs
	4	UPPS aus <i>Micrococcus luteus</i> (1), ^[146,158] FPPS aus <i>Bacillus stearothermophilus</i> (1,2) ^[160] UPPS aus <i>Bacillus subtilis</i> (1) ^[159]	
	41	HexPPS aus <i>M. luteus</i> (1), ^[152,153] HepPPS aus <i>B. subtilis</i> (1), ^[152,153] UPPS aus <i>M. luteus</i> (1) ^[158,161]	FPPS aus <i>B. stearothermophilus</i> (1) ^[162]
	42	UPPS und OPPS aus <i>E. coli</i> (2) ^[162]	
	43	HepPPS aus <i>B. subtilis</i> (1), ^[152] HexPPS aus <i>M. luteus</i> (2), ^[152,153] UPPS aus <i>M. luteus</i> (2) ^[158]	FPPS aus <i>B. stearothermophilus</i> (1) ^[157] UPPS aus <i>B. subtilis</i> ^[159]
	44		FPPS aus <i>B. stearothermophilus</i> (1,2) ^[160] UPPS aus <i>M. luteus</i> ^[146,158] UPPS aus <i>B. subtilis</i> ^[159]
	45	HepPPS aus <i>B. subtilis</i> (1), ^[153] HexPPS aus <i>M. luteus</i> (1), ^[153]	FPPS aus <i>B. stearothermophilus</i> (1) ^[157] UPPS aus <i>M. luteus</i> ^[158]
	46		FPPS aus <i>B. stearothermophilus</i> (1,2) ^[160]
	47		FPPS aus <i>B. stearothermophilus</i> (1,2) ^[160]
	48		UPPS aus <i>M. luteus</i> ^[158] HepPPS aus <i>Bacillus subtilis</i> ^[153] HexPPS aus <i>M. luteus</i> ^[153]

homoallylisches Substrat	Umsatz durch Mittelketten-PTs (Anzahl der Elongationen)	Umsatz durch Kurzketten-PTs (Anzahl der Elongationen)	Kein Umsatz durch genannte PTs
 49		FPPS aus <i>B. stearothermophilus</i> (1) ^[160]	
 50		FPPS aus <i>B. stearothermophilus</i> (1) ^[160]	
 51			UPPS aus <i>M. luteus</i> ^[158] FPPS aus <i>B. stearothermophilus</i> ^[160]
 52			UPPS aus <i>M. luteus</i> ^[158] FPPS aus <i>B. stearothermophilus</i> ^[160]
 78 (Cl-BPP)		FPPS aus <i>Gallus gallus</i> (1) ^[143]	
$\text{PP} = \text{R} - \overset{\text{O}}{\underset{\text{O}^-}{\text{P}}} - \text{O} - \overset{\text{O}}{\underset{\text{O}^-}{\text{P}}} - \text{OH}$			

Die Substitution der C3-Methylgruppe gegen Wasserstoff oder Halogene (Cl, Br) wurde sowohl an CPTs als auch TPTs getestet. Während der Katalyse der Kurz- und Mittelketten-PTs erfolgte stets nur eine einfache Kondensation des Prenylrests von But-3-enyldiphosphat (BPP, **41**) an das allylische Substrat.^[152,153,158,161,162] Wird zum Beispiel das Reaktionsprodukt aus DMAPP und BPP (nor-GPP) erneut als allylisches Substrat der *B. stearothermophilus* FPPS eingesetzt, erfolgt weder mit IPP, noch mit BPP als homoallylisches Substrat eine Umsetzung.^[162]

Der Umsatz der Substrate DMAPP oder GPP und 3-Chlorbut-3-enyldiphosphat (Cl-BPP, **78**) durch die FPPS aus *Gallus gallus* resultierte in der Bildung von 3-Chlor-GPP bzw. 3-Chlor-FPP, während zweifachchloriertes Produkt nicht nachgewiesen werden konnte.^[143] Die Bildung zweifachbromierter Produkte konnte jedoch durch die Umsetzung von FPP und 3-Brombut-3-enyldiphosphat (Br-BPP, **42**) mit der EcUPPS oder OPPS aus *E. coli* bestätigt werden.^[109]

Eine Alkylierung des C4 des homoallylischen Substrates hat ebenso einen entscheidenden Einfluss auf die Möglichkeit einer Kettenverlängerung. Durch eine zusätzliche Methylgruppe entstehen Produkte mit chiralen Kohlenstoffatomen, wobei das (*Z*)-konfigurierte homoallylische Substrat, selektiv eine (*R*)-Konfiguration der C4-Methylgruppe des Produktes hervorruft, während (*E*)-Konfiguration des Substrates,

(S)-konfigurierte Produkte zur Folge hat.^[160] Die Kurzketten-*trans*-PT FPPS aus *B. stearothermophilus* akzeptiert (*E*)- und (*Z*)-Isomere C4-methylierter (**4**, **44**), C4-ethylierter (**46**, **47**) und C4-propylierter (**49**, **50**) Derivate von IPP. Dabei werden zwei Kondensationsschritte beider Isomere (*E*, *Z*) des 4-Methyl-IPPs (**4**, **44**) und 4-Ethyl-IPPs (**46**, **47**) durch die FPPS katalysiert. Dies führt zur selektiven Bildung des (*S,S*)-(all-*E*)-dimethyl-FPP-Analogons (bzw. (*S,S*)-(all-*E*)-diethyl-FPP-Analogons) sowie des (*R,R*)-(all-*E*)-dimethyl-FPP-Derivats (bzw. (*R,R*)-(all-*E*)-diethyl-FPP-Derivats) aus den (*E*)- bzw. (*Z*)-konfigurierten Edukten.^[160] Obwohl eine zweifache Kondensation dieser Substrate möglich ist, treten einfachkondensierte Produkte gehäuft auf.^[160] Die Produktbildungsrate nimmt mit zunehmender C4-Alkylierungslänge ab.^[160] Die Umsetzung von 4-Propyl-IPP (**49**, **50**) führt schließlich nur noch zum einfach verlängerten Produkt.^[160] Versuche, 4-Methyl-IPP (**4**, **44**) mit zwei unterschiedlichen *cis*-PTs umzusetzen zeigte, dass nur das (*E*)-Isomer (**4**) als Substrat akzeptiert wird.^[146,158,159] Zwar entstehen hier ebenso selektiv (*S*)-konfigurierte Produkte, jedoch scheint nur eine Verlängerung des allylischen Substrates (FPP) möglich zu sein.^[146,158,159] (*Z*)- (**52**) oder (*E*)-4-Brom-IPP (**51**) dagegen wurden weder von FPPS-, noch von UPPS-Enzymen akzeptiert.^[158,160]

Eine Verlängerung von FPP mit artifiziellen homoallylischen Substraten durch die Kautschuksynthese aus *Hevea brasiliensis* (in Form von gewaschenen Kautschukpartikeln) wurde ebenfalls beschrieben.^[163] Nachweislich wurde eine Kettenverlängerung von FPP mit Isopentenylmonophosphat (IP) erreicht, die scheinbar ähnlich der natürlichen Kautschuksynthese verläuft.^[163] Auch Reaktionen mit Prenylhalogeniden, Prenylalkoholen oder anderen Monomeren mit 4-8 Kohlenstoffatomen sind in Form von Patenten veröffentlicht.^[163]

Die Möglichkeit der enzymatischen Synthese unterschiedlicher Polymere wäre ein interessanter Aspekt für die industrielle Anwendung, da in speziellen synthetisch erzeugten Gummiarten strukturell veränderte Polyisoprene vorkommen. Ein Beispiel hierfür ist Chloropren-Kautschuk (auch Polychloropren oder Chlorbutadien-Kautschuk), der unter anderem unter der Bezeichnung Neopren[®] vertrieben wird.^[164] Die Herstellung dieses Synthesekautschuks erfolgt durch Polymerisation von 2-Chlor-1,3-butadien (Chloropren), wobei die Monomere hauptsächlich 1,4-verknüpft werden.^[165] Die Doppelbindungen in der Polymerkette des Chloropren-Kautschuks sind sowohl in *trans*- als auch in *cis*-Stellung zu finden, wobei das Verhältnis *trans/cis* etwa 9:1 beträgt.^[165] Die Chloratome sind sehr reaktionsträge und tragen zur Stabilität und Beständigkeit von Polychloropren bei. In sehr geringem Maße tritt auch ein Einbau von Monomeren in

1,2- oder 3,4-Stellung auf.^[165] Die chemische Polymerisation von Buta-1,3-dien führt zur Bildung von *cis*-1,4-Polybutadien, dessen Eigenschaften vergleichbar mit denen des Naturkautschuks sind.^[166] Polybutadien-Kautschuk wird in der Automobilindustrie zur Herstellung von Reifen verwendet und ist mit einem Anteil von 25 % des Weltmarktes einer der wichtigsten Kautschukprodukte.^[167]

Wenn es möglich wäre eine umweltfreundliche, nicht-Erdöl-basierte Synthese von Polybutadien oder Polybutadienderivaten zu erreichen, könnte dies einen enormen Fortschritt in der Gummierstellung bedeuten. Zudem ist Naturkautschuk eine begrenzte Ressource und die Verwendung von Latexprodukten führt häufig zu Allergien, die auf Proteine zurückzuführen sind, welche nach der Aufarbeitung in dem Naturmaterial verbleiben.

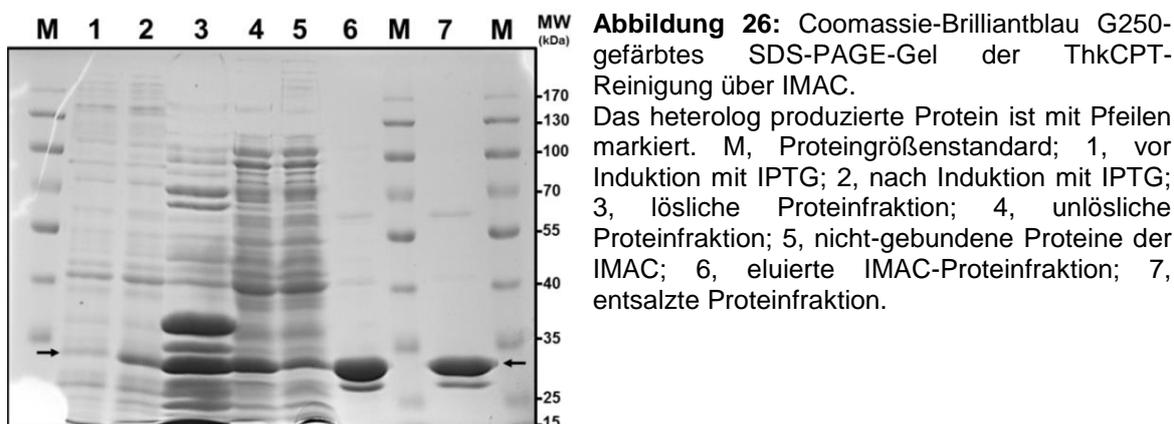
Die Substitution des natürlichen homoallylischen Substrats von PTs durch BPP oder C3-halogenierte Prenyldiphosphate scheint jedoch problematisch zu sein, besonders die Verlängerung des Startersubstrates mit mehr als zwei artifiziellen homoallylischen Substratmolekülen. Ziel dieser Arbeit sollte die Überprüfung des Substratspektrums zweier Mittelketten-CPTs hinsichtlich der Umsetzung verschiedener artifizieller, homoallylischer Substrate sein. Beide Enzyme sind in *E. coli* löslich exprimierbar und synthetisieren Polymere in *cis*-Konfiguration bei moderater Aktivität. Mit diesen Enzymen kann der Umsatz artifizieller homoallylischer Substrate erzielt werden, ohne dass Probleme wie mangelnde Aktivität durch fehlende Helferproteine entstehen, die die Verwendung einer Kautschuksynthese hervorrufen würde.

5.2 Ergebnisse und Diskussion

5.2.1 Rekombinante Herstellung und Reinigung der EcUPPS und ThkCPT

Die heterologe EcUPPS-Genexpression und die Reinigung der EcUPPS erfolgte wie in Abschnitt 3.2.1 beschrieben. Das 29 kDa große Protein wurde in einer Konzentration von 2,3 mg L⁻¹ Kultur gereinigt. Die rekombinante Expression des ThkCPT-Gens erfolgte im *E. coli* Expressionsstamm BL21(DE3) (Aminosäuresequenz im Anhang, Abbildung A 1). Der Expressionsvektor pET28a(+) vermittelt eine Kanamycinresistenz und enthält ein T7-Expressionssystem, welches eine IPTG-induzierte Proteinherstellung zulässt. Die ThkCPT (31 kDa) wurde über Ni²⁺-vermittelte IMAC gereinigt. Die Reinigung wurde anschließend über SDS-PAGE kontrolliert (Abbildung 26). Die Induktion der Biosynthese des Zielproteins ist in Bahn 2 zu sehen. Die löslichen Proteine (3) wurden nach erfolgter Zellyse von den unlöslichen Proteinen (4) getrennt. Nachdem die His₆-ThkCPT an das

IMAC-Material gebunden war, konnten unerwünschte Proteine des Expressionswirts (5) ausgewaschen werden. Anschließende Waschschrte und Elution der ThkCPT (6) mit Imidazol-haltigem Puffer sowie eine anschließende Entsalzung über Größenausschlusschromatographie an Sephadex™ G-25 führten zu chromatographisch reinem Zielprotein (7). Die durchschnittliche Ausbeute lag bei 6,1 mg L⁻¹ Flüssigkultur.



5.2.2 Analyse artifiziieller Elongationssubstrate der EcUPPS

Zunächst sollte die Toleranz des Enzyms gegenüber Veränderungen der Struktur des homoallylischen Substrates (Elongationssubstrat) getestet werden. Mit den beiden Mittelketten-*cis*-Prenyltransferasen EcUPPS und ThkCPT wurden verschiedene IPP-Analoga im Mikrotiterplattenformat umgesetzt und die Produkte wurden anschließend über DC, HPLC, GC/EI-MS und LC/ESI-MS näher charakterisiert. Als Elongationssubstrate wurden IPP sowie die artifiziiellen Substrate BPP (**41**), Br-BPP (**42**), Cl-BPP (**78**), 3-(Trifluormethyl)-but-3-enyldiphosphat (CF₃-BPP, **73**) und 3-Phenyl-but 3-enyldiphosphat (Ph-BPP, **74**) getestet. Die halogenierten Substrate wurden ausgewählt, da die entsprechenden Substituenten hinsichtlich des molekularen Volumens und der Hydrophobizität, einer Methylgruppe soweit wie möglich ähneln (Tabelle 8). Butenyldiphosphat wurde, neben der kommerziellen Relevanz des Produkts (Polybutadienkautschuk), gewählt, um den Einfluss der Methylgruppe näher zu charakterisieren. Mit Ph-BPP sollte die Möglichkeit der Verwendung voluminöser homoallylischer Substrate untersucht werden, die eine besonders hohe Stabilisierung in der Benzylstellung erlaubt.

Die Analyse der artifiziiellen Elongationssubstrate mit der EcUPPS erfolgte unter Verwendung des MTP-Phosphatdetektionsassays (Abbildung 27). BPP, Cl-BPP und Br-BPP wurden als Substrat von der EcUPPS akzeptiert (Abbildung 27). Mit einem

Tausendstel der katalytischen Effizienz gegenüber dem natürlichen Substrat IPP, ist die Produktbildung mit den artifiziellen Substraten Cl-BPP, Br-BPP und BPP gerade noch messbar (Abbildung 27). Die Hill-Koeffizienten für alle getesteten Substrate ($h \sim 1$) weisen auf nicht-kooperatives Verhalten hin. Die Affinität der EcUPPS zu BPP ($K_m = 63,5 \mu\text{M}$) ist um das 10fache geringer als die Affinität zu IPP ($K_m = 6,5 \mu\text{M}$). Hierdurch wird die essentielle Funktion des C3-Substituenten deutlich, der möglicherweise zur Positionierung des Substrats im aktiven Zentrum beiträgt. Cl-BPP und Br-BPP werden ähnlich gut erkannt wie IPP. Die Halogen-Substituenten scheinen, ebenso wie die Methylgruppe von IPP, eine geeignete Positionierung des Substrates zu begünstigen. Die Orientierung des Substrats kann folglich nicht die alleinige Ursache für die stark verringerten Reaktionsgeschwindigkeiten dieser alternativen homoallylischen Substrate sein.

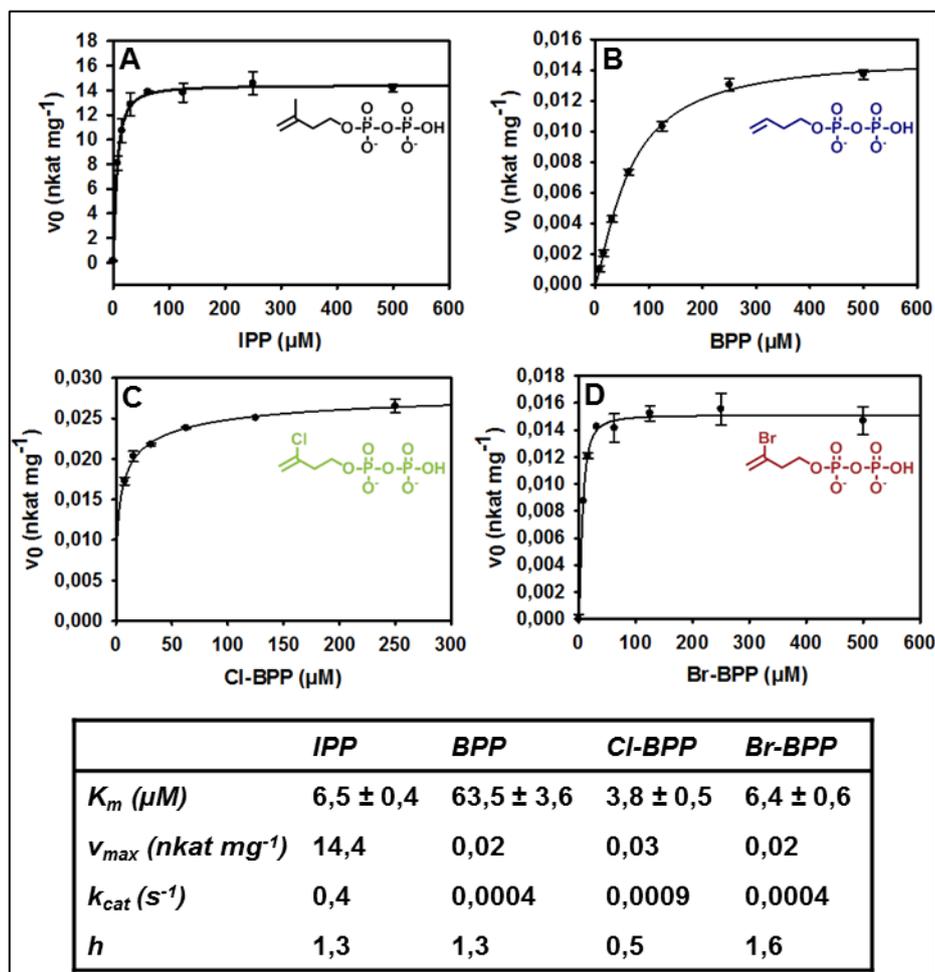


Abbildung 27: Bestimmung kinetischer Parameter der EcUPPS mit FPP und den homoallylischen Substraten IPP, BPP, Cl-BPP und Br-BPP. Die Kurvenregression erfolgte nach dem Hill-Modell mit SigmaPlot 12.3. h , Hill-Koeffizient; v_0 , Anfangsgeschwindigkeit.

Zu den Effekten, die die Architektur des jeweiligen Substrates auslöst, kommen Gegebenheiten, die die Elektronendichteverhältnisse innerhalb des Moleküls betreffen. Diese beeinflussen maßgeblich die Reaktion des homoallylischen Substrates mit dem

allylischen Prenyldonor. Die Änderung des Induktiven und des Mesomeren Effekts (I- bzw. M-Effekt) durch unterschiedliche Substituenten haben deshalb einen entscheidenden Einfluss (Tabelle 8). Halogene besitzen einen +M-Effekt und einen starken -I-Effekt, der dem Mesomeren Effekt überwiegt.^[166] Je elektronegativer das Heteroelement, desto stärker ist der -I-Effekt (Cl > Br).^[166] Eine Methylgruppe besitzt einen leichten +I-Effekt, aber keinen M-Effekt, während ein Wasserstoff keinen der beiden Effekte auslöst.^[166] Ein Phenylring besitzt zu einen leichten -I-Effekt und einen +M-Effekt, wobei letzterer überwiegt, während eine CF₃-Gruppe einem -I-Effekt aufweist.

Die elektronenschiebenden Eigenschaften (+I-Effekt) einer Methylgruppe an C3 des homoallylischen Substrates, weist, ausser Ph-BPP, keines der getesteten Substrate auf (Tabelle 8). Nahezu alle getesteten homoallylischen Prenyldiphosphate enthalten eine elektronenärmere C3-C4-Doppelbindung im Vergleich zu IPP (+I-Effekt). Gerade eine elektronenreiche C3-C4-Doppelbindung ist aber förderlich, da kationenstabilisierend, um die Kondensation an das allylische Substrat zu ermöglichen. Die Ursache für die extrem verlangsamte Reaktionsgeschwindigkeit der Enzymreaktionen mit den Substraten BPP, Cl-BPP und Br-BPP könnte folglich auf die verschobenen Elektronendichteverhältnisse innerhalb des Substrates zurückzuführen sein.

Tabelle 8: Induktive (I) und Mesomere Effekte (M) ausgelöst durch verschiedene C3-Substituenten an BPP sowie Atomradien der Substituenten.
+, leicht elektronenschiebend; 0, weder elektronenschiebend, noch -ziehend; -, leicht elektronenziehend; - -, elektronenziehend; - - -, stärker elektronenziehend. Die Berechnung der molekularen Volumina der C3-Substituenten an BPP erfolgte mit *Molinspiration* (<http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>).

C3-Substituent an BPP	molekulares Volumen des Substituenten (Å ³)	Effekt		elektronenschiebend (+) /-ziehend (-)
		I	M	
-CH ₃	22,9	+		+
-H	9,6			0
-Cl	19,9	-	+	- -
-Br	24,2	-	+	-
-CF ₃	37,6	-		- - -
-C ₆ H ₅	77,7	-	+	+

Ph-BPP und CF₃-BPP werden nicht umgesetzt. Dies ist bei Ph-BPP wahrscheinlich auf sterische Effekte zurückzuführen, da der Phenylrest durch sein Volumen zu Hinderungen der Substraterkennung in der aktiven Tasche führt. Im Fall von CF₃-BPP ist neben dem molekularen Volumen sicher auch der starke -I-Effekt für den ausbleibenden Umsatz entscheidend.

Von besonderem Interesse im Hinblick auf die biosynthetische Herstellung artifizierender Gummisorten, ist die Kettenlänge der Kondensationsprodukte, die mit den homoallylischen Substraten Cl-BPP, Br-BPP und BPP an FPP mit Hilfe der EcUPPS synthetisiert werden. Hierzu wurden Reaktionen der EcUPPS mit MANT-O-GPP als Startersubstrat sowie dem jeweiligen Elongationssubstrat nach der Diphosphathydrolyse mittels HPLC untersucht (Abbildung 28). Wie bereits bei der Analyse der Startereinheiten (siehe Kapitel 4) geklärt werden konnte, ist die gebildete Produktkettenlänge nicht vom verwendeten Startersubstrat MANT-O-GPP abhängig. Dabei kann mit IPP eine Kondensation von 8-9 Elongationseinheiten beobachtet werden, während eine Reaktion mit BPP nur zum einfachkondensierten Produkt führt. Die EcUPPS-Reaktion mit Cl-BPP und Br-BPP ermöglicht zwei Kondensationschritte an das Startersubstrat.

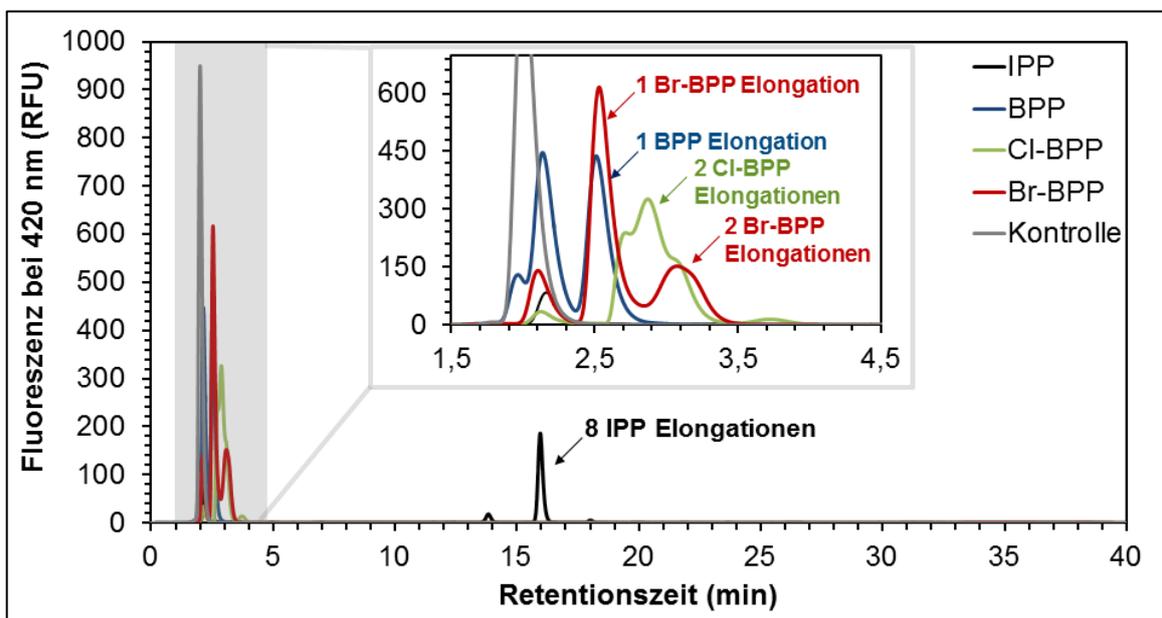


Abbildung 28: HPLC-Chromatogramm der Produkte der EcUPPS mit MANT-O-GPP und den Elongationssubstraten IPP, BPP, Cl-BPP und Br-BPP. Die Detektion erfolgte nach Anregung bei 352 nm über Fluoreszenz bei 420 nm. Die beispielhaft dargestellte Kontrolle wurde mit denaturierter EcUPPS, MANT-O-GPP und BPP durchgeführt. Gleichartige Kontrollen mit Cl-BPP, Br-BPP und IPP sind nicht dargestellt, da ähnliche Ergebnisse erzielt wurden. RFU, relative Fluoreszenzeinheiten.

Obwohl die HPLC-Analyse mit MANT-O-GPP eine selektive Methode zur Detektion der Produkte darstellt, kann durch mögliche Retentionszeitverschiebungen zwischen den unterschiedlichen artifizierten Produktoligomeren keine eindeutige Aussage formuliert werden, wie viele Prenyleinheiten in die jeweiligen Produkte eingeführt wurden. Die detaillierte Analyse der entstandenen Produkte erfolgte über eine redundante Bestimmung der Produktkettenlängen über DC, GC/EI-MS und LC/ESI-MS. In Abbildung 29 sind Dünnschichtchromatogramme der Hydrolyseprodukte einer EcUPPS-Reaktion mit

BPP, Cl-BPP und Br-BPP dargestellt. Für die Dünnschichtchromatographie als auch für GC/EI-MS-Analysen wurden EcUPPS-Assays mit FPP als Startersubstrat durchgeführt. Es wurde beobachtet, dass das Trennverhalten der MANT-O-Prenole am DC-Material, wahrscheinlich aufgrund des Fluorophors, unzureichend ist. Deshalb erfolgte die dünnschichtchromatographische Analyse mit den enzymatischen Kondensationsprodukten von FPP und dem jeweiligen homoallylischen Elongationssubstrat. Betrachtet man zunächst die BPP-Assayprodukte in Abbildung 29 ist deutlich ein zusätzlicher Produktpot im Vergleich zur Kontrolle mit denaturiertem Enzym erkennbar. Dieses Produkt entspricht dem einfachkondensierten BPP-Produkt, nor-Geranylgeraniol, welches auch als einziges Produkt bei der HPLC-Analyse detektiert wurde (Abbildung 28). Nor-Geranylgeraniol konnte zusätzlich über GC/EI-MS-Analytik, die in diesem Fall durch eine geringere Molekülgröße möglich ist, nachgewiesen werden (Abbildung 30). Der Molekülionenpeak $m/z = 276,2$ (berechnet: $m/z = 276,25$) ist deutlich erkennbar und das Fragmentation $m/z = 69,0$, welches einer Prenyleinheit ($C_5H_9^+$) zuzuordnen ist, tritt als Basispeak auf. Die Abspaltung einer Butenol-Gruppe könnte zu dem Fragmentation $m/z = 205,1$ ($C_{15}H_{25}^+$) führen. Auch nach Umsatz von MANT-O-GPP konnte ein entsprechendes Natriumaddukt des einfachkondensierten nor-MANT-O-Farnesol mit einer Retentionszeit von 2,14 min und $m/z = 380,3$ über LC/ESI-MS-Analysen detektiert werden (Tabelle 9).

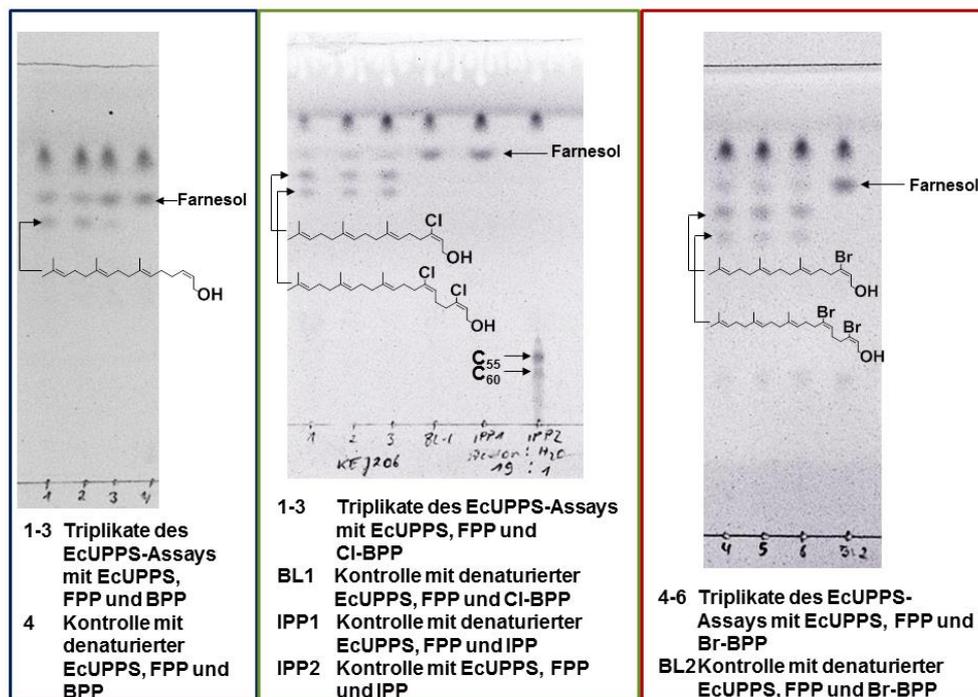


Abbildung 29: DC-Analyse der EcUPPS-Produkte mit FPP als Startersubstrat und BPP (blau) sowie Cl-BPP (grün) und Br-BPP (rot) als Elongationssubstrat. DC-Material: RP-18; Laufmittelsystem: Aceton/H₂O 19:1 (v/v), Nachweisreagenz: Iodampf.

Für die Cl-BPP und Br-BPP-Produkte konnte ein Nachweis über DC erfolgen. Hier sind in Abbildung 29 jeweils zwei Produktpots im Vergleich zu der Kontrolle mit denaturiertem Enzym zu erkennen. Es handelt sich dabei um das einfach- und zweifachkondensierte Reaktionsprodukt mit dem Startersubstrat FPP. Über GC/EI-MS konnte für die chlorierten und bromierten Produkte kein eindeutiger Nachweis erbracht werden (Abbildung 30). Hierbei führt wahrscheinlich die starke Erhitzung der Produkte während der Gaschromatographie als auch die starke EI-Ionisierung zu einer starken Fragmentierung der Produkte, so dass das in Abbildung 30 gezeigte EI-Spektrum des Cl-BPP-Produktes ausschließlich die Fragmentationen $m/z = 136,2$ und $m/z = 69,0$ zeigt, welche der Abspaltung zweier bzw. einer Prenyleinheit ($C_5H_9^+$) entsprechen.

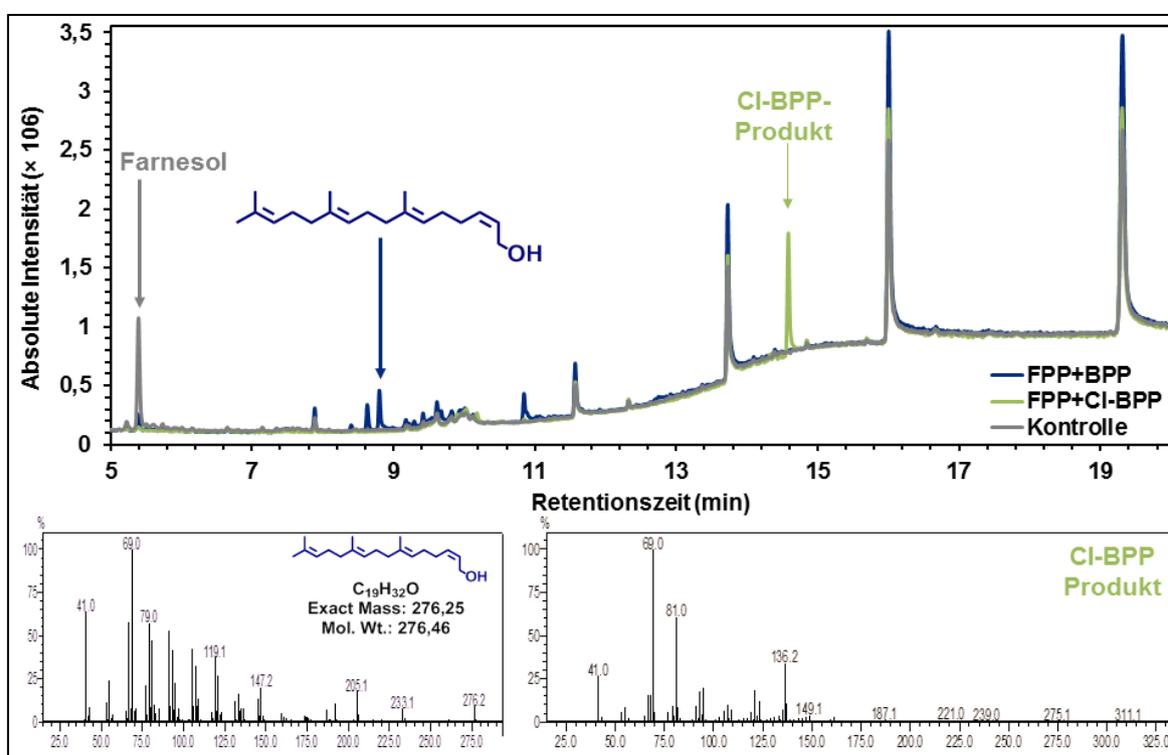


Abbildung 30: GC/EI-MS Analyse der EcUPPS-Assays mit FPP als Startersubstrat und den Elongationssubstraten BPP (blau) und Cl-BPP (grün). In grau ist ein Kontrollversuch mit denaturiertem Enzym dargestellt. Hier wurde ausschließlich Farnesol detektiert, welches nicht umgesetztem FPP (Edukt) entspricht. Unter dem TIC-Chromatogramm sind die korrespondierenden EI-Spektren zu dem detektierten BPP-Produkt sowie zu dem Cl-BPP-Produkt gezeigt.

Der Nachweis zweifachkondensierter Cl-BPP und Br-BPP-Produkte mit MANT-O-GPP konnte über LC/ESI-MS geführt werden (Tabelle 9). Dabei wurde mit einer Retentionszeit von 2,25 min und einem $m/z = 502,1$ $[M+Na^+]$ das Produkt einer zweimaligen Kondensation von Cl-BPP an MANT-O-GPP und mit einer Retentionszeit von 2,44 min und $m/z = 591,7$ $[M+Na^+]$ das zweifachbromierte Produkt nachgewiesen. Zusätzlich

konnte beobachtet werden, dass alle Produkte auch als Kaliumaddukt $[M+K^+]$ auftreten, was als zusätzlicher Nachweis der Molekülonen dienen kann.

Tabelle 9: LC/ESI-MS Analyse der MANT-O-GPP-Produkte der EcUPPS mit IPP, BPP, Cl-BPP und Br-BPP.
ber., berechnet; m/z , Masse-zu-Ladungsverhältnis; VL, Anzahl der Kondensationen des Elongations-substrats an MANT-O-GPP.

Elongations-substrat	$m/z [M+Na]^+$ (Retentionszeit in min)									
	1 VL	ber.	2 VL	ber.	7 VL	ber.	8 VL	ber.	9 VL	ber.
IPP	-	-	-	-	802,4 (8,77)	802,6	870,5 (10,94)	870,7	938,7 (13,27)	938,7
BPP	380,3 (2,14)	380,2	-	-	-	-	-	-	-	-
Cl-BPP	-	-	502,1 (2,25)	502,2	-	-	-	-	-	-
Br-BPP	-	-	591,7 (2,44)	592,1	-	-	-	-	-	-

Somit ist es gelungen mit vier verschiedenen Analysemethoden (DC, GC/EI-MS, HPLC und LC/ESI-MS) die Produktkettenlängen der natürlichen und artifizierten Polyprenole zu bestimmen. Dabei stellte sich vor allem die Kombination aus DC, HPLC und LC/ESI-MS als sehr zuverlässig heraus. GC/EI-MS ist wenig geeignet für die Analyse von Polyprenolen, da die Ionisierung der Moleküle zu starker Fragmentierung führt, so dass der Molekülonenpeak selbst oft nicht nachweisbar ist. Im Gegensatz dazu kann ein Nachweis über LC mit anschließender Elektrosprayionisierung im Positivionenmodus erfolgen. Die Polyprenole treten dabei bevorzugt als Natriumaddukte auf, doch auch Protonen- und Kaliumaddukte sind oft sichtbar. Die Dünnschichtchromatographie ermöglicht zusätzlich eine schnelle und einfache Vorbestimmung der Kettenlänge der Produkte. Somit steht hier ein sehr effizientes, redundantes, selektives und sensitives Analysespektrum zur Verfügung um die Kettenlängen der Produktalkohole zu analysieren.

5.2.3 Analyse artifizierter Elongationssubstrate der *Thermococcus kodakaraensis* cis-Prenyltransferase (ThkCPT)

Die Analyse des Elongationssubstratspektrums der ThkCPT erfolgte in derselben Weise wie für die EcUPPS (siehe Abschnitt 5.2.2). Betrachtet man die Ergebnisse des MTP-Phosphatassays in Abbildung 31, kann auch hier beobachtet werden, dass die nicht-natürlichen Elongationssubstrate BPP, Cl-BPP und Br-BPP von diesem Enzym schlechter umgesetzt werden als IPP. Das sehr voluminöse Ph-BPP und CF₃-BPP mit stark elektronenziehendem Substituenten werden, wie im Fall der EcUPPS, nicht als Substrat

erkannt (siehe Abschnitt 5.2.2). Die katalytischen Parameter der BPP-Umsetzung konnten aufgrund der geringen Reaktionsgeschwindigkeit nicht bestimmt werden, jedoch ist eindeutig zu erkennen, dass das Substrat umgesetzt wird (Abbildung 31). Der MTP-Phosphatassay wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Das Temperaturoptimum der ThkCPT liegt jedoch zwischen 60 °C und 70 °C.^[156] Der Temperaturunterschied zwischen dem Katalysoptimum der ThkCPT zu den Assaybedingungen ist wahrscheinlich die Ursache für verminderte Umsatzraten. Die Umsatzraten für Cl-BPP ($k_{\text{cat}} = 0,0005 \text{ s}^{-1}$) und Br-BPP ($k_{\text{cat}} = 0,0004 \text{ s}^{-1}$) liegen in demselben Bereich wie für die Umsetzung mit der EcUPPS. Die Ursache dafür liegt wahrscheinlich in den Elektronendichteverhältnissen (I-Effekt, M-Effekt) der Substrate begründet, wie bereits für die EcUPPS in Abschnitt 5.2.2 beschrieben (Tabelle 8). Die Affinität der ThkCPT zu IPP und den artifiziiellen halogenierten Elongationssubstraten ist im Vergleich zur EcUPPS insgesamt geringer. Die Unterschiede zwischen den einzelnen K_m -Werten der halogenierten Substrate zu dem K_m -Wert von IPP sind jedoch, genau wie im Fall der EcUPPS, gering.

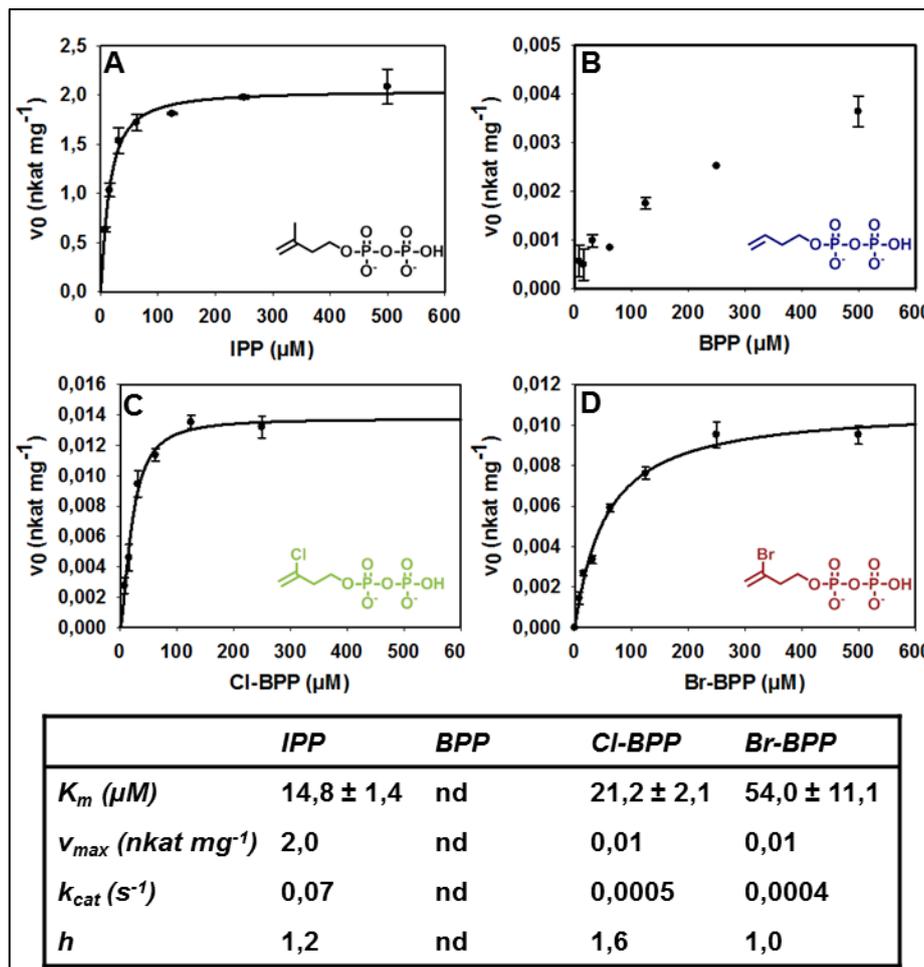


Abbildung 31: Bestimmung kinetischer Parameter der ThkCPT mit FPP und den homoallylischen Substraten IPP, BPP, Cl-BPP und Br-BPP bei 22 °C. Die Kurvenregression erfolgte nach dem Hill-Modell mit SigmaPlot 12.3. h , Hill-Koeffizient; v_0 , Anfangsgeschwindigkeit; nd, nicht bestimmt.

Da der MTP-Phosphatassay bei Raumtemperatur durchgeführt wurde, war es sehr wichtig die Produktbildung unter optimalen Reaktionsbedingungen zu kontrollieren. Dazu wurden HPLC-Analysen durchgeführt. Die Enzymassays wurden bei 65 °C mit dem Fluoreszenzsubstrat MANT-O-GPP sowie dem jeweiligen Elongationssubstrat inkubiert und anschließend über HPLC analysiert (Abbildung 32). MANT-O-GPP wird auch von dem thermophilen Enzym akzeptiert und die Produktbildung kann so analysiert werden. Mit IPP als Elongationssubstrat erhält man eine Produktverteilung mittelkettiger MANT-O-GPP-Produktanaloga (6-10 IPP-Elongationen). Hauptsächlich entstehen mit der ThkCPT die einfachkondensierten Reaktionsprodukte aus MANT-O-GPP und dem jeweiligen artifiziiellen Elongationssubstrat BPP, Cl-BPP und Br-BPP. Diese Reaktionsprodukte haben eine etwas längere Retentionszeit als der entsprechende Prenylalkohol von MANT-O-GPP, welcher auch in der Kontrolle zu beobachten ist. Erstaunlicherweise entstehen mit Cl-BPP und Br-BPP aber auch MANT-O-GPP-Produktanaloga mit höherer Kettenlänge, die über HPLC nachweisbar sind (Abbildung 32). Die detektierten Produktanaloga entsprechen Reaktionsprodukten einer Kondensation von bis zu fünf halogenierten Elongationssubstraten an MANT-O-GPP.

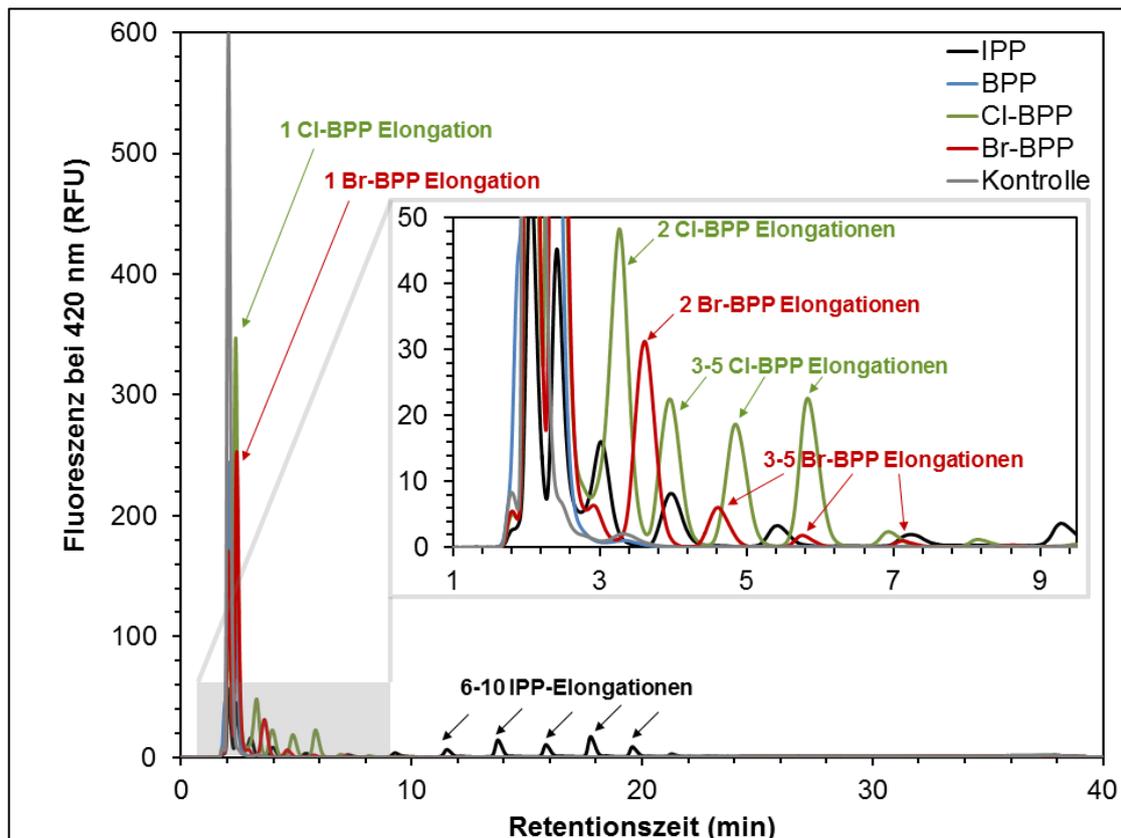


Abbildung 32: HPLC-Chromatogramm der Produkte der ThkCPT mit MANT-O-GPP und den Elongationssubstraten IPP, BPP, Cl-BPP und Br-BPP bei 65 °C Inkubationstemperatur. Die Detektion erfolgte nach Anregung bei 352 nm über Fluoreszenz bei 420 nm. Die beispielhaft dargestellte Kontrolle wurde mit denaturierter ThkCPT, MANT-O-GPP und BPP durchgeführt. Gleichartige Kontrollen mit Cl-BPP, Br-BPP und IPP sind nicht dargestellt, da ähnliche Ergebnisse erzielt wurden. RFU, relative Fluoreszenzeinheiten.

Die geringe Abundanz dieser Produkte macht jedoch den weiteren Nachweis, insbesondere den höherer Oligomere sehr schwierig. Zunächst war jedoch interessant, ob die im Vergleich zur EcUPPS veränderte Produktkettenlänge auf erhöhte Reaktionstemperaturen der enzymatischen Katalyse zurückzuführen ist. Um dies zu testen wurden die HPLC-Assays in gleicher Weise wiederholt und bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erfolgter Aufarbeitung wurden die Proben über HPLC analysiert (Abbildung 33).

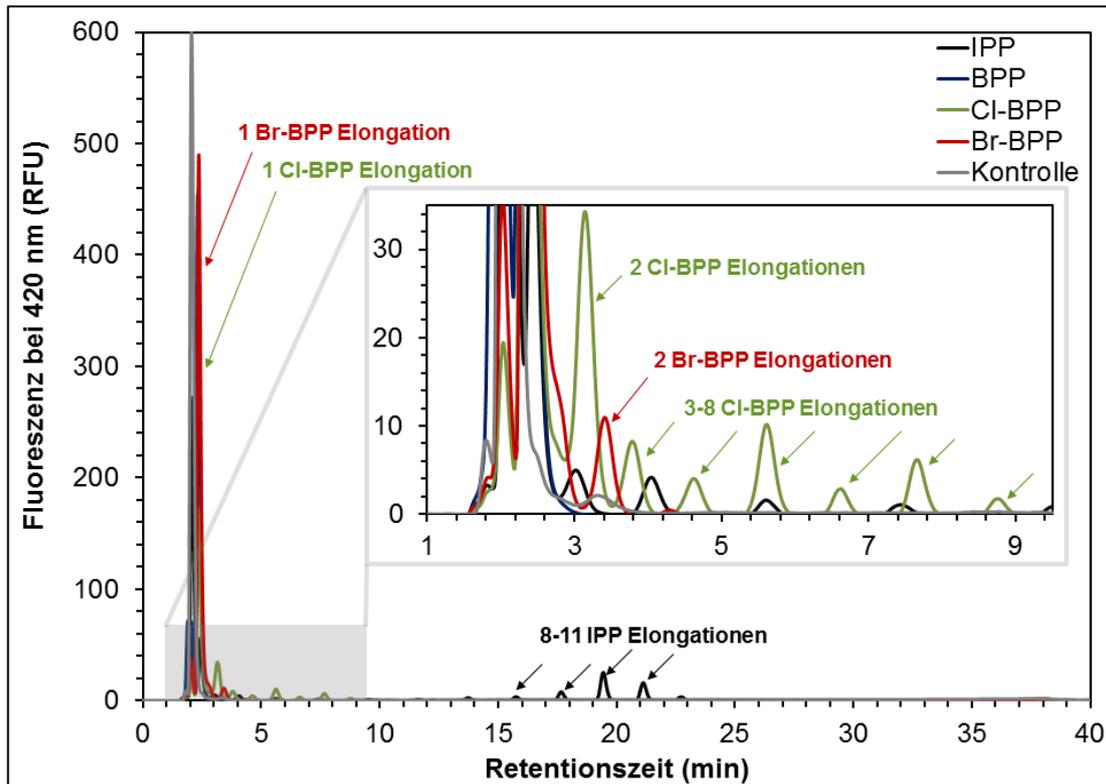


Abbildung 33: HPLC-Chromatogramm der Produkte der ThkCPT mit MANT-O-GPP und den Elongationssubstraten IPP, BPP, CI-BPP und Br-BPP bei 25 °C Inkubationstemperatur. Die Detektion erfolgte nach Anregung bei 352 nm über Fluoreszenz bei 420 nm. Die beispielhaft dargestellte Kontrolle wurde mit denaturierter ThkCPT, MANT-O-GPP und BPP durchgeführt. Gleichartige Kontrollen mit CI-BPP, Br-BPP und IPP sind nicht dargestellt, da ähnliche Ergebnisse erzielt wurden. RFU, relative Fluoreszenzeinheiten.

Wie schon bei der 65 °C-Inkubation der ThkCPT-Assays zu beobachten war, konnten auch bei Raumtemperatur Reaktionsprodukte mit mehr als zwei Kondensationen, vor allem mit CI-BPP, beobachtet werden. Aus der suboptimalen Reaktionstemperatur resultiert zwar ein geringerer Umsatz, jedoch kann davon ausgegangen werden, dass die Kettenverlängerungsreaktion nicht allein auf die Reaktionstemperaturunterschiede zurückzuführen ist, da die Inkubation der Enzymreaktion bei 65 °C zur Bildung derselben Produkte führte wie die Reaktion bei Raumtemperatur. Erstaunlich ist zudem, dass bei 25 °C Assaytemperatur eher Produkte mit längeren Ketten entstehen, was auch bei dem

natürlichen Substrat IPP zu beobachten ist. Dominierend ist bei den artifiziellen Substraten jedoch, gleichsam wie bei der Inkubation bei 65 °C, das einfachkondensierte Reaktionsprodukt.

Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der EcUPPS und der ThkCPT zeigt, neben einer recht hohen Sequenzidentität von 41 %, dass vor allem Aminosäurebereiche, die direkt an der Katalyse beteiligt sind in beiden Enzymen vorkommen. Deshalb ist es wahrscheinlich, dass das gesteigerte Kondensationsvermögen der ThkCPT mit Cl-BPP und Br-BPP möglicherweise in einer besseren Stabilisierung der wachsenden Produktkette im Enzym begründet liegt.

Um die Produktkettenlängen zu verifizieren, wurden DC-Analysen, der Kondensationsprodukte von FPP und dem jeweiligen artifiziellen Elongationssubstrat, durchgeführt (Abbildung 34).

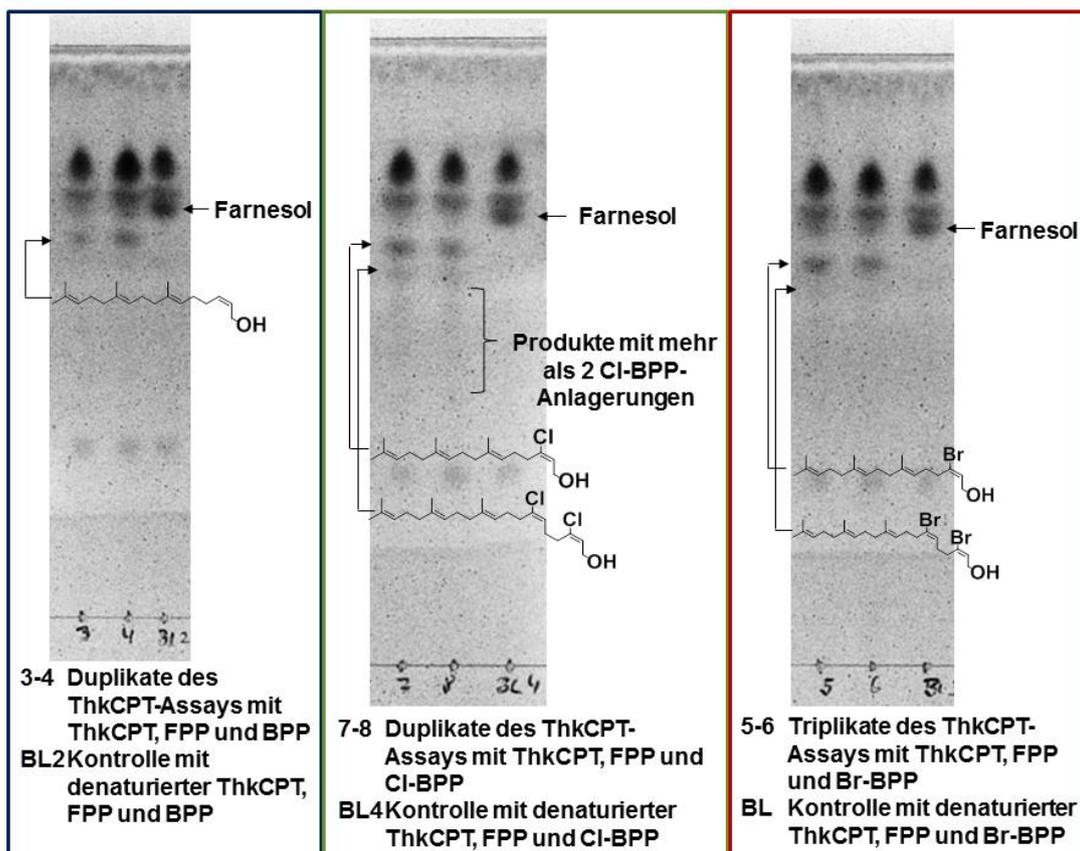


Abbildung 34: DC-Analyse der ThkCPT-Produkte mit FPP als Startersubstrat und BPP (blau) sowie Cl-BPP (grün) und Br-BPP (rot) als Elongationssubstrat bei 65 °C-Assaytemperatur. DC-Material: RP-18; Laufmittelsystem: Aceton/H₂O 19:1 (v/v), Nachweisreagenz: Iodampf.

Auch hier konnte das einfachkondensierte Reaktionsprodukt mit den artifiziellen Elongationssubstraten als Hauptprodukt nachgewiesen werden, während die

mehrfachkondensierten Reaktionsprodukte nur als Nebenprodukte auftreten. Dennoch kann man bei der DC-Analyse mit dem Substrat CI-BPP das zweifachkondensierte Produkt eindeutig erkennen, während sich die mehrfachkondensierten Reaktionsprodukte lediglich durch Spots von sehr geringer Intensität erkennen lassen. Die geringe Abundanz der Kondensationsprodukte ist auch bei diesem Analyseverfahren problematisch. Mit Br-BPP ist selbst das Produkt einer zweifachen Kondensation schlecht nachweisbar. Längerkettige Reaktionsprodukte sind mit Br-BPP aufgrund der geringen Sensitivität des Verfahrens nicht nachweisbar.

Die LC/ESI-MS-Messungen ermöglichten den Nachweis der Natrium- und Kaliumaddukte der Produktalkohole im positiven Ionisierungsmodus (Tabelle 10). Besonders mit IPP konnten dabei die Elongationsprodukte einer sieben bis zehnfachen Anlagerung von IPP an das Startersubstrat MANT-O-GPP bei 65 °C-Assaytemperatur nachgewiesen werden.

Tabelle 10: LC/ESI-MS Analyse der MANT-O-GPP-Produkte der ThkCPT mit IPP, BPP, CI-BPP und Br-BPP bei 65 °C-Assaytemperatur.
ber., berechnet; m/z , Masse-zu-Ladungsverhältnis; VL, Anzahl der Kondensationen des Elongations-substrats an MANT-O-GPP.

Elongations-substrat	$m/z [M+Na]^+$ (Retentionszeit in min)									
	1 VL	ber.	7 VL	ber.	8 VL	ber.	9 VL	ber.	10 VL	ber.
IPP	-	-	802,6 (8,86)	802,6	870,8 (10,86)	870,7	938,5 (13,27)	938,7	1006,7 (15,27)	1006,8
BPP	308,3 (2,14)	380,2	-	-	-	-	-	-	-	-
CI-BPP	414,2 (2,27)	414,2	-	-	-	-	-	-	-	-
Br-BPP	458,2 (2,19)	458,1	-	-	-	-	-	-	-	-

Für die artifiziellen Elongationssubstrate konnte eindeutig das Produkt einer einfachen Kondensation von MANT-O-GPP mit BPP nachgewiesen werden, welches mit einer Retentionszeit von 2,14 min und einem $m/z = 380,3 [M+Na]^+$ detektiert wurde. Für die Elongationssubstrate CI-BPP und Br-BPP konnte bei 65 °C und 25 °C-Assaytemperatur das Produkt einer einfachen Kondensation zum Startersubstrat gemessen werden. Die Ergebnisse der LC/ESI-MS Messung stimmen damit sehr gut mit den Messungen der HPLC überein. Produktoligomere höherer Kondensationsstufen konnten mittels LC/ESI-MS nicht nachgewiesen werden, da deren Konzentration bei der geringen Ionisierungsneigung wahrscheinlich unterhalb der Nachweisgrenze liegt. Ein konkreter Hinweis für das Auftreten von Produktoligomeren mit mehr als einer Kondensation von CI-BPP und Br-BPP konnte somit durch HPLC/Fluoreszenz als auch DC verifiziert werden.

5.2.1 Mutagenesestudien zur Umsetzung artifiziieller Elongationssubstrate mit der EcUPPS

Die Umsatzanalyse der synthetischen Elongationssubstrate BPP, Cl-BPP und Br-BPP durch die EcUPPS zeigte, dass mit BPP die Verlängerung des Startersubstrates um eine Einheit möglich ist, während mit Cl-BPP und Br-BPP zwei Elongationsschritte katalysiert werden können. Für die verbesserte Umsetzung von BPP wurde angenommen, dass eine räumliche Beschränkung der S2-Substratbindungsstelle und damit verbunden die Restriktion des Positionierungsfreiraums von BPP innerhalb des katalytische Zentrums, zu einer verbesserten Umsetzung des Substrates führen würde. Damit könnte die Kondensation von mehr als einem BPP-Molekül an das Startersubstrat katalysiert werden.

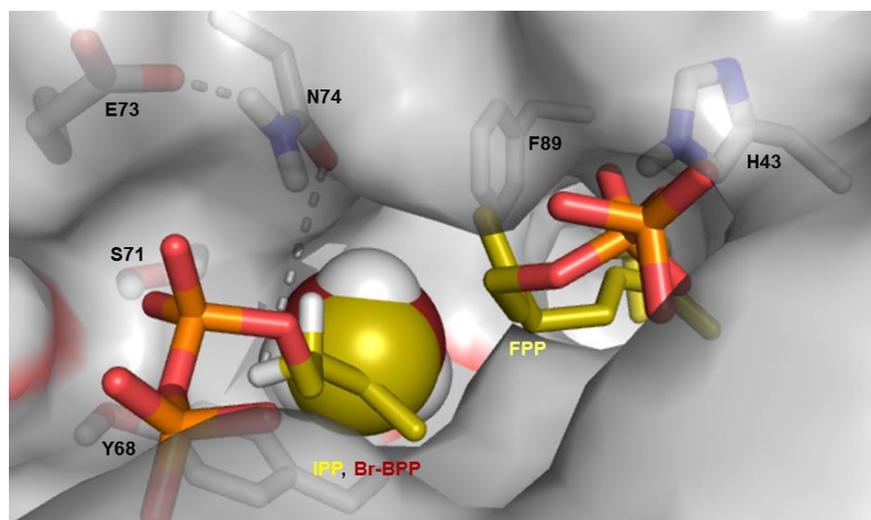


Abbildung 35: Modell des katalytischen Zentrums der EcUPPS (EcUPPS_2) mit den Substraten FPP und einer überlagerten Darstellung der Elongationssubstrate IPP, BPP, Cl-BPP und Br-BPP (wobei der Substituent an C3 als Kalottenmodell hervorgehoben ist um die Atomgröße zu verdeutlichen). Verglichen wird der Atomradius an C3 wenn die CH₃-Gruppe von IPP (gelb) durch Brom (rot) ausgetauscht wird. In grau sind die Wasserstoffe der CH₃-Gruppe zu sehen. Chlor besitzt einen geringeren Radius als Brom oder die CH₃-Gruppe und ist somit nicht zu sehen. Die Oberfläche der Substratbindungstasche ist halbtrenant in grau dargestellt. Die Abbildung wurde mit PyMOL 1.5.x erstellt.

Ortsgerichtete Mutagenesen in der IPP-Bindungstasche sollten zunächst die Reaktionsgeschwindigkeit und die Affinität des Substrates zum Enzym verbessern um so mindestens ein 2-3faches Durchlaufen des Katalysemechanismus mit den artifiziiellen Substraten zu ermöglichen. Betrachtet man in Abbildung 35 das katalytische Zentrum mit den artifiziiellen Substraten wird deutlich, dass die Substitution der C3-Methylgruppe (IPP) gegen Wasserstoff (BPP) zu einem Zwischenraum in der Substratbindungstasche führt. Mit IPP wird die Substratbindungstasche hingegen voll ausgefüllt und das Substrat optimal positioniert.

Enzymvarianten, die der Aufklärung des Katalysemechanismus dienten (siehe Abschnitt 3.2.2) wurden zusätzlich mit den artifiziellen Elongationssubstraten untersucht (Abbildung 36). Alle diese Varianten, außer S72C und E73D, weisen eine stark reduzierte Produktbildung mit diesen Substraten auf oder bilden kein Produkt. Die gebildeten Produktkettenlängen sind vergleichbar mit denen des Wildtyp-Enzyms. BPP wird ausschließlich vom Wildtyp-Enzym sowie der Variante S72C umgesetzt. Diese Tatsache stellt einen zusätzlichen Beweis dafür dar, dass S72 nicht direkt an der Katalyse beteiligt ist.

Y68 befindet sich in räumlicher Nähe zur IPP-Bindungsstelle. Hier sollte der Effekt einer Histidinvariante mit den alternativen Substraten untersucht werden. Erhöhte K_m -Werte für FPP und IPP bestätigen eine Funktion der Aminosäure während der Substratbindung (Tabelle 11). Der Umsatz artifizierter Elongationssubstrate mit Y68H zeigte jedoch kein erhöhtes Kondensationsvermögen.

Histidin 43 ist vermutlich an der Stabilisierung des allylischen Substrates beteiligt.^[95,96] Erhöhte K_m -Werte von H43F und H43W für beide Substrate bestätigen den Einfluss von H43 auf die Substratbindung (Tabelle 11). Jedoch ist die Aktivität beider Varianten geringer als die des Wildtyp-Enzyms. Artificielle Elongationssubstrate werden von beiden Varianten nicht oder nur mit sehr geringem Umsatz konvertiert.

Tabelle 11: Bestimmung der kinetischen Parameter der EcUPPS-Varianten mittels Phosphatdetektionsassay für die Substrate FPP und IPP. Die Kurvenregression erfolgte nach dem Hill-Modell. Grau, Literaturdaten bestimmt mit radioaktiv markierten Substraten.				
EcUPPS-Variante	K_m (FPP) μM	relative k_{cat} %	K_m (IPP) μM	relativer k_{cat} (%)
Wildtyp	1,8 ± 0,1	100,0	6,6 ± 0,4	100
H43F	3,4 ± 0,4	19,0	17,5 ± 1,3	12
H43W	5,9 ± 0,3	38,0	33,6 ± 3,3	19
Y68H	4,6 ± 0,5	25,0	20,7 ± 3,5	20
F89W	10,3 ± 0,1	117,0	43,2 ± 9,4	71
H43A	3,0 ± 0,3 ^[95]	0,1 ^[95]	-	-
F89A	2,6 ± 0,2 ^[150]	24,0 ^[150]	-	-

Da eine Kettenverlängerungsreaktion der EcUPPS mit den Substraten BPP, Cl-BPP und Br-BPP thermodynamisch und damit prinzipiell möglich ist, könnte das verminderte Kondensationspotential der EcUPPS mit diesen homoallylischen Substraten auf Interaktionsprobleme der Produktintermediate mit den Aminosäureresten der

FPP-Bindungsstelle zurückzuführen sein. Möglicherweise ist die Abspaltung des Diphosphates vom einfach verlängerten Produktintermediat (z. B. nor-GGPP) an dieser S1-Bindungstasche gehemmt, so dass kein weiterer Prenylrest auf das allylische Produktintermediat übertragen werden kann.

Deshalb wurde die Enzymvariante F89W hergestellt, die durch einen größeren aromatischen Rest zunächst eine räumliche Reduktion der S1-Bindungsstelle und damit eine bessere Stabilisierung der entstehenden Produktkette durch stärkere π - π -Wechselwirkungen erreichen sollte. F89W zeigt mit IPP als Elongationssubstrat eine erhöhte Umsatzrate im Vergleich zum Wildtyp-Enzym (Tabelle 11). Betrachtet man zusätzlich die K_m -Werte ist ein deutlicher Verlust der Affinität des Enzyms zu beiden Substraten die Folge dieser Mutation. Vermutlich verengt das voluminöse Indol-Ringsystem den Produktkanal. Dadurch könnte die Diphosphatgruppe des allylischen Substrates näher zum Elongationssubstrat orientiert werden während gleichzeitig die Substratbindung durch die räumliche Restriktion erschwert wäre. Wird F89 durch ein Alanin ersetzt, konnte gezeigt werden, dass der K_m -Wert nur sehr geringfügig erhöht ist, während die Aktivität jedoch nur noch 24 % des Wildtypniveaus beträgt.^[150]

Da bei dieser Variante die Substratbindung ungehindert erfolgen kann, jedoch keine Stabilisierung der Produktkette durch π - π -Wechselwirkungen mit diesem Aminosäurerest möglich ist, sinkt die Aktivität, während der K_m -Wert auf Wildtypniveau bleibt. Der Umsatz von Cl-BPP und Br-BPP mit F89W führte zur Bildung dihalogener Produkte (Abbildung

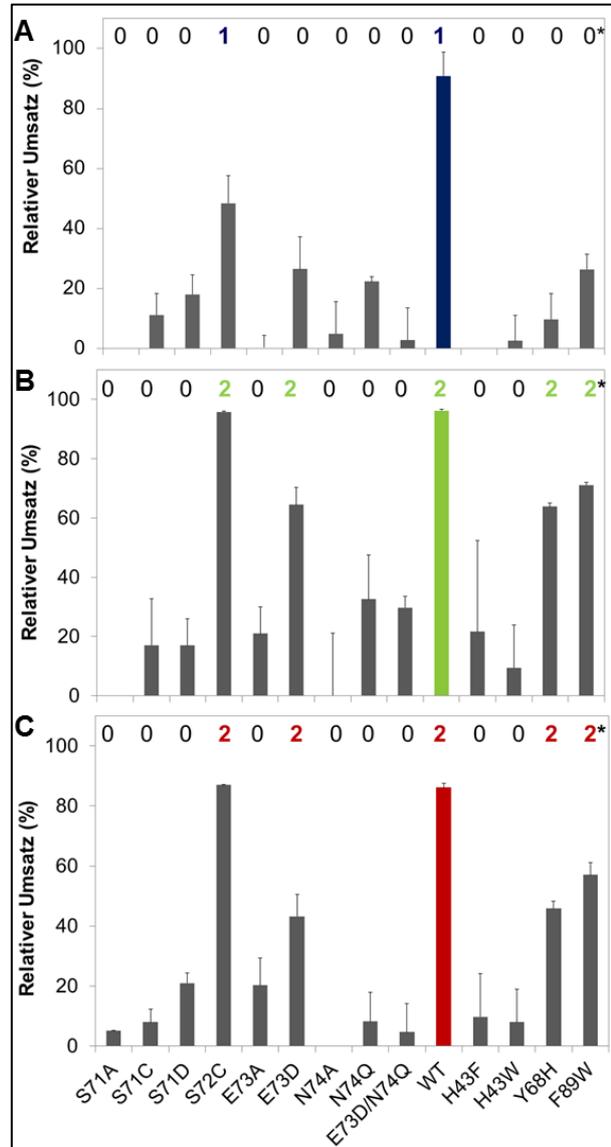


Abbildung 36: Gesamtproduktbildung der EcUPPS-Varianten mit MANT-O-GPP und den homoallylischen Substraten BPP (A), Cl-BPP (B) oder Br-BPP (C) bestimmt über HPLC. Der relative Umsatz wurde bestimmt durch die Abnahme des MANT-O-Geraniol-Signals im Vergleich zu einer Kontrolle mit denaturiertem Enzym. *, Anzahl der Elongationen mit dem jeweiligen Elongationssubstrat bestimmt über LC/ESI-MS.

36). BPP wird von der F89W-Enzymvariante nur geringfügig umgesetzt. Durch rationales Enzymdesign war es bisher nicht möglich eine Kettenverlängerung von BPP, Cl-BPP oder Br-BPP um mehr als zwei Elongationssubstrate mit der EcUPPS zu erreichen. Mit Hilfe eines Homologiemodells der ThkCPT, die keine Unterschiede in katalytisch aktiven Aminosäureresten aufweist, konnte gezeigt werden, dass die Kettenverlängerung wahrscheinlich eher durch die Stabilisierung der wachsenden Produktkette beeinflusst wird. Da die ThkCPT mit Cl-BPP und Br-BPP mehr als zwei Kondensationen des Elongationssubstrates katalysieren kann, jedoch vergleichend zur EcUPPS keine Unterschiede in den katalytischen Aminosäuren zu finden sind, kann davon ausgegangen werden, dass eher die Stabilisierung der Produktintermediate mit den artifiziellen Elongationssubstraten problematisch ist. Weiterhin führen Veränderungen sowohl in der S1- als auch in der S2-Bindungstasche der EcUPPS eher zu einem schlechteren Umsatz der artifiziellen Elongationssubstrate.

Da das Verständnis des genauen Mechanismus der Kettenverlängerungsreaktion noch immer nicht vollständig ist, könnte eine Kombination aus rationalem Enzymdesign und gerichteter Evolution zielführender sein als ortsgerichtete Mutagenese.

5.3 Schlussfolgerung

Mit zwei Mittelketten-CPTs, der EcUPPS und der ThkCPT, wurde die Möglichkeit untersucht das natürliche Elongationssubstrat IPP durch die artifiziellen Substrate BPP, Cl-BPP, Br-BPP, CF₃-BPP und Ph-BPP zu substituieren. Dabei wurden sowohl FPP als auch MANT-O-GPP zur enzymatischen Synthese von artifiziellen Produktoligomeren verwendet. Für die EcUPPS konnte gezeigt werden, dass die halogenierten Substrate Cl-BPP und Br-BPP zweimal an das Startersubstrat kondensiert werden können. BPP wird einmal mit dem allylischen Substrat verknüpft, während CF₃-BPP und Ph-BPP nicht umgesetzt werden. Die ThkCPT synthetisiert mit Cl- und Br-BPP Produktoligomere mit mehr als zwei Verlängerungen. So konnte über HPLC und auch über DC ein eindeutiger Hinweis auf Cl-BPP und Br-Produktanaloga mit mindestens fünf Kondensationen an das allylische Substrat gefunden werden.

Mutagenesestudien an der EcUPPS haben gezeigt, dass rationales Enzymdesign derzeit nicht zum Ziel führt, Kettenverlängerungen mit artifiziellen Substraten über das Wildtypniveau hinaus zu erreichen. Dazu fehlen Informationen des genauen Katalyseablaufs.

Die Ursache für den generell schlechteren Umsatz artifizierender homoallylischer Substrate könnte auf die Elektronendichteverhältnisse der C3-C4-Doppelbindung zurückzuführen sein. Die Methylgruppe von IPP mit einem +I-Effekt erhöht die Elektronendichte dieser Doppelbindung, während alle anderen Substrate außer Ph-BPP eher elektronenziehende Eigenschaften besitzen. Die fehlende C3-Methylgruppe von BPP ist wahrscheinlich die Ursache für die verminderte Affinität der getesteten Enzyme zu diesem Substrat, da diese wahrscheinlich zur Positionierung des Elongationssubstrats im katalytischen Zentrum beiträgt. Fraglich bleibt jedoch warum mit beiden Enzymen nur ein Elongationsschritt mit BPP möglich ist. Die Ursache für die Unterschiede im Kettenverlängerungsverhalten der EcUPPS und der ThkCPT ist unklar. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die höheren Elongationsraten der ThkCPT nicht allein auf die Thermophilie des Enzyms zurückzuführen sind.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist es erstmals gelungen, artifizierende Polyprenyldiphosphatanaloga enzymatisch zu synthetisieren, die das fluoreszierende MANT-O-GPP als allylisches Substrat sowie Cl-BPP oder Br-BPP als Elongationseinheit enthalten.

In weiterführenden Arbeiten sollten die Reaktionsbedingungen der ThkCPT-Reaktion so optimiert werden, dass halogenierte Produktoligomere verstärkt gebildet werden. Nur so wird ein Nachweis über LC/MS möglich. Dann wäre die Verwendung einer LC/MSⁿ-Messungen sinnvoll, wodurch eine „Sequenzierung“ der entstandenen Produkte über deren Fragmentierung möglich wird. Zur Steigerung des Kettenverlängerungspotentials der ThkCPT oder anderer CPTs mit artifizierenden homoallylischen Substraten könnte eine Kombination aus rationalem Enzymdesign und evolutionären Mutagenesemethoden genutzt werden. Interessant wäre dabei besonders die Kombination einer Kautschuksynthase mit einer löslichen Mittelketten-CPT durch z. B. *Gene Shuffling*.

6 Umsetzung von artifiziellen Prenyldiphosphaten mit einer Terpenzyklase

6.1 Einleitung

Sesquiterpene sind C₁₅-Kohlenwasserstoffe. Sie können durch Oxidation beispielsweise zu Sesquiterpenalkoholen, -ethern, -estern, -säuren oder -ketonen modifiziert werden.^[168] Obwohl ungefähr 25 000 Sesquiterpene in der Literatur beschrieben wurden, ist deren biologische Funktion oft rätselhaft.^[169] Durch die lipophilen Eigenschaften in Kombination mit einem moderaten Dampfdruck dienen Sesquiterpene der intra- und interspezifischen Informationsübertragung. Besonders aufgrund der großen strukturellen Vielfalt wird eine sehr spezifische Signalübertragung ermöglicht.^[170] Die Rolle von Sesquiterpenen als Lockstoffe konnte mehrfach durch Elektroantennogramme von Insekten nachgewiesen werden.^[171] Oft werden Gemische sehr ähnlicher Sesquiterpene produziert, die dadurch möglicherweise als Signalverstärkung dienen können.^[170] Haben diese Sesquiterpenmischungen eine Abwehrfunktion, könnten somit mehrere Angreifer oder Konkurrenten gleichzeitig adressiert werden.^[170,172] Gleichwohl ist das Risiko von Resistenzen durch die Produktion von Terpengemischen reduziert.^[173] Flüchtige Sesquiterpene sind meist lipophile Verbindungen. Eine Rolle dieser Substanzen als membranaktive Toxine, die die osmotische Kontrolle stören, wird daher vermutet.^[169] Zudem könnten sie eine Art Lösungsvermittler für andere Toxine darstellen, um deren Membrangängigkeit zu verbessern.^[170] Anwendung finden Sesquiterpenlactone wie Pentenolacton als Antibiotikum.^[174] Aber auch in der Duftstoff- und Parfümindustrie werden Sesquiterpene und deren Derivate verwendet, um charakteristische Düfte zu kreieren.^[175] Sie sind Hauptbestandteile ätherischer Öle und eröffnen durch das beachtliche Spektrum an Kohlenwasserstoffgrundgerüsten eine große Vielfalt an interessanten Gerüchen.^[175]

Nachtschattengewächse, wie die Tabakpflanze *Nicotiana tabacum*, synthetisieren u.a. Sesquiterpene als sekundäre Stressmetaboliten (Phytoalexine) als Antwort auf Pathogenbefall.^[176,177] Phytoalexine sind eine chemisch sehr heterogene Gruppe sekundärer Pflanzenstoffe, die oft wachstumshemmende Wirkung auf Mikroorganismen und antioxidative Eigenschaften aufweisen.^[177] Capsidiol, ein Sesquiterpenoid, ist das wichtigste Phytoalexin der Nachtschattengewächse und wird nach Pathogenbefall *de novo* synthetisiert.^[178] Zunächst entsteht das Intermediat 5-*epi*-Aristolochin (EA) über Zyklisierung von FPP durch die 5-*epi*-Aristolochensynthase (TEAS). Anschließend wird

EA durch die 5-*epi*-Aristolochenhydroxylase (TEAH) zum Endprodukt Capsadiol oxidiert (Abbildung 37).

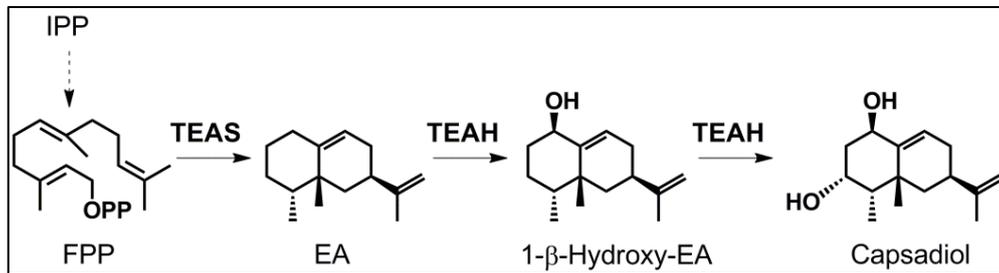


Abbildung 37: Biosynthese von Capsadiol in Tabak. EA, 5-*epi*-Aristolochene; FPP, Farnesyldiphosphat; IPP, Isopentenyldiphosphat; TEAS, Tabak 5-*epi*-Aristolochensynthase; TEAH, Tabak 5-*epi*-Aristolochenhydroxylase (modifiziert nach Takahashi *et al.*, 2007).^[179]

Die 5-*epi*-Aristolochensynthase aus *Nicotiana tabacum* (TEAS) gehört zu den Sesquiterpenzyklasen und ist strukturell den pflanzlichen Terpenoidsynthasen der Klasse I zuzuordnen (Abschnitt 2.3.1).^[56] Sie wurde als erste Sesquiterpensynthase geklont, sequenziert^[180] und kristallisiert^[59] und dient seitdem als Modellenzym der Biosynthese von Sesquiterpenen.^[181] Die TEAS ist ausschließlich aus α -Helizes aufgebaut, die durch kurze Schleifenstrukturen und Wendungen verbunden sind (Abbildung 38).^[94] Das monomere Enzym hat eine molekulare Masse von 64 kDa (550 Aminosäuren) und ist in zwei Domänen organisiert. Während die β -Domäne eine Gerüstfunktion hat und die Faltung des C-Terminus ermöglicht, befindet sich in der α -Domäne das katalytisch aktive Zentrum.^[69]

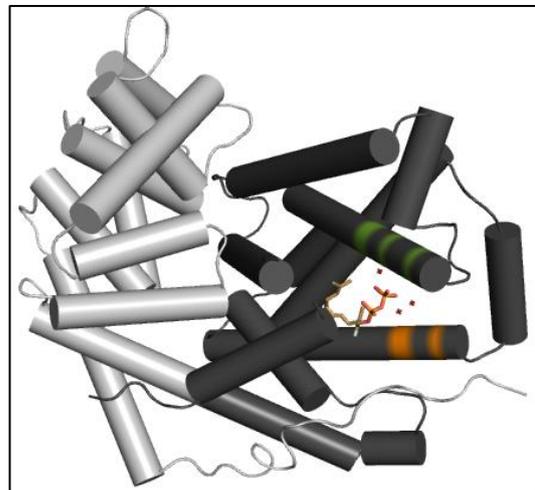


Abbildung 38: Tertiärstruktur der TEAS (PDB-Code: 3M01). Hellgrau dargestellt ist die β -Domäne, die dem Enzym strukturelle Stabilität verleiht. Dunkelgrau gefärbt ist die α -Domäne der TEAS mit der aktiven Tasche. Grün gefärbt ist das DDXXTXXXE-Motiv und orange das DDXXD-Motiv. Die drei Mg^{2+} -Ionen sind als rote Kugeln abgebildet. Das Kristallisationssubstrat ist Fluor-FPP (orange, Diphosphat; gelb, Farnesylrest).

Das katalytische Zentrum bindet drei Magnesiumionen über ein DDXXD- und DDXXTXXXE-Motiv.^[59] Über diese Mg^{2+} -Ionen am Eingang der hydrophoben Substratbindungstasche wird das Diphosphat von FPP gebunden und aktiviert.^[59] Die Bindung der bivalenten Metallionen wird unterstützt durch Argininreste.^[59] Die magnesium-unterstützte Aktivierung des Diphosphates des Substrates FPP führt zur Bildung eines Farnesylkations unter Abspaltung anorganischen Diphosphats (Abbildung 39).^[29] Daraufhin erfolgt eine dipolstabilisierte Migration des Farnesylkations tiefer in die

aktive Tasche, die durch Tyrosinreste (T401, T402, T403) vermittelt wird.^[59] Der erste Ringschluss zu dem (*E,E*)-Germacrenylkation erfolgt von C10 zu C1. Im Folgeschritt entsteht mittels einer Protonenabstraktion durch eine katalytisch aktive Aminosäure, die als Base fungiert, das neutrale, enzymgebundene Intermediat Germacren A.^[176] Die erneute Aktivierung erfolgt durch eine Protonenübertragung der Hydroxylfunktion von Tyrosin 520 auf das neutrale Intermediat, gefolgt von einer Umlagerung der C2-C3-Doppelbindung, die zur Bildung eines intramolekularen Rings zwischen C2 und C7 führt. Eine Hydridumlagerung von C2 zu dem neu entstandenen Carbokation an C3 des Eudesmanylikations mit darauffolgender Methylverschiebung von C7 nach C2 und finaler Deprotonierung, die in der Ausbildung einer C7-C8-Doppelbindung resultiert, führt zur Bildung von 5-*epi*-Aristolochen (Abbildung 39).^[29,176]

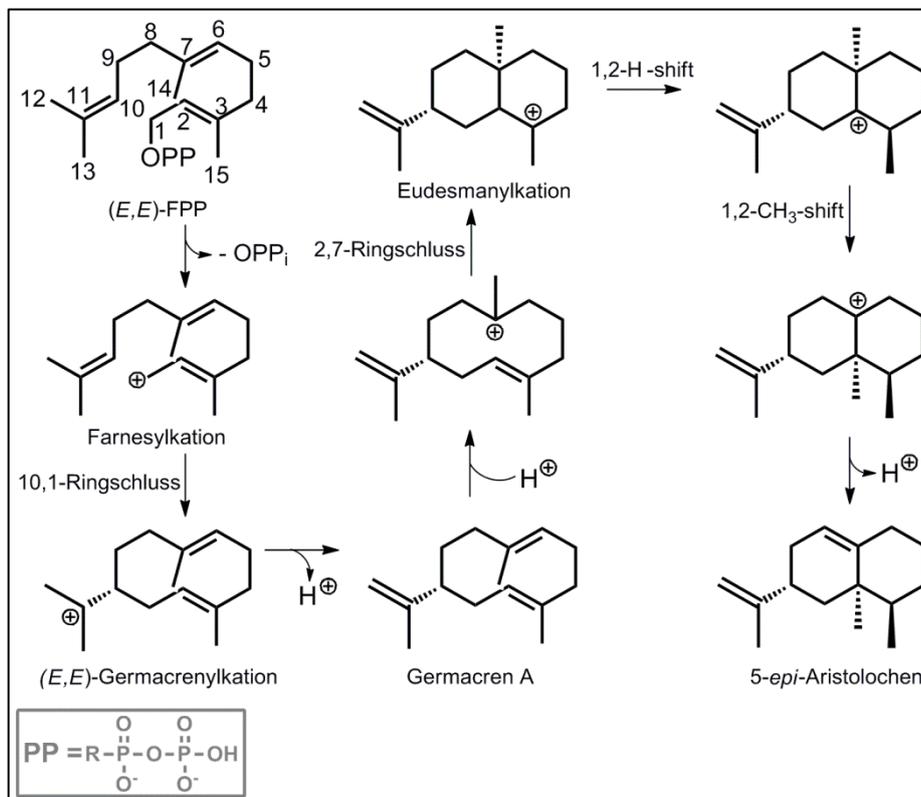


Abbildung 39: Reaktionsmechanismus der TEAS (modifiziert nach Degenhardt *et al.*, 2009).^[29]

Während der Zyklisierungsreaktion der TEAS entsteht neben dem Hauptprodukt 5-*epi*-Aristolochen eine Vielzahl weiterer Produkte, die in geringen Mengen detektierbar sind.^[181] Da diese Produkte nicht nur durch diesen sogenannten transoiden Zyklisierungsmechanismus entstanden sein können, der zu dem Hauptprodukt EA führt, wurde ein weiterer Zyklisierungsmechanismus postuliert (Abbildung 40).^[181] Der Nachweis dieses alternativen Synthesewegs erfolgte durch Umsetzung von (*Z,E*)-FPP.^[182,183] Erstaunlicherweise wird dieses Substrat nahezu gleich gut akzeptiert wie (*E,E*)-FPP,

wobei aber ein komplett anderes Produktspektrum entsteht, welches auf diesen cisoiden Zyklisierungsweg zurückgeführt werden kann (Abbildung 40).^[182,183]

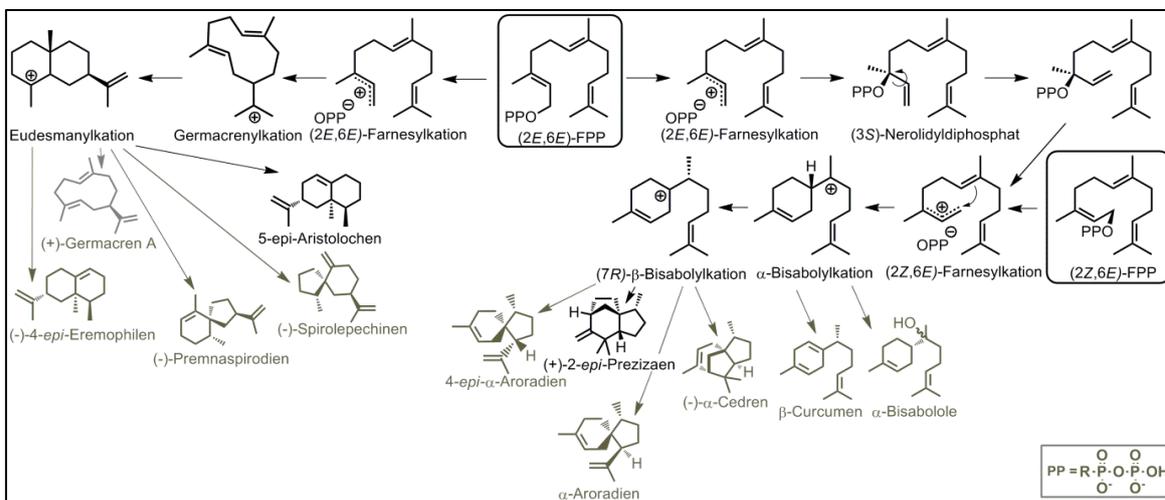


Abbildung 40: Zyklisierungsformen während der Katalyse der TEAS über den transoiden (links) oder cisoiden (rechts) Weg. Die Hauptprodukte sind in schwarz dargestellt, während Nebenprodukte grau gefärbt sind.^[181,183]

Substratanaloga stellen eine gute Möglichkeit dar, den Katalysemechanismus von Terpensynthasen näher zu erforschen aber auch gezielte, chemisch anspruchsvolle Reaktionen zu verwirklichen. Klasse II Terpenzyklasen, die eine protonierungsabhängige kationische Polyzyklisierungsreaktion verfolgen, wurden zum Beispiel als potentielle Katalysatoren für Friedel-Crafts-Alkylierungen getestet.^[184] Die Bildung von oxigenierten, heterozyklischen Terpenen mit der Squalen-Hopen-Synthase zeigt, welche Substratvielfalt und Reaktionsbreite die Anwendung dieser Enzyme ermöglicht.^[185] Diese Triterpenzyklase ist nicht nur in der Lage die terminale C=C-Isoprengruppe zu aktivieren, sondern erkennt auch eine Reihe nukleophiler Substrate (z.B.: Epoxide, Alkohole, aromatische Ringe, Carbonsäuren, Ketone, Amide).^[186] Somit könnte die Squalen-Hopen-Synthase ein geeignetes Enzym für stereoselektive Brønstedt-Säure-Katalyse darstellen.^[186] Im Fall der Klasse I Terpenzyklasen, die einen ionisierungsabhängigen Mechanismus verfolgen, wurden deuterierte, Tritium-markierte und ¹⁴C-markierte FPP- und Nerolidyldiphosphat-Analoga verwendet, um den Zyklisierungsmechanismus von Sesquiterpensynthasen zu verstehen.^[80,174,187-194] Fluorierte FPP-Analoga wurden vor allem zum Nachweis von Reaktionsintermediaten der Sesquiterpensynthasen verwendet. So konnte durch die Umsetzung von 2-Fluor-FPP^[195], 6-Fluor-FPP^[196] und 14-Fluor-FPP^[196] mit der Aristolochensynthese aus *Penicillium roquefortii* die Synthese der (-)-Germacren A-Intermediate mit dem entsprechenden Fluorierungsmuster nachgewiesen werden. Die Bildung eines Eudesmanylykations wurde in keinem Fall beobachtet. Übereinstimmende Ergebnisse wurden mit der TEAS und 6-Fluor-FPP erzielt.

Die Reaktion führte zur Bildung des fluorierten (+)-Germacrenanalogons.^[197] 2-Fluor-FPP konnte dagegen von der TEAS nicht umgesetzt werden.^[182]

Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Beispielen wurde die enzymatische Synthese heterozyklischer Terpene mit Klasse I Terpensynthasen bisher noch nicht untersucht. Klasse II Terpensynthasen verwenden einen protonierungsabhängigen Reaktionsmechanismus, der sich von der ionisierungsabhängigen Typ I Terpensynthasezyklisierung grundlegend unterscheidet (s. h. Abschnitt 2.3.1). Interessant war daher, ob Terpensynthasen der Klasse I geeignet sind die Bildung neuer C-C-Bindungen zu katalysieren (Friedel-Crafts-Alkylierung) oder auch heterozyklische, flüchtige Terpene für mögliche Anwendung in der Duftstoffindustrie zu generieren. Weiterhin wird mit dem Verständnis der Zyklisierung artifizieller Substrate die Möglichkeit eröffnet, bioaktive Terpene rational zu modifizieren und den Molekülen gezielt neue, verbesserte Eigenschaften zu verleihen. Die TEAS ist durch ihre Reaktionsvielfalt über den transoiden und cisoiden Zyklisierungsweg besonders geeignet diese Fragestellung zu beantworten. Das recht gute Verständnis des Reaktionsmechanismus und die langjährige Erforschung dieses Enzyms boten eine gute Grundlage die Synthese neuartiger Terpenoide auf der Basis von artifiziellen Prenyldiphosphaten, zu untersuchen.

6.2 Ergebnisse und Diskussion

6.2.1 Rekombinante Herstellung und Reinigung der TEAS

Die heterologe Genexpression des Tabak 5-*epi*-Aristolochensynthase-Gens (TEAS-Gens, Aminosäuresequenz im Anhang, Abbildung A 1) im *E. coli* Expressionsstamm BL21 (DE3) erfolgte in dem Vektor pET28b(+), der einen IPTG-induzierbaren T7-Promotor besitzt und Kanamycinresistenz vermittelt. Die Proteinreinigung erfolgte über Ni²⁺-vermittelte IMAC und wurde anschließend anhand einer SDS-PAGE kontrolliert (Abbildung 41). Nach der rekombinanten Herstellung der TEAS in *E. coli* (64 kDa) (2) erfolgte die affinitätschromatographische Reinigung der löslichen Proteinfraction (3). Während die TEAS über einen N-terminalen His₆-Tag an die IMAC-Matrix gebunden war, konnten ungebundene Proteine des Expressionswirts (4) von der Säule gewaschen werden. Im Folgeschritt wurde das Zielprotein eluiert. Nach einem Entsalzungsschritt gelang die Reinigung der TEAS (5) mit einer Konzentration von bis zu 33,4 mg L⁻¹ Flüssigkultur.

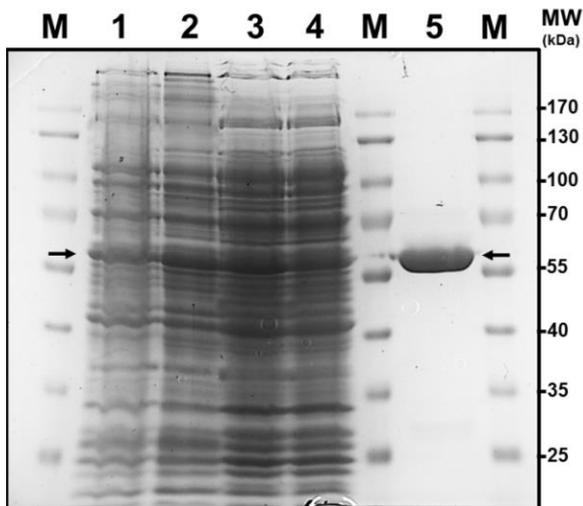


Abbildung 41: Coomassie-Brilliantblau G250-gefärbtes SDS-PAGE-Gel der TEAS-Reinigung über IMAC. Das Zielprotein ist mit Pfeilen markiert. M, Proteingrößenstandard; 1, vor Induktion mit IPTG; 2, nach Induktion mit IPTG; 3, lösliche Proteinfraktion; 4, nicht-gebundene Proteine der IMAC; 5, entsalzte Proteinfraktion.

6.2.2 Synthetische Prenyldiphosphate als Substrate der TEAS

Zur enzymatischen Synthese neuartiger Terpenoide wurden verschiedene synthetische und natürliche Prenyldiphosphate mit der TEAS konvertiert. Die Substrate können nach ihrer Struktur in vier Gruppen unterteilt werden (Abbildung 42). Substrate mit elektronenreichen π -Systemen (**53**, **70**, **71**, **75**) wurden ausgewählt um zu prüfen ob nach der Diphosphatabspaltung und der Bildung eines Prenylkations eine C-C-Bindungsknüpfung direkt an das aromatische Ringsystem in einer Art intramolekularen Friedel-Crafts-Alkylierung erfolgen kann. Nichtaromatische Substrate mit Heteroatomen (**61**, **66**, **69**, **76**, **77**) wurden analysiert um den Einfluss von Schwefel- und Sauerstoffinsertionen auf den Zyklisierungsweg zu untersuchen. Die stärkere Elektronegativität von Sauerstoff ($\chi_{\text{AR}} = 3,5$) im Vergleich zu Schwefel ($\chi_{\text{AR}} = 2,5$) und Kohlenstoff ($\chi_{\text{AR}} = 2,5$) könnte durch Elektronendichteverchiebungen neue Zyklisierungswegen ermöglichen. Substrate mit Alkinfunktionen (**62**, **72**) ermöglichen die Derivatisierung der entstandenen Produkte über Klick-Reaktionen.^[198] Der Substratumsatz der artifiziellen und natürlichen Prenyldiphosphate wurde über GC/EI-MS analysiert (Abbildung 43). Im Anhang sind die korrespondierenden EI-Spektren zu den jeweiligen Produkten in Tabelle A 6 bis Tabelle A 13 zu finden. Die hier beschriebenen Ergebnisse entstanden in einem Gemeinschaftsprojekt mit Dipl.-Biochem. Benjamin Weigel. Er untersuchte den Umsatz synthetischer Substratanaloga mit einer Monoterpensynthase.^[199]

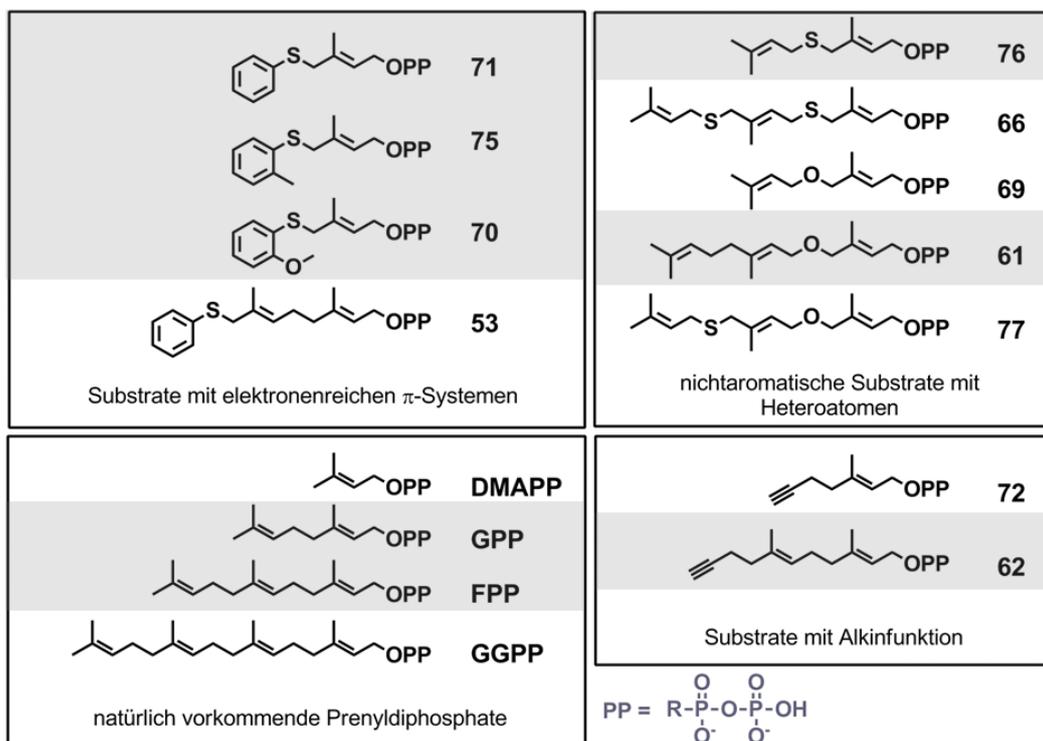


Abbildung 42: Synthetische und natürliche Prenyldiphosphate, die als Substrate der TEAS getestet wurden. Grau hinterlegt sind Prenyldiphosphate, die die TEAS konvertieren kann.

Die relativen Anteile am Produktspektrum, bestimmt über GC/EI-MS (TIC), sind in Tabelle 12 zusammengefasst. Die enzymatische Umsetzung von FPP ergab das erwartete Hauptprodukt 5-*epi*-Aristolochen (EA) (FPP-Produkt c, Abbildung 43) mit einer Abundanz von 78 % der Gesamtproduktbildung (Tabelle 12).

Tabelle 12: Produktverteilung bei Umsatz verschiedener allylischer Diphosphat-Substrate durch die TEAS.

Substrat	Produktverteilung (%) ^{[a] [b]}											relative Ausbeute (%) ^[c]
	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	
FPP	9,9	1,1	78,0	6,5	1,3							100
GPP	23,1	7,0	3,5	2,7	2,3	8,5	46,4	1,0	4,5			20
61	99,3											130
62	31,5	2,3	4,9	4,7	2,4	39,8	6,9	7,5				4
70	97,3											40
71	7,1	89,9	1,4									40
75	4,4	94,6	1,0									30
76	29,6	31,1	1,6	2,4	3,3	8,4	8,3	2,4	4,7	1,3	2,5	60

[a] berücksichtigt sind Produkte mit einer Abundanz über 1 %. Alle Produktverteilungen wurden in Triplikaten bestimmt. Zusätzlich erfolgte eine Hydrolysekontrolle mit denaturierter TEAS, um nicht-enzymatische Reaktionen zu berücksichtigen.

[b] Bitte beachten, dass Produkte in Spalte (z.B. „a“) in den Reihen nicht identisch sind, also FPP-a ≠ GPP-a ≠ 61a etc.

[c] relative Ausbeute der Produkte des genannten Substrates zu dem Gesamtumsatz des natürlichen Substrates FPP bestimmt über GC/MS (TIC), normiert auf den internen Standard Naphthalen.

fett gedruckt sind neue, artifizielle TEAS-Produkte, deren Struktur aufgeklärt werden konnte.

Neben dem Hauptprodukt entstanden (+)-Germacren A (a), (-)-Spirolepechinen (b), (-)-4-*epi*-Eremophilen (d) und (-)-Premnasiroidien (e) sowie weitere Sesquiterpene mit einer Ausbeute unter 1 % (Abbildung 40, Abbildung 43). Dieses Ergebnis stimmt mit den Literaturberichten überein.^[181] Von den getesteten natürlich vorkommenden Prenyldiphosphaten (DMAPP, GPP, FPP, GGPP) wird neben FPP erstaunlicherweise auch GPP von der TEAS konvertiert (Abbildung 43). Von den elf getesteten artifiziellen Substraten werden sechs Prenyldiphosphate von der TEAS konvertiert (Abbildung 42, Abbildung 43). Dabei dienen sowohl Substrate mit Heteroatomen (**61**, **76**), mit elektronenreichen π -Systemen (**70**, **71**, **75**) und einer Alkinfunktion (**62**) als Substrat dieser Terpenzyklase.

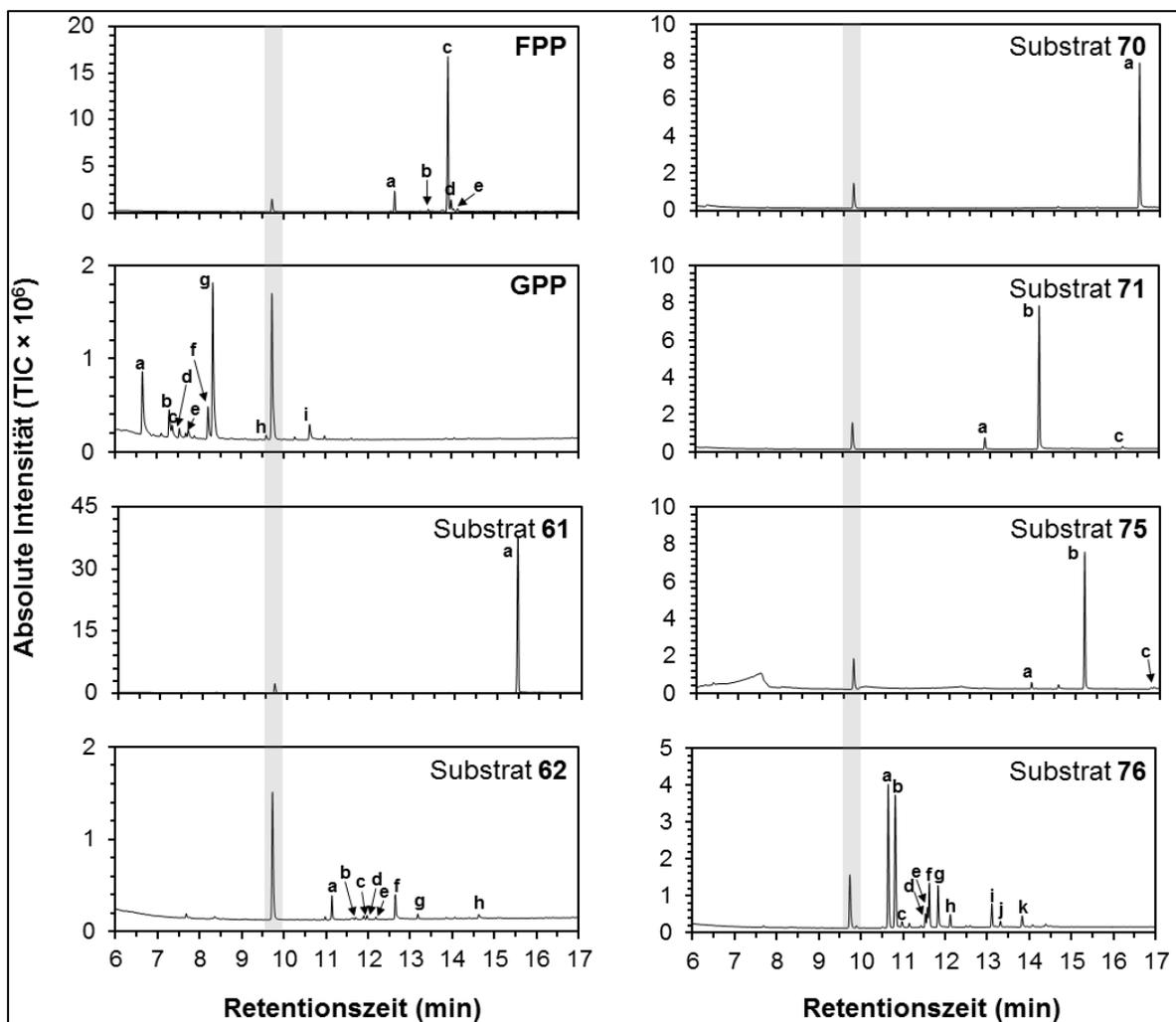


Abbildung 43: GC/EI-MS-Chromatogramme (TIC) der TEAS-Enzymassays mit den Substraten GPP, FPP, **61**, **62**, **70**, **71**, **75** und **76**. Die Produkte sind mit Buchstaben bezeichnet und die dazugehörigen EI-Spektren sind im Anhang (Tabelle A 6-Tabelle A 13) zu finden. Grau markiert ist der interne Standard Naphthalen.

Mit GPP als Substrat konnten im Vergleich zu FPP 20 % Produktbildung erzielt werden (Tabelle 12). Dabei entstand als Hauptprodukt Linalool (**GPP-g**) aber auch andere lineare

sowie zyklische Monoterpene. Die TEAS ist nicht nur in der Lage, die Diphosphatgruppe von GPP zu spalten, sondern katalysiert sogar die einfache Zyklisierung zu den Monoterpenen (-)-Limonen (**GPP-b**), Terpinen-4-ol (**GPP-h**), γ -Terpinen (**GPP-e**) und α -Terpinolen (**GPP-f**) (Abbildung 43, Abbildung 44).

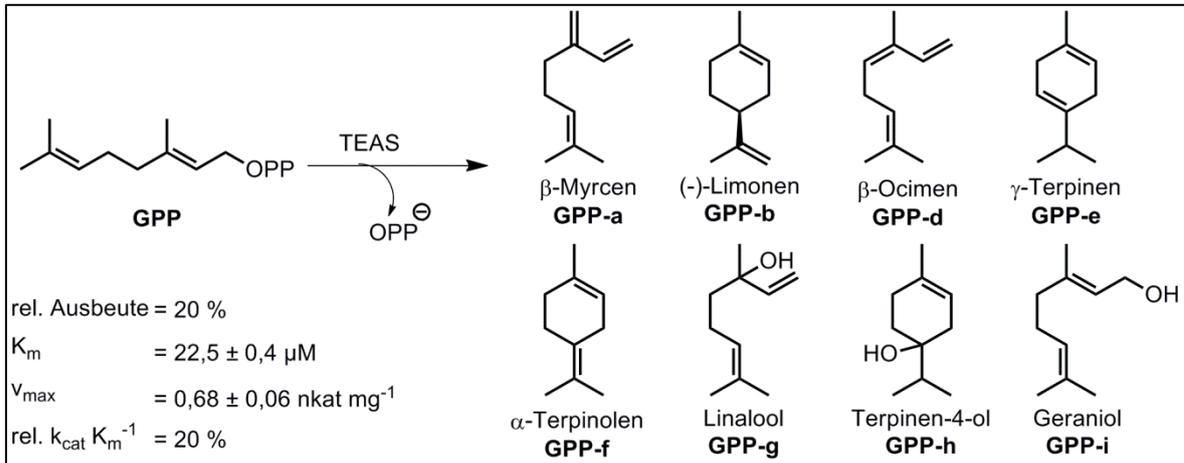


Abbildung 44: Enzymatische Produkte, die bei Umsetzung von GPP mit der TEAS nachgewiesen wurden. Parameter der Katalyse (K_m , v_{max} , rel. $k_{\text{cat}} K_m^{-1}$ - relative spezifische Aktivität im Vergleich zu FPP) wurden mit dem MTP-Phosphatdetektionsassay bestimmt. Die relative Ausbeute (rel. Ausbeute) bezieht sich auf die Gesamtproduktbildung im Vergleich zu dem Gesamtumsatz des natürlichen Substrates FPP, welcher über den TIC (GC/EI-MS) bestimmt wurde.

Der K_m -Wert der TEAS gegenüber den Substraten FPP und GPP, welcher mit dem in Kapitel 7.5.1.4 beschriebenen Mikrotiterplatten-Phosphatdetektionsassay bestimmt wurde, ist für beide Substrate annähernd gleich (Abbildung 44, Tabelle 13). Jedoch führt die verringerte Reaktionsgeschwindigkeit der TEAS mit GPP zu einer um 80 % verringerten spezifischen Aktivität im Vergleich zu FPP.

Tabelle 13: Zusammenfassung der Bestimmungen kinetischer Parameter der TEAS mit natürlichen und artifiziellen Substraten. rel. $k_{\text{cat}} K_m^{-1}$, relative katalytische Effizienz bezogen auf das natürliche Substrat FPP (100 %).

Substrat	K_m (μM)	v_{max} (nkat mg^{-1})	h	k_{cat} (s^{-1})	$k_{\text{cat}} K_m^{-1}$ ($\text{s}^{-1} \text{mM}^{-1}$)	rel. $k_{\text{cat}} K_m^{-1}$ (%)
FPP	19,5 ± 1,8	3,05 ± 0,14	2,0	0,2	10	100
GPP	22,5 ± 4,0	0,68 ± 0,06	1,6	0,04	2	20
61	21,7 ± 2,4	1,96 ± 0,10	1,6	0,1	5	50
62	5,73 ± 0,4	0,09 ± 0,002	1,6	0,005	1	10
70	46,3 ± 2,2	0,12 ± 0,003	1,2	0,007	0,2	2
71	26,0 ± 4,6	0,15 ± 0,01	1,1	0,01	0,4	4
75	16,2 ± 5,6	0,18 ± 0,03	1,1	0,01	0,6	6
76	19,1 ± 0,9	0,36 ± 0,01	1,4	0,02	1	10

Die Substrate **61** und **76** enthalten eine Sauerstoff- bzw. Schwefelinsertion. Während **61** vom molekularen Volumen dem natürlich Substrat FPP ähnelt, entspricht **76** eher einem GPP-Analogon (Abbildung 45). Die TEAS erzielt mit dem sauerstoffhaltigen FPP-Analogon **61** 130 % Produktivität relativ zu FPP, die sich mit 99,3 % auf nahezu nur ein Produkt (**61a**) beschränkt (Tabelle 12, Abbildung 45). Die Identifizierung des TEAS-Produktes **61a** erfolgte durch NMR-Spektroskopie (siehe Abschnitt 6.2.3). Der Umsatz von Substrat **76** durch die TEAS resultiert in der Bildung von mindestens elf verschiedenen Sesquiterpenoiden, wobei die Produktivität des Enzyms im Vergleich zur Zyklisierung von FPP, 60 % beträgt. Die Affinität der TEAS zu **76** ist vergleichbar mit der zu FPP oder GPP (Tabelle 13), die katalytische Effizienz ist jedoch mit $0,02 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ weitaus geringer. Die Identifizierung des Thiophenderivates **76a** erfolgte durch den Vergleich zu einem authentischen Standard, den Dr. Roman Weber im Rahmen seiner Dissertation mittels präparativer GC aus einer enzymatischen Umsetzung von Substrat **76** mit der Limonensynthase aus *Cannabis sativa* isolierte (Abbildung 45; Anhang, Tabelle A 11).^[154]

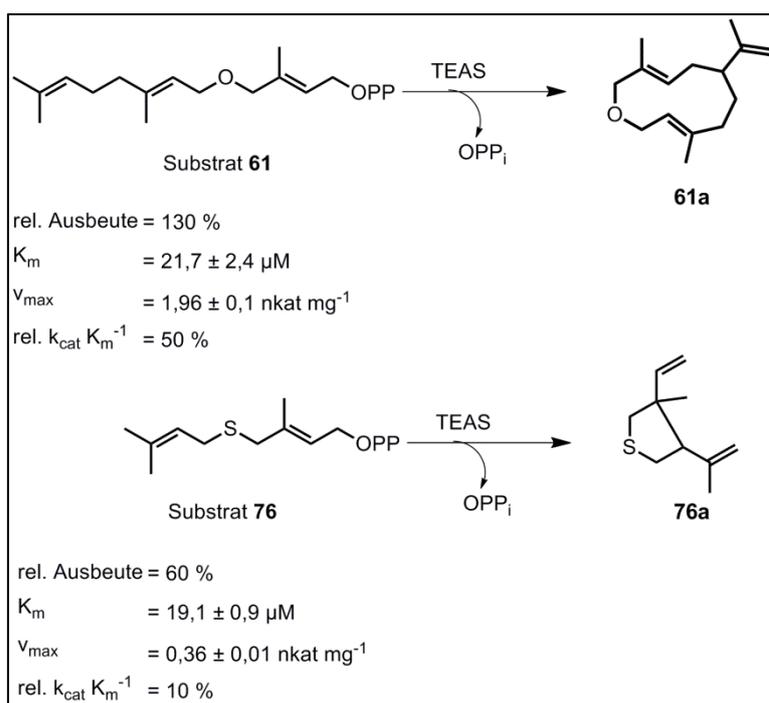


Abbildung 45: Enzymatische Produkte, die bei Umsetzung von Substrat **61** und Substrat **76** mit der TEAS nachgewiesen wurden. Parameter der Katalyse (K_m , v_{max} , rel. $k_{\text{cat}} K_m^{-1}$ - relative spezifische Aktivität im Vergleich zu FPP) wurden mit dem MTP-Phosphatdetektionsassay bestimmt. Die relative Ausbeute (rel. Ausbeute) bezieht sich auf die Gesamtproduktbildung im Vergleich zu dem Gesamtumsatz des natürlichen Substrates FPP, welcher über den TIC (GC/EI-MS) bestimmt wurde.

Substrat **62** enthält eine Alkinfunktion und führte zu 4 % relativem Umsatz im Vergleich zu FPP. Dieser schlechte Substratumsatz in Kombination mit einer großen Produktvielfalt ließ keine Identifizierung der Produkte über GC/EI-MS zu. Die EI-MS-Spektren deuten jedoch auf die Bildung verschiedener aliphatischer Kohlenwasserstoffe hin, da jeweils ein Molekülionenpeak von $m/z = 174$ identifiziert werden konnte (Tabelle A 7). Produktpeak **62h** könnte das Hydrolyseprodukt mit einem Molekülionenpeak bei $m/z = 192$

repräsentieren (Tabelle A 7). Obwohl der K_m -Wert der TEAS für Substrat **62** 3fach niedriger ist als für FPP, scheint die sterisch anspruchsvolle Alkinfunktion den Ablauf der Katalyse massiv zu stören.

Aromatische Prenyldiphosphate werden hauptsächlich durch Diphosphatspaltung und anschließende Wasseranlagerung in die Hydrolyseprodukte konvertiert (Abbildung 46, Abbildung 48). Eine Friedel-Crafts-Alkylierung erfolgt nicht. Dafür wäre wahrscheinlich, wie im Fall der zyklischen Monoterpene, eine Isomerisierung der C2-C3-Doppelbindung zum Linalyl-ähnlichen Kation notwendig. Durch die Rigidität der Substrate ist eine solche Umlagerungsreaktion erschwert, so dass hauptsächlich die Prenylalkohole (**70a**, **71b** und **75b**, jeweils > 90 % der Gesamtproduktbildung) entstehen (Tabelle 12). Die Identifizierung der Hauptprodukte erfolgte durch GC/MS-Vergleich mit chemisch synthetisierten Referenzsubstanzen, hergestellt von Dipl.-Biochem. Benjamin Weigel am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie. Das Produkt **71a** konnte über einen Literaturvergleich als 3-Methyl-4-(phenylthio)-1,3-butadien identifiziert werden (Abbildung 46).^[200] Produkt **71c** wurde über einen Datenbankabgleich als 3-Methyl-4-(phenylthio)-(E)-2-butenol identifiziert (Abbildung 46).

Bei dem Produkt **75a** handelt es sich vermutlich um 3-Methyl-4-(methylphenylthio)-1,3-butadien, bei Produkt **75c** ist 3-Methyl-4-(methylphenylthio)-(E)-2-butenol wahrscheinlich. Die EI-MS-Spektren von **71a** und **75a** zeigen ein sehr ähnliches Fragmentierungsmuster, wobei sich die Molekül- und Fragmentationen um $m/z = 14$ unterscheiden, was auf die zusätzliche Methylgruppe in **75** im Vergleich zu **71** zurückzuführen ist (Anhang, Tabelle A 9 und Tabelle A 10). Der K_m -Wert der TEAS für die aromatischen Substrate **70**, **71** und **75** liegt in derselben Größenordnung wie derjenige von FPP (Tabelle 13). Die relative spezifische Aktivität der TEAS beträgt jedoch nur 2-6 % im Vergleich zur Umsetzung von FPP.

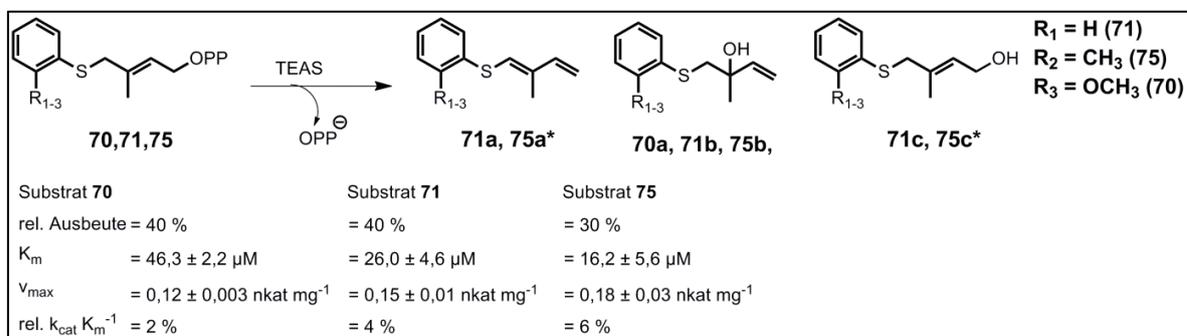


Abbildung 46: Enzymatische Produkte, die bei Umsetzung von Substrat **70**, **71** und **75** mit der TEAS nachgewiesen wurden. Vermutliche Produkte sind mit einem Stern (*) gekennzeichnet. Parameter der Katalyse (K_m , v_{max} , rel. $k_{\text{cat}} K_m^{-1}$ - relative spezifische Aktivität im Vergleich zu FPP) wurden mit dem MTP-Phosphatdetektionsassay bestimmt. Die relative Ausbeute (rel. Ausbeute) bezieht sich auf die Gesamtproduktbildung im Vergleich zu dem Gesamtumsatz des natürlichen Substrates FPP, welcher über den TIC (GC/EI-MS) bestimmt wurde.

Nicht umgesetzt werden Substrate, die sterisch sehr anspruchsvoll sind (**53**) oder sich durch eine zweite heteroatom-verknüpfte Prenyleinheit auszeichnen (**66, 77**). Aber auch zu kleine Substrate wie das DMAPP-Analogon **72**, kann nicht als Substrat erkannt werden.

Die Bildung der Monoterpene durch die TEAS verläuft wahrscheinlich wie in Abbildung 47 dargestellt. Lineare Produkte entstehen durch Wasseranlagerung (Geraniol und Linalool) oder Protonenabstraktion (β -Myrcen und β -Ocimen) aus dem Geranylkation, während für die Bildung zyklischer Monoterpene eine Isomerisierung der C2-C3-Doppelbindung notwendig ist. Nach Bindung von GPP im katalytischen Zentrum erfolgt die Abspaltung der Diphosphatgruppe und Ionisierung zum Geranylkation, welches durch erneuten Angriff des Diphosphates an Position 3 zur Bildung von Linalyldiphosphat führt. Dieses kann von der transoiden Form in das cisoiden Linalyldiphosphat isomerisieren.

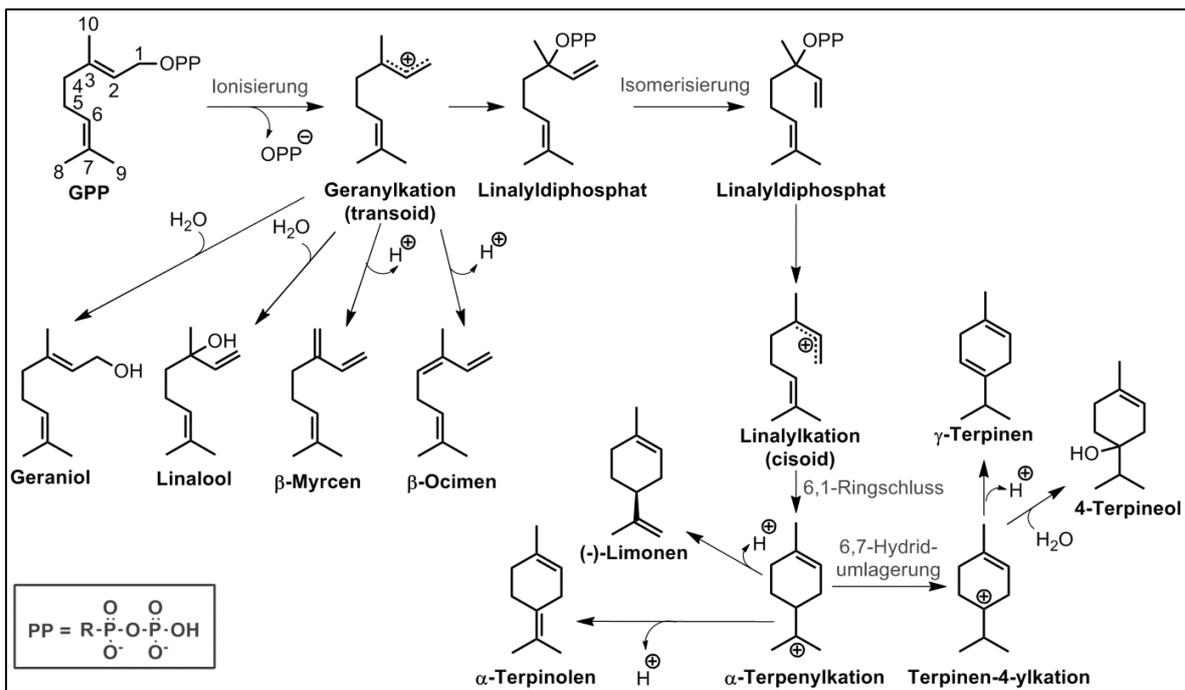


Abbildung 47: Vermutlicher Bildungsmechanismus von linearen (links) und zyklischen (rechts) Monoterpenen durch die TEAS. GPP, Geranyldiphosphat.

Durch erneute Ionisierung nach Spaltung des Diphosphates wird das Linalylykation gebildet. Ausschließlich über die Bildung dieses Kations kann eine Zyklisierung über einen 6,1-Ringschluss realisiert werden. Das α -Terpenylkation ist das zentrale Intermediat für die Bildung zyklischer Monoterpene. Eine Protonenabstraktion resultiert in der Bildung von (-)-Limonen oder α -Terpinolen. Erfolgt ausgehend von dem α -Terpenylkation eine 6,7-Hydridumlagerung wird ein intermediäres Terpinen-4-ylkation gebildet, welches durch

Wasseranlagerung 4-Terpineol entstehen lässt oder nach einer Protonenabstraktion die Bildung von γ -Terpinen auslöst.

Der postulierte Mechanismus der enzymatischen Synthese von **61a** beginnt mit der Abspaltung der Diphosphatgruppe (Abbildung 48). Anschließend findet ein 1,11-Ringschluss durch den Angriff der terminalen Doppelbindung an das Prenylkationintermediat statt. Nach der Bildung des Oxagermacrenylkations **61a⁺** erfolgt eine Protonenabstraktion, welche zu dem Produkt **61a** führt. Die Reprotonierung, wie sie während der Synthese von EA erfolgt, kann vermutlich durch die elektronenziehende Wirkung des Sauerstoffs oder einer veränderten Orientierung des Produktes in der Enzymtasche nicht erfolgen. Ähnliche Beobachtungen konnten bei der Zyklisierung von 6-Fluor-FPP durch die TEAS bereits gemacht werden.^[201] Die Bildung dieses Produktes erfolgt wahrscheinlich analog der Biosynthese von 5-*epi*-Aristolochen (EA), bei der Germacren A als neutrales Intermediat nachgewiesen wurde.^[176,201]

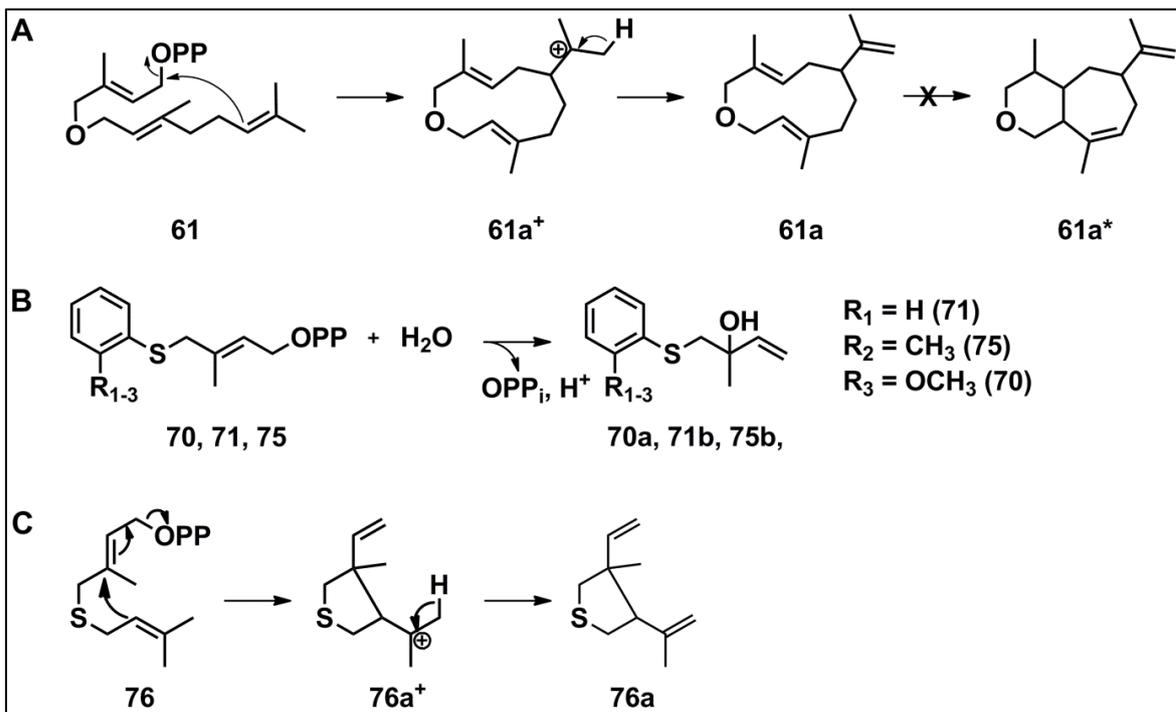


Abbildung 48: Postulierte Reaktionsmechanismen der TEAS mit den Substraten **61** (A), **70, 71, 75** (B) und **76** (C).

Nach enzymatischer Abspaltung der Diphosphatgruppe von Substrat **76** wird ein Thiophenring gebildet wodurch wahrscheinlich das intermediäre Carbeniumion **76a⁺** entsteht (Abbildung 48). Eine abschließende Protonenabstraktion führt dann zur Bildung des Thiophenderivates **76a**. Neben dem identifizierten Produkt **76a** entstehen eine Reihe aliphatischer Verbindungen mit einem Molekülionenpeak bei m/z 168, aber auch Produkte

mit m/z 186, die wahrscheinlich den korrespondierenden Alkoholen entsprechen (Anhang, Tabelle A 11).

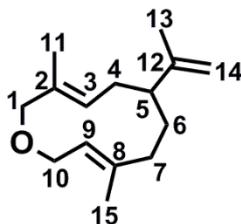
6.2.3 Strukturaufklärung des Oxagermacrenderivates 61a

Die Strukturaufklärung des TEAS-Produktes **61a** erfolgte über eine Kombination aus ^1H - und ^{13}C - sowie 2D-NMR-Experimenten (Heteronukleare Korrelationsspektroskopie über mehrere Bindungen (HMBC), Heteronukleare Korrelationsspektroskopie über eine Bindung (HSQC)) (Tabelle 14). Die NMR-Spektren befinden sich im Anhang (Abbildung A 3 bis Abbildung A 6).

Die HMBC-Korrelationen zeigten aufgrund der chemischen Verschiebung zwischen 126,0 ppm (C3) und 151,8 ppm (C12) sechs sp^2 -hybridisierte C-Atome, von denen drei wegen fehlender HSQC-Kopplung, als quartäre Kohlenstoffatome identifiziert wurden ($\delta = 135,6$ ppm (C2), 137,4 ppm (C8), 151,8 ppm (C12)). Die verbleibenden sp^2 -hybridisierten C-Atome zeigen entweder eine Korrelation zu einem Proton ($\delta = 126,6$ ppm (C3), 124,7 ppm (C9)) oder zu zwei Protonen ($\delta = 151,8$ ppm (C14)). Somit kann an Position 14 von einer terminalen Methylengruppe ausgegangen werden.

Tabelle 14: ^1H - und ^{13}C -NMR Daten des TEAS-Produktes **61a**.

d, Dublett; dd, Dublett eines Dubletts; dp, Dublett eines Quintetts; dq, Dublett eines Quartetts; m, Multipllett; s, Singulett; td, Triplett eines Dubletts; HMBC, Heteronukleare Korrelationsspektroskopie über mehrere Bindungen; J, Kopplungskonstante; δ , chemische Verschiebung.



Position	δ_{H} (ppm); Multiplizität (J in Hz)	δ_{C} (ppm)	HMBC Korrelation
1 a	4,04; d (12,5)	79,9	2, 3, 10, 11
1 b	3,86; d (12,5)		
2		135,6	1, 4, 11
3	5,38; m	126,6	1, 4, 5, 11
4 a	2,05; m	33,4	2, 3, 5, 6, 12
4 b	1,90; m		
5	1,88; m	48,6	3, 4, 6, 7, 12, 13, 14
6 a	1,65; m	32,8	4, 5, 7, 8, 12
6 b	1,39; m		

Position	δ_H (ppm); Multiplizität (J in Hz)	δ_C (ppm)	HMBC Korrelation
7 a	2,12; dd (13,1; 6,1)	39,8	5, 6, 8, 9, 15
7 b	1,73; td (13,1; 2,1)		
8		137,4	6, 7, 10, 15
9	5,28; m	124,7	7, 10, 15
10 a	4,22; dd (13,2; 8,5)	69,2	1, 8, 9
10 b	4,17; dd (13,2; 6,1)		
11	1,67; s	14,5	1, 2, 3
12		151,8	4, 5, 6, 13, 14
13	1,73; dd (1,4; 0,8)	19,6	5, 12, 14
14 a	4,69; dp (2,2; 0,8)	107,7	5, 12, 13
14 b	4,60; dq (2,2; 1,4)		
15	1,69; s	17,7	7, 8, 9

Die HMBC-Korrelationen von H3 und H9 mit den korrespondierenden quartären Kohlenstoffen an Position 2 und 8 sind aufgrund der gewählten Parameter im Rahmen des Experiments nicht sichtbar. Dennoch ist es über die Betrachtung indirekter Korrelationen benachbarter Atome möglich, die direkte Verknüpfung von C2 und C3 sowie C8 und C9 nachzuweisen. H3 zeigt Korrelationen zu C1, C4, C5 und C11, wobei C2 mit H1, H4 und H11 korreliert. H11 zeigt Korrelationen zu C1, C2 und C3, während H1 Korrelationen zu C2, C3, C10 und C11 aufweist. Zusammen mit der Tieffeldverschiebung belegen diese Korrelationen eine Verknüpfung von C2 und C3 über eine Doppelbindung. In derselben Weise kann eine Verknüpfung von C8 und C9 nachgewiesen werden. H9 zeigt Korrelationen zu C7, C10 und C15, wobei C8 mit H6, H7, H10 und H15 korreliert (Abbildung 49).

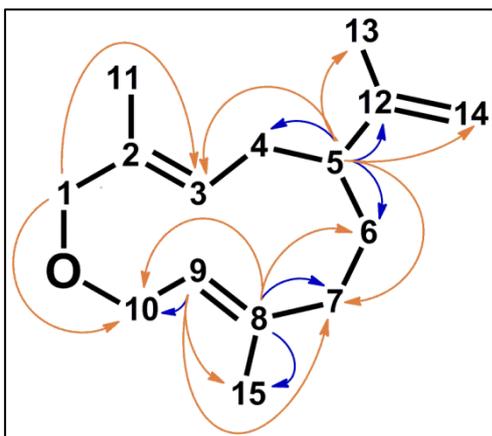


Abbildung 49: Ausgewählte HSQC- und HMBC-Korrelationen von **61a**. 2J -Kopplungen sind blau, 3J -Kopplungen orange abgebildet.

H15 wiederum weist Korrelationen zu C7, C8 und C9 auf und H7 hat Korrelationen zu C5, C6, C8, C9 und C15. Die Tieffeldverschiebung in Kombination mit den Korrelationen umliegender Atome erklärt die Verknüpfung von C8 und C9 über eine Doppelbindung. Die

Verknüpfung von C1 und C10 über eine Sauerstoffbrücke kann über die chemischen Verschiebungen der beteiligten Atome abgeschätzt werden ($\delta = 4,04$ ppm (H1a); 3,86 ppm (H1b); 4,22 ppm (H10a); 4,17 ppm (H10b); 79,9 ppm (C1); 69,2 ppm (C10)). Weiterhin können zwischen den Positionen 1 und 10 HMBC-Korrelationen nachgewiesen werden, während zwischen Position 1 und 9 sowie Position 2 und 10 keine heteronuklearen Kopplungen bestehen (Abbildung 49). Die Größe des Rings wurde über HMBC-Korrelationen von H5 zu C3, C4, C6, C7, C12, C13, und C14 bestimmt, die einen Ringschluss an Position 5 bestätigen und damit die Bildung eines 11-Ringsystems belegen (Abbildung 49). Das EI-MS-Spektrum in Abbildung 50 bestätigt zusätzlich die erwartete Struktur **61a**, die damit ein Germacren-Analogon darstellt. Der Molekülionenpeak bei $m/z = 220$ entspricht der erwarteten Masse (berechnet: $220,18 \text{ g mol}^{-1}$). Vergleicht man die EI-MS-Spektren von **61a** und Germacren A in Abbildung 50 zeigt sich nahezu dasselbe Fragmentierungsverhalten. Durch den sukzessiven Neutralverlust von $m/z = 14$ (CH_2) entstehen die Fragmentationen $m/z = 175, 161, 147, 133$ (Germacren A) und die korrespondierenden Fragmentationen von **61a** mit $m/z = 191, 177, 163$ und 149 , die sich aufgrund der Sauerstoffinsertion um genau je 16 g mol^{-1} unterscheiden. Der Verlust einer CHO-Gruppe ($m/z = 29$) von dem Fragmentation $m/z = 163$ könnte zu dem Fragment mit 135 Da führen, welches erstmals kein Sauerstoff enthält. Der Verlust einer Methylgruppe ($m/z = 121$) und sukzessiver Neutralverlust von CH_2 lässt sowohl im Fall von Germacren A als auch bei der Fragmentierung von Terpenoid **61a** Fragmentationen der Masse 121 Da , 107 und 93 Da entstehen. Der Basispeak von **61a** ist, anders als von Germacren A, bei $m/z = 68$ zu finden. Möglicherweise handelt es sich dabei um $\text{C}_5\text{H}_8^{++}$. Deutlich ist bei dem Vergleich der Fragmentierungsmuster von **61a** und Germacren A die Ähnlichkeit beider Verbindungen zu erkennen. Dies bestätigt zusätzlich die über NMR-Spektroskopie ermittelte Struktur.

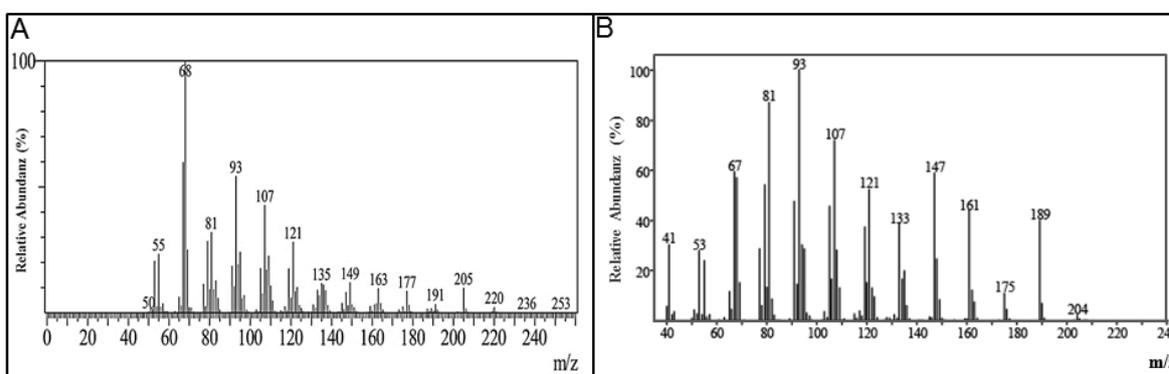


Abbildung 50: Vergleich der EI-MS-Spektren von **61a** (A) und Germacren A (B).^[181]

Anhand von NMR-spektroskopischen Untersuchungen und von polarimetrischen Messungen konnte belegt werden, dass das Terpenoid **61a**, welches durch Zyklisierung

von Substrat **61** durch die TEAS entsteht, in Form eines einzigen Diastereomers vorliegt. Es ist davon auszugehen, dass die Doppelbindungen von Produkt **61a** *E*-konfiguriert sind, da sie im Substrat **61** ebenfalls eine *E*-Konfiguration aufweisen. Zudem ist während der Zyklisierung des natürlichen Substrates FPP durch die TEAS keine Isomerisierung der Doppelbindungen bekannt. Die ¹H-NMR-Daten belegen außerdem eine feste Konformation des 11-Rings von Terpenoid **61a**, da man Protonen der CH₂-Gruppen des Rings in axiale und äquatoriale Protonen unterscheiden kann, weil sie separate Signale liefern (Anhang, Abbildung A 3). Aufgrund der festen Ringkonformation, kann Verbindung **61a** nur in Form von zwei Diastereomeren vorkommen, jedoch kann sie nicht in Form von Enantiomeren vorliegen. Da nur ein Satz von ¹H- und ¹³C-NMR-Signalen zu beobachten ist, die GC/MS-Messungen nur ein Signal von Verbindung **61a** aufweisen und der Drehwert eine spezifische Rotation von $[\alpha]_{589}^{24,6} = -37,5^\circ$ ergab, handelt es sich bei dem (-)-Oxagermacren **61a** nachweislich um ein einziges Diastereomer (Anhang, Abbildung A 3, Abbildung A 4, Tabelle A 6). Die Bildung von (-)-1-Fluorgermacren aus 6-Fluor-FPP, die bereits in der Literatur beschrieben wurde, bestätigt die Bildung des Diastereomers (-)-Oxagermacren.^[201]

6.3 Schlussfolgerung

Durch die enzymatische Umsetzung von elf synthetischen und vier natürlich vorkommenden Prenyldiphosphaten durch die TEAS konnte die erstaunliche Substratpromiskuität dieser Sesquiterpensynthese gezeigt werden. Neben der Zyklisierung von FPP wurde erstmals die Bildung von Monoterpenen mit dem Substrat GPP nachgewiesen. So entstehen, neben linearen Monoterpenen und Monoterpenalkoholen, die zyklischen Monoterpene Limonen, Terpinolen, Terpinen und Terpeneol.

Von den getesteten elf synthetischen Prenyldiphosphaten wurden drei aromatische Substrate hauptsächlich zu den Lilanool-ähnlichen Alkoholen **70a**, **71b** und **75b** hydrolysiert (Abbildung 51). Substrat **62**, welches eine Alkinfunktion enthält, wird zwar umgesetzt, jedoch war die Identifizierung der Produkte aufgrund der geringen Umsatzrate und der hohen Produktvielfalt nicht möglich.

Mit der Zyklisierung der Substrate **76** und **61** gelang die Biosynthese endozyklisch modifizierter Terpene. Erstmals konnte gezeigt werden, dass neben der Limonensynthase^[154,199] (Monoterpensynthase) auch die Sesquiterpensynthase TEAS heterozyklische Terpene synthetisiert. Substrat **61** wurde zu 99 % in das Produkt **61a**

umgewandelt, welches als reines, negativ drehendes Diastereomer vorliegt. Die Strukturaufklärung über 1D- und 2D-NMR-Experimente sowie GC/EI-MS ermöglichte die Identifizierung des Produktes als (-)-Oxagermacren (**61a**) (Abbildung 51).

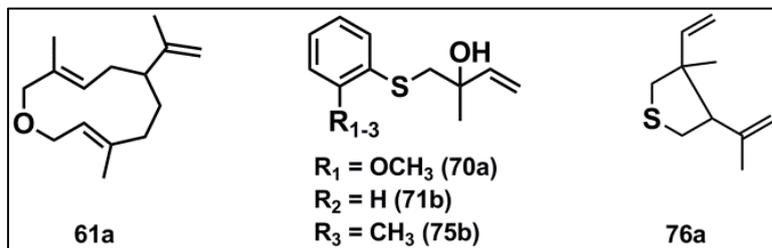


Abbildung 51: Hauptprodukte der Umsetzung von Substrat **61**, **70**, **71**, **75** und **76** mit der TEAS.

In weiterführenden Versuchen sollte vor allem die Stereochemie der Produkte geklärt werden. Die Ermittlung der absoluten Konfiguration von Verbindung **61a** und **76a** sowie der Linalool-ähnlichen Alkohole **70a**, **71b** und **75b** ist dabei über eine chemische Derivatisierung der Produkte möglich. Das Enantiomerenverhältnis der Linalool-ähnlichen Alkohole könnte über chirale HPLC bestimmt werden, wobei die absolute Konfiguration über diese Methode nur mit chemisch synthetisierten Standards zugänglich wird. Da Verbindung **76a** zwei benachbarte Stereozentren aufweist, könnte zudem deren relative Konfiguration durch NMR-spektroskopische Untersuchungen bestimmt werden. Dies setzt jedoch die Isolierung einer ausreichenden Menge aus dem Produktgemisch mittels präparativer GC voraus.

Da Verbindungen wie Terpene häufig wachstumshemmende Wirkungen auf Mikroorganismen erzielen, wäre zudem die Untersuchung der identifizierten Substanzen auf antifungale oder antibakterielle Wirkung zu empfehlen. Außerdem wäre eine olfaktorische Analyse des Geruchspotentials der Verbindungen möglich, um potentiell interessante Geruchsstoffe zu identifizieren.

7 Materialien und Methoden

7.1 Materialien

7.1.1 Laborausstattung, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Materialien und Chemikalien sind im Anhang aufgelistet (Tabelle A 1 und Tabelle A 2). Deuterierte Lösungsmittel wurden von der Deutero GmbH (Kastellaun) bezogen. Für die Herstellung von Kulturmedien und Puffern wurde ausschließlich entionisiertes Wasser verwendet. Alle verwendeten Prenyldiphosphate wurden hausintern von Dr. Roman Weber, Dr. Marco Dessoy, Dr. Tula Beck und M.Sc. Steve Ludwig synthetisiert und unter anderem mittels NMR-Spektroskopie auf deren Identität und Reinheit geprüft.^[154,202]

Lösungsmittel, wenn nicht anders aufgeführt, wurden hausintern destilliert und von der Firma VWR (Poole, England) bezogen.

7.1.2 Software

Tabelle 15: Verwendete Software	
<i>Betreiber und Internetadresse</i>	<i>Funktion</i>
BCM Search Launcher http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/seq-util/seq-util.html	Reverse Komplementierung
ChemDraw 12.0	Erstellen von Strukturformeln Berechnung exakter Massen
EMBL – EBI http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/	Vergleich von DNA- und Aminosäuresequenzen
Eurofins MWG Operon http://www.eurofinsdna.com/de.html	Oligonukleotidsynthese Sequenzierung
Microsoft Excel 2007	Erstellen der MANT-O-Geraniol-Kalibriergerade Grafiken zur Gesamtproduktbildung und zu CD-Messungen
ExPASy http://www.expasy.ch/tools/dna.html	Translatierung der Nukleotidsequenzen in Aminosäuresequenzen

Betreiber und Internetadresse	Funktion
ExPASy ProtParam http://web.expasy.org/protparam/	Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen, des theoretischen pI-Wertes und des Extinktionskoeffizienten
K2D3 ^[139] http://www.ogic.ca/projects/k2d3/	Sekundärstrukturabschätzung durch Dekonvolution von CD-Spektren
Molinspiration Chemoinformatics http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties	Berechnung von molekularen Volumina
NIST/EPA/NIH Mass Spectral Database (NIST 11)	Datenbankvergleich von EI-Spektren
PyMOL 1.5.x	Abbildung von Enzymmodellen und Kristallstrukturen
SigmaPlot 12.3	Auswertung und Regression enzymkinetischer Daten

7.1.3 Proteine

DNase I (3000 U mg ⁻¹ , Rinderpankreas)	AppliChem, Darmstadt
Fast Digest [®] <i>DpnI</i>	Thermo Scientific, Darmstadt
Anorganische Phosphatase aus <i>E. coli</i> (>800 U mg ⁻¹)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Saure Phosphatase aus Kartoffel (3-10 U mg ⁻¹)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Lysozym (20000 U mg ⁻¹ , Hühnereiweiß)	Carl Roth, Karlsruhe
<i>Pfu</i> DNA Polymerase (2,5 U µL ⁻¹)	Thermo Scientific, Darmstadt
<i>DreamTaq</i> DNA Polymerase (5 U µL ⁻¹)	Thermo Scientific, Darmstadt

7.1.4 Oligonukleotide

Oligonukleotide (Tabelle 16) wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) synthetisiert. Alle Oligonukleotide wurden HPSF (*High Purity Salt Free*) gereinigt, lyophilisiert erworben und anschließend in MilliQ[™]-entionisiertem Wasser gelöst.

Tabelle 16: Verwendete Oligonukleotide für ortsgerichtete Mutagenesen und Sequenzierungen. f, vorwärts orientiert; r, rückwärts orientiert; EcUPPS, *E. coli* Undecaprenyldiphosphatsynthase; T_m, Schmelztemperatur; **fett gedruckt**, Mutagenesestellen.

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	T _m (°C)
EcUPPS_H43F_f	AGGGAAGATTCGTGCCTTTGGG TTCAAAGCCGGGGCA	> 75
EcUPPS_H43F_r	TGCCCCGGCTTT GAACCCAAAGGCACGAATCTTCCT	> 75

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	T_m (°C)
EcUPPS_H43W_f	AGGGAAGATTTCGTGCCTTTGGGT GG AAGCCGGGGCA	> 75
EcUPPS_H43W_r	TGCCCCGGCTTT CC ACCCAAAGGCACGAATCTTCCCT	> 75
EcUPPS_Y68H_f	GCGTTAACGCT GCAT GCCTTTAGTAGTGAAAACCTGGAAC	71,6
EcUPPS_Y68H_r	GTTCCAGTTTTCACTACTAAAGGC ATGC AGCGTTAACGC	71,6
EcUPPS_S71A_f	AACGCTGTATGCCTTT GCT AGTGAAAACCTGGAACCGACCA	72,5
EcUPPS_S71A_r	TGGTCGGTTCAGTTTTCACT AGC AAAGGCATACAGCGTT	72,5
EcUPPS_S71C_f	AACGCTGTATGCCTTT TGT AGTGAAAACCTGGAACCGACCA	71,5
EcUPPS_S71C_r	TGGTCGGTTCAGTTTTCACT AC AAAAGGCATACAGCGTT	71,5
EcUPPS_S71D_f	AACGCTGTATGCCTTT GAT AGTGAAAACCTGGAACCGACCA	71,5
EcUPPS_S71D_r	TGGTCGGTTCAGTTTTCACT ATC AAAGGCATACAGCGTT	71,5
EcUPPS_S72C_f	AACGCTGTATGCCTTTAGTT TGT GAAAACCTGGAACCGACCA	71,5
EcUPPS_S72C_r	TGGTCGGTTCAGTTTT ACA ACTAAAGGCATACAGCGTT	71,5
EcUPPS_E73A_f	GTATGCCTTTAGTAGT GCT AACTGGAACCGACCAGCGCAG	74,6
EcUPPS_E73A_r	CTGCGCTGGTTCGTTCCAGTT AGC ACTACTAAAGGCATAC	74,6
EcUPPS_E73D_f	GTATGCCTTTAGTAGT GATA ACTGGAACCGACCAGCGCAG	73,6
EcUPPS_E73D_r	CTGCGCTGGTTCGTTCCAGTT ATC ACTACTAAAGGCATAC	73,6
EcUPPS_N74A_f	GTATGCCTTTAGTAGTGA AGCCT GGAACCGACCAGCGCAG	> 75
EcUPPS_N74A_r	CTGCGCTGGTTCGTTCC AGGCTT CACTACTAAAGGCATAC	> 75
EcUPPS_N74Q_f	GTATGCCTTTAGTAGTGA ACAGT GGAACCGACCAGCGCAG	74,6
EcUPPS_N74Q_r	CTGCGCTGGTTCGTTCC ACTGTT CACTACTAAAGGCATAC	74,6
EcUPPS_E73D/N74Q_f	GTATGCCTTTAGTAGT GATCAGT GGAACCGACCAGCGCAG	74,6
EcUPPS_E73D/N74Q_r	CTGCGCTGGTTCGTTCC ACTGATC ACTACTAAAGGCATAC	74,6
EcUPPS_F89W_f	GCGTTAATGGAAGT TGGGT TGGGCGCTC	72,2
EcUPPS_F89W_r	GAGCGCCACAC CCAC AGTTCCATTAACGC	72,2
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	47,7
T7 term	CTAGTTATTGCTCAGCGGT	48,9

7.1.5 Plasmide

pET11b-EcUPPS ^[203]	erhalten von Professor Poulter, Universität Utah, USA Merck Biosciences, Darmstadt	Ampicillin-Resistenz
pET28a(+)-ThkCPT	wurde über Gensynthese der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) erhalten Merck Biosciences, Darmstadt	Kanamycin-Resistenz

pET28b(+)-TEAS ^[59]	erhalten von Professor Chappell, Universität Kentucky, Kentucky Merck Biosciences, Darmstadt	Kanamycin-Resistenz
pTG10-GroESL ^[135]	erhalten von Professor Poulter, Universität Utah, USA	Chloramphenicol-Resistenz
pUC19	Leervektor zum Test der Transformationseffizienz Thermo Scientific, Darmstadt	Ampicillin-Resistenz

7.1.6 *Escherichia coli* Stämme

DH5α	F ⁻ Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rK ⁻ , mK ⁺) <i>phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1</i> Invitrogen, Karlsruhe
One Shot [®] TOP10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139</i> Δ(<i>ara-leu</i>) 7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG λ-</i> Invitrogen, Karlsruhe
BL21 (DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdSB</i> (rB-mB-) <i>gal dcm</i> (DE3) Invitrogen, Karlsruhe

Kompetente *E. coli* DH5α und *E. coli* BL21 wurden nach der Methode von Inoue^[204] hergestellt und mit dem Leervektor pUC19 transformiert, um deren Effizienz zu testen. Die Transformationseffizienz auf LB-Ampicillin-Selektionsmedium betrug zwischen 10⁸ bis 10⁹ Transformanten.

7.1.7 Kulturmedien

Luria-Bertani Medium (LB-Medium)	1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 1 % NaCl, pH 7,0
Luria-Bertani Agar (LB-Agar)	1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 1 % NaCl, 1,5 % Agar, pH 7,0

<i>Terrific Broth</i> (TB-Medium)	1,2 % Trypton, 2,4 % Hefeextrakt, 0,4 % (v/v) Glycerin, 72 mM K ₂ HPO ₄ , 17 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,5 Puffersubstanzen als Stammlösung separat autoklaviert und kurz vor Verwendung steril zu den weiteren Bestandteilen des Mediums zugegeben
<i>Super Optimal Broth + Glucose</i> (SOC Medium)	2 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 10 mM MgSO ₄ , 10 mM MgCl ₂ , 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 0,8 % Glucose, pH 7,0

Die Prozentangaben verstehen sich als Gewichtsprozente (*w/v*), falls nicht anders angegeben. Die Kulturmedien wurden nach ihrer Herstellung autoklaviert und direkt vor der Verwendung mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt (Endkonzentrationen: 100 µg mL⁻¹ Ampicillin, 50 µg mL⁻¹ Kanamycin oder 50 µg mL⁻¹ Chloramphenicol). Antibiotika wurden als 1000fache Stammlösung der benötigten Konzentration in Wasser hergestellt, steril filtriert und bei -20 °C bis zur Verwendung gelagert. Die 50 mg mL⁻¹ Stammlösung von Chloramphenicol wurde in MeOH hergestellt und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

7.2 Mikrobiologische Methoden

7.2.1 Stammhaltung und Kultivierung der Bakterienstämme

Übernachtkulturen wurden in Kultiverröhrchen in 5 mL LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum angezogen. Eine Einzelkolonie einer LB-Agarkultur diente dabei zum Animpfen. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 200 rpm in einem Inkubationsschüttler über Nacht. Zur langfristigen Lagerung wurde eine Übernachtskultur (5 mL) zentrifugiert (5 min bei 4000 × g), der Überstand entfernt und das Bakterienpellet in 1 mL LB-Medium mit 20 % (v/v) Glycerin resuspendiert. Die Kulturen wurden in geeigneten Kryoröhrchen mit Schraubverschluss in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Die kurzfristige Lagerung der Bakterienstämme erfolgte auf Antibiotikum-haltigem LB-Agar. LB-Agarplatten wurden mit Parafilm verschlossen und bei 4 °C für maximal 4 Wochen gelagert.

7.3 Molekularbiologische Methoden

7.3.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde zur ortsgerichteten Mutagenese eines Zielfragmentes sowie zum schnellen Nachweis einer Plasmidtransformation in *E. coli* über Kolonie-PCR genutzt und in einem *Thermocycler* (Biometra, Göttingen) durchgeführt.

7.3.1.1 Ortsgerichtete Mutagenese

Die ortsgerichtete Mutagenese des Zielfragmentes erfolgte mit modifizierten Oligonukleotiden, die die gewünschte Mutation kodierten (Tabelle 16). Die komplementären Oligonukleotide wurden in einer PCR verwendet, um das gesamte Plasmid zu amplifizieren. Die 50 μL -Reaktionsansätze enthielten 2 U *Pfu*-DNA-Polymerase, Reaktionspuffer, 0,2 mM dNTP-Mix, 10 pmol der entsprechenden Primer sowie 700-900 ng parentale DNA. Die Amplifizierung erfolgte nach einem initialen Denaturierungsschritt (2 min 95 °C) in 35 Zyklen (1 min 95 °C, 30 s T_m-5 °C, 2 min k_b^{-1} bzw. 5 min 72 °C).

Die zurückbleibenden, methylierten Mutterstränge wurden mit Fast Digest® *DpnI* nach Herstellerangaben verdaut und damit aus dem Ansatz entfernt. 3 μL des Reaktionsansatzes wurden zur Transformation von chemokompetenten *E. coli* TOP10 oder DH5 α verwendet.

7.3.1.2 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR diente der Überprüfung der Plasmidtransformation in chemokompetente *E. coli*. Die 20 μL -Reaktionsansätze enthielten 0,6 U *DreamTaq*-DNA-Polymerase, Reaktionspuffer, 0,2 mM dNTP-Mix, 4 pmol der Oligonukleotide T7 und T7 term sowie einen Kolonieabstrich als parentale DNA. Die Amplifizierung erfolgte nach einem initialen Denaturierungsschritt (2 min 94 °C) in 35 Zyklen (1 min 94 °C, 1 min 55 °C, 1 min bzw. 7 min 72 °C).

Zur Positivkontrolle wurde eine Reaktion mit 0,5 μL gereinigter Plasmid-DNA des erwarteten Fragmentes durchgeführt. Der Nachweis möglicher Verunreinigungen der verwendeten Reagenzien erfolgte durch eine Negativkontrolle, die 0,5 μL dH₂O enthielt.

7.3.2 Plasmidpräparation aus *E. coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte unter Verwendung des *QIAprep*[®] *Spin Miniprep Kits* (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben.

7.3.3 Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli*

Die Transformation von chemokompetenten *E. coli* TOP10, DH5 α oder *E. coli* BL21(DE3) erfolgte mittels Hitzeschock. Dazu wurde ein 50 μ L-Aliquot, der bei -80 °C gelagerten chemokompetenten *E. coli* zunächst für 5 min auf Eis langsam aufgetaut. Nach Zugabe der zu transformierenden Plasmid-DNA und weiteren 10 min Inkubation auf Eis, fand bei 42 °C für 30 s im Wasserbad die Transformation der kompetenten Zellen statt. Der Transformationsansatz wurde anschließend mit 250 μ L SOC-Medium versetzt und für 1 h bei 37 °C und 200 rpm in einem Inkubationsschüttler gelagert. Zur Selektion wurden die Transformanten auf einer LB-Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

7.3.4 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte photometrisch über die Bestimmung der optischen Dichte bei 260 nm ($A_{260} = 1$ entspricht dabei ca. 50 μ g mL⁻¹ doppelsträngiger DNA). Die Konzentrationsbestimmung erfolgte durch Zugabe von 2 μ L Plasmid-DNA zu 68 μ L dH₂O und Messung bei A_{260} im Vergleich zu reinem dH₂O. Der Extinktionsquotient $E_{A\ 260}/E_{A\ 280}$ wurde als Reinheitsmaß betrachtet und lag stets über 1,8.

7.3.5 Agarosegelelektrophorese

Für die größenabhängige Trennung von DNA-Fragmenten wurden 1 %ige Gele in TAE-Puffer (40 mM Tris, 2 mM EDTA, 20 mM Essigsäure, pH 8,0) verwendet, die 400 μ g mL⁻¹ Ethidiumbromid enthielten. Die DNA-Proben wurden mit 6x *DNA Loading Dye* (Thermo Scientific, Darmstadt) versetzt auf das Gel aufgetragen. Die Trennung erfolgte bei 100 V und konstanter Spannung in einer horizontalen Elektrophoreseapparatur in TAE-Puffer. Die Bestimmung der DNA-Fragmentlänge erfolgte mit einem Molekulargewichtsmarker (*Gene-Ruler*[™] 1 kb *DNA Ladder*, Thermo Scientific, Darmstadt). Die Visualisierung der DNA Fragmente fand unter UV-Licht der Wellenlänge

320 nm in einer Geldokumentationsanlage, auf Grundlage der DNA-Interkalierung von Ethidiumbromid, statt.

7.3.6 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA erfolgte über die Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) mit den vektorspezifischen Oligonukleotiden T7 und T7 term (Abschnitt 7.1.4). Zur Auswertung von Sequenzierungen wurde die in Tabelle 15 beschriebene Software verwendet.

7.4 Proteinbiochemische Methoden

7.4.1 Rekombinante Proteinherstellung

Zur rekombinanten Proteinerzeugung wurde eine Vorkultur in einem sterilen Erlenmeyerkolben in LB- (EcUPPS, ThkCPT) oder TB-Medium (TEAS) mit dem entsprechenden Antibiotikum aus einer Glycerinkultur über Nacht bei 37 °C und 200 rpm angezogen. Das Medium enthielt 100 µg mL⁻¹ Ampicillin und 50 µg mL⁻¹ Chloramphenicol im Fall der EcUPPS oder 50 µg mL⁻¹ Kanamycin für die Herstellung der ThkCPT und der TEAS. Für die 500 mL Hauptkultur wurde die Vorkultur 1:20 (v/v) mit Antibiotikum-haltigem Medium verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ (optische Dichte bei 600 nm) von ~ 1,0 bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Die Induktion der rekombinanten Proteinbiosynthese erfolgte mit 1 mM IPTG für 4 h bei 37 °C (EcUPPS, ThkCPT) oder 0,1 mM IPTG für 6 h bei 22 °C (TEAS). Anschließend wurden die Zellen bei 10 000 × g für 10 min bei 4 °C pelletiert und nach entfernen des Überstandes bei -20 °C bis zur Verwendung gelagert.

7.4.2 Zellaufschluss

Der Zellaufschluss fand in 20 mL TEAS/EcUPPS-Lysepuffer (25 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5) oder ThkCPT-Lysepuffer (25 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 8,5) versetzt mit 750 µg mL⁻¹ Lysozym und 1 µg mL⁻¹ DNase I statt. Nach Inkubation auf Eis für 1 h auf einem Taumler bei 50 rpm wurde die Zellsuspension mit einem Ultraschall-Homogenisator (Amplitude: 70 %, Impuls an: 1 s, Impuls aus: 1 s; 3-mal für 30 s) mechanisch aufgeschlossen. Das Zelllysate wurde zwischen den Homogenisierungsschritten für 1 min auf Eis gekühlt.

7.4.3 Proteinreinigung mittels Immobilisierter Metallchelat-Affinitätschromatographie (IMAC)

Das Zellysate wurde für 30 min bei 15 000 x g zentrifugiert, das Pellet verworfen und der Überstand mit dem löslichen, überexprimierten Protein mit Hilfe der Metallchelat-Affinitätschromatographie an Ni²⁺ (Ni Sepharose™ 6 *Fast Flow*) oder Co²⁺ (TALON®) beladener Sepharose gereinigt. Die Komplexbildung und damit die Bindung des Zielproteins an das IMAC-Material erfolgte über einen His₆-Tag.

7.4.3.1 Reinigung der EcUPPS mittels Co-IMAC

Die Reinigung der EcUPPS-Varianten erfolgte an TALON®-Metallaffinitätsmaterial nach Herstellerangaben. 2 mL TALON®-Material wurden mit der cytosolischen Proteinlösung für 1 h auf Eis vorsichtig geschwenkt. Anschließend wurde das Material zweimal mit Waschpuffer A (25 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5) und einmal mit Waschpuffer B (25 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 7,5) gewaschen, um ungebundene Proteine von der Matrix zu entfernen. Die Waschschriffe wurden mit je 10 mL Waschpuffer bei 700 x g durchgeführt und das TALON®-Material vor jedem Zentrifugationsschritt resuspendiert. Nach Überführung der TALON®-Suspension in eine Leerkartusche wurde das gebundene Protein mit 3 mL Elutionspuffer (25 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 300 mM Imidazol, pH 7,5) von der Säule eluiert. Die Proteinfraktionen wurden mittels SDS-PAGE auf Reinheit geprüft. Anschließend wurde der imidazolhaltige Elutionspuffer auf einer PD10-Entsalzungssäule gegen Assaypuffer (50 mM HEPES/NaOH, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 0,5 mM MgCl₂, 10 % Glycerin (v/v), pH 7,5) ausgetauscht. Das gereinigte Protein wurde in 500 µL-Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20 °C bis zur Verwendung gelagert.

7.4.3.2 Reinigung der ThkCPT mittels Ni-IMAC

Die Reinigung der ThkCPT erfolgte an einer FPLC-Anlage mit einer Nickel-Sepharose-Säule (HisTrap™ FF crude 1 mL, GE Healthcare, Freiburg) nach Herstellerangaben. Die cytosolische Proteinlösung wurde mit einer Flussrate von 0,3 mL min⁻¹ auf die Säule aufgebracht. Mit 15 mL Puffer A (25 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 8,5) wurde die Säule anschließend gespült um ungebundene Proteine zu entfernen. Puffer B (25 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 300 mM Imidazol, pH 8,5) diente zur

Elution des Zielproteins mit folgendem Gradienten in Kombination mit Puffer A und $0,3 \text{ mL min}^{-1}$ Flussrate: (SV- Säulenvolumen)

0% Puffer B $\xrightarrow{5 \text{ SV}}$ 0% Puffer B $\xrightarrow{1 \text{ SV}}$ 10% Puffer B $\xrightarrow{2 \text{ SV}}$ 10% Puffer B $\xrightarrow{1 \text{ SV}}$ 100% Puffer B $\xrightarrow{7 \text{ SV}}$ 100% Puffer B

Die Proteinfractionen wurden mittels SDS-PAGE auf Reinheit geprüft und homogene Proteinlösungen wurden vereinigt. Anschließend wurde der imidazolhaltige Elutionspuffer auf einer PD10-Säule gegen Assaypuffer (50 mM Hepes/NaOH, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 0,5 mM MgCl_2 , 10 % Glycerin (v/v), pH 8,0) ausgetauscht. Das gereinigte Protein, wurde in 500 μL -Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ bis zur Verwendung gelagert.

7.4.3.3 Reinigung der TEAS mittels Ni-IMAC

Die Reinigung der TEAS erfolgte an einer FPLC-Anlage mit einer Nickel-Sepharose-Säule (HisTrap™ FF crude 1 mL, GE Healthcare, Freiburg) nach Herstellerangaben. Die cytosolische Proteinlösung wurde mit $0,3 \text{ mL min}^{-1}$ auf die Säule aufgebracht. Mit 15 mL Puffer A (25 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5) wurde die Säule anschließend gespült um ungebundene Proteine zu entfernen. Puffer B (25 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 300 mM Imidazol, pH 7,5) diente zur Elution des Zielproteins mit folgendem Gradienten in Kombination mit Puffer A und $0,3 \text{ mL min}^{-1}$ Flussrate: (SV- Säulenvolumen)

0% Puffer B $\xrightarrow{2 \text{ SV}}$ 0% Puffer B $\xrightarrow{4 \text{ SV}}$ 10% Puffer B $\xrightarrow{2 \text{ SV}}$ 10% Puffer B $\xrightarrow{7 \text{ SV}}$ 100% Puffer B $\xrightarrow{3 \text{ SV}}$ 100% Puffer B

Die Proteinfractionen wurden mittels SDS-PAGE auf Reinheit geprüft und homogene Proteinlösungen wurden vereinigt. Anschließend wurde der imidazolhaltige Elutionspuffer auf einer PD10-Entsalzungssäule gegen Assaypuffer (50 mM Hepes/NaOH, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 20 mM MgCl_2 , 10 % Glycerin (v/v), pH 7,5) ausgetauscht. Das gereinigte Protein, wurde in 500 μL -Aliquots flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ bis zur Verwendung gelagert.

7.4.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Bradford-Methode mit Roti®-Quant (Carl Roth, Karlsruhe) nach Herstellerangaben. Die Detektion fand bei 595 nm in einem Photometer basierend auf dem Farbumschlag des Coomassie Brilliantblau G-250 Farbstoffes bei Bindung an Proteine statt. Zur Quantifizierung wurde eine BSA-Standardkurve zwischen $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ - $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ Rinderserumalbumin bestimmt. Mit Gleichung 1 wurde die Proteinkonzentration ermittelt.

$$c \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right) = \left(\frac{OD_{595 \text{ nm}}}{m_{\text{Standardkurve}}} \right) \cdot VF$$

Gleichung 1: Bestimmung der Proteinkonzentration anhand einer BSA-Standardkurve.
VF, Verdünnungsfaktor.

7.4.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Überprüfung der Reinheit rekombinanter Proteine wurde eine SDS-PAGE nach Laemmli durchgeführt.^[205] Die Trennung erfolgte mit Acrylamid/Bisacrylamid-Trenngelen mit 10 %igem (TEAS, ThkCPT) oder 14 %igem (EcUPPS) Acrylamidgehalt. Nach der Elektrophorese wurden die Gele mit der Coomassie-Methode gefärbt. Die Färbung der Gele erfolgte 10 min in Färbelösung (0,25 % Coomassie-Brilliantblau G-250 (w/v), 40 % H₂O, 50 % MeOH, 10 % Essigsäure (v/v)) nach Erwärmen in der Mikrowelle (30 s, 360 Watt) auf einem Taumler. Entfärbt wurde mit Entfärbelösung (10 % Essigsäure, 30 % MeOH, 60 % H₂O (v/v)) nach Erwärmen in der Mikrowelle (30 s, 360 Watt) auf einem Taumler.

7.5 Analytische Methoden

Substratstammlösungen (5 mM Startersubstrate und 10 mM Elongationssubstrate) wurden in 25 mM Ammoniumbicarbonatlösung hergestellt.^[206]

7.5.1 Mikrotiterplatten-Phosphatdetektionsassay^[137]

Die Berechnung von Umsatzraten und kinetischen Parametern erfolgte wie in Abschnitt 7.5.1.5 beschrieben. Gemessen wurde in einem Mikrotiterplattenspektrophotometer (SpectraMax M5, Molecular Devices, Biberach) in 96-Kavitäten-Platten (96 *MicroWell plate*, Nunc, flacher Boden, ohne Deckel; VWR, Poole, England). Die Lagerung der anorganischen Phosphatase aus *E. coli* erfolgte bei -20 °C in 100 µL Aliquots einer 800 U mL⁻¹-Stammlösung in Lagerpuffer (20 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 50 % Glycerin (v/v), pH 8,0).

7.5.1.1 Bestimmung von Substratkinetiken der EcUPPS und ThkCPT

Zur Bestimmung der Substratkinetik von IPP wurden 0,1 μM EcUPPS oder 1 μM ThkCPT zusammen mit 10 μM FPP und verschiedenen Konzentrationen an IPP (500 μM , 250 μM , 125 μM , 62,5 μM , 31,25 μM , 15,625 μM , 7,8125 μM , 0 μM) für 72 s, 120 s, 165 s, 300 s, 521 s, 600 s und 900 s in EcUPPS-Assaypuffer (50 mM Hepes/NaOH, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 0,5 mM MgCl_2 , 10 % Glycerin (v/v), pH 7,5) oder ThkCPT-Assaypuffer (50 mM Hepes/NaOH, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM MgCl_2 , 10 % Glycerin (v/v), pH 8,0) versetzt mit 0,1 % Triton-X-100 (v/v) und 8 U mL^{-1} anorganischer Phosphatase bei 22 °C inkubiert. Die Dreifachbestimmungen der Enzymreaktionen wurden mit 100 μL BIOMOL Green™ Detektionsreagenz gestoppt und nach weiteren 20 min in einem Mikrotiterplattenspektrophotometer bei 620 nm gemessen. Zur Kontrolle erfolgte für jede Substratkonzentration eine Messung mit denaturiertem Enzym zu den unterschiedlichen Zeitpunkten um Selbsthydrolyse der Substrate zu berücksichtigen. Zur Quantifizierung wurde eine P_i -Standardkurve in Doppelbestimmung mitgeführt. Die Verdünnung des KP_i -Standards erfolgte in Assaypuffer, wurde mit 100 μL BIOMOL Green™ Detektionsreagenz nach Ablauf der Enzymreaktion in den Test-Kavitäten detektiert und zeitgleich nach weiteren 20 min bei 620 nm gemessen. Eine lineare Beziehung zwischen $A_{620 \text{ nm}}$ und P_i -Konzentration ermöglichte eine Quantifizierung zwischen 80 μM - 0 μM P_i .

Die Bestimmung der FPP-Kinetiken der EcUPPS sowie der ThkCPT erfolgte unter analogen Bedingungen der Bestimmung von IPP-Kinetiken. Die Phosphathydrolyse wurde mit 150 μM IPP gemessen, wobei die Substratkonzentration von FPP variierte (80 μM , 40 μM , 20 μM , 10 μM , 5 μM , 2,5 μM , 1,25 μM , 0 μM). Die Enzymreaktion wurde nach 60 s, 120 s, 180 s, 300 s, 600 s, 900 s oder 1200 s durch Zugabe von 100 μL BIOMOL Green™ Detektionsreagenz gestoppt und wie oben beschrieben gemessen. Damit konnte ein linearer Messbereich für Umsatz-Zeit-Kurven bestimmt werden, so dass Folgemessungen zu definierten Zeitpunkten gestoppt werden konnten.

7.5.1.2 Bestimmung der Substratkinetiken artifiziieller Substrate

Die Assaybedingungen wurden wie in Abschnitt 7.5.1.1 beschriebenen gewählt. Zur Detektion der Produktbildung wurden 0,1 - 1 μM *cis*-Prenyltransferase (CPT) zusammen mit dem jeweiligen allylischen Substrat zwischen 80 - 0 μM im Fall der Startersubstrate, variiert, wobei das Elongationssubstrat IPP mit 150 μM konstant war. Die Bestimmung der Substratkinetik artifiziieller homoallylischer Substrate erfolgte zwischen 500 - 0 μM mit 10 μM FPP (mit dem jeweiligen homoallylischen Diphosphat).

7.5.1.3 Bestimmung der Substratkinetiken der EcUPPS-Varianten

Die Assaybedingungen wurden wie in Abschnitt 7.5.1.1 beschriebenen gewählt. Zur Detektion der Produktbildung wurden 0,1 - 10 μM EcUPPS-Variante zusammen mit verschiedenen FPP-Konzentrationen zwischen 40 - 0 μM inkubiert, wobei das Elongationssubstrat IPP mit 150 μM konstant war. Die Bestimmung der Substratkinetik von IPP zwischen 500 - 0 μM erfolgte mit 10 μM FPP.

7.5.1.4 Bestimmung der Substratkinetik der TEAS

Zur Dreifachbestimmung der Substratkinetik von FPP wurden 0,1 μM TEAS zusammen mit verschiedenen Konzentrationen an FPP (160 μM , 80 μM , 40 μM , 20 μM , 10 μM , 5 μM , 0 μM) für 60 s, 120 s, 180 s, 300 s, 600 s, 900 s und 1200 s in TEAS-Assaypuffer (50 mM Hepes/NaOH, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 20 mM MgCl_2 , 10 % Glycerin (v/v), pH 7,5) versetzt mit 8 U mL^{-1} anorganischer Phosphatase bei 22 °C inkubiert. Kontrollreaktionen, Detektion und Bestimmung der P_i -Standardkurve erfolgte gemäß Abschnitt 7.5.1.1. Die Berechnung enzymkinetischer Parameter ist in Abschnitt 7.5.1.5 beschrieben. Damit konnte ein linearer Messbereich für Umsatz-Zeit-Kurven bestimmt werden, so dass Folgemessungen zu definierten Zeitpunkten gestoppt werden konnten.

Zur Bestimmung von Kinetiken artifizierlicher Substrate wurden 0,1 - 1 μM TEAS zusammen mit verschiedenen Konzentrationen Substrat zwischen 160 - 0 μM variiert und wie in diesem Abschnitt beschrieben, gemessen.

7.5.1.5 Berechnung von Umsatzraten und kinetischen Parametern

Zur Berechnung der Umsatzraten in nkat mg^{-1} wurde Gleichung 2 verwendet.

$$v_0 = \frac{(A_{620} - A_{\text{Blank}}) \cdot 1000}{2 \cdot m \cdot t \cdot [E]}$$

Gleichung 2: Berechnung der Umsatzraten

v_0	Anfangsgeschwindigkeit der Diphosphathydrolyse (nkat mg^{-1})
A_{620}	Absorption bei 620 nm
A_{Blank}	Absorption der Kontrolle bei 620 nm
m	Anstieg der Phosphatstandardkurve (μM^{-1})

t	Dauer der Enzymreaktion (s)
[E]	Enzymkonzentration (mg L ⁻¹)

Dabei ist 1 Katal diejenige Menge Enzym, die unter angegebenen Bedingungen 1 mol Substrat pro Sekunde umsetzt. In dem hier beschriebenen Fall handelt es sich um die indirekte Detektion einer Produktbildung über den Nachweis der Diphosphathydrolyse während der Enzymreaktion.

Die Auswertung erfolgte durch nicht-lineare Regression nach der Hill-Gleichung (Gleichung 3) mit Sigma-Plot 12.3. Die Michaelis-Menten-Kinetik stellt einen Sonderfall der Hill-Kinetik dar, wobei $h = 1$ ist.

$$v = \frac{v_{\max} \cdot [S]^h}{K_m + [S]^h}$$

Gleichung 3: Nicht-lineare Regression nach der Hill-Gleichung

K_m	Substratkonzentration bei halbmaximaler Geschwindigkeit (μM)
v	Geschwindigkeit der Diphosphathydrolyse (nkat mg ⁻¹)
v_{\max}	maximale Geschwindigkeit (nkat mg ⁻¹)
[S]	Substratkonzentration (μM)
h	Hill-Koeffizient

Die Berechnung der Wechselzahl k_{cat} erfolgte nach Gleichung 4.

$$k_{\text{cat}} = \frac{(v_{\max} \cdot [E_1])}{[E_2]}$$

Gleichung 4: Berechnung der Wechselzahl k_{cat}

v_{\max}	maximale Geschwindigkeit ($\mu\text{kat mg}^{-1}$)
E_1	Enzymkonzentration (mg L ⁻¹)
E_2	Enzymkonzentration ($\mu\text{mol L}^{-1}$)

7.5.2 Bestimmung des Produktspektrums der EcUPPS und ThkCPT

Zur Bestimmung der Produktkettenlängen wurden Enzymassays (500 μL) in 2 mL Schraubdeckelgläschen durchgeführt. Dazu wurden 500 μL Assaypuffer (s. h. Abschnitt 7.5.1.1) mit 10 μM Enzym, 50 μM Startersubstrat und 400 μM Elongationssubstrat bei

Raumtemperatur (EcUPPS) oder 65 °C (ThkCPT^[8]) über Nacht inkubiert. Mit 500 µL 1-Butanol wurden die Polyprenyldiphosphate extrahiert. Die Butanolphase wurde in ein neues Glas überführt und unter Stickstoffstrom von dem Lösungsmittel befreit. Die Hydrolyse der Diphosphate zum Polyprenol erfolgte durch Zugabe von 200 µL Hydrolysepuffer (20 % Isopropanol, 4,4 U mL⁻¹ saure Phosphatase aus Kartoffel, 0,1 % Triton X-100, 50 mM Natriumacetat, pH 4,7) und wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert.^[112,207] Die Polyprenole wurden mit 500 µL *n*-Hexan extrahiert und für die DC- oder HPLC-Analyse vorbereitet. Für DC-Experimente, GC/EI-MS und LC/ESI-MS-Analysen wurde die *n*-Hexan-Phase in ein neues Glas überführt, das Lösungsmittel abgedampft und die Produkte erneut in 100 µL *n*-Hexan resuspendiert, um eine Konzentrierung der Probe zu erreichen. Für HPLC-Analysen mit MANT-O-GPP^[138] als Startersubstrat wurde die *n*-Hexan-Phase mit *n*-Hexan 1:3 verdünnt in das HPLC-System injiziert.

7.5.3 Dünnschichtchromatographische Methode zur ersten Kettenlängenbestimmung

Die Dünnschichtchromatographie stellt eine sehr schnelle und relativ sensitive Methode dar, um Substanzen oder Substanzgemische zu analysieren. Da die Analytik der entstehenden Prenyldiphosphatprodukte aufgrund des amphiphilen Molekülcharakters sehr schwierig ist, wurde zur DC-Detektion die Diphosphatgruppe, wie in Abschnitt 7.5.2 beschrieben, hydrolysiert, so dass der produktäquivalente Prenylalkohol analysiert werden konnte. Die Trennung fand an Kieselgel-60 RP-18 (Merck) mit Aceton/H₂O 19:1 (v/v) als mobile Phase statt. Die Detektion der Polyprenole erfolgte mit Ioddampf. Langkettige Polyprenole eluieren dabei mit niedrigerem R_F-Wert, während kurzkettige Polyprenole einen hohen R_F-Wert aufweisen.

7.5.4 Bestimmung des TEAS Produktspektrums

Die Bestimmung des TEAS Produktspektrums erfolge mit Enzymreaktionen (500 µL) in TEAS Assaypuffer (50 mM HEPES/NaOH, 100 mM NaCl, 20 mM MgCl₂, 1 mM DTT, pH 7,5), mit 100 µg mL⁻¹ TEAS und 0,2 mM Prenyldiphosphat in Gläschen mit Schraubverschluss. Die Reaktionen wurden mit 200 µL organischem Lösungsmittel (*n*-Hexan/*n*-Heptan (1:1, v/v) mit 25 µM Naphthalen als internen Standard) überschichtet. Nach 3 h Inkubation bei 22 °C TEAS wurden die Produkte extrahiert (30 s vortexen). Die organische Phase wurde anschließend mittels GC/MS analysiert.

Die Berechnung relativer Produktanteile erfolgte nach Gleichung 5.

$$x = \left(\frac{\left(\frac{A_1}{A_{\text{Standard}}} \right)}{\sum_{k=1}^n A(k)} \right) \cdot 100 \%$$

Gleichung 5: Berechnung relativer Produktanteile eines TEAS-Umsatzes

x	relativer Produktanteil (%)
A_1	Peakfläche des Produktes
A_{Standard}	Peakfläche des Standards (Naphthalen)
$\sum_{k=1}^n A(k)$	Summe aller Produktpeakflächen von A_k ($k = 1-n$)

7.5.5 Enzymatischer Umsatz im präparativen Maßstab

2 mg des Substrates **61** wurden mit 1 mg TEAS in Assaypuffer (3 mL) inkubiert. Der Assay-Ansatz wurde mit 500 μL organischem Lösungsmittel (*n*-Hexan/*n*-Heptan (1:1, v/v)) überschichtet und für 15 h bei 22 °C inkubiert. Nach Zugabe von 4 M Harnstoff wurden die Reaktionsprodukte mit dem organischen Lösungsmittelgemisch für 30 s extrahiert. Die Reaktion erfolgte in Triplikaten wobei die organischen Phasen vereinigt und anschließend das Lösungsmittel unter Stickstoffstrom vorsichtig evaporiert wurde. Erhalten wurden 0,5 mg (Gesamtausbeute: 8,3 %) der Verbindung **61a** als klares Öl. Das Reaktionsprodukt wurde in CDCl_3 gelöst und mittels 1D- und 2D-NMR Spektroskopie analysiert (siehe Abschnitt 7.5.13)

7.5.6 HPLC-Analytik

7.5.6.1 HPLC-Analytik der Polyprenole mit FPP als Startersubstrat

Die HPLC-Analyse^[208] erfolgte an einer Anlage von Merck HITACHI D-7000. Als stationäre Phase wurde eine YMC-ODS AQ Säule (150 x 4,6 mm, 5 μm ; 12 nm, YMC Europe GmbH, Dinslaken) verwendet. Das Injektionsvolumen betrug dabei 5 μL . Die Elution erfolgte mit 1 mL min^{-1} und detektiert wurde bei 210 nm (UV-VIS Detektor: Merck HITACHI L-7420). Die mobile Phase setzte sich aus Laufmittel A (MeOH/ H_2O /Isopropanol 12:1:8 (v/v/v)) und Laufmittel B (*n*-Hexan/Isopropanol 7:3 (v/v)) zusammen.

Laufmittelgradient (LM - Laufmittel)

0 % LM B $\xrightarrow{30 \text{ min}}$ 45 % LM B $\xrightarrow{5 \text{ min}}$ 70 % LM B $\xrightarrow{1 \text{ min}}$ 100 % LM B

7.5.6.2 HPLC-Analytik der Polyprenole mit MANT-O-GPP^[138] als Startersubstrat

Zur selektiven und vor allem sensitiven Detektion von Polyprenolen kann ein alternatives, fluoreszierendes Startersubstrat verwendet werden, (2E,6E)-8-O-(N-methyl-2-aminobenzoyl)-3,7-dimethyl-2,6-octadienyl-diphosphat (MANT-O-GPP) (siehe Abschnitt 4.2.3).^[138]

Die Analyse fand wie in dem Abschnitt 7.5.6.1 beschrieben statt. Injiziert wurden 3 µL pro Probe und die Detektion erfolgte über Fluoreszenz bei einer Einstrahlungswellenlänge von 352 nm durch Messung der Emission bei 420 nm (Fluoreszenzdetektor: Merck HITACHI L-7480).

Die Berechnung der Gesamtproduktbildung der EcUPPS und derer Varianten erfolgte indirekt über die Abnahme des MANT-O-Geraniol-Signals im Vergleich zu einer Kontrollprobe mit denaturiertem Enzym (Gleichung 6).

$$x = 100 \% - \left(\frac{(100 \% \cdot A_{\text{Probe}})}{A_{\text{Kontrolle}}} \right)$$

Gleichung 6: Berechnung der Gesamtproduktbildung

x	relativer Gesamtproduktanteil (%)
A _{Probe}	Peakfläche des MANT-O-Geraniol-Peaks der Probe
A _{Kontrolle}	Peakfläche des MANT-O-Geraniol-Peaks der Kontrolle

7.5.6.3 MANT-O-Geraniol-Kalibriergerade

Zur Bestimmung einer MANT-O-Geraniol Kalibriergerade wurden 50 µM MANT-O-Geraniol in *n*-Hexan seriell (1:1) verdünnt (50 µM-0,098 µM) und je 3 µL jeder Lösung in Doppelbestimmung über HPLC analysiert (siehe Abschnitt 7.5.6.2). Die Auswertung erfolgte in Excel 2010 durch Regression des linearen Messbereichs (0,098 µM-12,5 µM MANT-O-Geraniol bzw. 0-3,8 mg L⁻¹) (Gleichung 7).

$$F_A = 3\,000\,000 \times a + 153547$$

$$R^2 = 0,9979$$

Gleichung 7: MANT-O-Geraniol-Kalibriergerade

- F_A Fläche unter dem Fluoreszenzpeak (AUC)
 a Konzentration von MANT-O-Geraniol (mg L^{-1})

Bestimmung der unteren Nachweisgrenze der HPLC-Methode nach Hubaux und Vos^[209]:

$$x_c = \frac{s_{y,x} \cdot t(0,05; f)}{b} \cdot \sqrt{\frac{1}{N_c} + \frac{1}{N_a} + \frac{\bar{x}^2}{N_b \cdot Q_{xx}}}$$

Gleichung 8: Berechnung der kritischen Konzentration x_c

- x_c kritische Konzentration
 $s_{y,x}$ Reststandardabweichung der Messwerte der Kalibrierung
 N_c Anzahl der Kalibriermessung
 N_b Anzahl der Replikate
 N_a Anzahl der Wiederholbestimmungen
 \bar{x} Mittel der Gehalte der Kalibrierprobe (Mittelpunkt der Kalibriergeraden)
 Q_{xx} Fehlerquadratsumme der x-Werte der Kalibrierung
 f $N_c - 2$
 b Anstieg der Kalibriergerade

Die untere Nachweisgrenze der HPLC-Methode (MDL) für MANT-O-Geraniol wurde berechnet nach Gleichung 9 (siehe Kapitel 4.2.3.2):

$$MDL = 2x_c$$

Gleichung 9: Berechnung der unteren Nachweisgrenze der HPLC-Methode für MANT-O-Geraniol.

7.5.7 LC/MS-Analyse

Zur eindeutigen Kettenlängenbestimmung der Polyprenole wurden LC/MS-Messungen durchgeführt. Nach Injektion von 10 μL der Probe erfolgte die LC-Trennung analog zu Abschnitt 7.5.6.1 an einer HPLC-Anlage von Agilent Technologies (Böblingen) der 1200er Serie. Das LC-System war mit einem API 3200 LC/MS/MS System von AB Sciex

(Darmstadt) gekoppelt. Die ESI-Spektren wurden während eines HPLC-Laufes unter einer Ionensprayspannung von 4,5 kV bzw. -4,5 kV bei 400 °C unter Stickstoffstrom gemessen.

7.5.8 GC/MS-Analyse

7.5.8.1 GC/EI-MS-Analyse der EcUPPS-Produkte mit BPP und CI-BPP

Die GC/EI-MS Analyse erfolgte mit einem GC-MS-QP2010 Ultra von SHIMADZU (Duisburg), welches an einen GC-20100 Gaschromatographen (SHIMADZU, Duisburg) gekoppelt war. Für die EI-MS-Messungen wurde eine Elektronenstoß-Ionisierung von 70 eV und eine Quelltemperatur von 200 °C gewählt. Die Gaschromatographie erfolgte an einer Arylen-ZB-5MS-Säule (Zebron, 30 m x 0,25 mm, 0,25 µm Filmdicke von Phenomenex (Aschaffenburg)). Als Trägergas wurde Helium mit einer Flussrate von 0,96 mL min⁻¹ eingesetzt (splitlose Injektion, Injektortemperatur 220 °C, *Interface*-Temperatur 300 °C, Injektionsvolumen 1 µL). Das Temperaturprogramm startete bei 170 °C und wurde mit einer Heizrate von 10 °C min⁻¹ auf 300 °C erhöht. Die Scan-Raten für Massenspektren im Bereich von 50 - 600 u war 2000 u s⁻¹.

7.5.8.2 GC/EI-MS-Analyse der TEAS Produkte

Die GC/EI-MS-Analyse erfolgte an einem Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra (SHIMADZU, Duisburg) welches an einen GC-20100 Gaschromatographen (SHIMADZU, Duisburg) gekoppelt war. Für die EI-MS-Messungen wurde eine Elektronenstoß-Ionisierung von 70 eV und eine Quelltemperatur von 200 °C gewählt. Die Gaschromatographie erfolgte an einer Arylen-ZB-5MS-Säule (Zebron, 30 m x 0,25 mm, 0,25 µm Filmdicke von Phenomenex (Aschaffenburg)). Als Trägergas wurde Helium mit einer Flussrate von 1,1 mL min⁻¹ eingesetzt (splitlose Injektion, Injektortemperatur 220 °C, *Interface*-Temperatur 300 °C, Injektionsvolumen 1 µL). Das Temperaturprogramm startete bei 40 °C und wurde mit einer Heizrate von 10 °C min⁻¹ auf 300 °C erhöht. Die Scan-Rate für Massenspektren im Bereich von 50-300 u war 909 u s⁻¹.

Die TEAS-Produkte wurden anhand der erwarteten aliphatischen molekularen Massen ($M = M_{\text{Substrat}} - 228,02$, wobei 228,02 die molekulare Masse der Abgangsgruppe $\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}_7\text{P}_2$ darstellt) oder anhand der Molekülmasse des korrespondierenden Alkohols ($M+16$) identifiziert. Retentionsindizes (RI) der eluierten Verbindungen wurden nach Kalibrierung mit einem C₈-C₂₀ Alkanstandardgemisch (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) berechnet (Gleichung 10). Zur Identifizierung der Verbindungen wurden RI-Werte und Daten von Massenspektren mit der NIST/EPA/NIH Mass Spectral Database (NIST 11) sowie

Literaturdaten verglichen.^[54] Dazu wurde das Herstellerprogramm (SHIMADZU, Duisburg) verwendet. Für die Identifizierung von Monoterpenen wurden zusätzlich authentische Standards unter denselben Bedingungen wie die Produkte der Enzymreaktionen gemessen.

Die Berechnung von Kováts-Retentionsindizes^[210] erfolgte nach Gleichung 10.

$$RI = 100 \cdot c + 100 \left(\frac{(t'_R)_x - (t'_R)_c}{(t'_R)_{c+1} - (t'_R)_c} \right)$$

Gleichung 10: Berechnung der Kováts-Retentionsindizes.

RI	Retentionsindex
c	Anzahl der Kohlenstoffe im kleineren n-Alkanstandard
$(t'_R)_x$	Retentionszeit der unbekanntes Substanz
$(t'_R)_c$	Retentionszeit des kleineren n-Alkanstandards
$(t'_R)_{c+1}$	Retentionszeit des größeren n-Alkanstandards

7.5.9 UV/VIS Spektroskopie

Die Bestimmung der Proteinkonzentration für die Circular dichroismus-Spektroskopie erfolgte mit einem Jasco V-560 Spektrophotometer (JASCO, Gross-Umstadt) bei 280 nm. Die Messung der ggf. verdünnten Probe erfolgte im Absorptionsbereich zwischen 0,1 - 1. Als Kontrolle diente reine Pufferlösung. Die Berechnung der Konzentration erfolgte mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes (Gleichung 11), wobei Extinktionskoeffizienten der verschiedenen EcUPPS-Varianten über den EXPASy Server unter Verwendung von ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) berechnet wurden.

$$c = \frac{E_{280 \text{ nm}}}{e \cdot d} \cdot VF$$

Gleichung 11: Berechnung der Proteinkonzentration basierend auf dem Lambert-Beerschen Gesetz.

c	Proteinkonzentration (mol L ⁻¹)
E _{280 nm}	Absorption bei 280 nm

e	molarer Extinktionskoeffizient ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
d	Schichtdicke der Küvette (cm)
VF	Verdünnungsfaktor

7.5.10 Fluoreszenzspektroskopie

Die Messung von Emissionsspektren von MANT-O-GPP und MANT-O-Geraniol erfolgte in einem Mikrotiterplattenspektrophotometer (SpectraMax M5, Molecular Devices, Biberach) in einer 96-Kavitäten-Platte (PP, *Microplate, black, 96 Well, F-Shape*, Greiner Bio-One, Frickenhausen). Im Abstand von 5 nm wurde bei einer Anregungswellenlänge von 352 nm die Emission von Triplikaten von je 50 μL einer 50 μM MANT-O-GPP-Lösung (in Wasser und Assaypuffer (siehe Abschnitt 7.4.3.1) mit 10 μM EcUPPS) oder einer 50 μM MANT-O-Geraniol-Lösung (in *n*-Hexan, HPLC-LMA und HPLC-LMB (siehe Abschnitt 7.5.6)) im Bereich zwischen 380 nm und 600 nm gemessen.

7.5.11 Circulardichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie)

Die Messung der CD-Spektren erfolgte an einem JASCO J-815 Spektropolarimeter (JASCO, Gross-Umstadt). Die Messungen wurden bei 20 °C mit 22-103 μM Protein (Tabelle A 4) in Assaypuffer durchgeführt (Bestimmung der Proteinkonzentration analog Abschnitt 7.5.9). Die Messung der CD-Spektren erfolgte mit 50 nm min^{-1} mit einer Bandbreite von 2 nm sowie einer Integrationszeit von 1 s. Akkumuliert wurden 20 Einzelspektren pro Messung. Gemessen wurde zwischen 190-300 nm in einer Küvette mit 0,01 cm Schichtdicke. Die Messung erfolgte im Vergleich zu reinem Puffer. Die molare Masse der verschiedenen EcUPPS-Varianten wurde über den ExpASy Server unter Verwendung von ProtParam ermittelt (<http://web.expasy.org/protparam/>).

Die durchschnittliche Elliptizität pro Aminosäure in $\text{deg cm}^2 \text{ d mol}^{-1}$ ($(\Theta)_{\text{MRE}}$) wurde mit Gleichung 12 berechnet:

$$\Theta_{\text{MRE}} = \frac{\Theta \cdot M}{10 \cdot c \cdot d \cdot N_A}$$

Gleichung 12: Berechnung der durchschnittlichen Elliptizität pro Aminosäure

Θ	Elliptizität (mdeg)
----------	---------------------

M	molekulare Masse des Proteins (g mol ⁻¹)
c	Proteinkonzentration (mg mL ⁻¹)
d	Schichtdicke der Küvette (cm)
N _A	Anzahl der Peptidbindungen des Proteins

Zur Sekundärstrukturabschätzung im Fern-UV-Bereich (200 bis 240 nm) wurde das Programm K2D3 (<http://www.ogic.ca/projects/k2d3/>) verwendet.^[139]

7.5.12 Polarimetrie

Der Drehwert des Terpenoids **61a** wurde mit Hilfe eines JASCO P-2000 Polarimeters bestimmt. Die Messung erfolgte in CHCl₃ in einer 1 mL Quartzglasküvette (50 mm x 3 mm) bei 598 nm in einer Konzentration von 0,04 w/v % und 25 °C. Die spezifische optische Rotation wurde nach Gleichung 13 berechnet.

$$[\alpha]_{\lambda}^T = \frac{\alpha}{c \cdot d}$$

Gleichung 13: Berechnung der spezifischen optischen Rotation.

[α]	spezifischer Drehwinkel
T	Temperatur
λ	Messwellenlänge (nm)
α	gemessener Drehwinkel
c	Konzentration der Probe (w/v %)
d	Schichtdicke (mm)

7.5.13 Kernmagnetische Resonanzspektroskopie

Zur Messung von ¹H-, ¹³C- sowie 2D-NMR-Spektren stand ein VARIAN UNITY 400 (¹H: 399,94 MHz, ¹³C: 100,57 MHz) bzw. ein VARIAN VNMRS 600 (¹H: 599,83 MHz, ¹³C: 150,84 MHz) zur Verfügung. Die Messung erfolgte bei 22 °C in Chloroform-*d*₁. Die chemischen Verschiebungen sind in ppm angegeben. Internes TMS (¹H: 0 ppm) oder Restsignale undeuterten Chloroforms (¹H: 7,26 ppm, ¹³C: 77 ppm) dienen als Standards zur Referenzierung.

8 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird anhand von zwei Mittelketten-*cis*-Prenyltransferasen (EcUPPS, ThkCPT) sowie einer Terpensynthase (Terpenzyklase, TEAS) die beeindruckende Substratpromiskuität prenylierender Enzyme gezeigt. Prenyltransferasen nutzen ein allylisches Prenyldiphosphat als Startersubstrat, welches durch konsekutive Kondensation von Isopentyldiphosphat (IPP) verlängert wird. Während Prenyltransferasen eine intermolekulare Prenylierung katalysieren, erfolgt durch Terpenzyklasen eine intramolekulare Reaktion, die in der Bildung von linearen bzw. zyklischen Terpenen sowie Terpenalkoholen resultieren kann.

Um ein besseres Verständnis über die Katalyse der EcUPPS zu erlangen, wurde über zielgerichtete Mutageneseexperimente die molekulare Ursache der Kondensationsreaktion von FPP und IPP analysiert. Anhand dieser Versuche kann eine katalytische Diade aus E73 und N74 postuliert werden, die entscheidend an der Protonenabstraktion des Produktintermediates beteiligt ist.

Zusätzlich wurde der Umsatz von 21 synthetischen allylischen Substraten durch die EcUPPS, die als Modellsystem für Mittelketten-CPTs diente, getestet. Die artifiziellen Prenyldiphosphate zeichneten sich unter anderem durch die Verknüpfung zweier Prenyleinheiten über ein Heteroatom oder durch Substitution einer Prenyleinheit gegen ein aromatisches Ringsystem aus. 18 synthetische Startersubstrate wurden mit der EcUPPS umgesetzt, darunter auch das fluoreszente Substrat MANT-O-GPP. Die Analyse der Startersubstrate zeigte, dass besonders die ω -Prenyleinheit, die möglicherweise π - π -Wechselwirkungen zu Aminosäureresten des Enzyms eingeht, einen entscheidenden Einfluss auf die Substraterkennung hat. Es konnte außerdem nachgewiesen werden, dass die Kettenlänge der gebildeten Produkte unabhängig von den getesteten allylischen Substraten ist.

Die Bestimmung des Elongationssubstratspektrums der EcUPPS und der ThkCPT erfolgte mit den artifiziellen homoallylischen Substraten BPP, Cl-BPP, Br-BPP, CF₃-BPP und Ph-BPP. Beide Enzyme konvertieren ausschließlich BPP, Cl-BPP und Br-BPP, wobei mit BPP die Kondensation ausschließlich eines Prenylrestes an das allylische Substrat erfolgt. Ein zweimaliges Durchlaufen des Katalysemechanismus der EcUPPS mit den halogenierten Substraten resultiert in der Bildung zweifachhalogenerter Produkte. Mit der ThkCPT konnte erstmals gezeigt werden, dass die biokatalytische Kondensation von bis zu fünf Einheiten Cl-BPP und Br-BPP an das Startersubstrat möglich ist. Diese vielversprechende Kettenverlängerung dient nun als Grundlage für weitere Experimente

um den Mechanismus der Kettenverlängerung mit artifiziellen Substraten aufzuklären und stellt somit die Basis für die partielle enzymatische Synthese von modifiziertem Kautschuk dar. Zusätzlich ist, durch die Verwendung von MANT-O-GPP als allylisches Substrat und die synthetischen Verlängerungssubstrate, die enzymatische Synthese von komplett artifiziellen Polyprenyldiphosphaten gelungen.

Die Etablierung eines Diphosphatdetektionsassays ermöglichte erstmals die Bestimmung enzymkinetischer Parameter von prenylierenden Enzymen ohne radioaktiv markierte Substrate. So konnte, unabhängig von dem verwendeten Substrat, der Umsatz verschiedener allylischer und homoallylischer Substrate enzymkinetisch untersucht werden. Die Analyse der Produkte erfolgte über eine Kombination aus DC, HPLC und LC/MS. Eine schnelle Bestimmung der Produktbildung gelang durch die Etablierung einer DC-Methode. Die Entwicklung einer fluoreszenzbasierten HPLC-Methode mit dem Substrat MANT-O-GPP ermöglicht außerdem eine sensitive und selektive chromatographische Analyse der CPT-Produkte, da sowohl für die Bestimmung der Produkte von Enzymvarianten als auch für Untersuchungen zum Substratspektrum homoallylischer Verbindungen der Nachweis geringfügig abundanter Produkte notwendig war. Die genaue Bestimmung der Produktkettenlängen erfolgte durch die Weiterentwicklung der HPLC-Methode für die Anwendung an einer LC/ESI-MS-Anlage.

Die Umsetzung natürlicher und synthetischer Prenyldiphosphate durch die 5-*epi*-Aristolochensynthase (TEAS) führte, neben bekannten Terpenen, zur Biosynthese neuartiger aromatischer und zyklischer Mono- und Sesquiterpenoide. FPP wurde hauptsächlich zu dem erwarteten Produkt 5-*epi*-Aristolochen zyklisiert, während mit DMAPP und GGPP keine Produktbildung stattfand. Erstaunlicherweise wurde auch GPP als Substrat akzeptiert. Mit 20 % relativer Umsatzrate im Vergleich zu FPP entstanden, neben linearen Monoterpenen, die zyklischen Produkte Limonen, Terpinolen, Terpinen und Terpeneol. Artifizielle Substrate (**70**, **71**, **75**) bei denen eine Prenyleinheit durch einen aromatischen Ring substituiert wurde, konnten zu den Linalool-ähnlichen Alkoholen konvertiert werden. Eine Zyklisierung blieb allerdings aus. Artifizielle Prenyldiphosphate mit Sauerstoff- (**61**) oder Schwefelinsertion (**76**) führten dagegen zur Bildung von zyklischen Produkten. Dabei erfolgte, nach Abspaltung der Diphosphatfunktion ein Ringschluss zur terminalen Prenyleinheit, welcher nach einer Protonenabstraktion zur Bildung eines Oxagermacrenderivates (**61a**) und eines Thiophenderivates (**76a**) führte. Die Strukturaufklärung von **61a** gelang über GC/MS und NMR-Spektroskopie, während **76a** bereits aus der Umsetzung von **76** mit der Limonensynthase aus *Cannabis sativa* bekannt war.^[154]

9 Abstract

In the present study the outstanding substrate promiscuity of two medium-chain prenyl transferases (EcUPPS, ThkCPT) as well as of a terpene synthase (cyclase, TEAS) is shown. While prenyl transferases use allylic prenyl diphosphates as a starter unit, which are elongated by consecutive condensation steps of isopentenyl diphosphate (IPP), terpene cyclases catalyze an intramolecular reaction, yielding linear or cyclic terpenes, respectively.

Site-directed mutagenesis experiments were performed to gain thorough insights into the molecular mechanism of the substrate condensation reaction. A catalytic diad, consisting of E73 and N74 is postulated which is crucially involved in product formation from the cationic intermediate by proton abstraction.

The EcUPPS, as model for medium-chain prenyl transferases, was used to convert 21 artificial allylic prenyl diphosphates containing aromatic rings or heteroatom insertions. This experiment revealed a crucial role of the ω -prenyl unit of the allylic substrate during substrate recognition which interacts obviously by means of π - π -interactions with amino acids of the enzyme. Amongst the tested compounds, eighteen were accepted by the EcUPPS as starter substrates, e. g. the fluorescent MANT-O-GPP. By means of LC/MS it could be shown that the product chain length is independent of the used starter substrate.

The determination of homoallylic substrate conversion with BPP, Cl-BPP, Br-BPP, CF₃-BPP and Ph-BPP revealed Br-BPP, Cl-BPP and BPP to be substrates of the EcUPPS and ThkCPT. Both enzymes condensed BPP once. EcUPPS catalyzed the reaction of the allylic starter substrate with two molecules of Br-BPP as well as Cl-BPP. The ThkCPT catalyzed the attachment of up to five Br-BPP and Cl-BPP molecules. This promising result can be the basis for further mutagenesis experiments which would possibly help to elucidate the mechanism of chain elongation with artificial elongation substrates. Furthermore, the formation of halogenated ThkCPT-products is the first fundamental step in the partial enzymatic synthesis of modified rubber. The use of a combination of two different artificial substrates, MANT-O-GPP as starter unit and Cl-BPP, Br-BPP or BPP as elongation substrate, enabled the enzymatic synthesis of completely artificial prenyl diphosphates.

Moreover, a diphosphate detection assay was established based on the malachite-green staining of inorganic phosphate. For the first time, measurement of kinetic enzyme parameters was possible independent of the used prenyl diphosphate. For product analysis, a combination of TLC, HPLC and LC/MS was used. Thereby, a TLC method was introduced for a fast determination of the product distribution. Based on the MANT-fluorescence, an HPLC-assay was established, enabling a quite sensitive and selective method to detect low abundant prenyl transferase products. Further development of the HPLC-method for application on a LC/ESI-MS-device enabled the determination of the product chain length.

The conversion of natural and synthetic prenyl diphosphates by the 5-*epi*-aristolochene synthase (TEAS) revealed, besides known terpenes, the formation of novel aromatic and cyclic mono- and sesquiterpenoids. Whilst FPP was transformed into the expected main product 5-*epi*-aristolochene, DMAPP and GGPP are not converted. Surprisingly, GPP was also accepted as a substrate and led to the formation of the cyclic terpenes limonene, terpinolene, terpinene und terpineole, besides linear products with 20 % relative transformation compared to FPP.

Artificial prenyl diphosphates (**70**, **71**, **75**) with a terminal aromatic ring were transformed to the linalool-like alcohols. Their cyclization was not observed. The generation of cyclic products was, however, successful with ether (**61**) or thioether (**76**) derivatives. After enzymatic cleavage of the diphosphate moiety, ring closure occurs to the terminal double bond of the substrate. Subsequent proton abstraction leads to the formation of the oxa-germacrene derivative **61a** and the thiophene derivative **76a**. Structure elucidation of product **61a** was performed by a combination of GC/EI-MS and NMR spectroscopy. The structure of product **76a** was already known from the conversion of **76** by *Cannabis sativa* limonene synthase.^[154]

10 Literaturverzeichnis

- [1] L. Wessjohann, J. Keim, B. Weigel, M. Dippe, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*, 1–7.
- [2] Y. Gao, R. B. Honzatko, R. J. Peters, *Nat. Prod. Rep.* **2012**, *29*, 1153–1175.
- [3] R. Horton, L. Mauran, D. Rawn, G. Scrimgeour, M. Perry, *Principles of Biochemistry, 5th Edition*, Pearson Education, Glenview (USA), **2011**.
- [4] S. C. Roberts, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 387–95.
- [5] L. Wessjohann, S. Zakharova, D. Schulze, J. Kufka, R. Weber, L. Bräuer, W. Brandt, *Chim. Int. J. Chem.* **2009**, *63*, 340–344.
- [6] N. Dudareva, A. Klempien, J. K. Muhlemann, I. Kaplan, K. Muhlemann, *New Phytol.* **2013**, *198*, 16–32.
- [7] R. Eccles, *J. Pharm. Pharmacol.* **1994**, *46*, 618–30.
- [8] D. Pybus, C. Sell, *The Chemistry of Fragrances*, Royal Society Of Chemistry, Cambridge (UK), **1999**.
- [9] M. Miele, A. M. Mumot, A. Zappa, P. Romano, L. Ottaggio, *Phytochem. Rev.* **2012**, *11*, 211–225.
- [10] C. Liu, Y. Zhao, Y. Wang, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *72*, 11–20.
- [11] M. C. Wani, H. L. Taylor, M. E. Wall, P. Coggon, A. T. McPhail, *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 2325–2327.
- [12] S. Krishna, L. Bustamante, R. K. Haynes, H. M. Staines, *Trends Pharmacol. Sci.* **2008**, *29*, 520–7.
- [13] K. C. Wang, S. Ohnuma, *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1529*, 33–48.
- [14] K. Cornish, *Phytochemistry* **2001**, *57*, 1123–1134.
- [15] T. Schmidt, A. Hillebrand, D. Wurbs, D. Wahler, M. Lenders, C. S. Gronover, D. Prüfer, *Plant Mol. Biol. Reports* **2010**, *28*, 277–284.
- [16] T. Schmidt, M. Lenders, A. Hillebrand, N. van Deenen, O. Munt, R. Reichelt, W. Eisenreich, R. Fischer, D. Prüfer, C. S. Gronover, *BMC Biochem.* **2010**, *11*, 1–11.
- [17] L. Ruzicka, *Experientia* **1953**, *9*, 357–396.
- [18] K. Bloch, *Steroids* **1992**, *57*, 378–383.
- [19] T. J. Bach, *Lipids* **1995**, *30*, 191–202.
- [20] L. Zhao, W.-C. Chang, Y. Xiao, H.-W. Liu, P. Liu, *Annu. Rev. Biochem.* **2013**, *82*, 497–530.
- [21] M. Rohmer, *Nat. Prod. Rep.* **1999**, *16*, 565–74.

- [22] S. Kumari, P. Priya, G. Misra, G. Yadav, *Phytochem. Rev.* **2013**, *12*, 255–291.
- [23] J. Pérez-Gil, M. Rodríguez-Concepción, *Biochem. J.* **2013**, *452*, 19–25.
- [24] I. Hale, P. M. O'Neill, N. G. Berry, A. Odom, R. Sharma, *Med. Chem. Comm* **2012**, *3*, 418–433.
- [25] A. J. Wiemer, C.-H. C. Hsiao, D. F. Wiemer, *Curr. Top. Med. Chem.* **2010**, *10*, 1858–1871.
- [26] C. Obiol-Pardo, J. Rubio-Martinez, S. Imperial, *Curr. Opin. Med. Chem.* **2011**, *18*, 1325–1338.
- [27] S. Heuston, M. Begley, C. G. M. Gahan, C. Hill, *Microbiology* **2012**, *158*, 1389–401.
- [28] D. J. Miller, R. K. Allemann, *Nat. Prod. Rep.* **2012**, *29*, 60–71.
- [29] J. Degenhardt, T. G. Köllner, J. Gershenzon, *Phytochemistry* **2009**, *70*, 1621–1637.
- [30] D. J. Tantillo, *Nat. Prod. Rep.* **2011**, *28*, 1035–1053.
- [31] E. A. Zverina, C. L. Lamphear, E. N. Wright, C. a Fierke, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2012**, *16*, 544–552.
- [32] M. D. Resh, *Curr. Biol.* **2013**, *23*, 431–435.
- [33] M. Thurnher, G. Gruenbacher, O. Nussbaumer, *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1831*, 1009–1015.
- [34] X. Yu, X. Xie, S.-M. Li, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *92*, 737–748.
- [35] H.-X. Zou, X. Xie, X.-D. Zheng, S.-M. Li, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *89*, 1443–1451.
- [36] Y. Haagen, I. Unsöld, L. Westrich, B. Gust, S. B. Richard, J. P. Noel, L. Heide, *FEBS Lett.* **2007**, *581*, 2889–2893.
- [37] M. Jeya, H.-J. Moon, J.-K. J.-L. Lee, I.-W. Kim, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *85*, 1653–1663.
- [38] V. Kagan, P. Quinn, *Coenzyme Q: Molecular Mechanisms in Health and Disease*, CRC Press, New York (USA), **2000**.
- [39] L. Heide, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, *13*, 171–179.
- [40] U. Metzger, C. Schall, G. Zocher, I. Unsöld, E. Stec, S.-M. M. Li, L. Heide, T. Stehle, I. Unsöld, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106*, 14309–14.
- [41] S. A. Holstein, R. J. Hohl, *Lipids* **2004**, *39*, 293–309.
- [42] K. Asawatreratanakul, Y.-W. W. Zhang, D. Wititsuwannakul, R. Wititsuwannakul, S. Takahashi, A. Rattanapittayaporn, T. Koyama, *Eur. J. Biochem.* **2003**, *270*, 4671–4680.
- [43] K. Skorupinska-Tudek, J. Wojcik, E. Swiezewska, *Chem. Rec.* **2008**, *8*, 33–45.
- [44] S. Takahashi, T. Koyama, *Chem. Rec.* **2006**, *6*, 194–205.
- [45] S.-M. M. Li, *Phytochemistry* **2009**, *70*, 1746–1757.

- [46] S.-M. M. Li, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *84*, 631–639.
- [47] O. Saleh, Y. Haagen, K. Seeger, L. Heide, *Phytochemistry* **2009**, *70*, 1728–1738.
- [48] C. D. Poulter, *Phytochem. Rev.* **2006**, *5*, 17–26.
- [49] K. Yazaki, K. Sasaki, Y. Tsurumaru, *Phytochemistry* **2009**, *70*, 1739–1745.
- [50] S. Vandermoten, E. Haubruge, M. Cusson, *Cell. Mol. Life Sci.* **2009**, *66*, 3685–3695.
- [51] K. U. Wendt, G. E. Schulz, *Structure* **1998**, *6*, 127–133.
- [52] D. W. Christianson, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3412–3442.
- [53] E. Oldfield, F. Lin, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2012**, *51*, 1124–1137.
- [54] P. E. O'Maille, J. Chappell, J. P. Noel, *Arch. Biochem. Biophys.* **2006**, *448*, 73–82.
- [55] E. Y. Shishova, L. Di Costanzo, D. E. Cane, D. W. Christianson, *Biochemistry* **2007**, *46*, 1941–1951.
- [56] M. Köksal, Y. Jin, R. M. Coates, R. Croteau, D. W. Christianson, M. Ko, *Nature* **2011**, *469*, 116–120.
- [57] J. A. Aaron, D. W. Christianson, *Pure Appl. Chem.* **2010**, *82*, 1585–1597.
- [58] C. A. Lesburg, *Science*. **1997**, *277*, 1820–1824.
- [59] C. M. Starks, K. W. Back, J. Chappell, J. P. Noel, *Science*. **1997**, *277*, 1815–1820.
- [60] J. M. Caruthers, I. Kang, M. J. Rynkiewicz, D. E. Cane, D. W. Christianson, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 25533–25539.
- [61] E. Y. Shishova, F. Yu, D. J. Miller, J. a Faraldos, Y. Zhao, R. M. Coates, R. K. Allemann, D. E. Cane, D. W. Christianson, *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 15431–15439.
- [62] M. J. Rynkiewicz, D. E. Cane, D. W. Christianson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98*, 13543–13548.
- [63] J. A. Aaron, X. Lin, D. E. Cane, D. W. Christianson, *Biochemistry* **2010**, *49*, 1787–1797.
- [64] H. A. Gennadios, V. Gonzalez, L. Di Costanzo, A. Li, F. Yu, D. J. Miller, R. K. Allemann, D. W. Christianson, *Biochemistry* **2009**, *48*, 6175–6183.
- [65] R. P. McAndrew, P. P. Peralta-Yahya, A. DeGiovanni, J. H. Pereira, M. Z. Hadi, J. D. Keasling, P. D. Adams, *Structure* **2011**, *19*, 1876–1884.
- [66] D. Whittington, M. Wise, M. Urbansky, R. M. Coates, R. B. Croteau, D. W. Christianson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 15375–15380.
- [67] K. Zhou, Y. Gao, J. A. Hoy, F. M. Mann, R. B. Honzatko, R. J. Peters, *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 6840–6850.
- [68] M. Köksal, K. Potter, R. J. Peters, D. W. Christianson, *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1840*, 184–190.

- [69] M. Köksal, H. Hu, R. M. Coates, R. J. Peters, D. W. Christianson, *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 431–433.
- [70] R. Thoma, T. Schulz-Gasch, B. D’Arcy, J. Benz, J. Aebi, H. Dehmlow, M. Hennig, M. Stihle, A. Ruf, *Nature* **2004**, *432*, 118–122.
- [71] K. U. Wendt, *Science*. **1997**, *277*, 1811–1815.
- [72] F. Lopez-Gallego, S. Agger, D. Pella, M. Distefano, C. Schmidt-Dannert, *Eur. J. Chem. Biol.* **2010**, *11*, 1093–1106.
- [73] C.-M. Wang, R. Hopson, X. Lin, D. E. Cane, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 8360–8361.
- [74] M. J. Calvert, P. R. Ashton, R. K. Allemann, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 11636–11641.
- [75] K. Back, J. Chappell, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, *93*, 6841–6845.
- [76] C. L. Steele, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 2078–2089.
- [77] H. J. Bouwmeester, T. E. Wallaart, M. H. Janssen, B. van Loo, B. J. Jansen, M. A. Posthumus, C. O. Schmidt, J. W. De Kraker, W. A. König, M. C. Franssen, *Phytochemistry* **1999**, *52*, 843–854.
- [78] T. G. Köllner, C. Schnee, S. Li, A. Svatos, B. Schneider, J. Gershenzon, J. Degenhardt, *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 20779–20788.
- [79] C. G. Jones, J. Moniodis, K. G. Zulak, A. Scaffidi, J. A. Plummer, E. L. Ghisalberti, E. L. Barbour, J. Bohlmann, *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 17445–17454.
- [80] C. R. Benedict, J. L. Lu, D. W. Pettigrew, J. Liu, R. D. Stipanovic, H. J. Williams, *Plant Physiol.* **2001**, *125*, 1754–1765.
- [81] Y. Hu, W. K. W. Chou, R. Hopson, D. E. Cane, *Chem. Biol.* **2011**, *18*, 32–37.
- [82] D. Cane, M. Tandon, *Journal Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5602–5603.
- [83] I. Prosser, I. G. Altug, A. L. Phillips, W. a König, H. J. Bouwmeester, M. H. Beale, *Arch. Biochem. Biophys.* **2004**, *432*, 136–144.
- [84] X. He, D. E. Cane, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 2678–2679.
- [85] S. Picaud, M. Brodelius, P. E. Brodelius, *Phytochemistry* **2005**, *66*, 961–967.
- [86] M. Huang, C. Abel, R. Sohrabi, J. Petri, I. Haupt, J. Cosimano, J. Gershenzon, D. Tholl, *Plant Physiol.* **2010**, *153*, 1293–1310.
- [87] R. Cao, Y. Zhang, F. M. Mann, C. Huang, D. Mukkamala, M. P. Hudock, M. E. Mead, S. Pristic, K. Wang, F.-Y. Lin, et al., *Proteins* **2010**, *78*, 2417–2432.
- [88] D. R. Phillips, J. M. Rasbery, B. Bartel, S. P. Matsuda, *Curr. Opin. Plant Biol.* **2006**, *9*, 305–314.
- [89] R. Xu, G. C. Fazio, S. P. T. Matsuda, *Phytochemistry* **2004**, *65*, 261–291.
- [90] S. Ohnuma, M. Suzuki, T. Nishino, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 14792–14797.

- [91] K. Okada, K. Suzuki, Y. Kamiya, X. Zhu, S. Fujisaki, Y. Nishimura, T. Nishino, T. Nakagawa, M. Kawamukai, H. Matsuda, *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, *1302*, 217–223.
- [92] M. D. Collins, D. Jones, *Microbiol. Rev.* **1981**, *45*, 316–354.
- [93] K.-H. Teng, P.-H. Liang, *Mol. Membr. Biol.* **2012**, *29*, 267–273.
- [94] P.-H. Liang, T.-P. Ko, A. H.-J. Wang, *Eur. J. Biochem.* **2002**, *269*, 3339–3354.
- [95] S. Y. Chang, T. P. Ko, P. H. Liang, A. H. J. Wang, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 29298–29307.
- [96] S. Y. Chang, T. P. Ko, A. P. C. Chen, A. H. J. Wang, P. H. Liang, *Protein Sci.* **2004**, *13*, 971–978.
- [97] M. Fujihashi, Y. W. Zhang, Y. Higuchi, X. Y. Li, T. Koyama, K. Miki, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98*, 4337–4342.
- [98] R.-T. T. Guo, R. Cao, P.-H. H. Liang, T.-P. P. Ko, T.-H. H. Chang, M. P. Hudock, W.-Y. Y. Jeng, C. K.-M. M. Chen, Y. H. Zhang, Y. C. Song, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 10022–10027.
- [99] R.-T. T. Guo, T.-P. P. Ko, A. P.-C. C. Chen, C.-J. J. Kuo, A. H.-J. J. Wang, P.-H. H. Liang, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 20762–20774.
- [100] Y. Kharel, S. Takahashi, S. Yamashita, T. Koyama, *Febs J.* **2006**, *273*, 647–657.
- [101] S. Peukert, Y. Sun, R. Zhang, B. Hurley, M. Sabio, X. Shen, C. Gray, J. Dzink-Fox, J. Tao, R. Cebula, et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 1840–1844.
- [102] W. Wang, C. Dong, M. McNeil, D. Kaur, S. Mahapatra, D. C. Crick, J. H. Naismith, *J. Mol. Biol.* **2008**, *381*, 129–140.
- [103] C.-J. Kuo, R.-T. Guo, I.-L. Lu, H.-G. Liu, S.-Y. Wu, T.-P. Ko, A. H.-J. Wang, P.-H. Liang, *J. Biomed. Biotechnol.* **2008**, *2008*, 1–6.
- [104] R.-T. Guo, C.-J. Kuo, C.-C. Chou, T.-P. Ko, H.-L. Shr, P.-H. Liang, A. H.-J. Wang, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 4903–4912.
- [105] H. Y. Sun, T. P. Ko, C. J. Kuo, R. T. Guo, C. C. Chou, P. H. Liang, A. H. J. Wang, *J. Bacteriol.* **2005**, *187*, 8137–8148.
- [106] D. Sasaki, M. Fujihashi, N. Okuyama, Y. Kobayashi, M. Noike, T. Koyama, K. Miki, *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 3729–3740.
- [107] F.-L. Hsieh, T.-H. Chang, T.-P. Ko, A. H.-J. Wang, *Plant Physiol.* **2011**, *155*, 1079–1090.
- [108] W. Zhu, Y. Zhang, W. Sinko, M. E. Hensler, J. Olson, K. J. Molohon, S. Lindert, R. Cao, K. Li, K. Wang, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, *110*, 123–128.
- [109] Y.-P. P. Lu, H.-G. G. Liu, P.-H. H. Liang, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2009**, *379*, 351–355.
- [110] Y. Kharel, T. Koyama, *Nat. Prod. Rep.* **2003**, *20*, 111–118.
- [111] T. P. Ko, Y. K. Chen, H. Robinson, P. C. Tsai, Y. G. Gao, A. P. Chen, a H. Wang, P. H. Liang, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 47474–47482.

- [112] Y.-P. Lu, H.-G. Liu, K.-H. Teng, P.-H. Liang, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010**, *400*, 758–762.
- [113] K.-H. Teng, P.-H. Liang, *Bioorg. Chem.* **2012**, *43*, 51–57.
- [114] J. Post, N. van Deenen, J. Fricke, N. Kowalski, D. Wurbs, H. Schaller, W. Eisenreich, C. Huber, R. M. Twyman, D. Prüfer, et al., *Plant Physiol.* **2012**, *158*, 1406–1417.
- [115] K. Cornish, *Methods Enzymol.* **2012**, *4*, 63–82.
- [116] J. B. van Beilen, Y. Poirier, *Trends Biotechnol.* **2007**, *25*, 522–529.
- [117] K. H. Han, D. H. Shin, J. Yang, I. J. Kim, S. K. Oh, K. S. Chow, *Tree Physiol.* **2000**, *20*, 503–510.
- [118] D. Wititsuwaannakul, A. Rattanapittayaporn, T. Koyama, R. Wititsuwaannakul, *Macromol. Biosci.* **2004**, *4*, 314–323.
- [119] K. Cornish, W. Xie, *Methods Enzymol.* **2012**, *515*, 63–82.
- [120] S. Takahashi, H.-J. Lee, S. Yamashita, T. Koyama, *Plant Biotechnol.* **2012**, *29*, 411–417.
- [121] C. K. Chiang, W. Xie, C. McMahan, J. E. Puskas, *Rubber Chem. Technol.* **2011**, *84*, 166–177.
- [122] Y. Tanaka, *Rubber Chem. Technol.* **2001**, *74*, 355–375.
- [123] Y. Tanaka, S. Kawahara, E. Aik-Hwee, A. Takei, N. Ohya, *Acta Biochim. Pol.* **1994**, *41*, 303–309.
- [124] H. Mooibroek, K. Cornish, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2000**, *53*, 355–365.
- [125] B. S. Bushman, A. A. Scholte, K. Cornish, D. J. Scott, J. L. Brichta, J. C. Vederas, O. Ochoa, R. W. Michelmore, D. K. Shintani, S. J. Knapp, *Phytochemistry* **2006**, *67*, 2590–2596.
- [126] J. E. Puskas, E. Gautriaud, A. Deffieux, J. P. Kennedy, *Prog. Polym. Sci.* **2006**, *31*, 533–548.
- [127] J. E. Puskas, F. Peruch, A. Deffieux, D. E. Dabney, C. Wesdemiotis, H. B. Li, A. Lindsay, *J. Polym. Sci. Part A-Polymer Chem.* **2009**, *47*, 2172–2180.
- [128] K. Skorupinska-Tudek, J. Wojcik, E. Swiezewska, *Chem. Rec.* **2008**, *8*, 33–45.
- [129] M. Sato, K. Sato, S. Nishikawa, A. Hirata, J. Kato, A. Nakano, *Mol. Cell. Biol.* **1999**, *19*, 471–483.
- [130] S. Mookerjee, T. Coolbear, M. L. Sarkar, *Can. J. Biochem. Cell Biol.* **1983**, *61*, 1032–1040.
- [131] M. F. Feldman, M. Wacker, M. Hernandez, P. G. Hitchen, C. L. Marolda, M. Kowarik, H. R. Morris, A. Dell, M. A. Valvano, M. Aebi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 3016–3021.
- [132] C. M. Allen, *Methods Enzymol.* **1985**, *110*, 281–299.
- [133] P. H. Liang, *Biochemistry* **2009**, *48*, 6562–6570.

- [134] W. Sinko, C. de Oliveira, S. Williams, A. Van Wynsberghe, J. D. Durrant, R. Cao, E. Oldfield, J. A. McCammon, *Chem. Biol. Drug Des.* **2011**, *77*, 412–420.
- [135] P. Goloubinoff, A. Gatenby, G. Lorimer, *Nature* **1989**, *337*, 44–47.
- [136] A. A. Baykov, O. A. Evtushenko, S. M. Avaeva, *Anal. Biochem.* **1988**, *171*, 266–270.
- [137] L. V Lee, B. Granda, K. Dean, J. Tao, E. Liu, R. Zhang, S. Peukert, S. Wattanasin, X. Xie, N. S. Ryder, et al., *Biochemistry* **2010**, *49*, 5366–5376.
- [138] K.-H. Teng, A. P.-C. Chen, C.-J. Kuo, Y.-C. Li, H.-G. Liu, C.-T. Chen, P.-H. Liang, *Anal. Biochem.* **2011**, *417*, 136–141.
- [139] C. Louis-Jeune, M. A. Andrade-Navarro, C. Perez-Iratxeta, *Proteins* **2012**, *80*, 374–381.
- [140] M. Nagaki, M. Nakada, T. Musashi, J. Kawakami, T. Endo, Y. Maki, T. Koyama, *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2009**, *59*, 225–230.
- [141] G. Popják, J. L. Rabinowitz, J. M. Baron, *Biochem. J.* **1969**, *113*, 861–868.
- [142] C. D. Poulter, J. C. Argyle, E. A. Mash, *J. Biol. Chem.* **1978**, *253*, 7227–7233.
- [143] N. A. Heaps, C. D. Poulter, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 1838–1843.
- [144] C. D. Poulter, D. M. Satterwhite, *Biochemistry* **1977**, *16*, 5470–5478.
- [145] M. Nagaki, T. Ichijo, R. Kobashi, Y. Yagihashi, T. Musashi, J. Kawakami, N. Ohya, T. Gotoh, H. Sagami, *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2012**, *80*, 1–6.
- [146] S. Ohnuma, M. Ito, T. Koyama, K. Ogura, *Tetrahedron* **1989**, *45*, 6145–6160.
- [147] A. P.-C. Chen, Y.-H. Chen, H.-P. Liu, Y.-C. Li, C.-T. Chen, P.-H. Liang, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 15217–15224.
- [148] D. K. Lujan, J. A. Stanziale, A. Z. Mostafavi, S. Sharma, J. M. Troutman, *Carbohydr. Res.* **2012**, *359*, 44–53.
- [149] W. S. Xie, C. M. McMahan, A. J. Degraw, M. D. Distefano, K. Cornish, M. C. Whalen, D. K. Shintani, *Phytochemistry* **2008**, *69*, 2539–2545.
- [150] A. P. C. Chen, S. Y. Chang, Y. C. Lin, Y. S. Sun, C. T. Chen, A. H. J. Wang, P. H. Liang, *Biochem. J.* **2005**, *386*, 169–176.
- [151] Y. H. Chen, A. P. C. Chen, C. T. Chen, A. H. J. Wang, P. H. Liang, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 7369–7376.
- [152] M. Nagaki, K. Kimura, H. Kimura, Y. Maki, E. Goto, T. Nishino, T. Koyama, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 2157–2159.
- [153] M. Nagaki, K. Kuwahara, K. Kimura, J. Kawakami, Y. Maki, S. Ito, N. Morita, T. Nishino, T. Koyama, *J. Mol. Catal. B-Enzymatic* **2003**, *22*, 97–103.
- [154] R. Weber, Dissertation: Synthese und biokatalytische Umsetzung von Prenyldiphosphaten, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, **2010**.
- [155] R. Eisenthal, M. J. Danson, D. W. Hough, *Trends Biotechnol.* **2007**, *25*, 247–249.

- [156] Y. Yamada, W. Fukuda, K. Hirooka, T. Hiromoto, J.-I. Nakayama, T. Imanaka, E.-I. Fukusaki, S. Fujiwara, *J. Biotechnol.* **2009**, *143*, 151–156.
- [157] M. Nagaki, H. Kannari, J. Ishibashi, Y. Maki, T. Nishino, K. Ogura, T. Koyama, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 2549–2554.
- [158] M. Nagaki, S. Sato, Y. Maki, T. Nishino, T. Koyama, *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2000**, *9*, 33–38.
- [159] T. Koyama, M. Ito, S. Ohnuma, K. Ogura, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 3807–3810.
- [160] M. Nagaki, H. Yamamoto, A. Takahashi, Y. Maki, J. Ishibashi, T. Nishino, T. Koyama, *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2002**, *17*, 81–89.
- [161] K. Fujikura, Y. Maki, N. Ohya, M. Satoh, T. Koyama, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2008**, *72*, 851–855.
- [162] M. Nagaki, T. Koyamat, T. Nishino, K. Shimizu, Y. Maki, K. Ogura, *Chem. Lett.* **1997**, *26*, 497–498.
- [163] J. E. Puskas, C. McMahan, A. Deffieux, J. P. Kennedy, *Biosynthesis of Polyisoprenoids*, **2011**, U.S. Patent US 2011/0201771 A1.
- [164] W. H. Carothers, I. Williams, A. M. Collins, J. E. Kirby, *J. Am. Chem. Soc.* **1931**, *53*, 4203–4225.
- [165] J. T. Maynard, W. E. Mochel, *J. Polym. Sci.* **1954**, *13*, 251–262.
- [166] S. Hauptmann, *Organische Chemie*, VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig, **1985**.
- [167] A. Peters, Elastomermarkt mit Perspektiven, *K-Zeitung Online*, **24.06.2013**, Onlinezugriff: <http://www.k-zeitung.de/elastomermarkt-mit-perspektive/150/1193/68340/>
- [168] M. N. Zook, J. Chappell, J. A. Kirc, **1992**, *31*, 3441–3445.
- [169] Y. Inoue, A. Shiraishi, T. Hada, K. Hirose, H. Hamashima, J. Shimada, *FEMS Microbiol. Lett.* **2004**, *237*, 325–331.
- [170] R. Kramer, W.-R. Abraham, *Phytochem. Rev.* **2011**, *11*, 15–37.
- [171] M. de Bruyne, T. C. Baker, *J. Chem. Ecol.* **2008**, *34*, 882–897.
- [172] R. Nagel, A. Berasategui, C. Paetz, J. Gershenzon, A. Schmidt, *Plant Physiol.* **2014**, *164*, 555–69.
- [173] B. Anderson, J. S. Terblanche, A. G. Ellis, *BMC Evol. Biol.* **2010**, *10*, 204.
- [174] D. E. Cane, J. S. Oliver, P. H. M. Harrison, C. Abell, B. R. Hubbard, C. T. Kane, R. Lattman, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 4513–4524.
- [175] H. R. Ansari, A. J. Curtis, *J. Soc. Cosmet. Chem.* **1974**, *25*, 203–231.
- [176] K. A. Rising, C. M. Starks, J. P. Noel, J. Chappell, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 1861–1866.
- [177] I. Ahuja, R. Kissen, A. M. Bones, *Trends Plant Sci.* **2012**, *17*, 73–90.

- [178] A. S. Mialoundama, D. Heintz, D. Debayle, A. Rahier, B. Camara, F. Bouvier, *Plant Physiol.* **2009**, *150*, 1556–1566.
- [179] S. Takahashi, Y.-S. Yeo, Y. Zhao, P. E. O'Maille, B. T. Greenhagen, J. P. Noel, R. M. Coates, J. Chappell, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 31744–31754.
- [180] P. J. Facchini, J. Chappell, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1992**, *89*, 11088–11092.
- [181] P. E. O'Maille, J. Chappell, J. P. Noel, *Arch. Biochem. Biophys.* **2006**, *448*, 73–82.
- [182] J. P. Noel, N. Dellas, J. A. Faraldos, M. Zhao, B. A. Hess, L. Smentek, R. M. Coates, P. E. O'Maille, *Acs Chem. Biol.* **2010**, *5*, 377–392.
- [183] J. A. Faraldos, P. E. O'Maille, N. Dellas, J. P. Noel, R. M. Coates, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 4281–4289.
- [184] S. C. Hammer, J. M. Dominicus, P.-O. Syrén, B. M. Nestl, B. Hauer, *Tetrahedron* **2012**, *68*, 7624–7629.
- [185] M. Seitz, P.-O. Syrén, L. Steiner, J. Klebensberger, B. M. Nestl, B. Hauer, *Eur. J. Chem. Biol.* **2013**, *14*, 436–439.
- [186] S. C. Hammer, P.-O. Syrén, M. Seitz, B. M. Nestl, B. Hauer, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*, 293–300.
- [187] D. J. Schenk, C. M. Starks, K. R. Manna, J. Chappell, J. P. Noel, R. M. Coates, *Arch. Biochem. Biophys.* **2006**, *448*, 31–44.
- [188] D. E. Cane, P. C. Prabhakaran, E. J. Salaski, P. H. M. Harrison, H. Noguchi, B. J. Rawlings, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8914–8916.
- [189] I. Alchanati, J. A. A. Patel, J. Liu, C. R. Benedict, R. D. Stipanovic, A. a. Bell, Y. Cui, C. W. Magill, *Phytochemistry* **1998**, *47*, 961–967.
- [190] K. Nabeta, K. Kigure, H. Okuyama, T. Takasawa, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1995**, 1935–1939.
- [191] D. E. Cane, M. Tandon, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 5355–5358.
- [192] D. E. Cane, *Chem. Rev.* **1990**, *90*, 1089–1103.
- [193] C. O. Schmidt, H. J. Bouwmeester, S. Franke, W. A. Ko, *Chirality* **1999**, *11*, 353–362.
- [194] S. Picaud, P. Mercke, X. He, O. Sterner, M. Brodelius, D. E. Cane, P. E. Brodelius, *Arch. Biochem. Biophys.* **2006**, *448*, 150–155.
- [195] D. J. Miller, F. Yu, R. K. Allemann, *Eur. J. Chem. Biol.* **2007**, *8*, 1819–1825.
- [196] D. J. Miller, F. Yu, D. W. Knight, R. K. Allemann, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 962–975.
- [197] J. A. Faraldos, Y. Zhao, P. E. O'Maille, J. P. Noel, R. M. Coates, *Eur. J. Chem. Biol.* **2007**, *8*, 1826–1833.
- [198] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2001**, *40*, 2004–2021.
- [199] B. Weigel, Diplomarbeit: Biotransformationen Mit *Cannabis sativa* Monoterpensynthesen, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, **2011**.

- [200] C. Nájera, J. M. Sansano, *Tetrahedron* **1994**, *50*, 5829–5844.
- [201] J. A. Faraldos, Y. X. Zhao, P. E. O'Maille, J. P. Noel, R. M. Coates, *Chembiochem* **2007**, *8*, 1826–1833.
- [202] M. A. Dessoy, Dissertation: Synthesis and enzymatic coupling of prenyldiphosphates and benzoates, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, **2003**.
- [203] A. A. Scholte, L. M. Eubanks, C. D. Poulter, J. C. Vederas, *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 763–770.
- [204] H. Inoue, H. Nojima, H. Okayama, *Gene* **1990**, *96*, 23–28.
- [205] U. K. Laemmli, *Nature* **1970**, *227*, 680–685.
- [206] P. E. O'Maille, J. Chappell, J. P. Noel, *Anal. Biochem.* **2004**, *335*, 210–217.
- [207] H. Fujii, T. Koyama, K. Ogura, *Biochim. Biophys. Acta* **1982**, *712*, 716–718.
- [208] K. Skorupińska-Tudek, T. Bieńkowski, O. Olszowska, M. Furmanowa, T. Chojnacki, W. Danikiewicz, E. Swiezewska, *Lipids* **2003**, *38*, 981–990.
- [209] A. Hubaux, G. Vos, *Anal. Chem.* **1970**, *42*, 849–855.
- [210] E. Kováts, *Helv. Chim. Acta* **1958**, *41*, 1915–1932.

11 Anhang

Tabelle A 1 : Labor- und Verbrauchsmaterialien	
Autoklav	H+P Varioklav Thermo Scientific, Bonn
Biologische Sicherheitswerkbank	Thermo Scientific Hera Safe, Langenselbold
Circulardichroismus Spektrometer	Jasco J-815, Easton; USA
Elektrophoresekammer (horizontal)	Biometra Compact XS/S, Göttingen
Elektrophoresekammer (vertikal)	Biometra Compact M, Göttingen
	Biometra Minigel-Twin, Göttingen
Entsalzungssäule PD-10 (14,5 x 50 mm, Säulenvolumen 13,5 mL, Sephadex G-25, Partikelgröße 85-260 µm)	GE Healthcare Life Sciences, Freiburg
Flockeneisbereiter	Scotsman AF 100, Vernon Hills; USA
FPLC	ÄKTApurifier, GE Healthcare Life Sciences, Freiburg
	Schaltventileinheit: BOX-900
	pH-Detektor: pH/C-900
	UV-VIS-Detektor: UV-900
	Pumpe: P-900
GC/EI-Massenspektrometer	Fraktionssammler: Frac-950
	Kühlschrank: Unichromat 1500, UniEquip, München
	Gaschromatograph: GC-20100
Geldokumentationsanlage	GC-Massenspektrometer: GC-MS-QP2010 Ultra, SHIMADZU, Duisburg
	Biodocanalyze Biometra, Göttingen
HPLC	Merck HITACHI D-7000
	UV-VIS Detektor: Merck HITACHI L-7420
	Fluoreszenzdetektor: Merck HITACHI L-7480
	Autosampler: Merck HITACHI L-7250
Inkubationsschüttler	Infors HT Multitron, Bottmingen; Schweiz
	Infors HT Unitron, Bottmingen; Schweiz
	Infors HT Ecotron, Bottmingen; Schweiz
Kulturröhrchen	Röhre 13 mL, 100x16 mm, PP, Sarstedt, Nümbrecht
Kryoröhrchen	Nalgene [®] cryogenic vials, 2.0 mL, steril, Nalgene Nunc International, New York; USA
LC/ESI-Massenspektrometer	HPLC-Anlage: Agilent Technologies der 1200er Serie, Böblingen
	LC/MS/MS-Massenspektrometer: API 3200™, AB SCIEX, Darmstadt
Leerkartuschen	TALON [®] 2 mL Disposable Gravity Column, Clontech Mountain View; USA
Magnetrührer	MR 3001 K, Heidolph, Schwabach
Mikrotiterplatte	96 MicroWell plate, Nunc, flacher Boden, ohne Deckel, VWR, Poole; England
Mikrotiterplattenspektrophotometer	SpectraMax M5, Molecular Devices, Biberach
Mischer/Vortexer	Vortex Genie [®] 2 G560E, Scientific Industries, Inc., New York; USA
NMR	VARIAN UNITY 400, Agilent Technologies, Böblingen
	VARIAN VNMR5 600, Agilent Technologies, Böblingen
Petrischale	Schale 94/16 L.Mg.ON steril, Greiner Bio-One, Frickenhausen
pH-Meter	FiveGo™ FG2, Mettler Toledo, Gießen
Photometer	Eppendorf Bio Photometer Plus, Hamburg

Pipetten	Eppendorf Research, Hamburg
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße	Röhre 50mL, 114x28mm, PP, Sarstedt, Nümbrecht Röhre 15mL, 120x17mm, PP, Sarstedt, Nümbrecht Reagiergefäß 1,5mL, Sarstedt, Nümbrecht SafeSeal Reagiergefäß 2mL, PP, Sarstedt, Nümbrecht Multiply®-Pro Gefäß 0,2mL, PP, Sarstedt, Nümbrecht
Spannungsquelle	Biometra Standard Power Pack P25, Göttingen
Taumler	Heidolph Polymax 1040, Schwabach
Thermoblock	Biometra TSc ThermoShaker, Göttingen
Thermocycler	Biometra T Professional Basic Gradient, Göttingen
Ultraschall-Homogenisator	Bandelin electronic SonoPuls HD 3200, Berlin
UV/VIS Spektrometer	Jasco V-560, Easton; USA
Wasseraufbereitungsanlage	MilliQ-biocel, Millipore, Billerica; USA
Wasserbad	Lauda A100, Lauda-Königshofen
Zentrifugen	Eppendorf 5424, Hamburg Hettich Mikro 120, Kirchleugern Beckman Avanti™ J-E, Rotoren: JA-10, JA-16.250, JS-5.3, Krefeld

Tabelle A 2: Verwendete Chemikalien.	
10x <i>Pfu</i> Puffer mit 20 mM MgSO ₄	Thermo Scientific, Darmstadt
10x <i>FastDigest</i> [®] Puffer	Thermo Scientific, Darmstadt
10x <i>DreamTaq</i> [™] Puffer	Thermo Scientific, Darmstadt
6x DNA <i>Loading Dye</i>	Thermo Scientific, Darmstadt
Acrylamid/Bisacrylamid (40 %)	Merck, Darmstadt
Agar	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat	Carl Roth, Karlsruhe
Ampicillin, Natriumsalz	Carl Roth, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe
BIOMOL [®] -Reagenz	ENZO Life Sciences, Lörrach
Bradford-Reagenz Roti [®] -Quant	Carl Roth, Karlsruhe
1-Butanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Chloramphenicol	Carl Roth, Karlsruhe
<i>Coomassie</i> Brilliantblau G-250	Carl Roth, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
dNTP-Mix (10 mM pro dNTP)	Thermo Scientific, Darmstadt
Essigsäure, Rotipuran [®] 100 %	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid (10 mg mL ⁻¹)	VWR, Poole; England
GC-Alkanstandards (C ₈ -C ₂₀)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
GC-Monoterpenstandards (zur GC-Analyse oder höchstmöglicher Reinheitsgrad)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
<i>Gene-Ruler</i> [™] 1 kb DNA Ladder	Thermo Scientific, Darmstadt
Glycerin	Carl Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Carl Roth, Karlsruhe
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-piperazinyl)-ethansulfonsäure (Hepes)	Carl Roth, Karlsruhe
Imidazol	Carl Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Carl Roth, Karlsruhe
Kanamycinsulfat	Carl Roth, Karlsruhe
K ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	Carl Roth, Karlsruhe
N ₂	Air Liquide, Düsseldorf
NaCl	Carl Roth, Karlsruhe
NaOH	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe
<i>n</i> -Heptan, HPLC <i>Grade</i>	Carl Roth, Karlsruhe
<i>n</i> -Hexan, GC <i>Ultra Grade</i>	Carl Roth, Karlsruhe
<i>PageRuler</i> [™] <i>Plus Prestained Protein Ladder</i>	Thermo Scientific, Darmstadt

<i>Roti</i> [®] -Quant (Bradford-Reagenz)	Carl Roth, Karlsruhe
Salzsäure (37 %), rauchend	Carl Roth, Karlsruhe
TALON [®] Metallaffinitätsmatrix	Clontech, Mountain View; USA
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Carl Roth, Karlsruhe
Tris-Hydrochlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Triton X-100, reinst	Carl Roth, Karlsruhe
Trypton/Pepton	Carl Roth, Karlsruhe
Tween [®] 20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Naphthalen	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Tabelle A 3: Liste der verwendeten Prenyldiphosphate.		
Strukturformel	Substanzname/ Substanznummer	chemische Bezeichnung
	GGPP	(2E,6E,10E)-Geranylgeranyldiphosphat
	(E,E)-FPP oder kurz FPP	(2E,6E)-Farnesyldiphosphat
	(Z,E)-FPP	(2Z,6E)-Farnesyldiphosphat
	GPP	(2E)-Geranyldiphosphat
	DMAPP	Dimethylallyldiphosphat
	IPP	Isopentenylidiphosphat
	MANT-O-Geraniol	(2E,6E)-3,7-Dimethyl-8-[(N-methylantranoyl)oxy]octa-2,6-dienol
	MANT-O-GPP/ 23	(2E,6E)-3,7-Dimethyl-8-[(N-methylantranoyl)oxy]octa-2,6-dienyldiphosphat
	BPP/ 41	But-3-enyldiphosphat
	Br-BPP/ 42	3-Brombut-3-enyldiphosphat
	53	(2E,6E)-3,7-Dimethyl-8-(phenylthio)octa-2,6-dienyldiphosphat
	54	(2E,6E)-3,7-Dimethylundeca-2,6,10-trienyldiphosphat
	55	5-(Furan-2-yl)-3-methylpent-2-enyldiphosphat
	56	(2E)-3,11-Dimethyldodeca-2,10-dien-6-inyldiphosphat
	57	(2E,6E)-3,7-Dimethyl-8-[(3-methylbut-2-enyl)thio]octa-2,6-dienyldiphosphat
	58	(2E,6E)-3,7-Dimethyl-8-[(tert-butyl)dimethylsilyloxy]octa-2,6-dienyldiphosphat
	59	(2E,6E)-9-(Furan-2-yl)-3,7-Dimethyl-9-oxonona-2,6-dienyldiphosphat
	60	3-Methyl-5-(thiophen-2-yl)pent-2-enyldiphosphat
	61	(2E)-4-[(2E)-3,7-Dimethylocta-2,6-dienyl]oxy-3-methylbut-2-enyldiphosphat
	62	(2E,6E)-3,7-Dimethylundec-2,6-dien-10-inyldiphosphat
	63	(2E,6E)-3,7-Dimethyl-9-(3-methylthiophen-2-yl)-9-oxonona-2,6-dienyldiphosphat
	64	(2E,6E)-3,7-Dimethyl-9-oxo-9-(thiophen-2-yl)nona-2,6-dienyldiphosphat

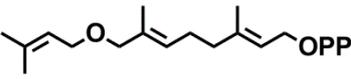
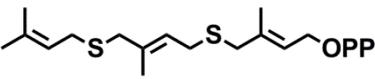
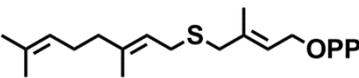
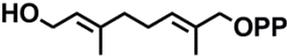
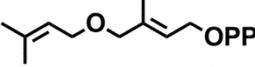
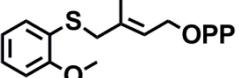
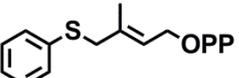
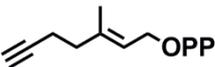
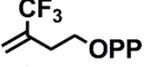
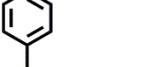
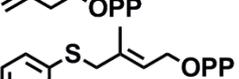
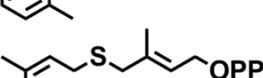
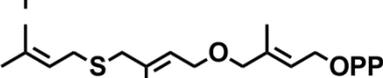
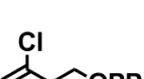
Strukturformel	Substanzname/ Substanznummer	chemische Bezeichnung
	65	(2E,6E)-3,7-Dimethyl-8-[(3-methylbut-2-enyl)oxy]octa-2,6-dienyldiphosphat
	66	(2E)-3-Methyl-4-[(2E)-3-methyl-4-[(3-methylbut-2-enyl)thio]but-2-enyl]thio]but-2-enyldiphosphat
	67	(2E)-4-[(2E)-3,7-Dimethylocta-2,6-dienyl]thio]-3-methylbut-2-enyldiphosphat
	68	(2E,6E)-2,6-Dimethyl
	69	(2E)-3-Methyl-4-[(3-methylbut-2-enyl)oxy]but-2-enyldiphosphat
	70	(2E)-3-Methyl-4-[(2-methoxyphenyl)thio]but-2-enyldiphosphat
	71	(2E)-3-Methyl-4-(phenylthio)but-2-enyldiphosphat
	72	(2E)-3-Methylhept-2-en-6-inyldiphosphat
	CF ₃ -BPP/ 73	3-(Trifluormethyl)but-3-enyldiphosphat
	Ph-BPP/ 74	3-Phenylbut-3-enyldiphosphat
	75	(2E)-3-Methyl-4-[(2-methylphenyl)thio]but-2-enyldiphosphat
	76	(2E)-3-Methyl-4-[(3-methylbut-2-enyl)thio]but-2-enyldiphosphat
	77	(2E)-3-Methyl-4-[(2E)-3-methyl-4-[(3-methylbut-2-enyl)thio]but-2-enyl]oxy]but-2-enyldiphosphat
	Cl-BPP/ 78	3-Chlorbut-3-enyldiphosphat
$PP = R - \overset{\overset{O}{\parallel}}{\underset{\underset{O^-}{\parallel}}{P}} - O - \overset{\overset{O}{\parallel}}{\underset{\underset{O^-}{\parallel}}{P}} - OH$		

Tabelle A 4: Proteinkonzentrationsbestimmung der EcUPPS-Varianten über UV/VIS-Spektroskopie bei 280 nm

<i>EcUPPS-Variante</i>	<i>c (μM)</i>
WT	22,2
S71A	50,7
S71C	67,1
S71D	40,0
S72C	59,7
E73A	86,2
E73D	69,5
E73D/N74Q	60,8
N74A	103,1
N74Q	95,1

Tabelle A 5: Produktanalyse der EcUPPS Assays mit artifiziellen und natürlichen Startersubstraten sowie IPP als Elongationssubstrat mittels LC/ESI-MS.*m/z* = Masse-zu-Ladungsverhältnis, *n* = Anzahl der IPP-Elongationen (IPP-Elong.)

<i>Substrat</i>	<i>C</i> ₄₅ ⁻ Analogon <i>m/z</i>	IPP- Elong. <i>n</i>	<i>C</i> ₅₀ ⁻ Analogon <i>m/z</i>	IPP- Elong. <i>n</i>	<i>C</i> ₅₅ ⁻ Analogon <i>m/z</i>	IPP- Elong. <i>n</i>	<i>C</i> ₆₀ ⁻ Analogon <i>m/z</i>	IPP- Elong. <i>n</i>	<i>C</i> ₆₅ ⁻ Analogon <i>m/z</i>	IPP- Elong. <i>n</i>
<i>E,E</i> -FPP	653,6 (M+Na ⁺)	6	721,7 (M+Na ⁺)	7	789,6 (M+Na ⁺)	8	857,8 (M+Na ⁺)	9	-	-
<i>Z,E</i> -FPP	-	-	-	-	789,7 (M+Na ⁺) 805,2 (M+K ⁺)	8	857,8 (M+Na ⁺)	9	-	-
62	-	-	-	-	829,5 (M+Na ⁺) 845,6 (M+K ⁺)	8	897,5 (M+Na ⁺) 913,6 (M+K ⁺)	9	-	-
GGPP	-	-	-	-	789,6 (M+Na ⁺)	7	857,7 (M+Na ⁺)	8	-	-
54	-	-	693,9 (M+Na ⁺)	7	761,8 (M+Na ⁺)	8	829,9 (M+Na ⁺)	9	-	-
55	-	-	-	-	-	-	869,5 (M+Na ⁺) 885,7 (M+K ⁺)	10	-	-
56	-	-	-	-	773,6 (M+Na ⁺)	8	-	-	-	-
57	-	-	821,7 (M+Na ⁺)	7	889,8 (M+Na ⁺)	8	-	-	-	-
58	-	-	-	-	851,8 (M+Na ⁺)	8	920,1 (M+Na ⁺)	9	-	-
59	-	-	-	-	-	-	883,9 (M+Na ⁺) 899,6 (M+K ⁺)	9	951,7 (M+Na ⁺) 967,9 (M+K ⁺)	10
60	-	-	-	-	817,7 (M+Na ⁺)	9	-	-	-	-
61	-	-	-	-	? (M+Na ⁺) 821,6 (M+K ⁺)	8	873,6 (M+Na ⁺) 889,6 (M+K ⁺)	9	-	-
62	-	-	-	-	759,5 (M+Na ⁺) 775,5 (M+K ⁺)	8	827,7 (M+Na ⁺) 843,4 (M+K ⁺)	9	-	-

<i>Substrat</i>	C ₄₅ ⁻ Analogon <i>m/z</i>	IPP- Elong. <i>n</i>	C ₅₀ ⁻ Analogon <i>m/z</i>	IPP- Elong. <i>n</i>	C ₅₅ ⁻ Analogon <i>m/z</i>	IPP- Elong. <i>n</i>	C ₆₀ ⁻ Analogon <i>m/z</i>	IPP- Elong. <i>n</i>	C ₆₅ ⁻ Analogon <i>m/z</i>	IPP- Elong. <i>n</i>
MANT-O- GPP	-		802,5 (M+Na ⁺)	7	870,6 (M+Na ⁺) 886,6 (M+K ⁺)	8	938,7 (M+Na ⁺) 954,5 (M+K ⁺)	9	-	
63	-		-		845,5 (M+Na ⁺) 861,5 (M+K ⁺)	8	913,5 (M+Na ⁺) 929,6 (M+K ⁺)	9	-	
64	-		-		831,9 (M+Na ⁺) 847,8 (M+K ⁺)	8	899,5 (M+Na ⁺) 915,5 (M+K ⁺)	9	967,6 (M+Na ⁺) 983,7 (M+K ⁺)	10
65	-		-		873,8 (M+Na ⁺)	8	941,9 (M+Na ⁺)	9	-	
GPP	-		-		789,4 (M+Na ⁺) 805,6 (M+K ⁺)	9	-		-	

>EcUPPS-Aminosäuresequenz

MHHHHHVMLSATQPLSEKLPAGCRHVAIIMDGNRWAKKQGGKIRAFGHKAGAKSVRRRAVSFAANNNGIEALTLYAFSSSENWNRPAQEVSA
 MELFWALDSEVKSLHRHNVRLRIIGDTSRFNSRLQERIRKSEALTAGNTGLTLNIAANYGGRWDIVQGVRQLAEKVQQGNLQPDQIDEMLN
 QHVCMHELAPVDLVRTGGEHRISNFWLLWQIAYAEFYFTDVLWPDFDEQDFEGALNAFANRERRFGGTEPGDETA*

>ThkCPT-Aminosäuresequenz

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMEFMLYRLVSHIPILFKPVYDAYESYLLEKVKSGNIPKHVAIIMDGNRRWARKLEKPPWYGHVLFSGSKLEEIL
 EWCRELNIRTLTVYAFSTENFKRSKEEVEALMNLFEKFKELVQDERVHRYGIRVNVLGRKDMLPENVRKAAEEAERATRKYSNYNLNIALAYG
 GRSEIADAVREIVRDVLEGGKIKPEDIDEEAIKRYLYYPNMPDPDIVRTGGEVRISNFWLLYQIAYSEFFVDVYFPEFRKIDFLRIIREFQKRQRRFG
 RGSLEHHHHHH*

>TEAS-Aminosäuresequenz

MVHHHHHMMASAAVANYEEEEIVRPVADFSPSLWGDQFLSFSIKNQVAEKYAKEIEALKEQTRNMLLATGMKLADTLNLDITIERLGISYHFEKEI
 DDILDQIYNQNSCNLDLCTSAQFRLLRQHGFNISPEIFSKFQDENGKFKESLASDVLGLNLYEASHVRTHADDILEDALAFSTIHLESAAPHLK
 SPLREQVTHALEQCLHKGVPVETRFVFISSYDKEQSKNNVLLRFKLDLDFNLLQMLHKQELAQVSRWWKDLDFVTTLPYARDRVVECYFWALG
 VYFEPQYSQARVMLVKTISMISIVDDTFDAYGTVKELEAYTDAIQRWDINEIDRLPDYMKISYKAILDLYKDYEKELSSAGRSHIVCHAIERMKEVV
 RNYNVESTWFIEGYTPPVSEYLSNALATTTYYYLATTSYLGMKSATEQDFEWLSKNPKILEASVIICRVIDDTATYEVEKSRGQIATGIECCMRDY
 GISTKEAMAKFQNAETAWKDINEGLLRPTPVSTEFLLPILNLARIVEVYIHNLDGYTHPEKVLKPHIINLLVDSIKI*

Abbildung A 1: Aminosäuresequenzen der verwendeten Enzyme. *, Stopcodon.

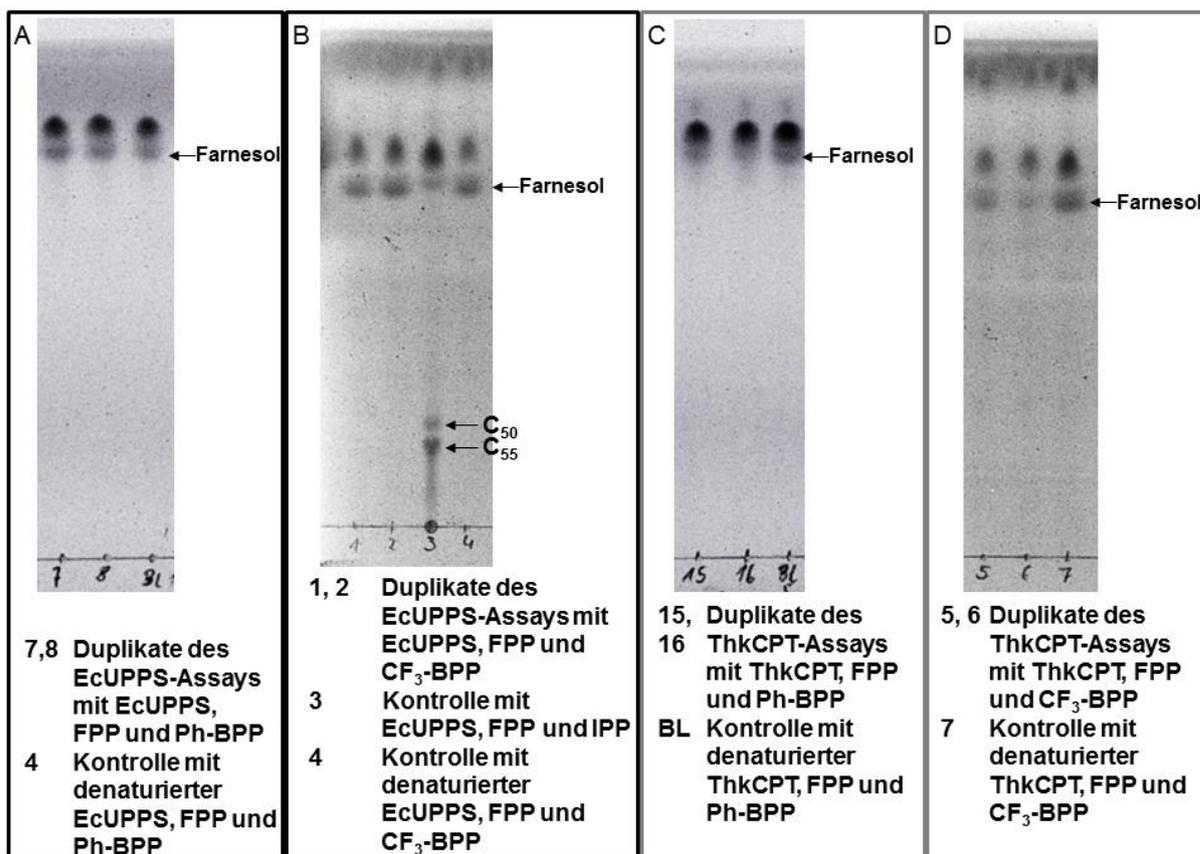
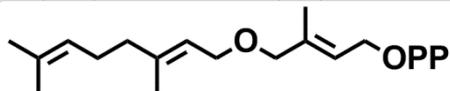
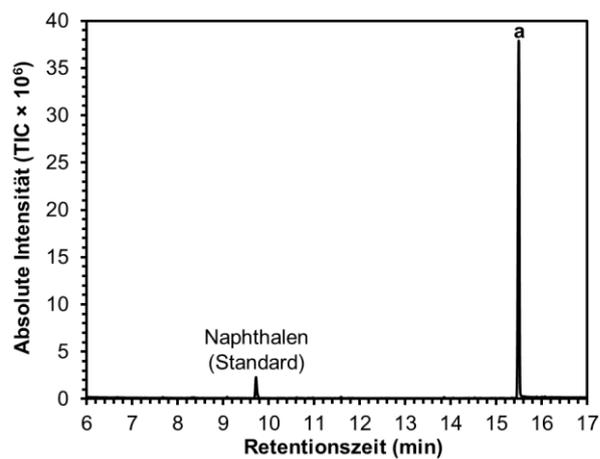


Abbildung A 2: DC-Analyse der EcUPPS- und ThkCPT-Enzymreaktionen mit FPP als Startersubstrat und Ph-BPP (A, C) sowie CF₃-BPP (B, D) als Elongationssubstrat. DC-Material: RP-18; Laufmittelsystem: Aceton/H₂O 19:1 (v/v), Nachweisreagenz: Ioddampf.

Tabelle A 6: GC/EI-MS-Chromatogramm (TIC) der Produkte einer TEAS-Reaktion mit dazugehörigen EI-Spektren der einzelnen Produkte mit Substrat **61**.
m/z, Masse-zu-Ladungsverhältnis; RT, Retentionszeit; RI, Retentionsindex



Substrat **61**



Produkt 61a
RT: 15,492 min
RI: 1535

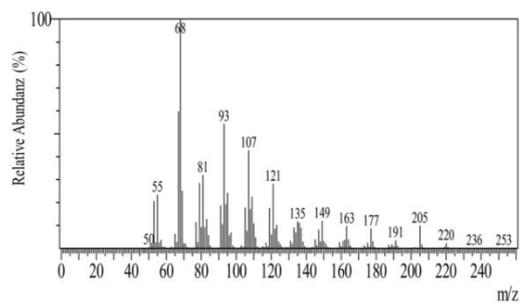
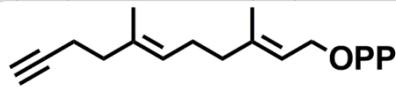
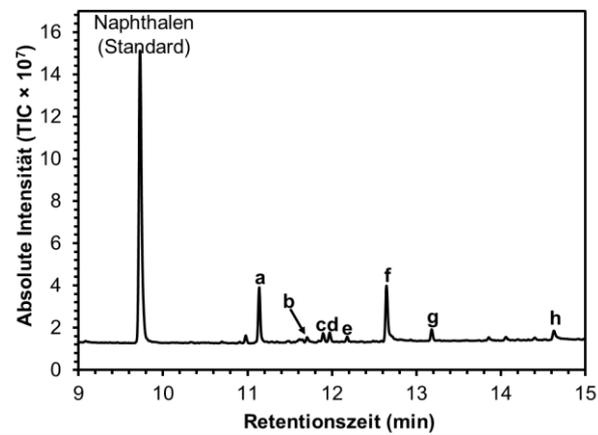
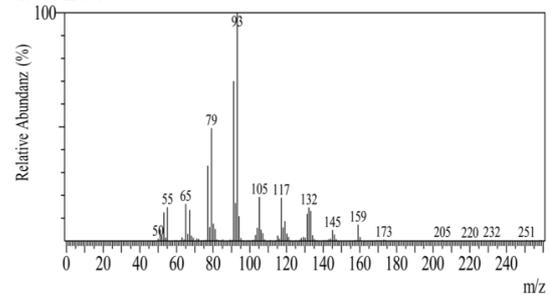


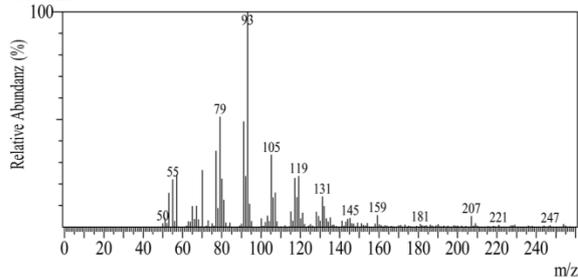
Tabelle A 7: GC/EI-MS-Chromatogramm (TIC) der Produkte einer TEAS-Reaktion mit dazugehörigen EI-Spektren der einzelnen Produkte mit Substrat **62**.
m/z, Masse-zu-Ladungsverhältnis; RT, Retentionszeit; RI, Retentionsindex

Substrat **62****Produkt 62a**

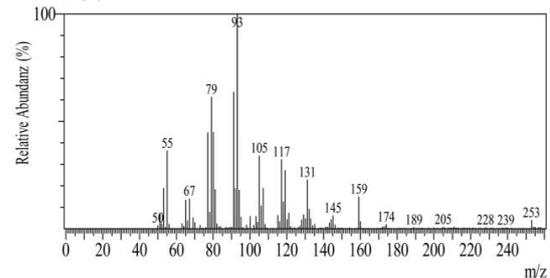
RT: 11,139 min
RI: 1211

**Produkt 62b**

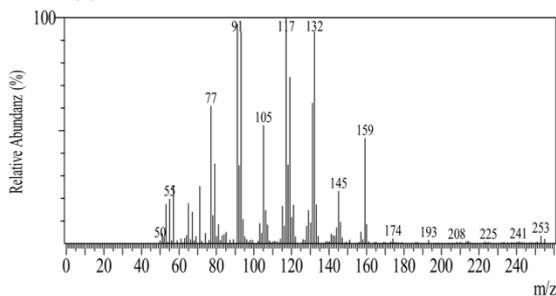
RT: 11,705 min
RI: 1250

**Produkt 62c**

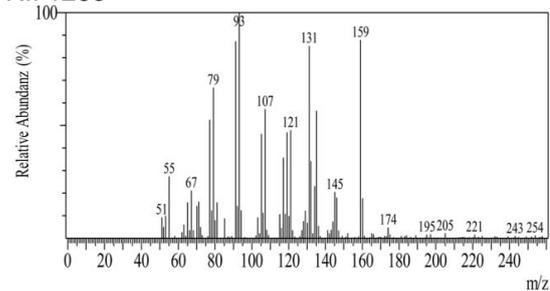
RT: 11,896 min
RI: 1263

**Produkt 62d**

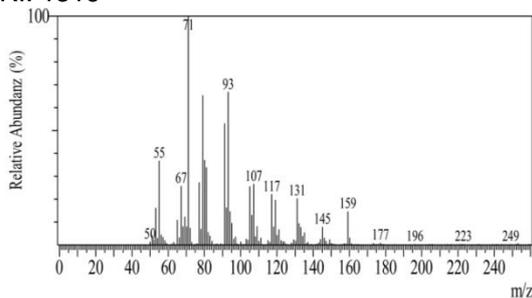
RT: 11,972 min
RI: 1269

**Produkt 62e**

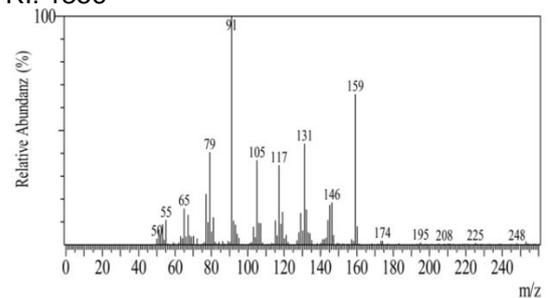
RT: 12,181 min
RI: 1283

**Produkt 62f**

RT: 12,647 min
RI: 1316

**Produkt 62g**

RT: 13,181 min
RI: 1356



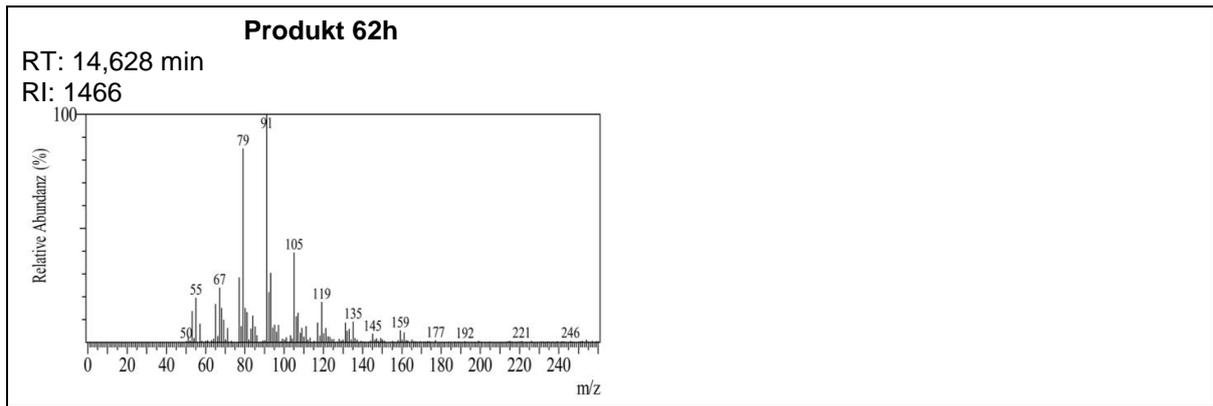
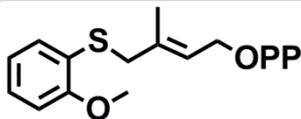
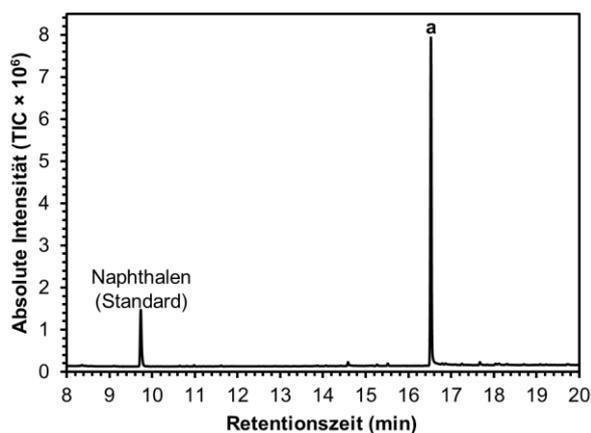
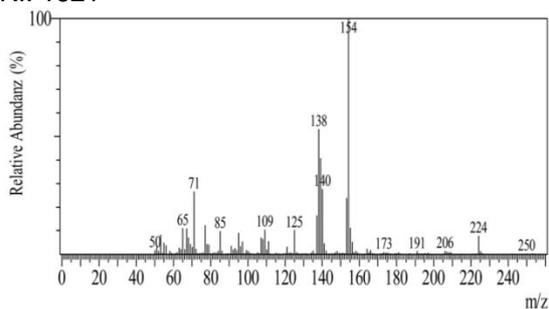


Tabelle A 8: GC/EI-MS-Chromatogramm (TIC) der Produkte einer TEAS-Reaktion mit dazugehörigen EI-Spektren der einzelnen Produkte mit Substrat **70**.
 m/z, Masse-zu-Ladungsverhältnis; RT, Retentionszeit; RI, Retentionsindex; *, die Synthese erfolgte durch Dipl.-Biochem. Benjamin Weigel 2011 am IPB.

Substrat **70****Produkt 70a**

RT: 16,521 min

RI: 1621

**Referenzspektrum Produkt 70a*:**

Methoxyphenylthionalool

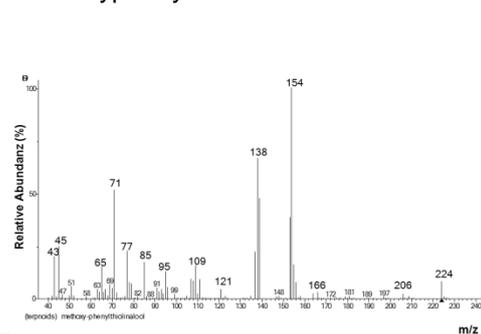
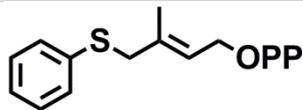
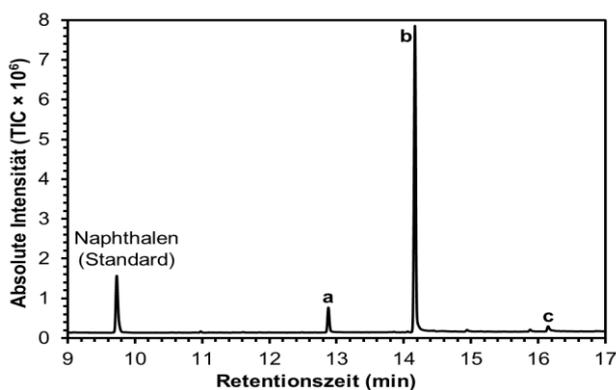


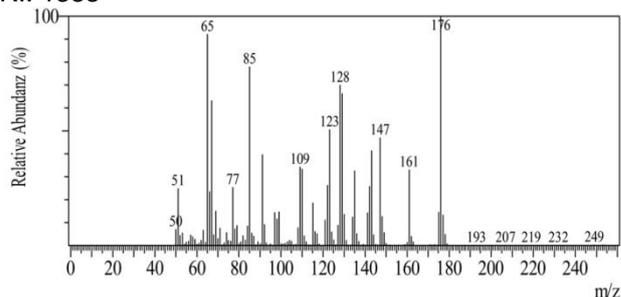
Tabelle A 9: GC/EI-MS-Chromatogramm (TIC) der Produkte einer TEAS-Reaktion mit dazugehörigen EI-Spektren der einzelnen Produkte mit Substrat **71**.

m/z, Masse-zu-Ladungsverhältnis; RT, Retentionszeit; RI, Retentionsindex; *, die Synthese erfolgte durch Dipl.-Biochem. Benjamin Weigel 2011 am IPB.

Substrat **71****Produkt 71a** (3-Methyl-4-(phenylthio)-1,3-butadien)

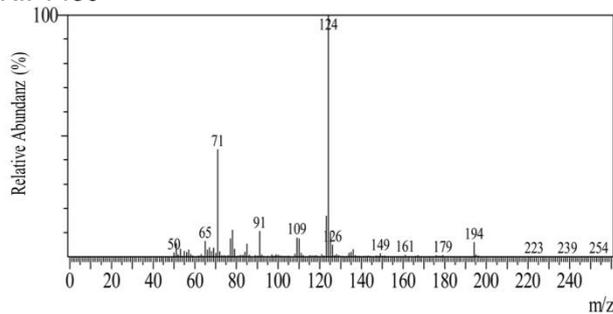
RT: 12,872 min

RI: 1333

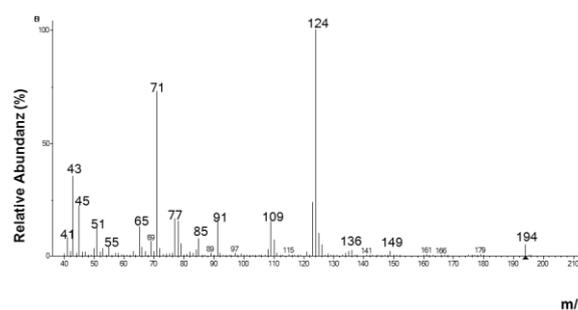
**Produkt 71b**

RT: 14,163 min

RI: 1430

Referenzspektrum Produkt **71b***:

Phenylthiolinalool

**Produkt 71c**(3-Methyl-4-(phenylthio)-(*E*)-2-buten-1-ol)

RT: 16,140 min

RI: 1588

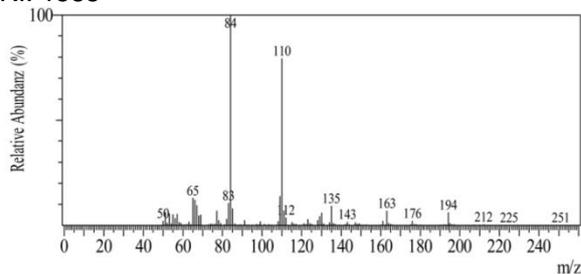
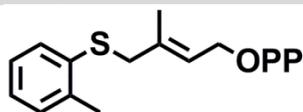
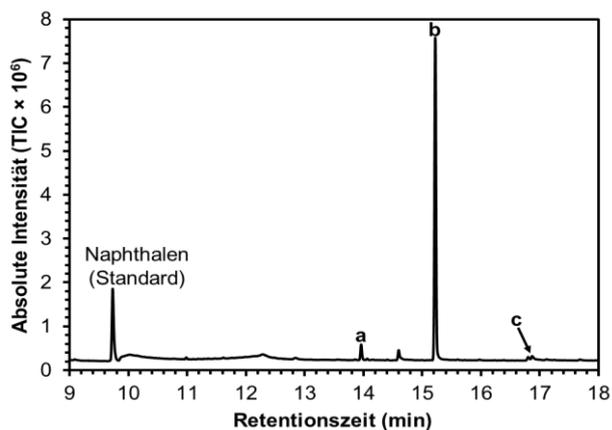
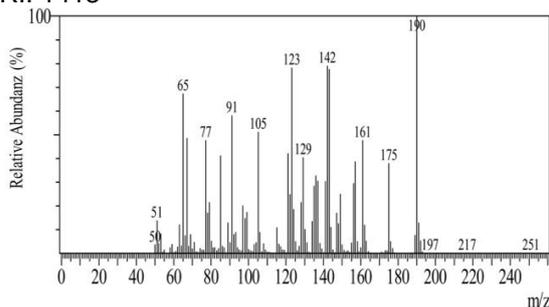


Tabelle A 10: GC/EI-MS-Chromatogramm (TIC) der Produkte einer TEAS-Reaktion mit dazugehörigen EI-Spektren der einzelnen Produkte mit Substrat **75**.
m/z, Masse-zu-Ladungsverhältnis; RT, Retentionszeit; RI, Retentionsindex; *, die Synthese erfolgte durch Dipl.-Biochem. Benjamin Weigel 2011 am IPB.

Substrat **75****Produkt 75a**

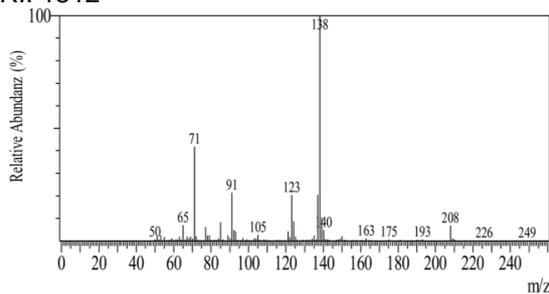
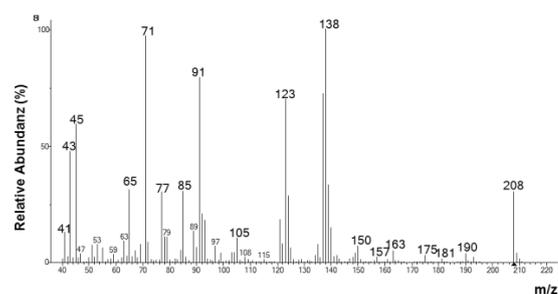
RT: 13,954 min

RI: 1413

**Produkt 75b**

RT: 15,217 min

RI: 1512

**Referenzspektrum Produkt 75b*:**
Methylphenylthiolinalool**Produkt 75c**

RT: 16,802 min

RI: 1645

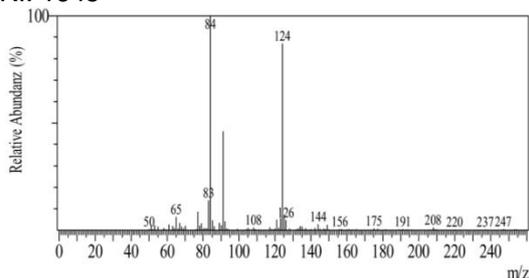
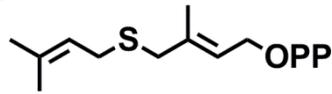
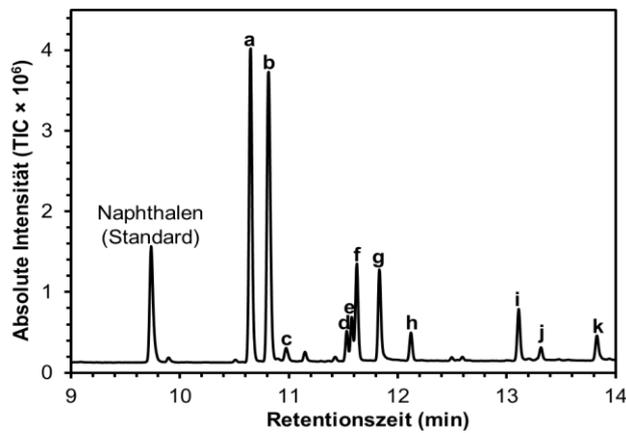
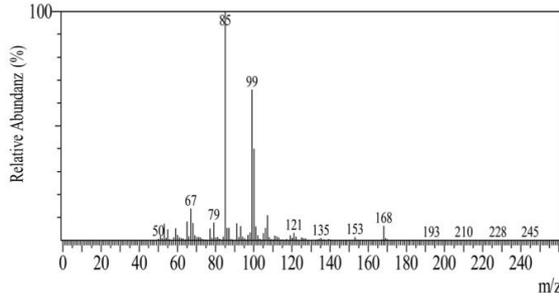
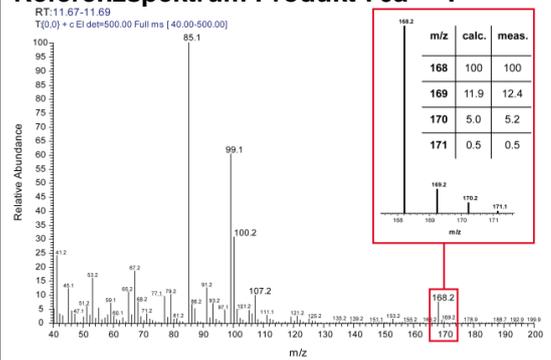


Tabelle A 11: GC/EI-MS-Chromatogramm (TIC) der Produkte einer TEAS-Reaktion mit dazugehörigen EI-Spektren der einzelnen Produkte mit Substrat **76**.
m/z, Masse-zu-Ladungsverhältnis; RT, Retentionszeit; RI, Retentionsindex

Substrat **76**Produkt **76a**

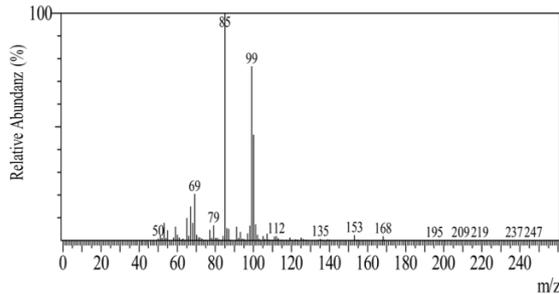
RT: 10,646 min

RI: 1178

Referenzspektrum Produkt **76a**^[154]:Produkt **76b**

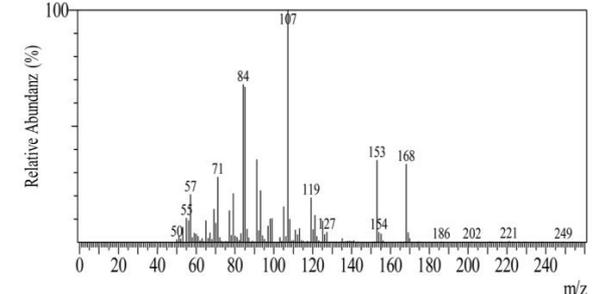
RT: 10,820 min

RI: 1189

Produkt **76c**

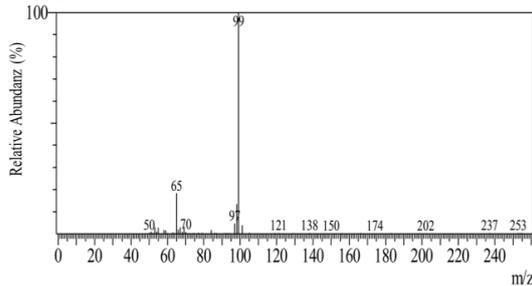
RT: 10,975 min

RI: 1200

Produkt **76d**

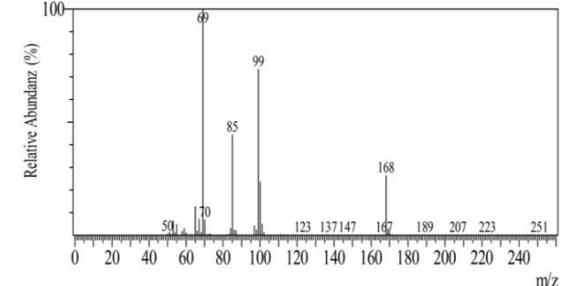
RT: 11,531 min

RI: 1238

Produkt **76e**

RT: 11,577 min

RI: 1241



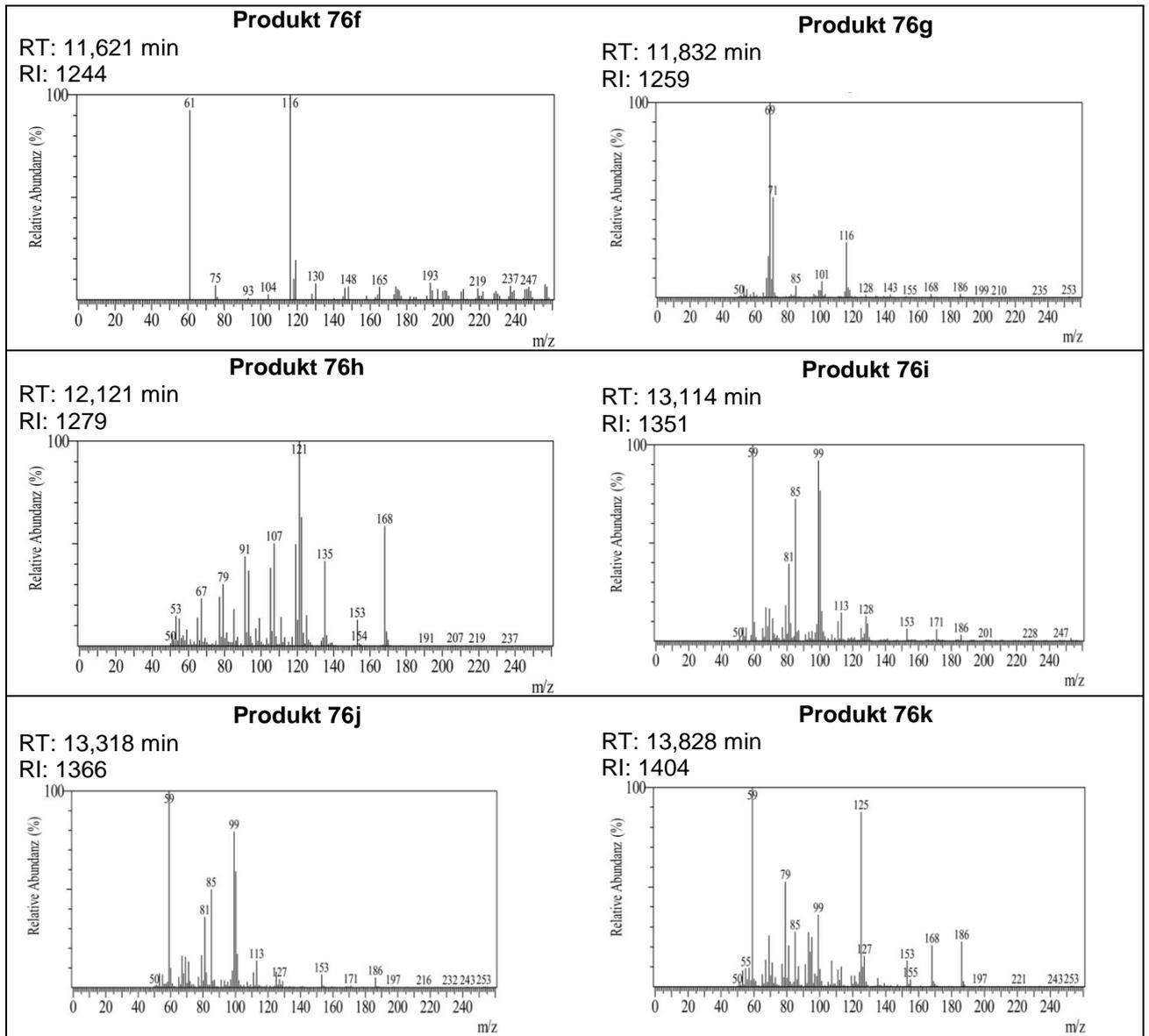
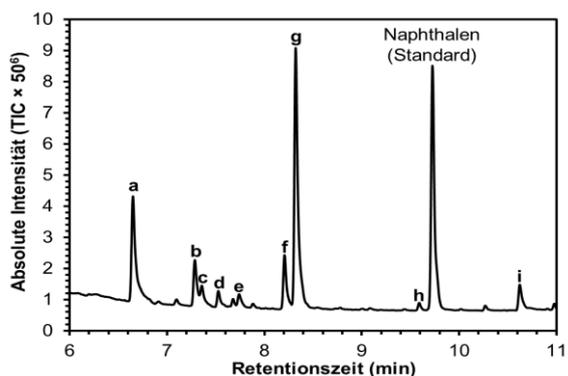
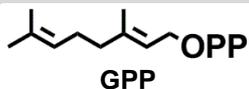
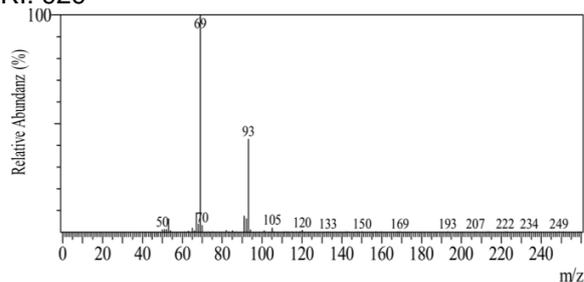


Tabelle A 12: GC/EI-MS-Chromatogramm (TIC) der Produkte einer TEAS-Reaktion mit dazugehörigen EI-Spektren der einzelnen Produkte mit Substrat **GPP**.
 m/z, Masse-zu-Ladungsverhältnis; RT, Retentionszeit; RI, Retentionsindex, ^a, gemessene Referenzspektren authentischer Standards.



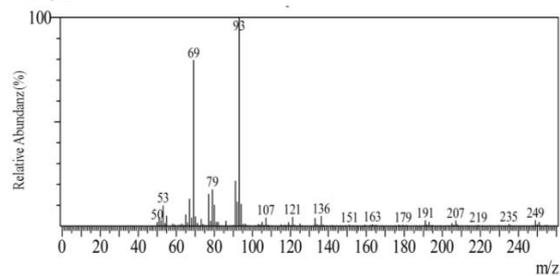
Produkt GPP-a (β -Myrcen)

RT: 6,655 min
RI: 929



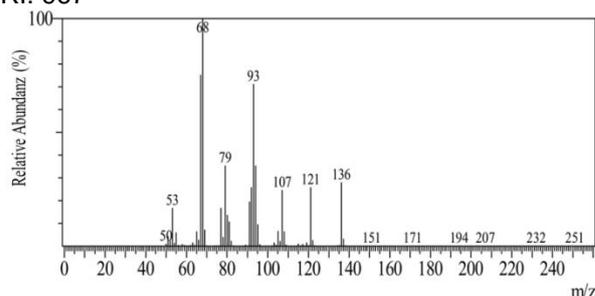
Referenzspektrum Myrcen*:

RT: 6,627
RI: 927



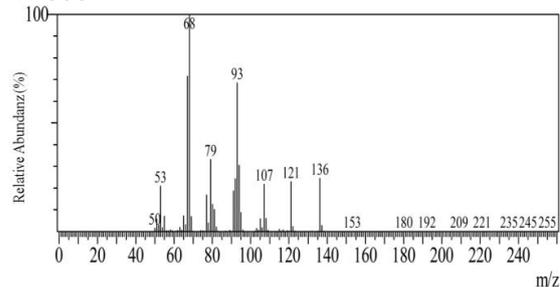
Produkt GPP-b ((-)-Limonen)

RT: 7,294 min
RI: 967



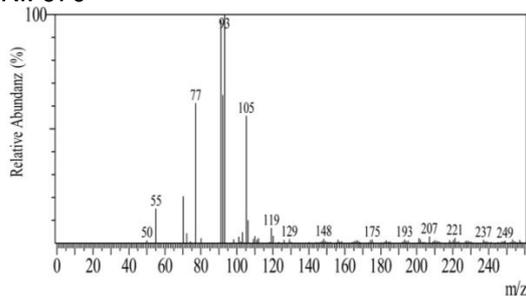
Referenzspektrum (-)-Limonen*:

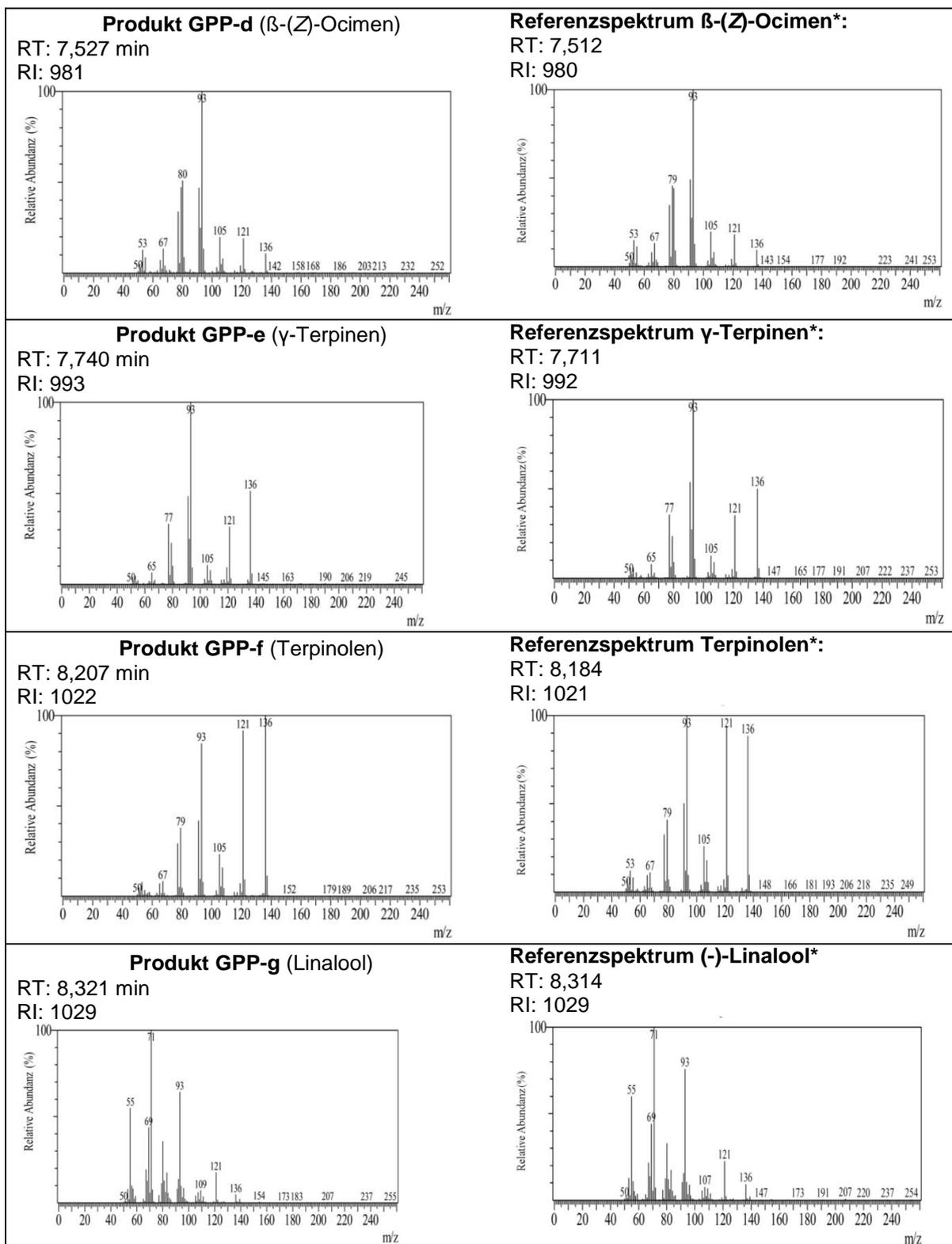
RT: 7,260
RI: 965



Produkt GPP-c

RT: 7,357 min
RI: 970





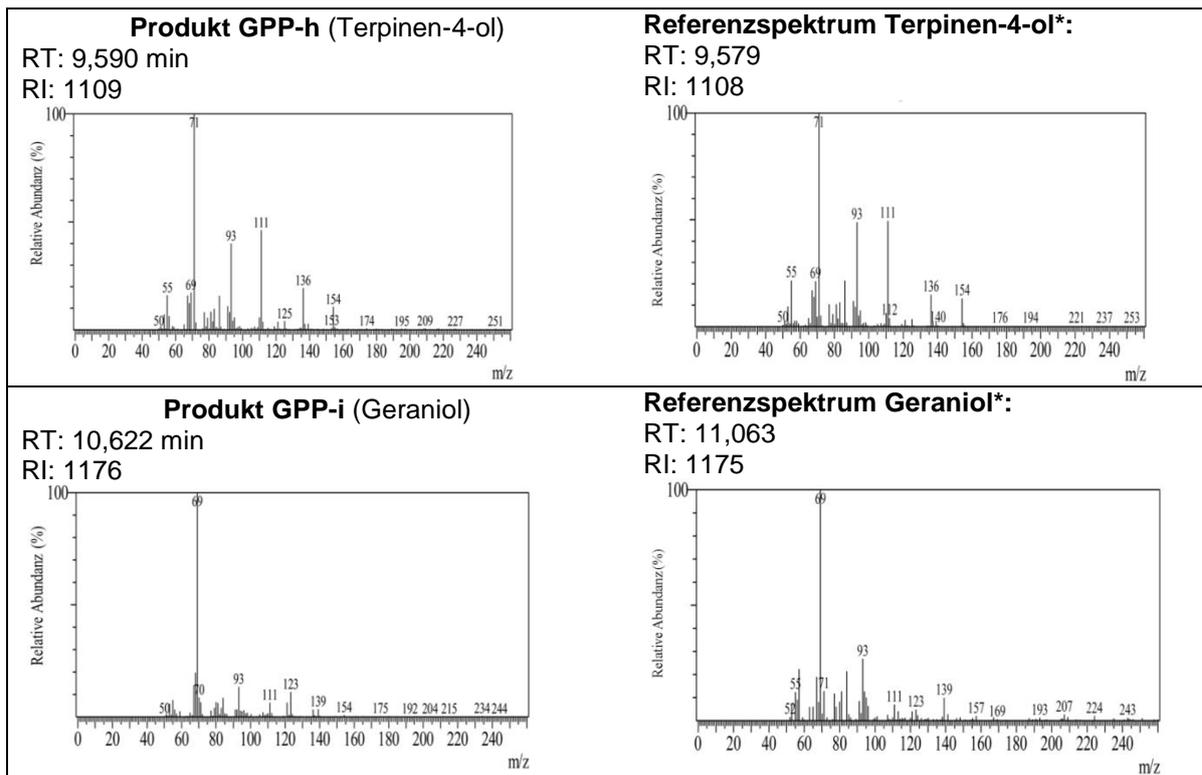
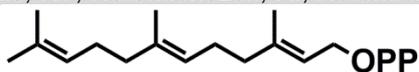
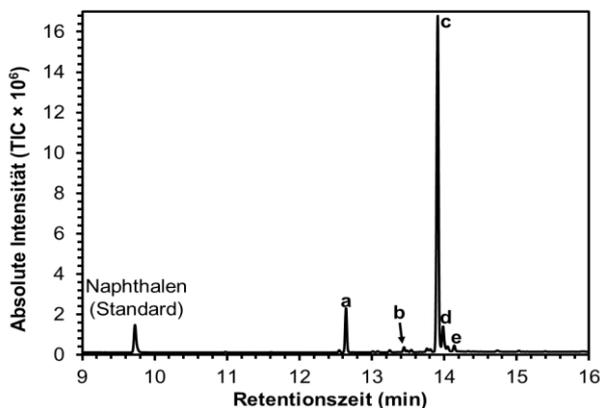
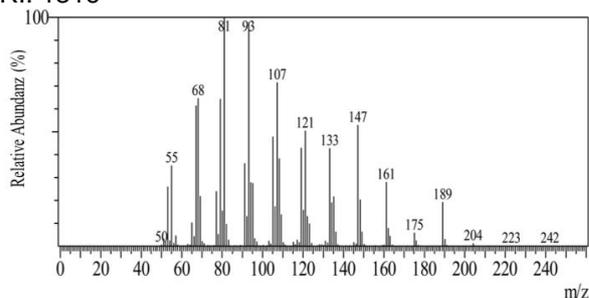
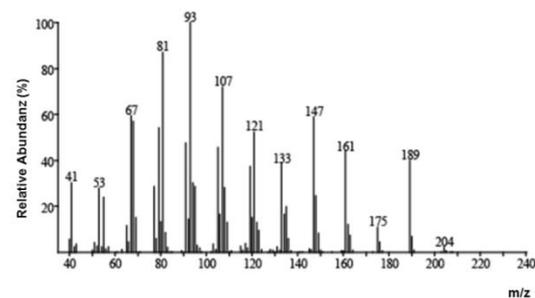


Tabelle A 13: GC/EI-MS-Chromatogramm (TIC) der Produkte einer TEAS-Reaktion mit dazugehörigen EI-Spektren der einzelnen Produkte mit Substrat **FPP**.
m/z, Masse-zu-Ladungsverhältnis; RT, Retentionszeit; RI, Retentionsindex.

Substrat **FPP**Referenzspektrum^[181]**Produkt FPP-a ((+)-Germacren A)**

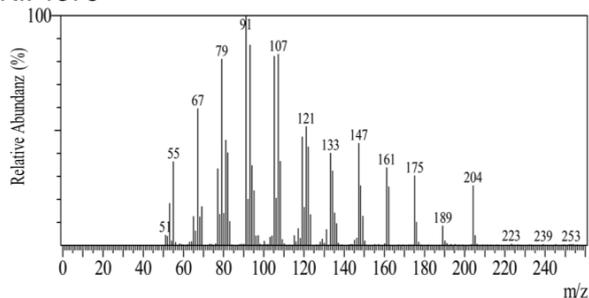
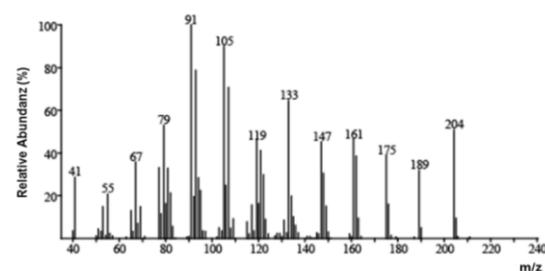
RT: 12,642 min

RI: 1316

Referenzspektrum (+)-Germacren A^[181]:**Produkt FPP-b ((-)-Spirolepechinen)**

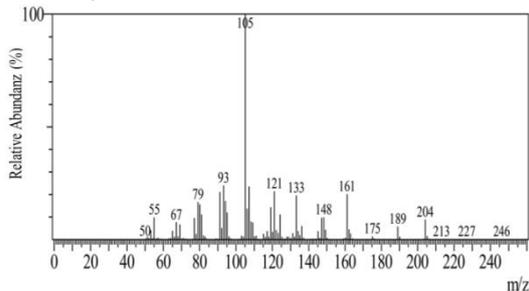
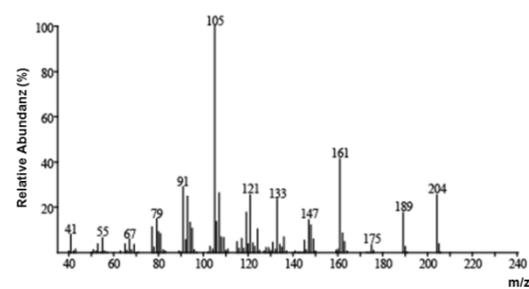
RT: 13,444 min

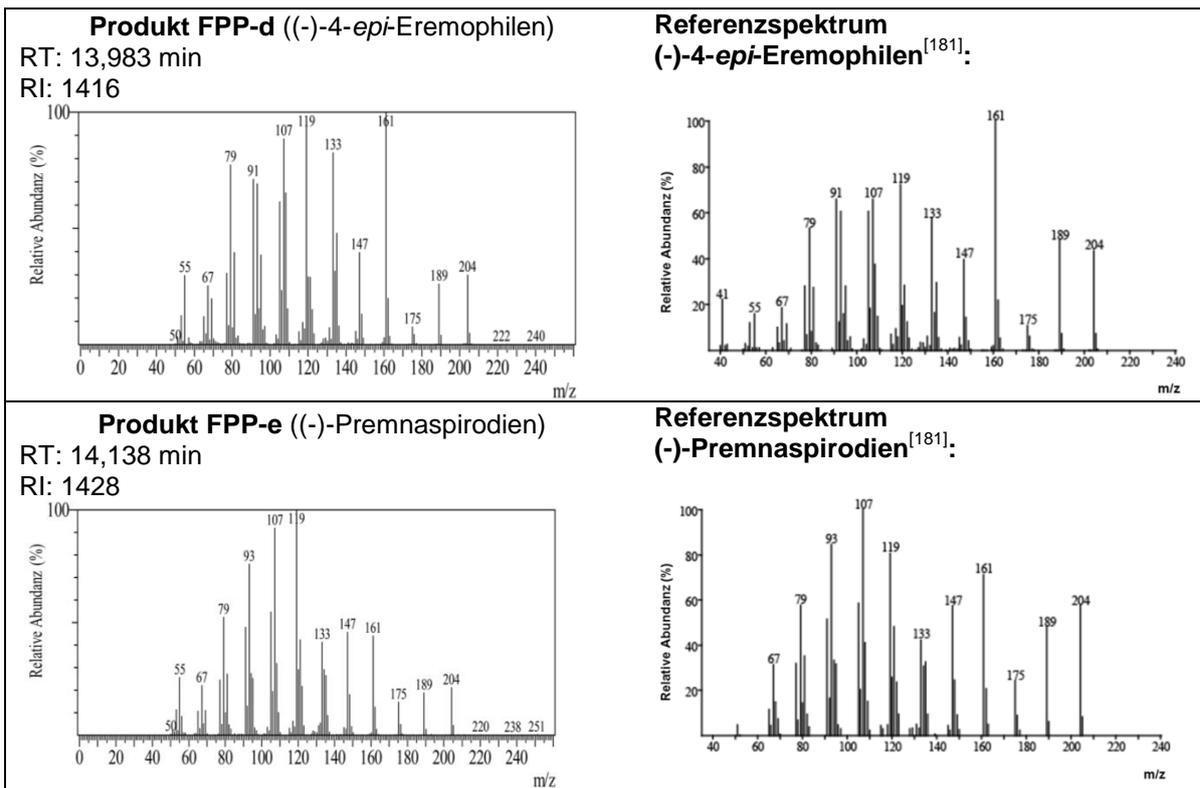
RI: 1375

Referenzspektrum (-)-Spirolepechinen^[181]:**Produkt FPP-c (5-*epi*-Aristolochen)**

RT: 13,909 min

RI: 1410

Referenzspektrum 5-*epi*-Aristolochen^[181]:



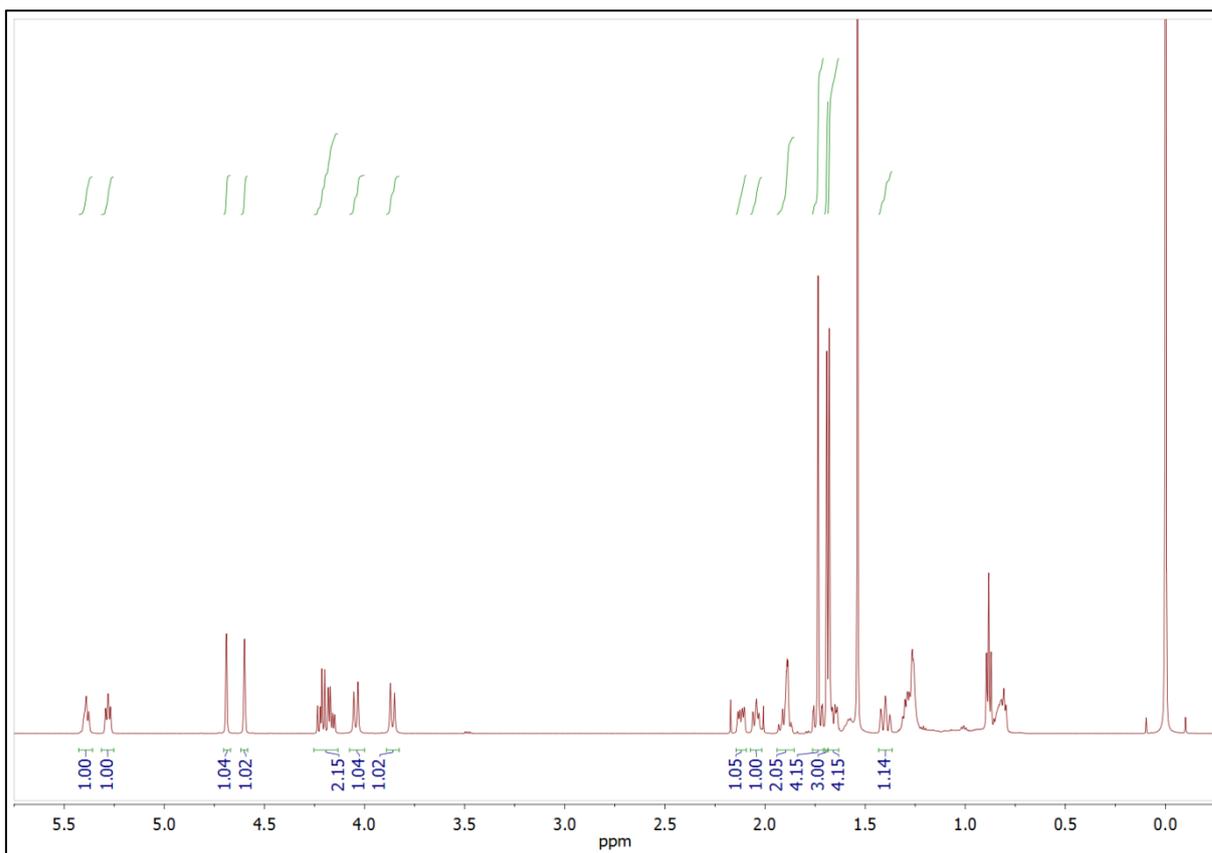


Abbildung A 3: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Produkt **61a** in CDCl_3 .

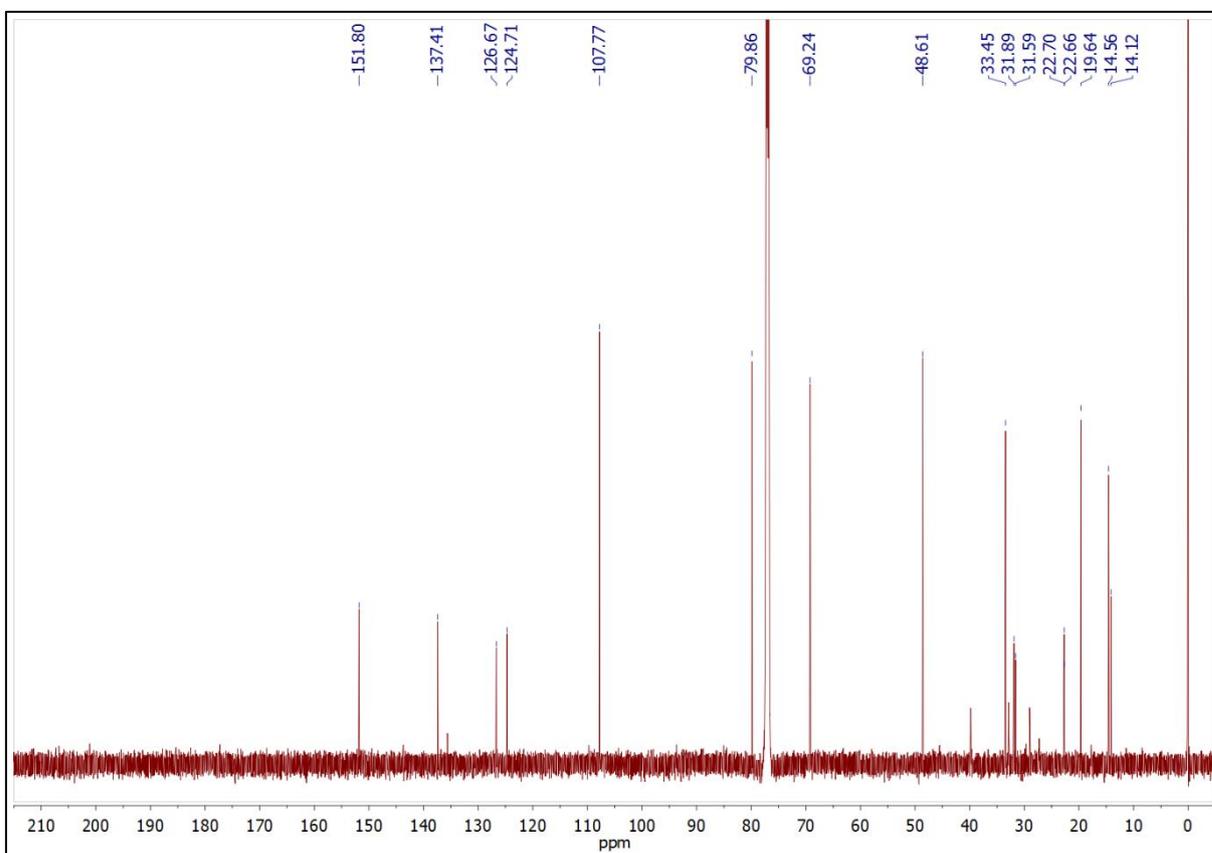


Abbildung A 4: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum von Produkt **61a** in CDCl_3 .

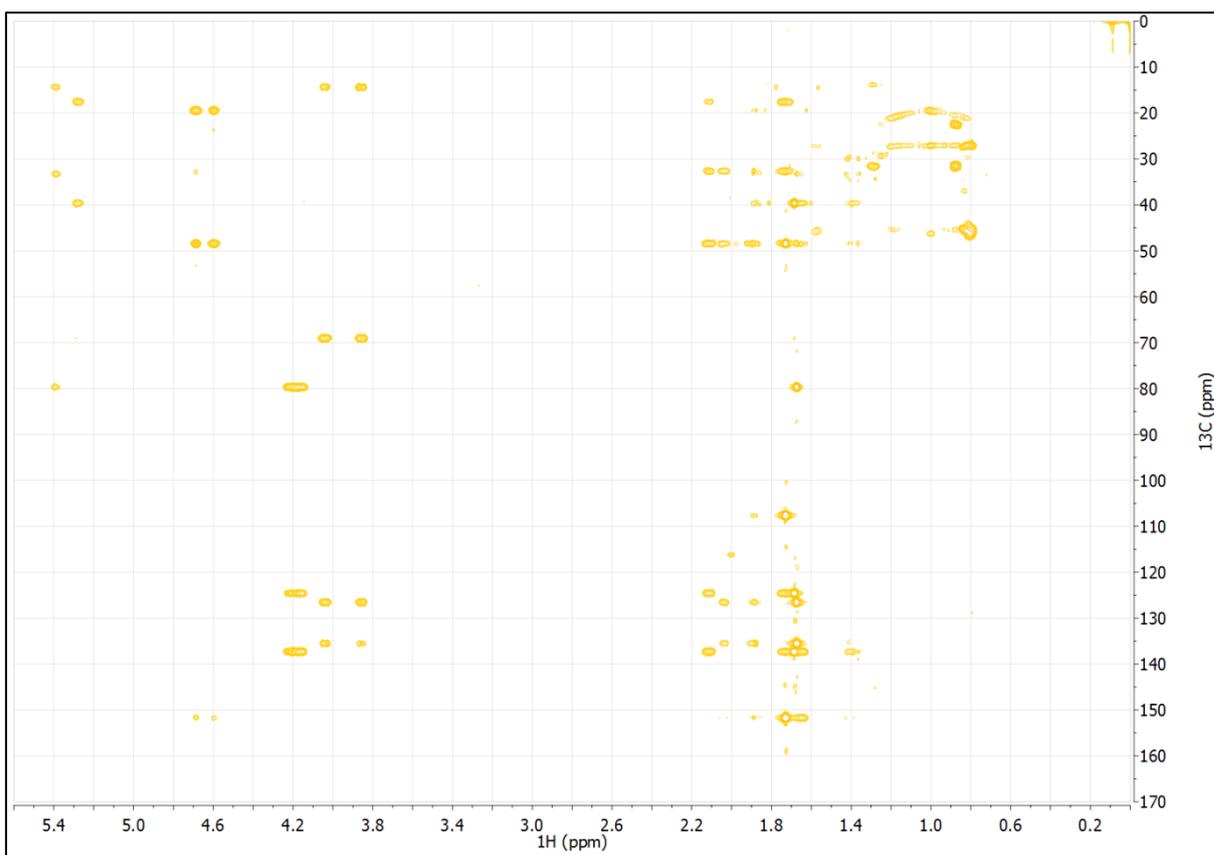


Abbildung A 5: gHMBC-Spektrum von Produkt **61a** in CDCl_3 .

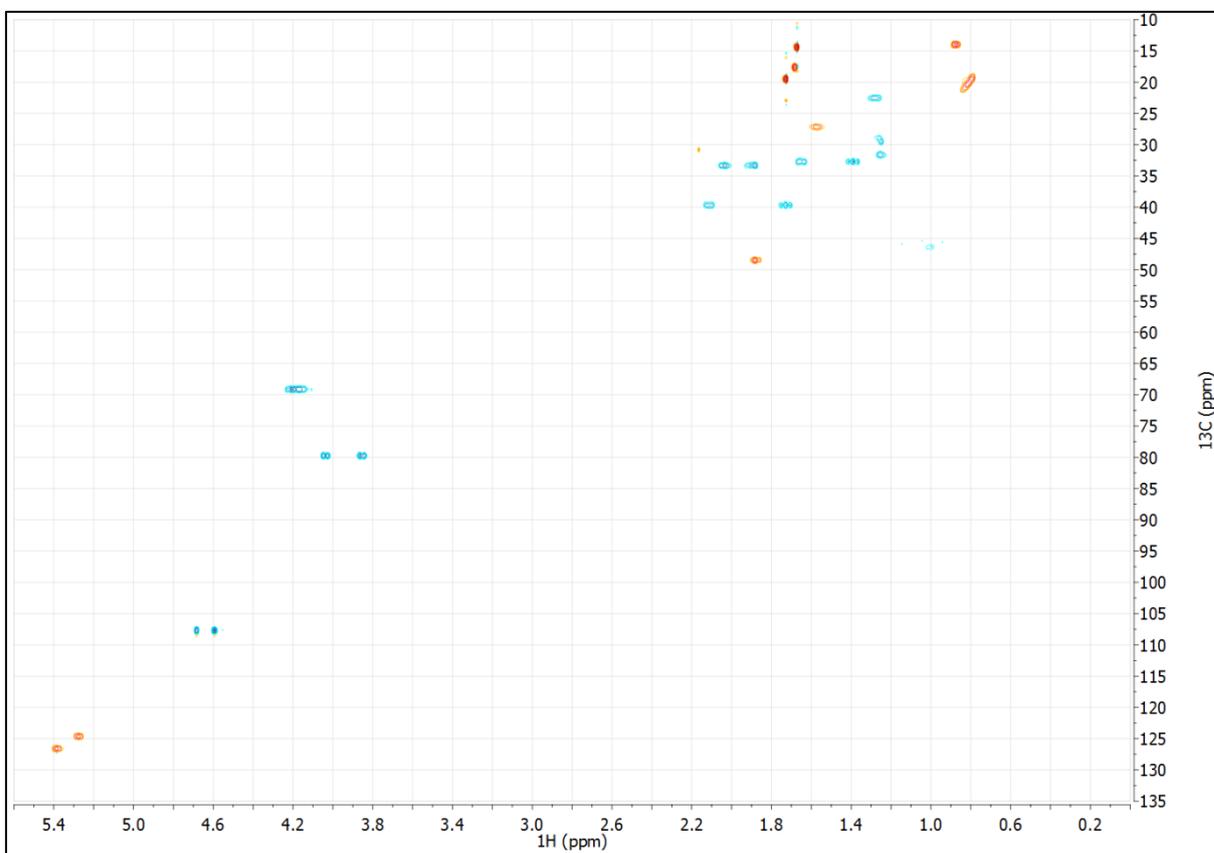


Abbildung A 6: gHSQC-Spektrum von Produkt **61a** in CDCl_3 .

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel habe ich nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht. Außerdem erkläre ich, dass ich mich mit der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit erstmals um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe.

Ort, Datum

Danksagung

Professor Dr. Ludger A. Wessjohann danke ich für die herausforderungsvolle Aufgabe, die Betreuung der Arbeit sowie das Vertrauen welches mir von Ihm stets entgegengebracht wurde.

Ein besonderer Dank gilt den Vertretern des industriellen Kooperationspartners, Dr. Liv Juliane Adler und Dr. Claus Dreisbach, von der Firma Lanxess Deutschland GmbH, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen. Des Weiteren möchte ich mich bei der Firma Lanxess Deutschland GmbH für die Finanzierung bedanken.

Für eine sehr gute Zusammenarbeit möchte ich mich bei Steve Ludwig bedanken, der besonders durch die Synthese der Substrate und ideenreiche Diskussionen einen großen Beitrag zum Gelingen meiner Arbeit geleistet hat.

Für die Aufnahme von LC/ESI-MS-Spektren danke ich Martina Lerbs. Für die Aufnahme von NMR-Spektren möchte ich mich bei Dr. Andrea Porzel und Gudrun Hahn bedanken.

Für die Unterstützung bei GC/MS- und HPLC-Messungen danke ich Christine Kuhnt bzw. Anja Ehrlich.

PD Dr. Wolfgang Brandt und Dr. Silke Pienkny danke ich in aller Form für die Unterstützung bei Computer-Modelling-Experimenten und für die ständige Diskussionsbereitschaft. Für ein ständig offenes Ohr bei Fragestellungen zu ihren Fachgebieten und zu administrativen Anliegen bedanke ich mich bei Dr. Norbert Arnold, Dr. Jürgen Schmidt und Professor Dr. Bernhard Westermann.

Der gesamten Abteilung Natur- und Wirkstoffchemie danke ich für das hervorragende Arbeitsklima in dem es immer Spaß gemacht hat seinen Tag zu verbringen und sowohl wissenschaftlich als auch darüber hinaus zu diskutieren. Mein besonderer Dank geht dabei an die AG Chemoenzymatik.

Julia Kufka, Anne-Katrin Bauer, Julia Mülbradt, Dr. Katharina Michels, Dr. Torsten Geißler, Sebastian Stark, Rainer Preusentanz, Annika Denkert, Dr. Martin Dippe, Benjamin Weigel und Steve Ludwig danke ich für eine großartige Zeit, in der, neben wissenschaftlichen Ideen auch Freundschaften gereift sind.

Ganz besonders danken möchte ich jedoch meinen Eltern und meiner Oma, die mich schon immer in jeder Weise unterstützt und auch meine Doktorarbeit emotional begleitet haben.

Lebenslauf

persönliche Daten

Name	Keim
Vorname	Jeanette
Geburtsdatum	15.09.1984
Geburtsort	Zeitz
Staatsangehörigkeit	deutsch

Hochschulbildung

02/2010 - 12/2013

Promotion

Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie, Halle (Saale)
Abteilung Natur- und Wirkstoffchemie,
Professor Dr. Ludger A. Wessjohann
Thema: „Biokatalytische Umsetzung von natürlichen und
artifiziellen Prenyldiphosphaten“

03/2009-12/2009

Diplomarbeit

Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie, Halle (Saale)
Abteilung Natur- und Wirkstoffchemie,
Professor Dr. Ludger A. Wessjohann
Thema: „Isolierung von Sekundärmetaboliten aus
Höheren Pilzen“

10/2004 - 01/2010

Studium der Biologie

Friedrich-Schiller-Universität Jena
Abschluss: Diplom-Biologin

Schulbildung

09/1995 - 04/2004

Allgemeine Hochschulreife

CJD-Christophorusschule in Droyßig

Veröffentlichungen

- | | |
|-------------|---|
| 2013 | Keim, J., Ludwig, S., Schreckenbach, F., Wessjohann, L., Dreisbach, C. & Früh, T. Europäische Patentanmeldung Nr: 13 184 167.8. (Registrierung am 12.09.2013) |
| 2013 | Wessjohann, L. A., Keim, J., Weigel, B. & Dippe, M. (2013) Alkylating enzymes. <i>Curr. Opin. Chem. Biol.</i> , 17, 317-329. |
| 2010 | Oikarinen, M., Tauriainen, S., Penttilä, P., Keim, J., Rantala, I., Honkanen, T., & Hyöty, H. (2010) Evaluation of immunohistochemistry and <i>in situ</i> hybridization methods for the detection of enteroviruses using infected cell culture samples. <i>J. Clin. Virol.</i> , 47(3), 224-228. |

Ort, Datum